

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR)
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Síntese, caracterização e purificação de bioconjugados peptídicos que
apresentam atividade antitumoral**

Mestranda: Letícia Oliveira Catarin Nunes
Orientador: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Araraquara, SP
2021

Letícia Oliveira Catarin Nunes

**Síntese, caracterização e purificação de bioconjugados peptídicos que
apresentam atividade antitumoral**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Biotecnologia.

Mestranda: Letícia Oliveira Catarin Nunes
Orientador: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Araraquara, SP

2021

N972s Nunes, Letícia Oliveira Catarin.
Síntese, caracterização e purificação de bioconjugados peptídicos
que apresentam atividade antitumoral / Letícia Oliveira Catarin Nunes. –
Araraquara: [S.n.], 2021.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de
Biotecnologia.

Orientador: Norival Alves Santos Filho.

1. Glicoproteína CD44. 2. Melitina. 3. Peptídeos antitumorais. 4.
Peptídeos aptâmeros. I. Santos Filho, Norival Alves, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese, caracterização e purificação de bioconjugados peptídicos que apresentam atividade antitumoral

AUTORA: LETÍCIA OLIVEIRA CATARIN NUNES

ORIENTADOR: NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química UNESP Araraquara

Prof. Dr. GUILHERME RAMOS OLIVEIRA E FREITAS (Participação Virtual)
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Profa. Dra. THAISE GONÇALVES DE ARAÚJO (Participação Virtual)
Instituto de Biotecnologia / Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Araraquara, 16 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 88887.363738/2019-00.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Eliana e João Augusto, que foram a minha base e deram todo o incentivo e estiveram comigo em todas as etapas até chegar ao meu objetivo.

Ao meu orientador, Norival Alves Santos Filho, por ter acreditado no meu trabalho para desenvolver esse projeto e por estar presente, mesmo que à distância, em todos os momentos que se fez necessário.

Ao Laboratório do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, onde pude aprender e aprofundar meus conhecimentos sobre síntese de peptídeos, pelas amizades construídas, as sugestões, dicas e orientações que foram cruciais para compor esse trabalho.

Ao grupo do laboratório de Biologia Celular da Profa. Dra. Valéria Valente, por ter disponibilizado todo o tempo, materiais e equipamentos necessários que contribuíram significativamente para a conclusão desse projeto.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, bem como o Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia pelo suporte em todos os momentos que foram necessários ao longo desse projeto.

RESUMO

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morte, principalmente nos países em desenvolvimento, representando hoje uma crise real para os sistemas de saúde em todo mundo. O tratamento convencional contra as células tumorais, como a quimioterapia e radioterapia, apresentam eficiência parcial, além de produzir uma gama de efeitos colaterais, diminuindo a qualidade de vida do paciente, além de estarem relacionados com a multirresistência por parte das células tumorais. Nesse contexto, estudos buscam o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras para combater a doença. Pequenas moléculas, como peptídeos antitumorais, surgem como moléculas de interesse na terapia contra o câncer. Porém, a baixa especificidade e alta toxicidade sobre células normais, levam à busca por trabalhar com peptídeos antitumorais bioconjugados com peptídeos aptâmeros. Aptâmeros são moléculas relativamente pequenas que apresentam grande seletividade por apresentar interações com marcadores de membrana celular, como a glicoproteína de membrana CD44. Esses marcadores, geralmente são superexpressos em linhagens tumorais, e quando conjugados com peptídeos antitumorais, podem levar a maior eficácia na morte de células tumorais em decorrência a um direcionamento do peptídeo. Neste contexto, o objetivo desse trabalho é sintetizar os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi, bem como avaliar os seus potenciais de ligação em alvos específicos em linhagens celulares, como adenocarcinoma de mama (MCF-7, ATCC HTB-22), adenocarcinoma de pulmão (A549, ATCC CCL-185) e células não tumorais de pulmão (MRC-5, ATCC CCL-171). Para tanto, foi realizada a síntese dos peptídeos em fase sólida e a purificação dos peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi por cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, culturas celulares foram submetidas à microscopia automática através do In Cell Analyzer, após incubação prévia com os peptídeos, apresentando marcações evidentes em diferentes concentrações. Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) para as três linhagens testadas, bem como com a Melitina e Aureína. Com a seleção do aptâmeros LO1903, o qual apresentou marcações evidentes nas linhagens testadas, foi realizada a síntese dos bioconjugados LO2121, LO2122 e LO2123. No ensaio de viabilidade celular foi possível concluir que todos os bioconjugados apresentam maior especificidade quando comparados com a Melitina. Colaborando com os resultados da viabilidade celular, no ensaio de degradação no soro foi possível constatar que os bioconjugados são estáveis em soro e não sofrem degradação por proteases em diferentes concentrações. Contudo, um fator interessante é que apesar da conjugação da Melitina com o aptâmeros, as moléculas não apresentaram modificações em sua estrutura, muito menos na sua atividade, como visto no ensaio de viabilidade.

Palavras-Chave: Glicoproteína CD44. Melitina. Peptídeos antitumorais. Peptídeos aptâmeros.

ABSTRACT

Currently, cancer is one of the leading causes of death, especially in developing countries, representing today a real crisis for health systems worldwide. Conventional treatment against tumor cells, such as chemotherapy and radiotherapy, present partial efficiency, besides producing a range of side effects, reducing the quality of life of the patient, and are related to multidrug resistance by tumor cells. In this context, studies seek to develop innovative therapeutic strategies to combat the disease. Small molecules, such as antitumor peptides, emerge as molecules of interest in cancer therapy. However, the low specificity and high toxicity on normal cells lead to the search for working with antitumor peptides bioconjugated with aptamer peptides. Aptamers are relatively small molecules that show great selectivity by interacting with cell membrane markers, such as the membrane glycoprotein CD44. These markers are usually overexpressed in tumor cell lines, and when conjugated with antitumor peptides, they can lead to a higher efficacy in killing tumor cells due to the targeting of the peptide. In this context, the aim of this work is to synthesize the peptides LO1904, LO1908 and LO1908oxi, as well as to evaluate their binding potentials on specific targets in cell lines, such as breast adenocarcinoma (MCF-7, ATCC HTB-22), lung adenocarcinoma (A549, ATCC CCL-185) and non-tumor lung cells (MRC-5, ATCC CCL-171). To this end, solid-phase peptide synthesis and purification of LO1904, LO1908 and LO1908oxi peptides by high-performance liquid chromatography was performed. In addition, cell cultures were subjected to automated microscopy using In Cell Analyzer after prior incubation with the peptides, showing evident markings at different concentrations. Then, the cell viability assay was performed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) technique for the three tested strains, as well as with Melittin and Aurein. With the selection of the aptamer LO1903, which showed evident markings in the tested strains, the synthesis of the bioconjugates LO2121, LO2122 and LO2123 was performed. In the cell viability assay it was possible to conclude that all bioconjugates present higher specificity when compared to Melittin. Collaborating with the cell viability results, in the serum degradation assay it was possible to find that the bioconjugates are stable in serum and do not undergo degradation by proteases at different concentrations. However, an interesting factor is that despite the conjugation of Melittin with aptamers, the molecules did not present modifications in their structure, much less in their activity, as seen in the viability assay.

Keywords: CD44 glycoprotein. Melittin. Antitumor peptides. Aptamer peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da glicoproteína CD44 obtida através de modelagem molecular pelo site I-Tasser e representada pelo programa Pymol versão 2.3.1.....	18
Figura 2: Expressão mediana de CD44 em células tumorais (vermelho) e células normais (verde). Quanto mais intensa a tonalidade da cor, maior a expressão da proteína.	19
Figura 3: Esquema de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS).	22
Figura 4: Estrutura química da 5(6)-carboxifluoresceína.	22
Figura 5: Posições dos peptídeos e suas respectivas concentrações na placa de 96 poços.	25
Figura 6: Concentrações dos peptídeos para a citometria de fluxo.	26
Figura 7: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1904 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	29
Figura 8: Espectro de massas do peptídeo LO1904 bruto.	30
Figura 9: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1904 FR1 (A) e FR2 (B) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas das frações 1 (C) e 2 (D) do peptídeo.	31
Figura 10: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908 bruto (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	33
Figura 11: Perfil cromatográfico peptídeo LO1908 puro (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas do peptídeo LO1908 puro (B).	34
Figura 12: Representação esquemática do peptídeo LO1908oxi.	35
Figura 13: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908oxi bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	35
Figura 14: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908oxi puro (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas do peptídeo LO1908oxi puro (B).	36
Figura 15: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular A549 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.	38
Figura 16: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MRC-5 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.	39
Figura 17: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.	39

Figura 18: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular A549 em relação a Melitina e Aureína.....	40
Figura 19: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MRC-5 em relação a Melitina e Aureína.....	41
Figura 20: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 em relação a Melitina e Aureína.....	42
Figura 21: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem A549 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32µg/mL(A), LO1908 na concentração de 32µg/mL (B) e LO1908oxi na concentração 16µg/mL (C) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeos testado.....	43
Figura 22: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem MRC5 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32 µg/mL(C), LO1908 na concentração de 32 µg/mL (C) e LO1908oxi na concentração 128 µg/mL (A) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeo testado.....	44
Figura 23: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem MCF7 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32 µg/mL, LO1908 na concentração de 128 µg/mL (C) e LO1908oxi na concentração de 32 µg/mL (A) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeo testado.....	45
Figura 24: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular A549 considerando as marcações dos aptâmeros.....	47
Figura 25: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular MRC-5 considerando as marcações dos aptâmeros.....	48
Figura 26: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular MCF-7 considerando as marcações dos aptâmeros.....	48
Figura 27: Perfil cromatográfico em coluna analítica da Melitina (bruto) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.....	50
Figura 28: Espectro de massas da melitina (bruto).....	51
Figura 29: Perfil cromatográfico em coluna analítica da Melitina pura em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.....	52
Figura 30: Espectro de massas da Melitina pura.....	52

Figura 31: Perfil cromatográfico em coluna analítica do peptídeo LO2121 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	54
Figura 32: Espectro de massas do peptídeo LO2121 bruto.	55
Figura 33: Perfil cromatográfico em coluna analítica do peptídeo LO2121 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	56
Figura 34: Espectro de massas do peptídeo LO2121 puro.	57
Figura 35: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2122 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	58
Figura 36: Perfil cromatográfico peptídeo LO2122 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	58
Figura 37: Espectro de massas do peptídeo LO2122 puro.	59
Figura 38: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2123 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	60
Figura 39: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2123 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.	60
Figura 40: Espectro de massas do peptídeo LO2123 puro.	61
Figura 41: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF7 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.	62
Figura 42: Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.	63
Figura 43: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MRC5 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.	64
Figura 44: Espectros de DC do peptídeo LO1903.	65
Figura 45: Espectros de DC da Melitina.	66
Figura 46: Espectros de DC do peptídeo LO2121.	67
Figura 47: Espectros de DC do peptídeo LO2122.	67
Figura 48: Espectros de DC do peptídeo LO2123.	68
Figura 49: Estabilidade do peptídeo LO1903 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.	69
Figura 50: Estabilidade da Melitina observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.	70

Figura 51: Estabilidade do peptídeo LO2121 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.	71
Figura 52: Estabilidade do peptídeo LO2122 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.	72
Figura 53: Estabilidade do peptídeo LO2123 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolos de síntese dos peptídeos.	23
Tabela 2: Características dos peptídeos.....	24
Tabela 3: Protocolos de clivagem dos bioconjugados.....	54

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Câncer	13
1.2 Peptídeos antitumorais	15
1.3 Peptídeos aptâmeros	17
2. Objetivos	20
3. Material e método	21
3.1 Cultura celular	21
3.2 Síntese de Peptídeos	21
3.3 Oxidação dos peptídeos e formação de pontes dissulfeto	23
3.4 Purificação e caracterização dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)	24
3.5 Espectrometria de Massas	24
3.6 In cell Analyzer	24
3.7 Citometria de fluxo	25
3.8 Avaliação de viabilidade celular	26
3.9 Dicroísmo circular (DC)	27
3.10 Degradação no plasma	27
4. Resultados e discussão	28
4.1 Síntese, clivagem e purificação dos peptídeos aptâmeros	28
4.2 Avaliação da viabilidade celular	37
4.3 Análise de microscopia de fluorescência em In Cell Analyzer	42
4.4 Citometria de fluxo	46
4.5 Síntese e clivagem do peptídeo antitumoral	49
4.6 Síntese, clivagem e purificação dos bioconjugados	53
4.7 Avaliação da viabilidade celular após tratamento com os bioconjugados	61
4.8 Dicroísmo circular	64
4.9 Estabilidade dos peptídeos em soro	68
5. Conclusões	74
Referências	75
APÊNDICE A - Microscopia automática para análise em In Cell Analyzer de placas de cultura das linhagens A549, MRC5 e MCF7	86

1. Introdução

1.1 Câncer

O Câncer é considerado com uma das principais causas de óbitos, sendo responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Estima-se que as mortes causadas por câncer cheguem a 10 milhões por ano, fazendo com que as neoplasias representem uma barreira importante para o aumento da expectativa de vida (BRAY *et al.*, 2018; WHO, 2021).

Dessa maneira, entende-se como câncer um grupo de mais de 100 doenças distintas que apresentam crescimento anormal de células, sem uma regulação eficaz. Células cancerosas apresentam divisão descontrolada e independente de sinais inibitórios, além de possuir fácil replicação e alta capacidade de invasão de tecidos saudáveis por meio de membranas basais e paredes de capilares (VOGELSTEIN, KINZLER, 2004; BROOKS *et al.*, 2010; KREEGER, LAUFFENBURGER, 2010; MARUSYK, POLYAK, 2010; BOOHAKER *et al.*, 2012; WIJAYA, MUCHTARIDI, 2017).

Fatores como o uso de tabaco, que representa aproximadamente 25% das mortes por câncer; alto índice de massa corporal; consequentemente falta de atividade física; alto consumo de bebidas alcoólicas; e baixo consumo de frutas e vegetais representam cerca de um terço das mortes por câncer (WHO, 2021).

Outros fatores, como infecções causadoras de câncer, tais como hepatites e papilomavírus humano (do inglês *Human Papillomavirus*, HPV) são responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de câncer em países que apresentam renda baixa e média baixa (PLUMMER *et al.*, 2016; WHO, 2021).

Segundo estimativas globais, somente em 2018 ocorreram aproximadamente 18 milhões de novos casos, sendo o câncer de pulmão o mais incidente, somando 2,1 milhões dos casos, seguido pelo câncer de mama, também representando 2,1 milhões dos casos. O câncer de cólon e reto representam 1,8 milhão e próstata, 1,3 milhão. Em mulheres, os novos casos chegam a 8,6 milhões, cerca de 48% dos casos, sendo frequente o câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%). Em homens, os casos chegam a 9,5 milhões, cerca de 53% dos casos, onde são frequentes o câncer de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%) (BRAY *et al.*, 2018; OPAS, 2018).

Em 2019, o câncer foi considerado a primeira ou segunda principal causa de morte em pessoas com idade menor que 70 anos em 112 de um total de 183 países, ocupando o terceiro ou quarto lugar em outros 23 países (WHO, 2021).

Os tratamentos atuais para o câncer envolvem intervenções cirúrgicas, terapias gênicas ou hormonais e também quimioterapia e radioterapia (WANG, JIA, 2016; MARGUS, PIROGOVA, PIVA, 2017; YAVARI *et al.*, 2018).

Cerca de 30 a 50% dos pacientes com câncer recebem tratamento com irradiação, tanto sozinho como em tratamento misto com quimioterapia e cirurgias. Logo, 7 milhões de pacientes recebem tratamento por radioterapia no mundo a cada ano. Apesar da melhoria das taxas de cura de tumores malignos, os pacientes podem desenvolver uma ampla gama de morbidades crônicas a longo prazo, decorrentes do tratamento radioterápico (BARTON *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2019).

A quimioterapia, principal terapia aplicada no tratamento de diversos tipos de câncer, utiliza produtos químicos que atacam as células cancerígenas, porém, os efeitos colaterais e possíveis sequelas em longo prazo decorrentes desse tratamento ainda são motivo de preocupação. Dentre os efeitos colaterais da quimioterapia, a náusea e o vômito são os efeitos mais vistos nesse tratamento (NURGALI, JAGOE, ABALO, 2018). Além disso, em aplicação prolongada, pode ocasionar quimiorresistência e possui baixa seletividade, ou seja, acomete células tumorais e compromete células normais (RABBANI-CHADEGANI *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2017; ALJABERY *et al.*, 2018).

A estratégia cirúrgica, apesar de remover tumores sólidos rapidamente, pode ocasionar traumas óbvios, sangramentos, infecções e também baixa imunológica (CAI *et al.*, 2018).

Como alternativa, a imunoterapia surge como tratamento contra o câncer. Isso se faz devido à capacidade de modulação do sistema imune do paciente, facilitando o efeito antitumoral, ou seja, é capaz de criar um ambiente hostil para as células cancerígenas. Essa técnica apresenta menos efeitos colaterais quando comparada com a radioterapia e quimioterapia, porém, considerando o tratamento baseado em transferências projetadas de células T e estratégias imunomoduladoras, efeitos imunomediados secundários podem ser vistos, como alterações de funcionamento endócrino, tireóide e na hipófise (HARRIS *et al.*, 2013; LOHMUELLER, FINN, 2017; LUO *et al.*, 2019; LU, SU, 2019).

Considerando a problemática quanto aos tratamentos atuais contra diversos tipos de câncer, como a baixa especificidade e efeitos colaterais, bem como a capacidade proliferativa das células tumorais, há uma necessidade pela busca por tratamentos alternativos que aumente a especificidade e efetividade no tratamento contra o câncer.

Desse modo, os peptídeos antitumorais, ou anticâncer, descritos como pequenas moléculas que apresentam acentuada penetração nos tecidos, certa seletividade para alvos

tumorais e facilidade de penetração celular, surgem como alternativa aos tratamentos convencionais para diversos tipos de câncer.

1.2 Peptídeos antitumorais

Os peptídeos antitumorais (do inglês *anticancer peptides*, *ACPs*) são moléculas relativamente pequenas, compostas por uma sequência entre 10 e 30 resíduos de aminoácidos, além de apresentar facilidade de síntese e modificações, potencial para penetração celular e alta toxicidade (SCHWEIZER, 2009; VLIEGHE *et al.*, 2010; THUNDIMADATHIL, 2012; TYAGI *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2009; QIAO, WANG, YU, 2019).

Possui natureza catiônica decorrente da presença de resíduos de arginina e lisina e, em alguns casos, presença de histidina em sua sequência, além de apresentar cerca de 50% de aminoácidos hidrofóbicos (ZASLOFF, 2002; HANCOCK, SAHL, 2006; CICERO, FOGACCI, COLLETTI, 2017; QI *et al.*, 2018). Apresentam baixa imunogenicidade, compatibilidade em sistemas biológicos contribui para o seu potencial uso em tratamentos contra o câncer (HU *et al.*, 2016).

A principal diferença entre as células normais e as células tumorais é a constituição da membrana, de modo que as células tumorais possuem uma membrana mais negativamente carregada, o que contribui para a interação eletrostática dos ACPs com essas células, ocasionando uma reorganização da camada fosfolipídica e formação de poros, contribuindo para a citotoxicidade e, conseqüentemente, lise celular (TOKE, 2005; SCHWEIZER, 2009; UTSUGI *et al.*, 1991; HARRIS *et al.*, 2013) A atuação dos peptídeos antitumorais envolvem diferentes alvos moleculares, como membrana celular (necrose), através de formação de poros ou lise total, membrana mitocondrial (apoptose), ou atividade não membranar. (TOKE, 2005; HARRIS *et al.*, 2013).

Características como baixa imunogenicidade, compatibilidade em sistemas biológicos e possibilidade de modificação, conectando moléculas bioativas, contribuem para o seu potencial uso em tratamentos contra o câncer (HU *et al.*, 2016).

Há cerca de 230 peptídeos anticâncer derivados de peptídeos antimicrobianos (PAMs), apresentando característica endógena e produção em diferentes organismos multicelulares para proteção contra agentes patogênicos, tais como bactérias, fungos e vírus (WANG, LI, WANG, 2016; XU, LAI, 2015; KANG *et al.*, 2012). É possível encontrar no banco de dados de Ensaios Clínicos do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, utilizando caracteres referentes aos peptídeos anticâncer, cerca de 1002 ensaios clínicos baseados em peptídeos, objetivando a ação em diferentes tipos de câncer (PAN, XU, JIA, 2020).

Alguns peptídeos já vêm sendo estudados para a terapia anticâncer, como o HPRP-A1-TAT, peptídeo híbrido que possui um mecanismo de ação capaz de destruir a membrana celular e ocasionar o esvaziamento rápido do conteúdo citoplasmático, apresentando atividade contra melanomas, câncer gástrico, câncer de fígado e câncer cervical (HAO *et al.*, 2015). O peptídeo Temporin-LA, derivado da pele de rã-touro, atua no interior das células, ocasionando lise da membrana celular em câncer hepático, além de não apresentar toxicidade óbvia em células normais do fígado (DIAO *et al.*, 2012). Já a vasopressina, peptídeo conjugado com ^{99m}Tc, apresenta possibilidade de combinação para gerar imagens de células de câncer de pulmão considerando sua alta estabilidade (GNIAZDOWSKA *et al.*, 2014).

Outro peptídeo já reconhecidamente com atividade anticâncer é a aureína 1.2. Esse peptídeo, com ação antimicrobiana, é secretado da pele de rãs australianas do gênero *Litoria* *genus*, e possui 13 resíduos de aminoácidos em sua sequência (ROZEK *et al.*, 2000). Aureína 1.2 apresenta atividade antitumoral em linhagens de melanoma, leucêmicas, câncer de pulmão, cólon, próstata e câncer de mama (ROZEK *et al.*, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2012; DTP, 2021).

Além dos peptídeos citados, a Melitina, componente do veneno da abelha europeia *Apis mellifera*, surge como um ACP bem descrito na literatura (KLOCEK, SEELING, 2008; HEINEN, VEIGA, 2011; RADY *et al.*, 2017). É um peptídeo anfipático catiônico solúvel em água, composto por 26 resíduos de aminoácidos (sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ) e classificado como α -helicoidal, ou seja, apresenta cadeia peptídica relativamente curta e de estrutura simples (DONG, TIAN, WANG, 2007; KLOCEK, SEELING, 2008; SOMAN *et al.*, 2009; HEINEN, VEIGA, 2011; RADY *et al.*, 2017).

Estudos apresentam que a Melitina possui um amplo espectro como agente antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e também como antitumoral, devido a sua baixa seletividade em relação a sua característica citolítica (SHI *et al.*, 2016; WANG, JIA, 2016; LIU *et al.*, 2016; RADY *et al.*, 2017).

Os mecanismos de ação da Melitina envolvem morte celular, como apoptose, inibição da proliferação, controle do ciclo celular e inibição da motilidade, além da migração, invasão e metástase das células tumorais (JO *et al.*, 2012; ZARRINNAHAD *et al.*, 2018).

Os efeitos antitumorais da Melitina podem ser visto em linhagens de melanoma (TU *et al.*, 2008), câncer de pulmão (GAO *et al.*, 2018), glioblastoma (SISA *et al.*, 2017), leucemia (ORSOLIC, 2012; ZHANG *et al.*, 2017), ovário (JO *et al.*, 2012), cervical (ZARRINNAHAD *et al.*, 2018), pancreático e também em câncer de mama (WANG *et al.*, 2018).

Apesar de sua ação antitumoral, a Melitina apresenta atividade celular inespecífica, ou seja, atua tanto em células tumorais como em células normais, além de apresentar meia vida curta no sangue e potencial para causar reação tóxica grave por via intravenosa, devido a sua alta atividade hemolítica (RADY *et al.*, 2017).

Considerando a alta toxicidade da Melitina tanto em células tumorais como em células normais, a sua ação direta no tratamento contra o câncer, a utilização dessa molécula diretamente no tratamento contra o câncer é limitada, de modo que a utilização de conjugados de Melitina surge como uma alternativa para o direcionamento e, conseqüentemente, seletividade e aumento da ação tumoral (BEI *et al.*, 2014; QIAN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; RADY *et al.*, 2017).

1.3 Peptídeos aptâmeros

Moléculas denominadas “peptídeos aptâmeros”, termo derivado da analogia com DNA e RNA aptâmeros, detém características que os tornam excelentes agentes com capacidades semelhantes ao dos anticorpos (THIBAUT *et al.*, 2012; NIMJEE *et al.*, 2017). Essas moléculas são constituídas por cadeias de aminoácidos relativamente curtas compostas por cerca de 20 a 30 resíduos de aminoácidos, o que garante uma estrutura menor do que dos anticorpos. Além disso, possuem alta estabilidade e solubilidade, bem como propriedades de reconhecimento para proteínas alvos (LI *et al.*, 2011; MASCINI, PALCHETTI, TOMBELLI, 2012), e capacidade de ligação com células e tecidos (WU *et al.*, 2015). A baixa imunogenicidade, alta especificidade e capacidade de reconhecimento direcionam os peptídeos aptâmeros como candidatos a drogas promissoras (KEEFE, PAI, ELLINGTON, 2010; ZHANG, HONG, CAI, 2011; LI, ZHAO, QIU, 2013; SUNDARAM *et al.*, 2013).

Quanto à citotoxicidade, os peptídeos aptâmeros podem ser considerados não tóxicos (ESG, 2003; CHAN *et al.*, 2008) e considerando a sua estrutura simples e pequena, a sua obtenção pode ser realizada através de técnicas como a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), o que garante uma produção em larga escala e de forma eficiente, com diminuição nos custos na produção para diversos alvos moleculares (SONG, LEE, BAN, 2012; SUN *et al.*, 2014).

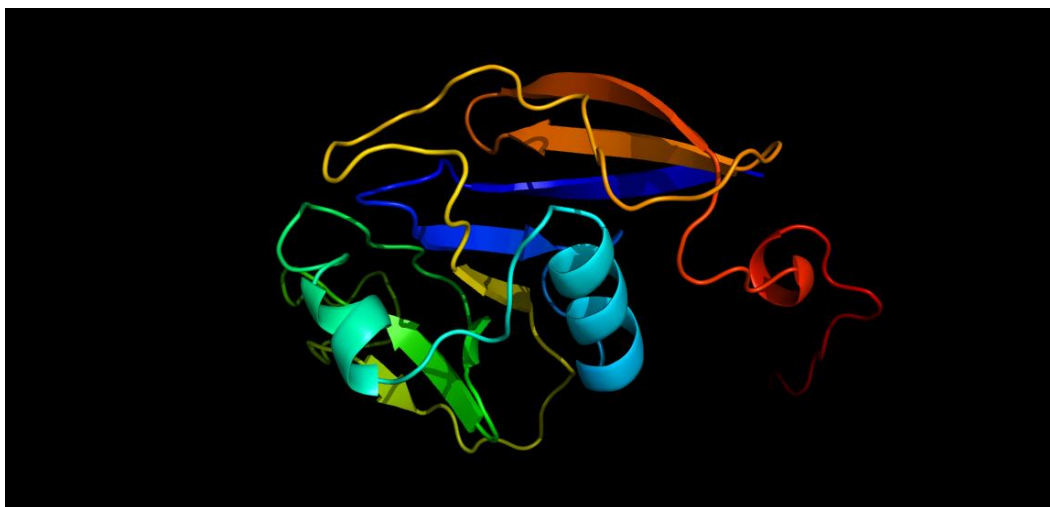
Em decorrências dos efeitos colaterais e citotoxicidade para células normais dos tratamentos convencionais para o câncer, os aptâmeros podem ser empregados como carreadores para outras moléculas, apresentando um direcionamento mais específico para as células tumorais, e, conseqüentemente, minimizando a toxicidade para as células normais e aumentando a eficácia da ação anticâncer (RADOM *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014).

A potencial utilização de aptâmeros na ação terapêutica de agentes antitumorais em diferentes linhagens tumorais é comprovada por meio de dados científicos que apresentam sua ação em câncer de cabeça e pescoço (GUO *et al.*, 2011); câncer de mama (ARAVIND *et al.*, 2012; ALIBOLANDI *et al.*, 2015); câncer de pâncreas (SUN *et al.*, 2014); câncer colorretal (LI *et al.*, 2014), leucemia linfoblástica (HUANG *et al.*, 2009; ARAVIND *et al.*, 2012), câncer hepático (ALIBOLANDI *et al.*, 2015) e câncer de próstata (MIN *et al.*, 2011).

Por apresentarem alta estabilidade bem como sua alta capacidade de afinidade e seletividade por receptores extracelulares e biomarcadores específicos de superfície celular, os aptâmeros são estudados para o diagnóstico de diversos tumores, como detecção de células tumorais circulantes, análise imuno-histoquímica e imagens *in vivo* (RADOM *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2020).

Diversos receptores de superfície são superexpressos em células tumorais, como o CD133, CD44, CD49 e ITGA6, porém, o CD44 (Figura 1) é o marcador molecular mais expresso. Essa molécula é caracterizada como uma glicoproteína de adesão transmembrana envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo o ácido hialurônico (HA), a fibronectina e a laminina, bem como seus ligantes naturais. Suas funções envolvem a adesão celular (agregação e migração), degradação do ácido hialurônico, ativação linfocitária, angiogênese e liberação de citocinas em decorrência de sua estrutura e distribuição nos tecidos (GEE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2015).

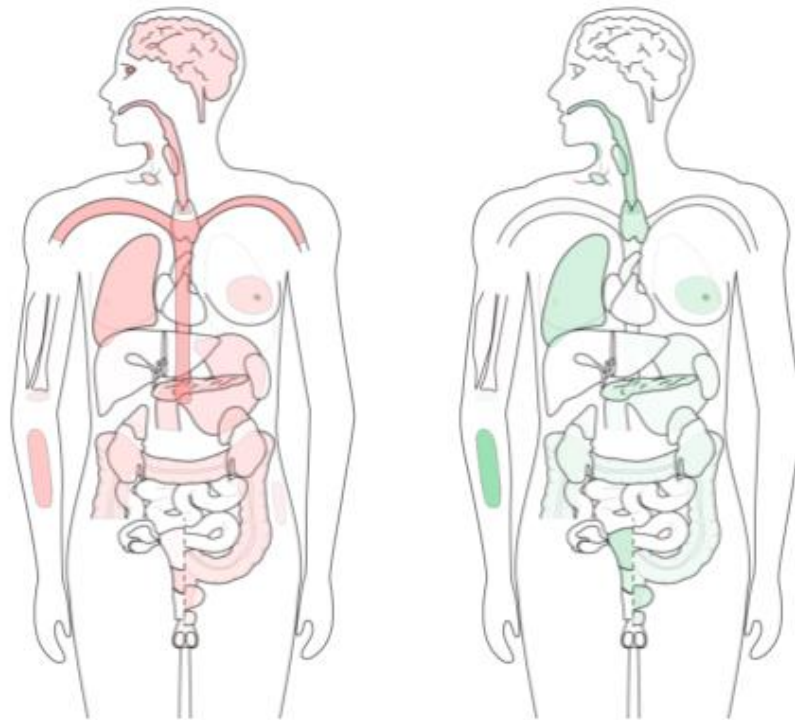
Figura 1: Estrutura tridimensional da glicoproteína CD44 obtida através de modelagem molecular pelo site I-Tasser e representada pelo programa Pymol versão 2.3.1.



Fonte: Própria autora.

CD44 é expressa em diversas linhas celulares (Figura 2), como leucócitos e fibroblastos, contribuindo para a sua participação na migração e ativação celular e hematopoiese (GEE *et al.*, 2004). Além disso, é encontrada em diversos tipos de tumores, como cólon, fígado, próstata e mama (ZOLLER, 2011), principalmente por promover a sobrevivência e agressividade das células tumorais e induzir a tumorigênese e metástase, ou seja, as linhagens que apresentam superexpressão de CD44 são capazes de formar tumores mais agressivos (GOODISON *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2006). A glicoproteína CD44, além de ser um marcador tumoral, é também um alvo terapêutico promissor, principalmente no câncer de mama (TIJINK *et al.*, 2006; SAUTER *et al.*, 2007; MARANGONI *et al.*, 2009).

Figura 2: Expressão mediana de CD44 em células tumorais (vermelho) e células normais (verde). Quanto mais intensa a tonalidade da cor, maior a expressão da proteína.



Fonte: Gepia 2 (gepia2.cancer-pku.cn/)

Considerando a busca por terapias alternativas para o tratamento de câncer, os aptâmeros aparecem como uma estratégia inovadora para a localização de alvos moleculares específicos em células tumorais, bem como o controle da progressão e até mesmo lise completa da célula tumoral. A estratégia baseia-se na utilização das proteínas de membrana expressas em células tumorais como marcadores, e a capacidade dos ligantes específicos a esses marcadores levarem as moléculas anticâncer diretamente ao tumor, ocasionando o aumento da sua especificidade e diminuição da toxicidade em células normais.

2. Objetivos

- Sintetizar e purificar os peptídeos aptâmeros LO1904, LO1908 e LO1908 oxidado;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens A549, MRC05 e MCF7 tratadas com os peptídeos antitumorais e peptídeos aptâmeros;
- Analisar as marcações dos peptídeos aptâmeros em membrana celular das linhagens testadas;
- Sintetizar e purificar o peptídeo antitumoral Melitina e analisar suas atividades em linhagens tumorais;
- Sintetizar e purificar conjugados de peptídeo antitumoral com aptâmeros;
- Avaliar o potencial antitumoral dos bioconjugados e seus potenciais tóxicos contra células normais;
- Avaliar a estabilidade no plasma sanguíneo dos peptídeos e conjugados;
- Estudar o conteúdo de estrutura secundária dos peptídeos e conjugados por espectroscopia de dicroísmo circular.

3. Material e método

3.1 Cultura celular

A cultura celular foi realizada com linhagens de câncer de mama (adenocarcinoma de mama, MCF-7 ATCC HTB-22), câncer de pulmão (adenocarcinoma de pulmão, A549 ATCC CCL-185) e células não tumorais de pulmão (MRC-5 ATCC CCL-171). As células foram cultivadas em frascos apropriados (garrafas para cultura celular), em meio de cultura DMEN High Glicose, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Life Technologies - 12657029); antibiótico e antimicótico (Sigma Aldrich – A5955). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Síntese de Peptídeos

A principal ferramenta utilizada hoje na obtenção de peptídeos é a síntese de peptídeos em fase sólida (MERRIFIELD, 1963). Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir de sua região C-terminal que se encontra ligada covalentemente a uma resina (Figura 3).

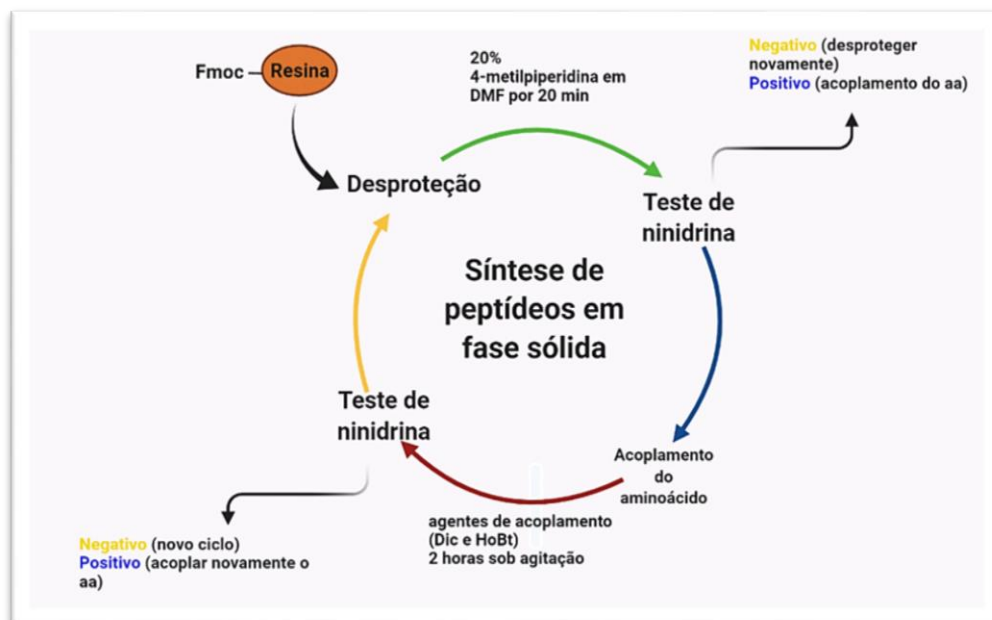
Na Síntese de Peptídeo em Fase Sólida foi utilizado o protocolo da química Fluorenilmetiloxicarboxil (Fmoc). Neste, a proteção do grupo alfa-amino é feita pelo Fmoc e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos terc-butil, tritil e terc-butiloxicarbonil, entre outros. Para a síntese do peptídeo LO1903 utilizou-se a resina Fmoc-Arg(Pbf)-Wang com grau de substituição de 0,31mmol/g e para o peptídeo LO1907 a resina Fmoc-Gly-Wang com grau de substituição de 0,467mmol/g.

O Fmoc é base lábil, ou seja, a sua retirada do grupo amino (desproteção) ligado à resina foi realizada em um meio básico - solução de 20% 4-metilpiperidina/dimetilformamida (DMF) por 5 e 20 minutos. A confirmação da desproteção do grupamento amino ocorreu através do teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970). Este reagente, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (maioria dos aminoácidos) ou amarelo/amarronzado (prolina), permitindo saber se o acoplamento foi realmente efetuado com 100% de eficiência.

A etapa de acoplamento foi realizada pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc aminoácido a ser inserido com N,N-diisopropilcarbodiimida (Dic)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Todas as sínteses realizadas foram na escala de 0,4mM e os aminoácidos foram acoplados em 2x de excesso, e deixados duas horas em agitação. O teste de ninidrina foi novamente utilizado, mas, nesse caso, para avaliar o acoplamento dos aminoácidos em todas

as sínteses. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

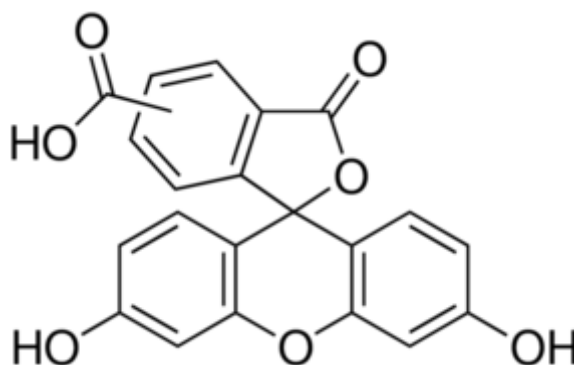
Figura 3: Esquema de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS).



Fonte: Própria autora.

Ao final do acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos que compõem os peptídeos LO1903 e LO1907, os mesmos foram pesados e fracionados, sendo utilizada uma fração de cada peptidil-resina (0,1mM) para realizar o acoplamento de um marcador fluorescente (5(6)-carboxifluoresceína (5(6)-FAM)) (Figura 4), realizando novamente as etapas de acoplamento, como previamente descrito, obtendo-se assim os peptídeos LO1904 e LO1908.

Figura 4: Estrutura química da 5(6)-carboxifluoresceína.



Fonte: Sigma Aldrich

Em seguida, realizou-se a remoção dos grupamentos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos e clivagem da resina. Para isso, foram utilizados protocolos de clivagem específicos para cada peptídeo, sendo 95% de TFA, 2,5% de água ultra pura e 2,5% de TIS para o peptídeo LO1904 e 94% de TFA, 2,5% de água ultra pura, 2,5% de EDT e 1% de TIS para o peptídeo LO1908 (tabela 1). Após a clivagem, os peptídeos brutos foram precipitados com éter etílico anidro gelado e separados a partir de material não peptídico solúvel por centrifugação. Em seguida, o conteúdo peptídico foi extraído com 0,045% (v/v) de TFA em H₂O (solvente A) e 0,036% (v/v) de TFA em acetonitrila (solvente B) na proporção 50:50%, sendo liofilizado para posterior purificação e caracterização em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e confirmação da massa molecular por espectrometria de massas.

Tabela 1: Protocolos de síntese dos peptídeos.

Peptídeos	Sequências	Resinas	Métodos de clivagem
LO1903	FNLPLPSRPLL	Fmoc-Arg(PBF)-Wang	-
LO1904	5(6)-FAM-FNLPLPSRPLL	Fmoc-Arg(PBF)-Wang	95% TFA 2,5% H ₂ O ultra pura 2,5% TIS
LO1907	NPGTCKDKWIECLLNG	Fmoc-Gly-Wang	-
LO1908	5(6)-FAM-NPGTCKDKWIECLLNG	Fmoc-Gly-Wang	94% TFA 2,5% H ₂ O ultra pura 2,5% EDTO 1% TIS

3.3 Oxidação dos peptídeos e formação de pontes dissulfeto

A oxidação intracadeia dos resíduos de cisteína do peptídeo LO1908 (5(6)-FAM-NPGTCKDKWIECLLNG) foram realizadas pelo método da oxidação por ar (*Novabiochem Peptide Synthesis catalog*, 2013). O peptídeo foi diluído em uma solução tampão contendo bicarbonato de amônio 0,1 mol/L para que a concentração não ultrapasse 100 mg/L. A mistura seguiu para agitação, em agitador magnético, por 24 horas, deixada aberta para aeração. Após as 24 horas, as amostras resultantes passaram por liofilização para posterior purificação. A oxidação do peptídeo foi acompanhada por espectrometria de massas. Após a oxidação, os peptídeos foram renomeados como LO1908oxi.

3.4 Purificação e caracterização dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

As purificações dos peptídeos sintetizados foram realizadas em modo semipreparativo utilizando um CLAE *System Gold Beckman*, em coluna de fase reversa C18 (*Phenomenex* 2,1 x 25 cm). O método de purificação para os peptídeos foi 20-60% de solvente B em 120min. O grau de pureza das frações foi determinado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (*Kromassil*) em 5-95% de solvente B em 30min. Os solventes utilizados para a purificação e verificação do teor de pureza dos peptídeos foram 0,045 % de TFA em água deionizada (Solvente A) e 0,036 % de TFA em acetonitrila (Solvente B) (tabela 2).

Tabela 2: Características dos peptídeos.

Nome do peptídeo	Tempo de retenção (min)	Massa molar (g/Mol)	Método de purificação
LO1904	13,5	1781,03	20-60% em 120min
LO1908	15,6	2149,38	20-60% em 120min
LO1908oxi	16	2147,38	20-60% em 120min

3.5 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas dos peptídeos foram obtidos por meio de um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. Realizou-se a infusão direta das soluções de amostra a uma concentração de aproximadamente 10 ppm em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5.0 uL/min e a fonte de electrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de electrospray.

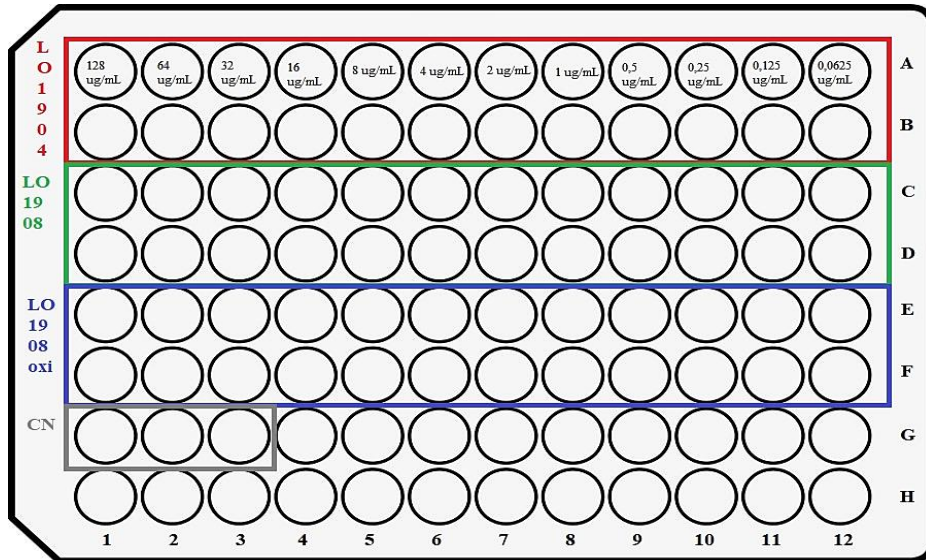
3.6 In cell Analyzer

As linhagens A549, MCF-7 e MRC-5 previamente descongeladas e cultivadas em garrafas para cultura celular em meio DMEN High Glicose suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e antibiótico e antimicótico (ATB/ATM) foram mantidas em estufa por 2 dias para o crescimento celular. Em sequência, foi realizado o plaqueamento das linhagens em placas de 96 poços em meio DMEN High Glicose contendo 1×10^6 células, sendo novamente deixadas em estufa de CO₂ 5% por 24 horas para que as células pudessem aderir à placa.

Os peptídeos utilizados para a marcação em alvos celulares foram o LO1904, LO1908 e LO1908oxi e a própria 5(6)-carboxifluoresceína para avaliar se a mesma, sem estar acoplada aos peptídeos, apresenta marcação nos alvos celulares. Soluções estoque dos

peptídeos foram preparadas em uma concentração de 0,5 mg/mL em água ultrapura para posterior utilização. As concentrações trabalhadas foram: 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL para caracterizar uma diluição seriada (Figura 5).

Figura 5: Posições dos peptídeos e suas respectivas concentrações na placa de 96 poços.



Fonte: Própria autora.

As placas contendo as células de cada linhagem celular cultivada foram tratadas com as diluições da solução estoque dos peptídeos LO1904, LO1908, LO1908oxi e a 5(6)-carboxifluoresceína, sendo levadas à estufa por 30min para que os peptídeos pudessem se ligar às proteínas de membrana. Em seguida, as placas foram centrifugadas e lavadas com PBS apenas uma vez para garantir a aderência das células no fundo dos poços. O núcleo das células foi marcado com Hoechst em concentração de 50µL por poço por cerca de 5 minutos. Após o tempo de espera para a marcação do núcleo, as placas foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS, estando prontas para análise no equipamento In Cell Analyzer.

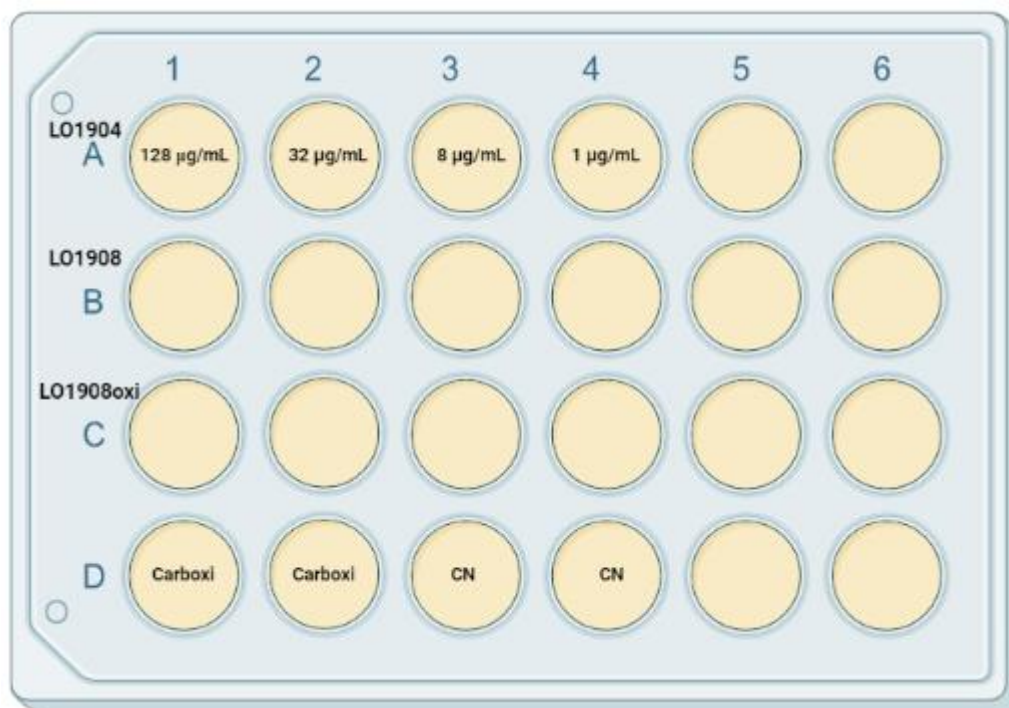
3.7 Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo, as linhagens A549, MRC-5 e MCF-7 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo meio DMEN High Glicose com $5,6 \times 10^6$ de células por placa, sendo novamente deixadas em estufa de CO₂ por 24 horas para que as células possam aderir à placa.

Os peptídeos utilizados para a marcação em alvos celulares foram o LO1904, LO1908 e LO1908oxi, além da 5(6)-carboxifluoresceína como controle. Soluções estoque desses

peptídeos foram preparadas em uma concentração 0,5 mg/mL para posterior utilização. As concentrações trabalhadas foram: 128 µg/mL, 32 µg/mL, 8 µg/mL e 1 µg/mL (Figura 6).

Figura 6: Concentrações dos peptídeos para a citometria de fluxo.



Fonte: Própria autora

As placas contendo as células de cada linhagem celular cultivada foram tratadas com as diluições da solução estoque dos peptídeos LO1904, LO1908, LO1908oxi e a 5(6)-carboxifluoresceína, sendo levadas à estufa por 30min para que os peptídeos pudessem se ligar às proteínas de membrana. Em seguida, para que as células aderidas à placa fossem soltas e transferidas para tubos *ependorfs* utilizou-se tripsina, e para a inativação da mesma utilizou-se meio de cultura. Os *ependorfs* foram centrifugados e os pellets formados foram ressuspensos em paraformaldeído 4% em PBS por 30min em geladeira para que as células fossem fixadas. Os *ependorfs* foram centrifugados novamente para retirada do paraformaldeído e ressuspensos em PBS gelado para ser analisado no citômetro. O citômetro utilizado foi o BD FACSCanto II, que apresenta detecção simultânea de até 10 parâmetros de partículas com até 50µm, com taxa máxima de aquisição de 10.000 eventos por segundo.

3.8 Avaliação de viabilidade celular

Através da técnica de MTT é possível quantificar a atividade mitocondrial e consequentemente, avaliar a viabilidade celular, através da formação de cristais de formazan

sendo de coloração azul ou roxa. Dessa maneira, a coloração surge como quantificador da viabilidade das células.

Para a avaliação da viabilidade celular, as linhagens MCF-7, MRC-5 e A549 foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio DMEN High Glicose e 1×10^6 de células, sendo deixadas em estufa de CO₂ por 24 horas para que as células possam aderir à placa.

As placas contendo as linhagens foram tratadas com os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi, bem como a Melitina e Aureína 1.2 e os bioconjugados LO2121, LO2122 e LO2123, nas concentrações 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL, 1µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL, 0,0625µg/mL. Além disso, foi utilizado DMSO 5% em meio como controle e poços sem célula como o branco.

Ao completar 21 horas de estufa, as placas foram tratadas com solução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) em meio por 3 horas. Após as 24 horas completas, o meio com peptídeo contendo a solução de MTT foi retirado e as células são solubilizadas em isopropanol acidificado. A leitura da intensidade da cor da solução foi realizada em leitor de placas com filtro de 570nm. Após a leitura, foi realizada a análise estatística dos dados obtidos para a plotagem dos gráficos referentes a viabilidade celular e citotoxicidade das linhagens testadas.

3.9 Dicroísmo circular (DC)

Utilizou-se a espectroscopia de dicroísmo circular no intuito de elucidar a estrutura secundária dos peptídeos. Assim, os espectros de DC foram obtidos através de um espectropolarímetro Jasco J-815, em celas de 1,0 mm de caminho óptico, com 5 varreduras por um espectro com tempo de integração de 3 s por ponto.

Para essa análise, foram preparadas soluções estoques dos peptídeos LO1903, Melitina e os bioconjugados LO2121, LO2122 e LO2123 em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, na concentração de 1 mg/mL para posterior utilização. Além disso, as soluções dos peptídeos foram preparadas em LPC (lisofosfatidilcolina) 5 mM.

3.10 Degradação no plasma

O ensaio de degradação dos peptídeos no soro sanguíneo foi realizado conforme Santos-Filho e colaboradores (2017), com pequenas modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução de 5 mL de soro diluído (25%) em solução tampão (PBS). Foram preparadas soluções estoque dos peptídeos LO1903, Melitina, LO2121, LO2122 e LO2123 contendo 2 mg de peptídeo em 2 mL de PBS em pH 7,4.

Além disso, foram considerados os controles dos peptídeos não incubados em soro, preparados com 100 µL da solução estoque, 100 µL de tampão e 100 µL de etanol 96%; além do controle do soro, preparado a partir de 100 µL de tampão, 100 µL de soro e 100 µL de etanol 96%.

Em seguida foram preparados os tubos contendo 100 µL de peptídeo e 100 µL de soro. Os tempos considerados para avaliar a degradação dos peptídeos foram de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Os tubos foram retirados da estufa, e precipitados em 100 µL de etanol 96%, centrifugado a 3000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi recolhido, onde 100 µL foi levado ao HPLC analítico em método de 5-95% de solvente B em 30 min, e o restante do sobrenadante foi congelado em nitrogênio e liofilizado para futura análise dos produtos de degradação.

4. Resultados e discussão

4.1 Síntese, clivagem e purificação dos peptídeos aptâmeros

O peptídeo nomeado como LO1903, de sequência FNLPLPSRPLL, peso molecular 1422,71g/mol foi sintetizado utilizando a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) conforme descrito previamente (MARRIFIELD, 1994).

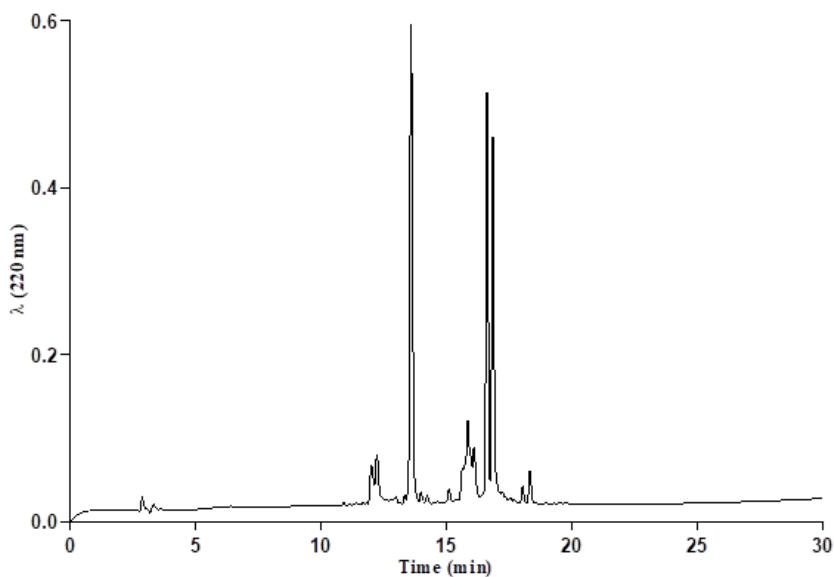
Após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos que compõem o peptídeo LO1903, o mesmo foi pesado e $\frac{3}{4}$ do peso total (referente à escala 0,3 mM) foram guardados para posterior utilização. Dessa maneira, utilizou-se $\frac{1}{4}$ do peso total (referente à escala 0,1 mM) para o acoplamento da 5(6)-carboxifluoresceína, com peso molecular de 376,32g/mol seguindo o mesmo protocolo de SPFS, obtendo assim o peptídeo nomeado LO1904. Para garantia do sucesso de acoplamento, o acoplamento da 5(6)-carboxifluoresceína foi repetido 2x sequencialmente, respeitando o intervalo de acoplamento de 2 horas.

Após a síntese do LO1904 realizou-se a clivagem, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado, sonificado, centrifugado 3x (sequencialmente) para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. Posteriormente, o peptídeo contido no precipitado obtido foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA em água ultra pura (Solvente A) e 0,036% de TFA em acetonitrila (Solvente B) em proporção de 50%:50%, sendo sonificado e centrifugado 3x (sequencialmente). O sobrenadante resultante desse processo contendo o peptídeo LO1904 foi liofilizado e identificado como peptídeo LO1904 bruto.

Antes da purificação, o peptídeo bruto foi analisado por um cromatógrafo Shimadzu em coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil), em gradiente de 5-95%

de solvente B em 30 minutos, para análise do grau de pureza e estabelecer o gradiente de solvente B durante a purificação, ou seja, a porcentagem necessária de solvente B para a eluição do peptídeo em coluna de fase reversa, considerando o tempo decorrido após a injeção e o pico de interesse (Figura 7).

Figura 7: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1904 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.

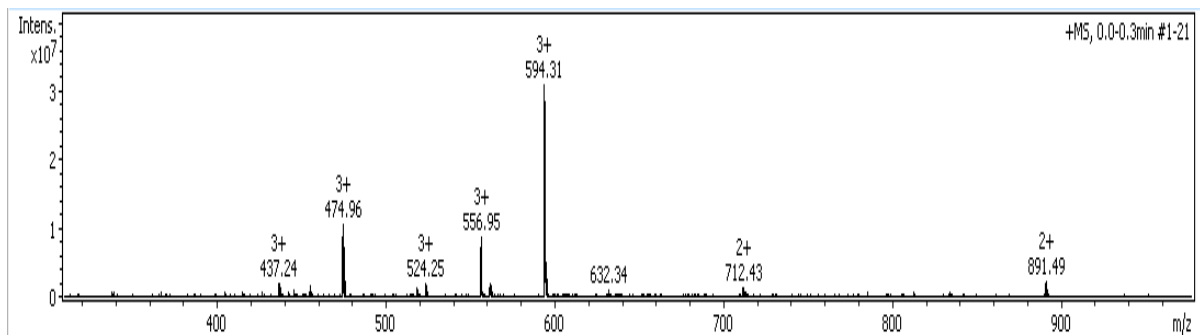


Fonte: Própria autora

O pico de interesse, ou seja, o pico relativo ao peptídeo LO1904 possui tempo de retenção por volta de 16,6min, o que, levando em consideração o gradiente linear de 5-95% de solvente B em 30 minutos (uma variação de cerca 3% de solvente B por minuto), pode-se inferir que o peptídeo LO1904 possui eluição por volta de 45,5% de solvente B. Assim, para a purificação do peptídeo foi decidido utilizar o gradiente 20-60% de solvente B em 120 minutos.

É interessante apontar que os outros picos encontrados no cromatograma podem ser considerados interferentes, ou seja, contaminantes peptídicos por erro em processos de acoplamento/desproteção que não são considerados a molécula de interesse.

Posteriormente, com o objetivo de analisar a massa molar do peptídeo e confirmar a obtenção do material desejado, foi realizada a espectrometria de massas do peptídeo LO1904, em aparelho Thermo LCQ-fleet em configuração ESI-IT-MS (Figura 8).

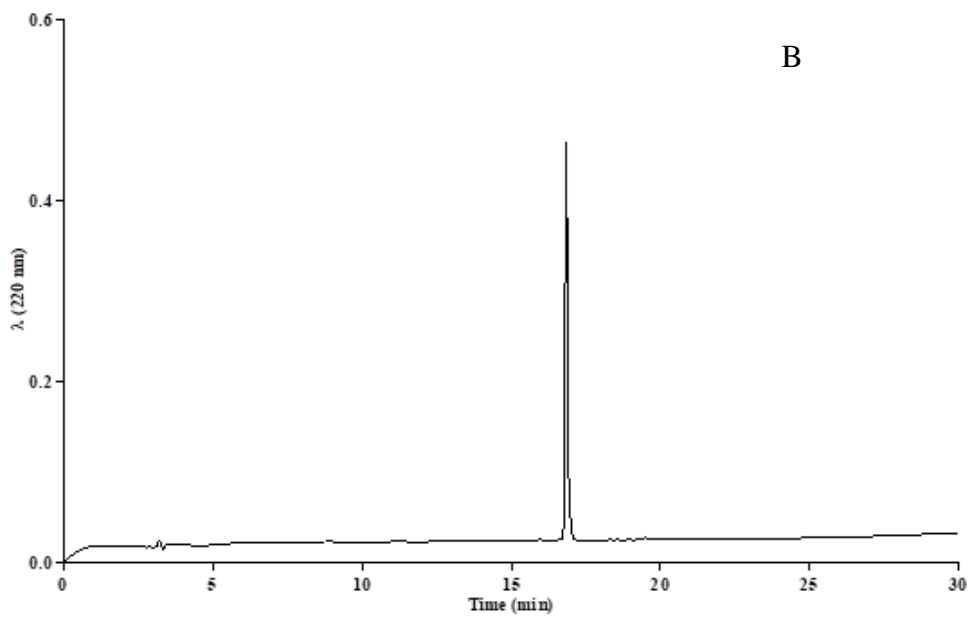
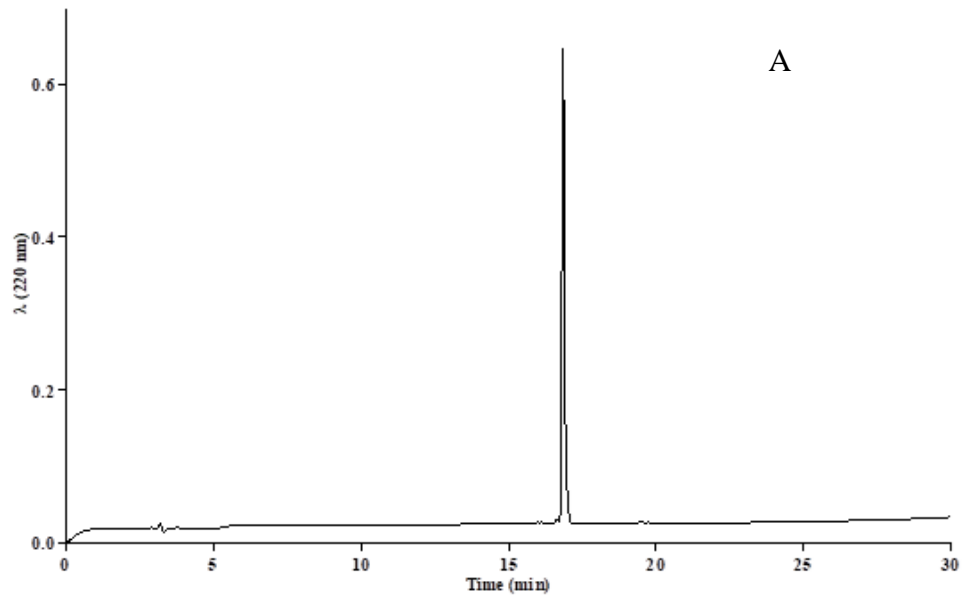
Figura 8: Espectro de massas do peptídeo LO1904 bruto.

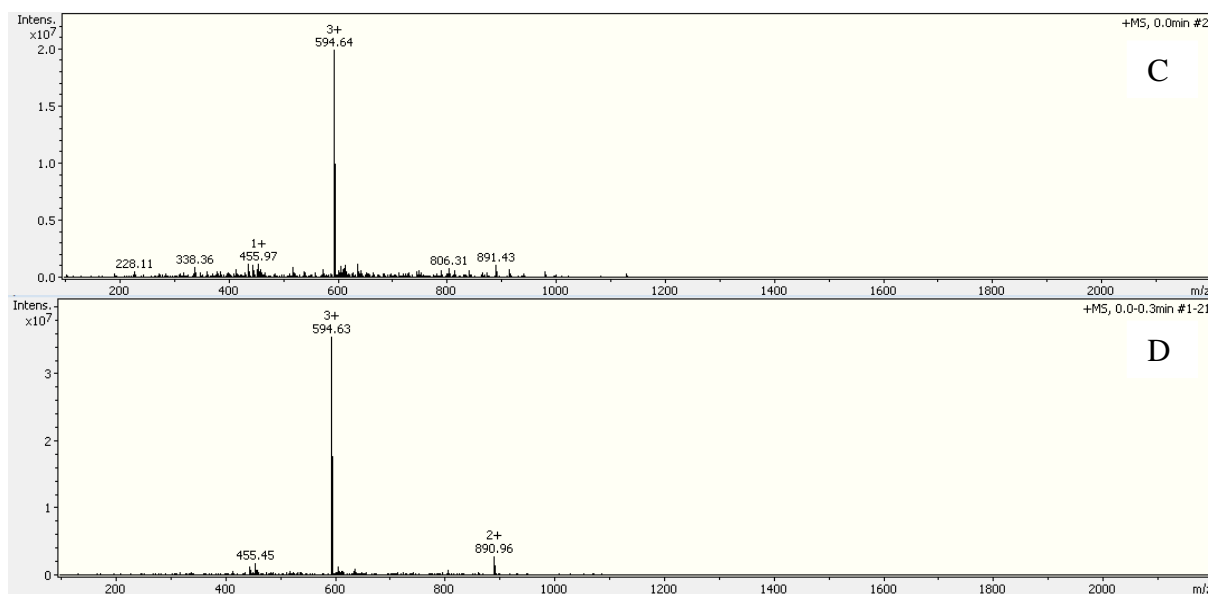
Fonte: Própria autora.

De acordo com o espectro de massas do LO1904 bruto, apresentado na figura 8, o peptídeo acoplado à 5(6)-carboxifluoresceína possui uma razão massa/carga +3 (adição de 3 prótons) de 594,67 Da , e 891,51 Da, correspondendo ao pico 2+. Outros picos, como 2+ com razão massa carga/carga de 712,43Da e 3+ com razão massa/carga de 474,96Da estão relacionados aos contaminantes peptídicos que não foram acoplados à 5(6)-carboxifluoresceína, ou seja, o peptídeo LO1903.

A purificação do peptídeo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo utilizando coluna C18 (Phenomenex) (tamanho 250mm x 10mm, 300 Å, tamanho de partícula 5µm) em gradiente 20-60% de solvente B em 120min. Após a purificação, cada fração de interesse foi acompanhada em HPLC analítico para determinação do grau de pureza. Durante o processo de purificação, foram obtidas duas frações (FR1 e FR2), consideradas puras, onde foi realizada a corrida em HPLC analítico e o espectro de massas para confirmação (Figura 9).

Figura 9: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1904 FR1 (A) e FR2 (B) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas das frações 1 (C) e 2 (D) do peptídeo.





Fonte: Própria autora.

De acordo com o espectro de massas do peptídeo LO1904 puro, e considerando a adição de 3 prótons, o pico do peptídeo acoplado à 5(6)-carboxifluoresceína manteve-se com uma razão massa/carga de 594,63Da e 594,64Da, o que mostrou o sucesso da síntese e purificação do peptídeo de interesse. Assim, o peptídeo LO1904 puro (bem como todos os peptídeos puros) foi liofilizado e reservado para posterior utilização.

Considerando a superexpressão de proteínas de membrana em linhagens tumorais, trabalhar com peptídeos aptâmeros surge como uma alternativa promissora considerando a sua alta afinidade por proteínas de membranas e sua alta especificidade (CERCHIA, DE FRANCISCIS, 2010; CAMORANI, CERCHIA, 2015; TUERK, GOLD, 1995).

Os aptâmeros apresentam vasta aplicabilidade na terapia anticâncer, podendo ser utilizados como medicamentos, bem como atuar como um sistema de entrega de fármacos, podendo também serem conjugados a drogas com potencial anticâncer e nanopartículas, objetivando uma entrega direcionada, minimizando a citotoxicidade desses fármacos em células não tumorais, aumentando assim suas eficácias e reduzindo efeitos colaterais (SOLDEVILLA, VILLANUEVA, PASTOR; 2016).

A escolha dos peptídeos aptâmeros foi baseada em estudos anteriores que, através de técnicas de *phage display*, encontraram 7 peptídeos que possuíam ligação à proteína CD44, onde o peptídeo denominado de P7 no estudo (FNLPLPSRPLLRL) demonstrou ser o mais promissor, sendo sintetizado e ligado à biotina e FITC, onde a afinidade de ligação à CD44 foi analisada e confirmada (PARK *et al.*, 2012). Como os resultados do estudo anterior indicaram que o peptídeo P7 possui alta afinidade de ligação à CD44, essa molécula pode ser estudada como um agente que pode conferir seletividade para fármacos no combate ao câncer

de mama, uma vez que o marcador tumoral CD44 possui altos níveis de expressão neste tipo de tumor.

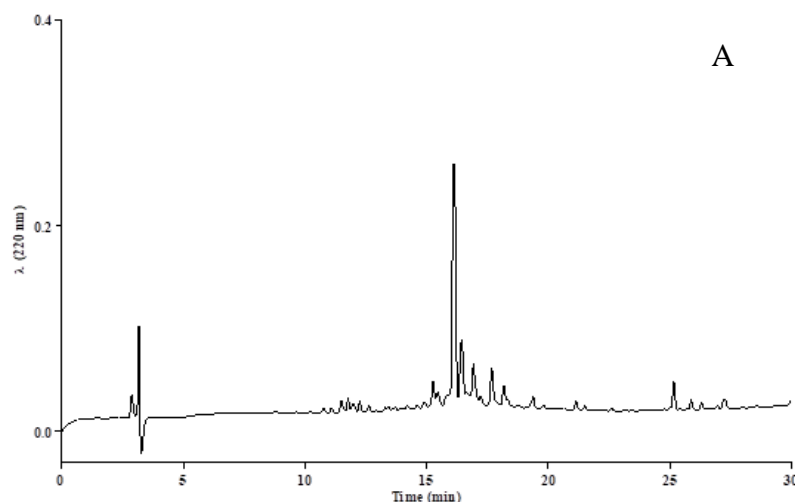
Em seguida, o peptídeo LO1907, de sequência NPGTCKDKWIECLLNG e peso molecular 1791,06g/mol foi sintetizado em resina Fmoc-Gly-Wang, com grau de substituição 0,467mmol/g em escala 0,4mmol com 3x de excesso.

Assim como realizado para a molécula anteriormente sintetizada, após o final da síntese o equivalente a $\frac{1}{4}$ do peso total foi utilizado para o acoplamento da 5(6)-carboxifluoresceína, seguindo o protocolo de SPFS, obtendo assim o peptídeo LO1908.

Após o processo de síntese, clivagem e extração, o peptídeo foi submetido à espectrometria de massas, com o intuito de certificar que a molécula obtida correspondia ao peptídeo de interesse.

Posteriormente, a molécula foi submetida à HPLC analítico, para observação do seu grau de pureza e tempo de retenção. Como observado (Figura 10A), é possível notar que o pico de interesse, possui tempo de retenção de aproximadamente 15,6 min o que, levando em consideração o gradiente linear de 5-95% de solvente B, pode-se inferir que o peptídeo LO1908 possui eluição por volta de 46,8% de solvente B.

Figura 10: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908 bruto (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.

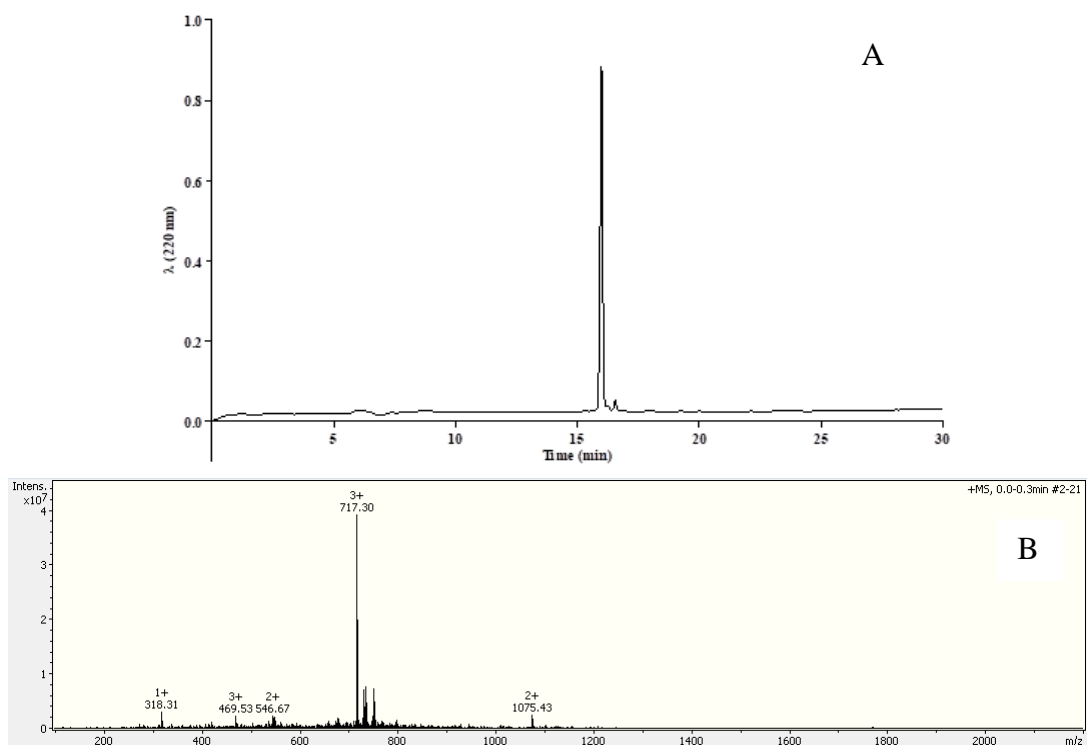


Fonte: Próprio autor

O peptídeo LO1908 passou pelo processo de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semipreparativo, conforme método apresentado na tabela 2. Como pode ser observado (figura 13), o peptídeo foi purificado com sucesso, apresentando alto grau de pureza.

Para confirmar o sucesso da purificação, LO1908 puro foi submetido à espectrometria de massas. Assim, considerando espectro de massas e a razão massa/carga, o pico do peptídeo LO1908 puro foi 717,30Da, representando o pico 3+, e 1075,43Da equivalente ao pico 2+, confirmando a pureza do peptídeo (Figura 11).

Figura 11: Perfil cromatográfico peptídeo LO1908 puro (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas do peptídeo LO1908 puro (B).



Fonte: Própria autora.

Por apresentar duas cisteínas em sua sequência, e para evitar possível confusão sobre a atividade da molécula (se o dímero, o monômero ou o peptídeo com a ponte dissulfeto intracadeia seria responsável pela atividade e o quanto essa ligação intracadeia afeta a ligação com o receptor), o peptídeo LO1908 foi submetido a uma oxidação intracadeia. Para um comparativo das suas propriedades (ou capacidade) de ligação ao receptor, a molécula sem a oxidação das cisteínas (LO1908) e com a oxidação (LO1908oxi) foram purificadas.

A ligação intracadeia dos resíduos de cisteína da molécula foi realizada através da oxidação por ar, em solução tampão bicarbonato de amônio 0,1 mol/L em pH 9,0, sendo deixada sob agitação por 24 horas. Após esse processo, obteve-se o peptídeo LO1908oxi (Figura 12).

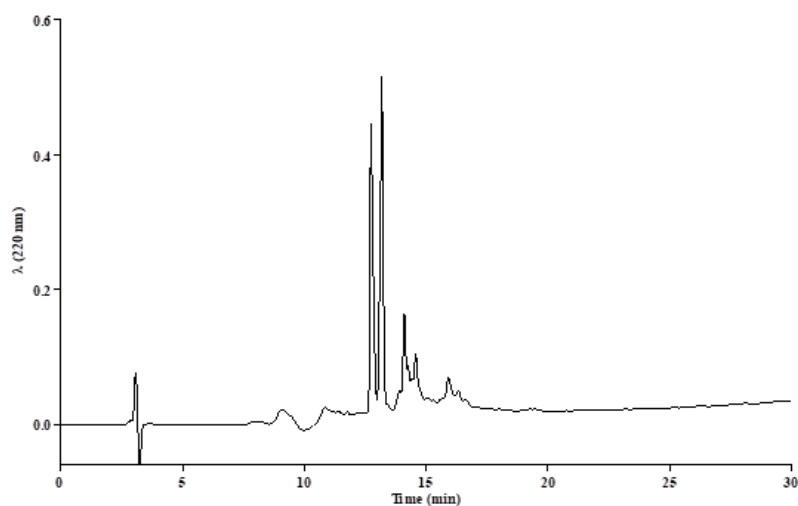
Figura 12: Representação esquemática do peptídeo LO1908oxi. Figura 12: Representação esquemática do peptídeo LO1908oxi.



Fonte: Própria autora.

Antes da purificação, o peptídeo bruto foi submetido a uma análise por cromatógrafo Shimadzu em coluna analítica (046 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil) para determinar o grau de pureza e estabelecer o tempo de retenção durante a purificação (Figura 13).

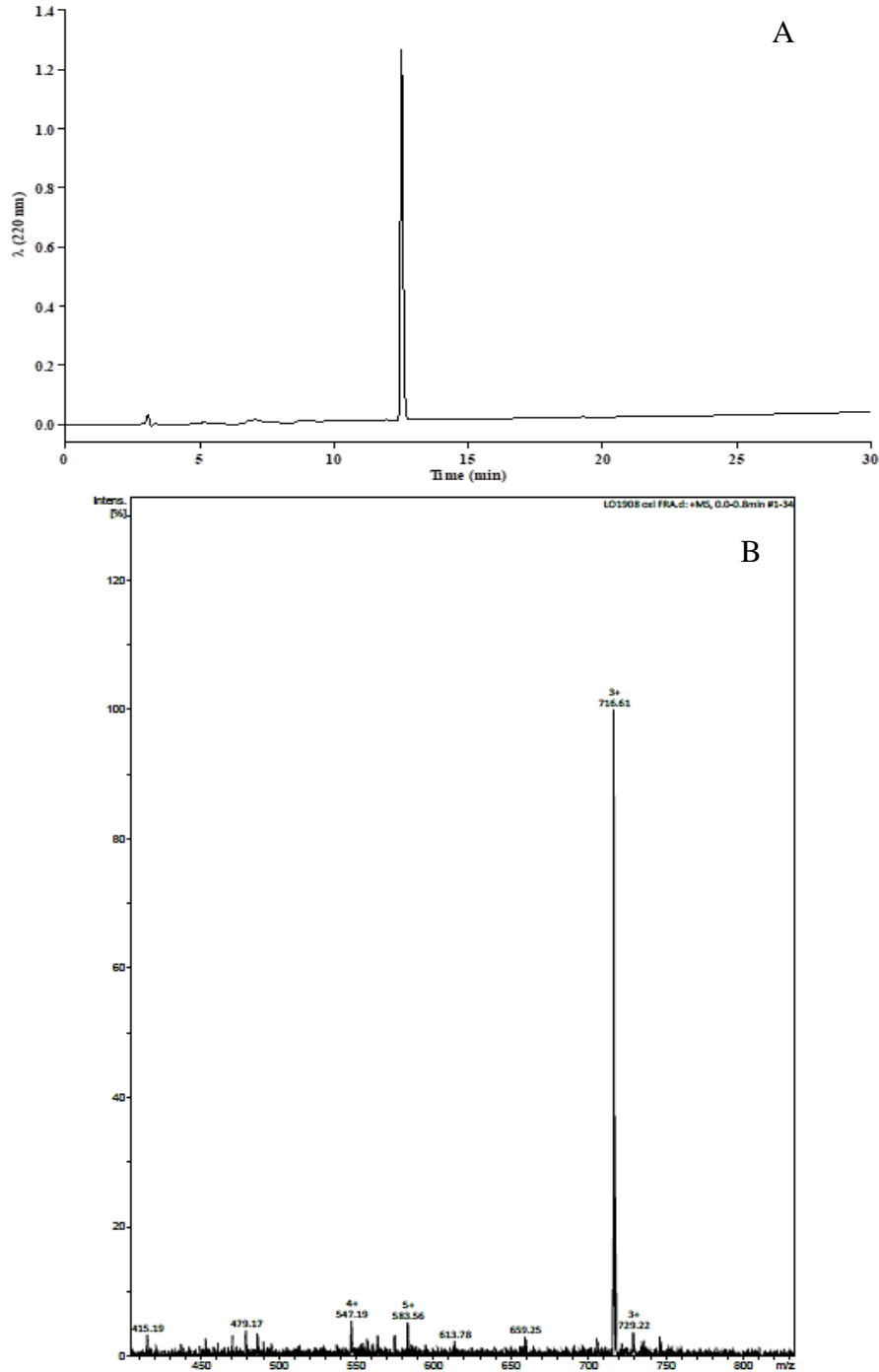
Figura 13: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908oxi bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

A purificação do peptídeo LO1908oxi foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo em gradiente 20-60% em 120min (Tabela 2). Após a purificação, foi realizado o espectro de massas para confirmação (Figura 14).

Figura 14: Perfil cromatográfico do peptídeo LO1908oxi puro (A) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min. Espectro de massas do peptídeo LO1908oxi puro (B).



Fonte: Própria autora.

É possível notar que o pico de interesse, ou seja, o pico do puro é retido em aproximadamente 16min e o seu tempo de retenção acontece mais ou menos em 48% de B (figura 14). Comparando ao peptídeo LO1908, de forma muito interessante, a oxidação intracadeia da molécula mudou consideravelmente a hidrofobicidade da molécula e seu

consequente tempo de retenção. Além disso, após espectrometria de massas, foi observada a presença majoritária de apenas um pico (716,6Da), relacionado à razão massa/carga +3, mostrando a eficiência da purificação do LO1906oxi (Figura 14).

A escolha do aptâmero NPGTCKDKWIECLLNG foi baseada em estudo de Rusckowski *et al.*, (2007) onde, identificaram 3 peptídeos com afinidade pela TAG-72, proteína-alvo para marcadores tumorais (CHEN *et al.*, 2008). Dos três peptídeos, o peptídeo de sequência NPGTCKDKWIECLLNG apresentou evidências de ligação quando apresentados à TAG-72 marcada radioativamente.

O acoplamento dos peptídeos à carboxifluoresceína foi realizado no presente trabalho, pois a utilização de uma sonda fluorescente irá proporcionar a visualização de marcação do peptídeo aos alvos moleculares específicos, no caso, às proteínas encontradas na membrana das células tumorais. A carboxifluoresceína como sonda fluorescente é utilizada no diagnóstico desde 1948, quando Moore *et al.* (1948) utilizou a fluorescência para realce do tecido tumoral durante sua remoção em processo neurocirúrgico. Autores como Whitney *et al.* (2011) e Belykh *et al.* (2016) apresentam a utilização da fluoresceína para direcionamento em alvos moleculares específicos em linhagens tumorais, onde são classificadas de acordo com o tipo de fluoróforo e molécula alvo.

A utilização da carboxifluoresceína ligada a aptâmeros para marcação de alvos moleculares em linhagens tumorais é descrito por Delac *et al.* (2015) e Kang *et al.* (2012). Autores como Jhaveri *et al.* (2000), Katilius, Katiliene e Woodbury (2006), Lerga e O'Sullivan (2008) e Chang *et al.* (2010), onde há o foco na ligação aos alvos específicos na superfície celular (CIBIEL, PESTOURIE, DUCONGÉ, 2012; DOUGHERTY, CAI, HONG, 2015).

4.2 Avaliação da viabilidade celular

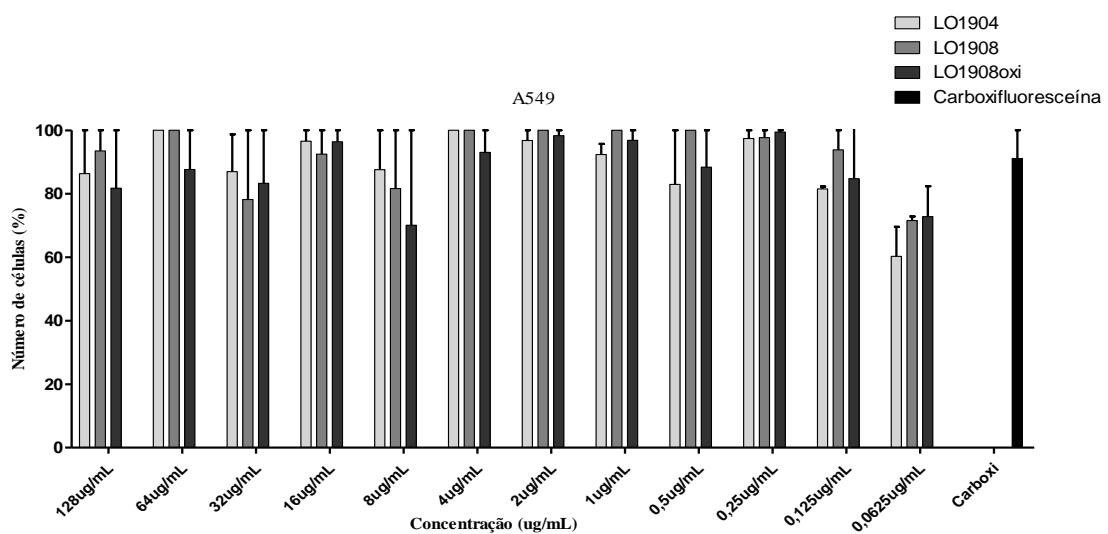
Antes das análises de ligação dos peptídeos aptâmeros aos seus marcadores de interesse, é importante avaliar se essas moléculas podem, de alguma forma, interferir na viabilidade das células. Para tanto, foi realizada a atividade de viabilidade celular (MTT), onde as linhagens foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio DMEN High Glicose e 1×10^6 de células, sendo posteriormente deixadas em estufa de CO₂ 5% por 24 horas para que as células possam aderir à placa.

Os peptídeos utilizados para tratar as linhagens foram o LO1904, LO1908, LO1908oxi e 5(6)-carboxifluoresceína, além de DMSO 5% em meio para controle positivo e poços sem célula como o branco. As concentrações dos peptídeos utilizadas foram 128µg/mL, 64µg/mL,

32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ para caracterizar uma diluição seriada. Com a leitura da intensidade da cor da solução para cada peptídeo em suas concentrações testadas foi possível considerar a absorbância de cada poço para a plotagem dos gráficos correspondentes a cada linhagem avaliada.

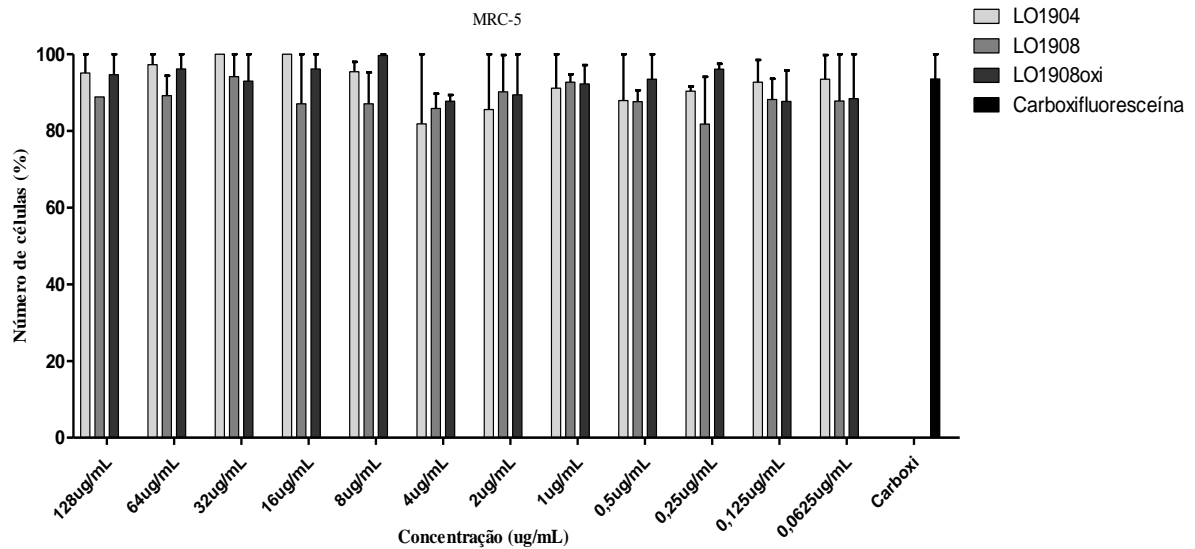
Para a linhagem A549 (Figura 15), pode-se observar que houve variações na viabilidade celular entre as concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ para todos os peptídeos, contudo, de forma não significativa, sendo possível observar que os aptâmeros não apresentaram citotoxicidade para a linhagem A549. Para a linhagem MRC-5 (Figura 16), assim como para a linhagem anterior, não houve variações significativas na viabilidade celular.

Figura 15: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular A549 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.



Fonte: Própria autora.

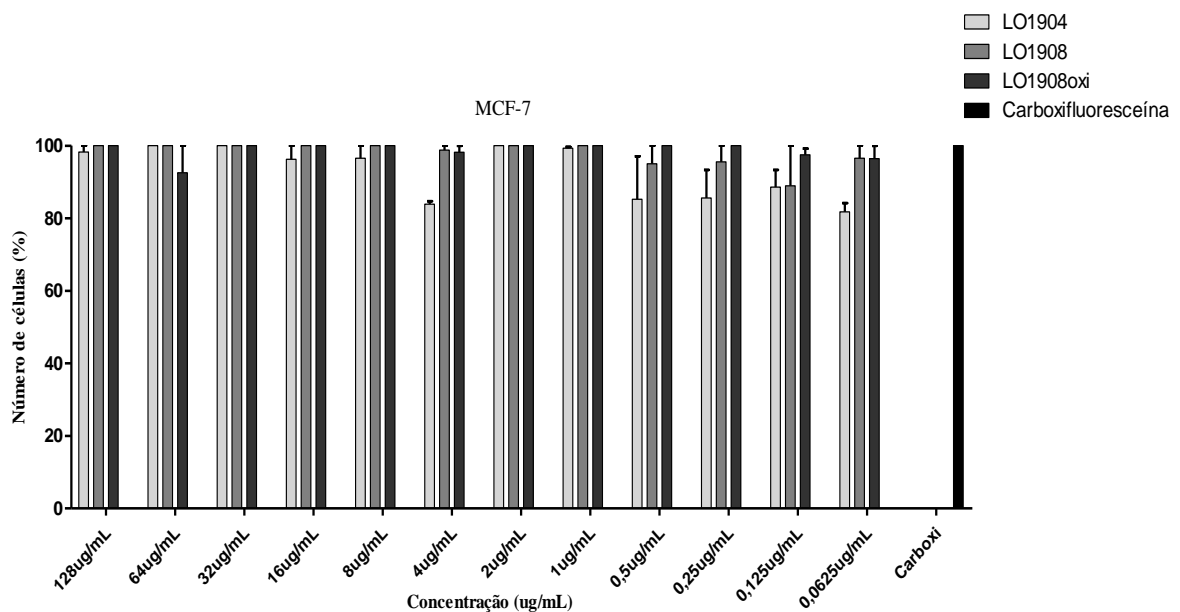
Figura 16: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MRC-5 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.



Fonte: Própria autora.

Por último, foi realizado o ensaio de viabilidade celular em linhagens tumorais de mama (MCF-7) (Figura 17). Nesta avaliação, não foi observada variações considerando as concentrações testadas dos peptídeos LO1908 e LO1908oxi. Já o peptídeo LO1904, nas menores concentrações (4µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL e 0,0625µg/mL) foi possível observar uma pequena diminuição da viabilidade celular, contudo, a viabilidade celular permanece superior a 80%.

Figura 17: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 em relação aos aptâmeros e carboxifluoresceína.



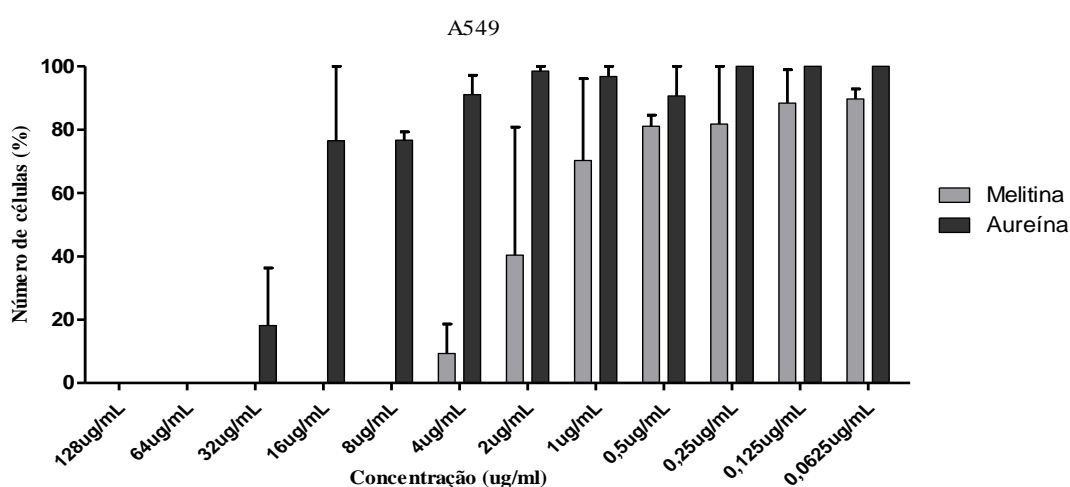
Fonte: Própria autora.

Considerando as análises de viabilidade celular pela técnica de MTT das linhagens MRC-5, A549 e MCF-7 em relação aos peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi, é possível concluir que os peptídeos aptâmeros não apresentaram citotoxicidade para as linhagens testadas.

Além das análises de citotoxicidade para os peptídeos aptâmeros LO1904, LO1908 e LO1908oxi, realizou-se ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT para os peptídeos Melitina e Aureína para verificar o perfil citotóxico dos peptídeos em relação as linhagens A549, MRC-5 e MCF-7, nas mesmas concentrações testadas para os aptâmeros. Os peptídeos antitumorais Melitina e Aureína foram escolhidos no presente trabalho, pois são moléculas bem conhecidas e bastante caracterizadas em relação às suas atividades antitumorais. É importante ressaltar que, para a realização do ensaio de MTT, os peptídeos antitumorais não foram sintetizados e purificados para esta etapa do trabalho, sendo gentilmente doados por membros do grupo de pesquisa que já haviam realizado a síntese e purificação para outros trabalhos. O peptídeo que apresentar melhor potencial antitumoral será escolhido para a síntese de bioconjugados.

Como observado na figura 18, a Melitina apresentou potencial citotóxico em todas as concentrações testadas para a linhagem A549, e a viabilidade celular se mostrou abaixo dos 50% nas concentrações de 128 μ g/mL, 64 μ g/mL, 32 μ g/mL, 16 μ g/mL, 8 μ g/mL, 4 μ g/mL e 2 μ g/mL. Logo, a Melitina apresenta um perfil citotóxico considerável em linhagens de câncer de pulmão. Em contrapartida, a Aureína apresentou potencial citotóxico menor que 50% somente nas concentrações de 128 μ g/mL, 64 μ g/mL e 32 μ g/mL.

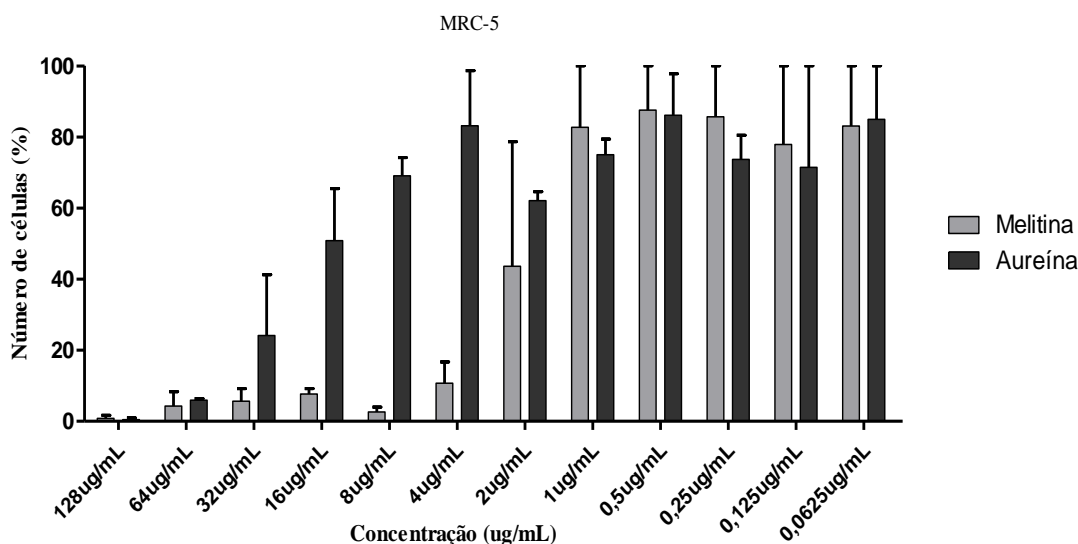
Figura 18: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular A549 em relação a Melitina e Aureína.



Fonte: Própria autora.

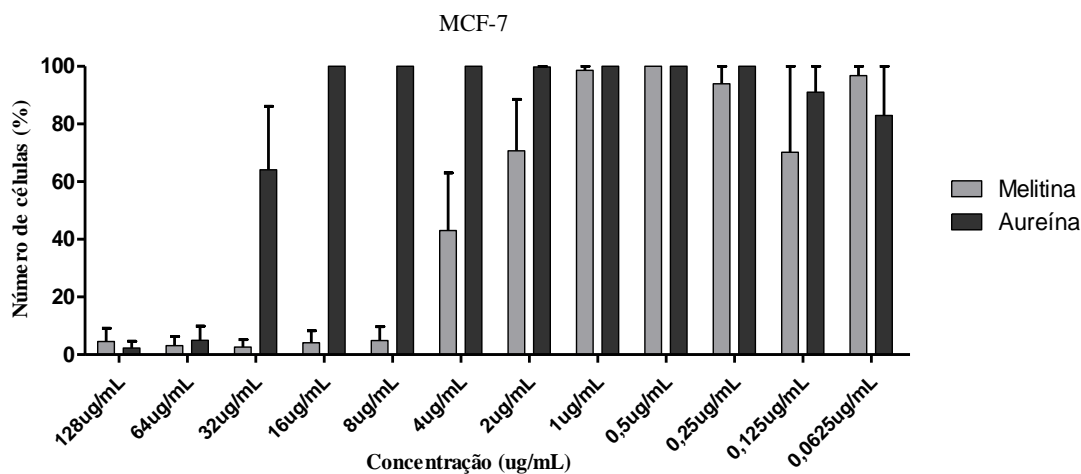
Para a linhagem MRC-5 (Figura 19), a Melitina também apresentou maior potencial citotóxico em todas as concentrações, porém, com melhor atividade nas concentrações de 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL e 2µg/mL, demonstrando que a Melitina, apesar de sua ação citotóxica em linhagens tumorais, também apresenta ação em linhagens não tumorais de pulmão. Em contrapartida, a Aureína apresentou potencial citotóxico somente nas concentrações de 128µg/mL, 64µg/mL e 32µg/mL. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que observaram que a melitina é biologicamente, farmacologicamente e toxicologicamente ativa, demonstrando atividade hemolítica, antibiótica e antifúngica e propriedades antitumorais (YANG *et al.*, 2011). No entanto, a especificidade da melitina é extremamente baixa, uma vez que ela demonstra citotoxicidade contra células normais e tumorais (SUN *et al.*, 2015).

Figura 19: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MRC-5 em relação a Melitina e Aureína.



Fonte: Própria autora.

Na linhagem MCF-7 (Figura 20), foi observado que a Melitina apresentou potencial citotóxico nas concentrações de 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL e 4µg/mL, demonstrando sua ação citotóxica também em linhagens tumorais de mama. Em contrapartida, a Aureína apresentou potencial citotóxico somente nas concentrações de 128µg/mL e 64µg/mL.

Figura 20: Avaliação da viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 em relação a Melitina e Aureína.

Fonte: Própria autora.

Com a análise da viabilidade celular pela técnica de MTT para as linhagens MRC-5, A549 e MRC-7 em relação aos peptídeos antitumorais Melitina e Aureína, foi possível observar que o peptídeo que possui maior potencial citotóxico para continuar a síntese dos bioconjugados é a Melitina, por apresentar citotoxicidade até mesmo em concentrações menores, diferente da Aureína, que apresentou potencial citotóxico apenas nas maiores concentrações. Contudo, é importante frisar que a Melitina apresenta citotoxicidade também contra células normais, o que justificaria a síntese de bioconjugados para aumentar a especificidade dessa molécula contra células tumorais.

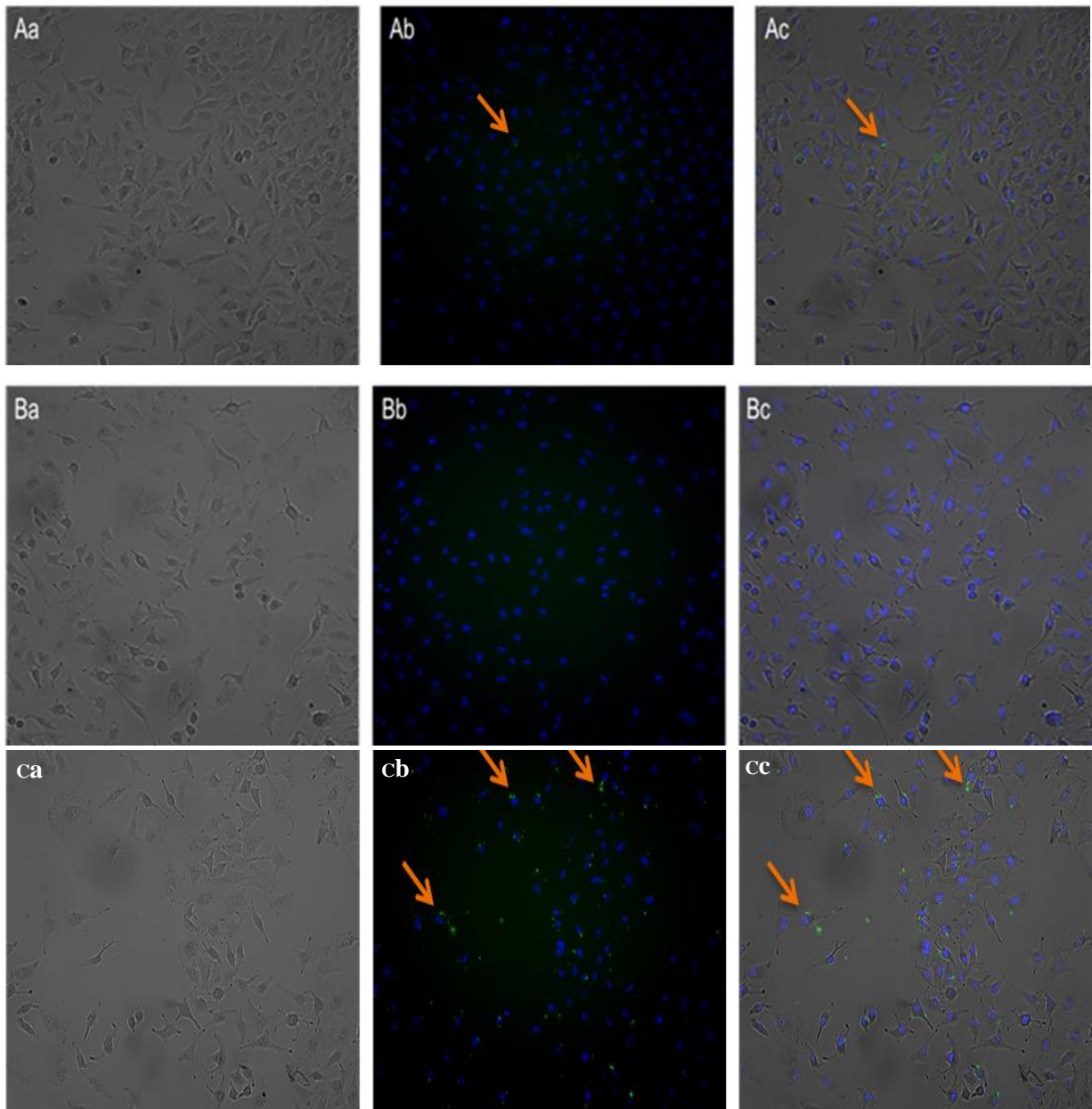
4.3 Análise de microscopia de fluorescência em In Cell Analyzer

Os peptídeos aptâmeros (LO1904, LO1908 e LO1908oxi) marcados com carboxifluoresceína foram utilizados para a análise de marcação em alvos celulares, além disso, como controle, utilizamos a 5(6)-Carboxifluoresceína para análise de possível marcação inespecífica.

As linhagens A549, MRC-5 e MCF-7 foram tratadas com diferentes diluições dos peptídeos LO1904, LO1908, LO1908oxi e 5(6)-Carboxifluoresceína e incubadas na estufa por 30 minutos, para ocorrer a ligação dos peptídeos com as proteínas de membrana. Após os 30 minutos em estufa, as placas foram centrifugadas e lavadas com PBS apenas uma vez para garantir a aderência das células no fundo dos poços. O núcleo das células foi marcado com Hoechst em concentração de 50µL por poço por 5 minutos. Após o tempo de espera para a marcação do núcleo, as placas foram centrifugadas e lavadas com PBS, estando prontas para análise no microscópio automático de fluorescência In Cell analyzer.

A análise do plaqueamento da linhagem A549 para o peptídeo LO1904 apresentou células bem aderidas principalmente em diluições mais concentradas (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), porém, para essa linhagem uma leve marcação na diluição de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi observada. O peptídeo LO1908 não apresentou marcações aparentes nessa linhagem celular. Já o peptídeo LO1908oxi apresentou marcações aparentes na concentração de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo possível notar uma marcação maior do que o peptídeo LO1904 (Figura 21).

Figura 21: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem A549 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A), LO1908 na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) e LO1908oxi na concentração 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeo testado.

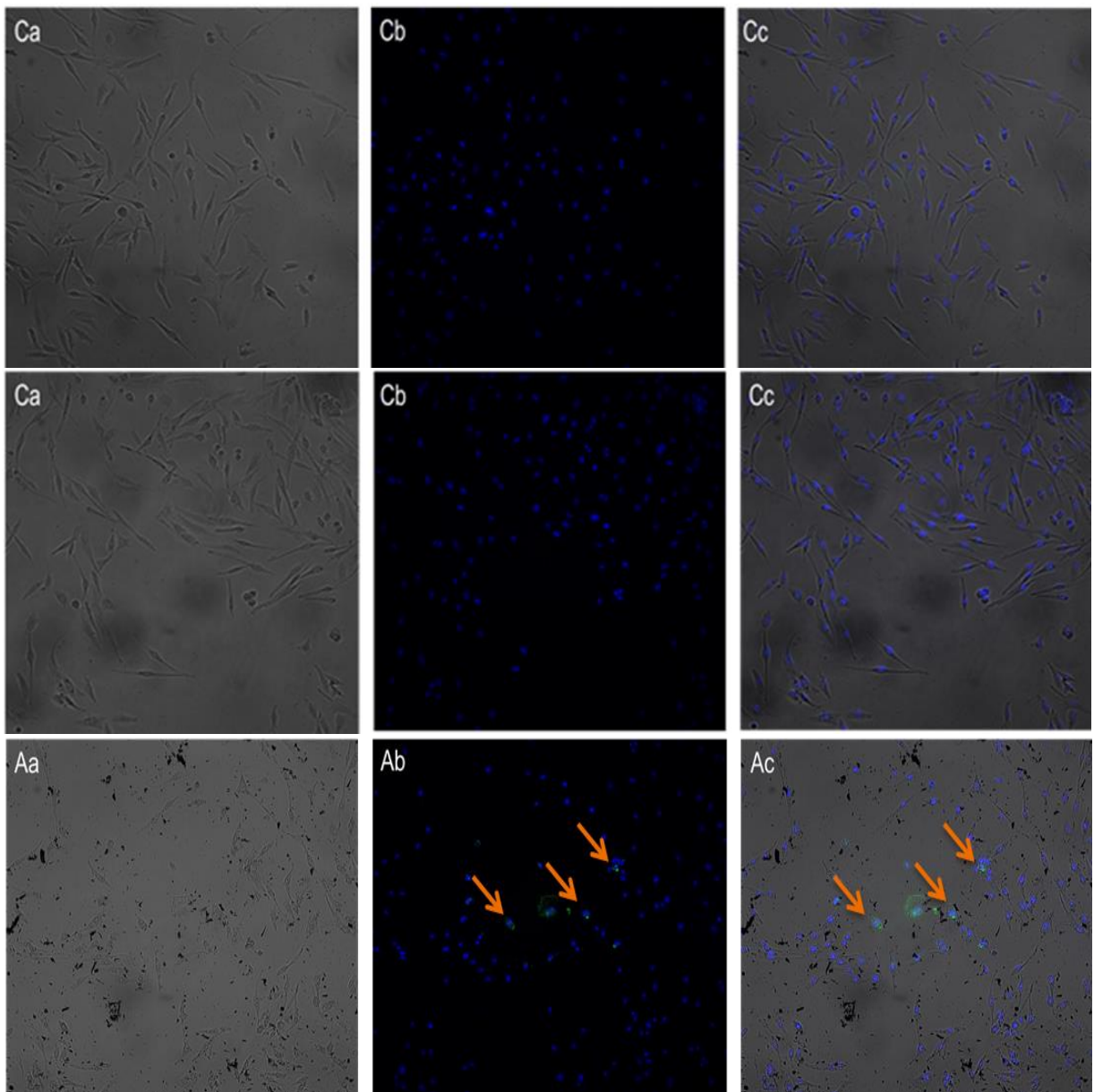


Fonte: Própria autora.

Dessa forma, considerando a análise acima para os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi na linhagem A549, é possível constatar que houve uma maior marcação do peptídeo LO1908oxi em diferentes concentrações, seguida de uma marcação mediana do LO1904 e marcação inexistente do LO1908.

Em seguida, foi realizada a análise em células não tumorais de pulmão MRC5. Para essa linhagem, os peptídeos LO1904 e LO1908 não apresentaram marcações. Já o peptídeo LO1908oxi apresentou marcações aparentes na concentração de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 22).

Figura 22: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem MRC5 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C), LO1908 na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) e LO1908oxi na concentração 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeo testado.

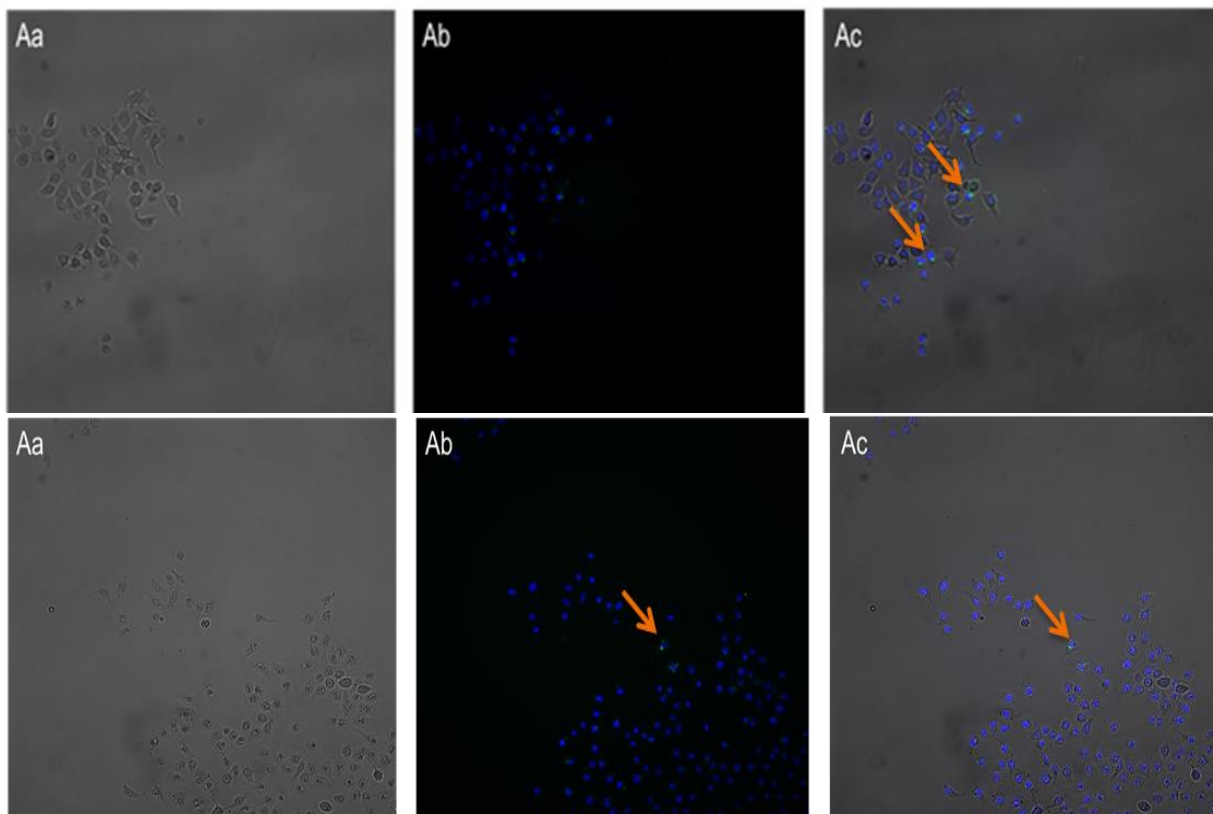


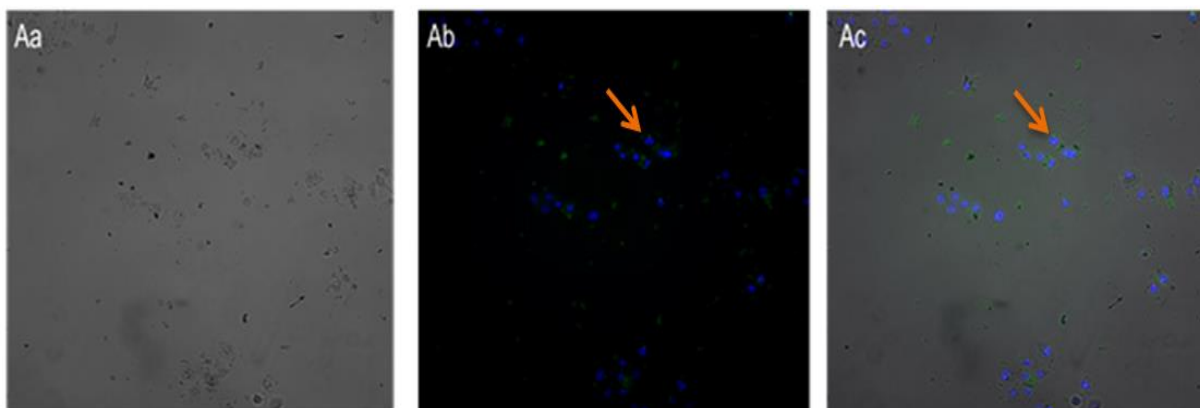
Fonte: Própria autora.

Na linhagem MRC-5 tratada com os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi foi possível observar que o peptídeo LO1908oxi apresentou pequenas marcações em diferentes concentrações, contudo, os peptídeos LO1904 e LO1908 não apresentaram marcações evidentes.

Posteriormente, foi realizada análise em linhagens tumorais de mama MCF-7. Nesta análise, para o peptídeo LO1904 observou-se marcação principalmentena concentração 32 μ g/mL. O peptídeo LO1908 apresentou poucas células aderidas ao poço, com marcação mínima na concentração de 128 μ g/mL. Já para o peptídeo LO1908oxi as marcações são vistas na concentração de 32 μ g/mL (Figura 23).

Figura 23: Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem MCF7 para os peptídeos LO1904 na concentração de 32 μ g/mL, LO1908 na concentração de 128 μ g/mL (C) e LO1908oxi na concentração de 32 μ g/mL (A) tanto em campo claro (a) como em campo escuro (b) e sobreposição (c). As setas direcionam para as marcações para cada peptídeo testado.





Fonte: Própria autora.

Para a linhagem MCF-7, há marcações medianas tanto nas células tratadas com o peptídeo LO1904 como com o peptídeo LO1908oxi, enquanto que as células tratadas com o peptídeo LO1908 não apresentou marcações aparentes.

As análises do In Cell Analyzer, apesar de ilustrativa, apresenta difícil conclusão quanto a propriedade dos peptídeos aptâmeros na marcação em membranas das linhagens testadas, pois não há como quantificar as células marcadas, tampouco a porcentagem de marcação. Por isso, apesar de já se ter alguma ideia sobre a possibilidade de marcação dos peptídeos aptâmeros às células, foi realizada a análise por citometria de fluxo, para a obtenção de resultados mais conclusivos. As imagens apresentadas são apenas ilustrativas, e o material completo, com todas as análises realizadas, se encontra no Apêndice A.

4.4 Citometria de fluxo

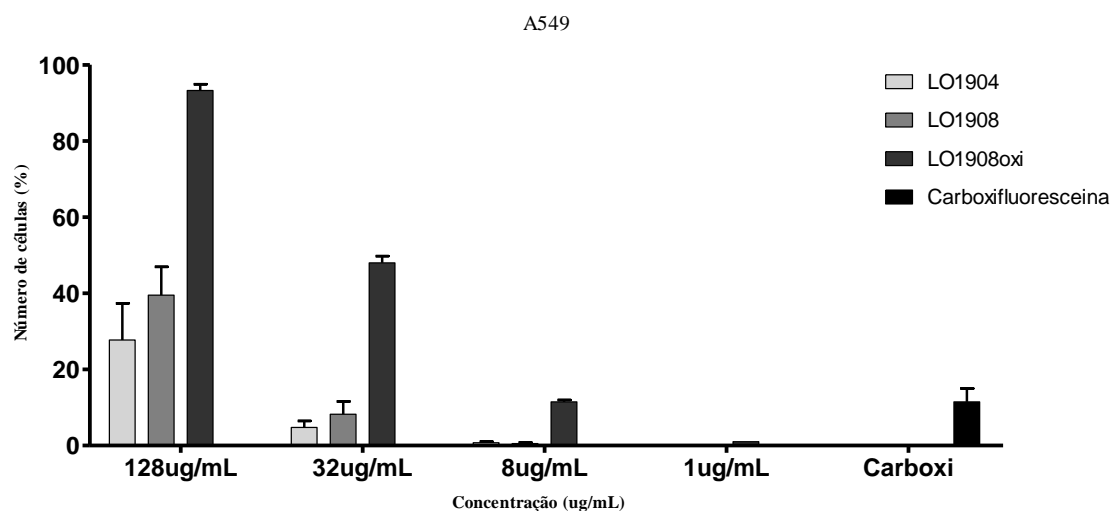
Com o objetivo de corrigir as limitações da técnica apresentadas na atividade com o In Cell Analyzer e termos uma maior confiabilidade dos resultados, podendo quantificar os eventos e números de marcação obtidos, para podermos escolher o melhor aptâmero para as determinadas linhagens, foi realizada a citometria de fluxo.

Assim como para as atividades anteriores, utilizamos nesta análise os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi (128 μ g/mL, 32 μ g/mL, 8 μ g/mL e 1 μ g/mL) e a 5(6)-carboxifluoresceína. As placas contendo as células de cada linhagem celular foram incubadas com os peptídeos LO1904, LO1908, LO1908oxi e o controle negativo, por 30min, para analisar as propriedades dos peptídeos em se ligar às proteínas de membranas. Em seguida, para que as células aderidas à placa fossem soltas e transferidas para tubos eppendorfs utilizou-se tripsina, inserindo meio de cultura para inativar a tripsina. Os eppendorfs foram centrifugados e os pellets formados foram ressuspensos em paraformaldeído 4% em PBS por 30min em geladeira para fixar as células. Os eppendorfs foram centrifugados novamente

para retirada do paraformaldeído e ressuspensionado em PBS gelado para ser analisado no citômetro de fluxo.

Com a citometria de fluxo foi possível avaliar as marcações dos aptâmeros em proteínas de membrana na linhagem A549 (Figura 24), onde o peptídeo LO1904 apresentou marcação nas concentrações de 128 μ g/mL (27,5%) e 32 μ g/mL (4,7%), enquanto que nas demais concentrações (8 μ g/mL e 1 μ g/mL) não houve marcações evidentes. O peptídeo LO1908 apresentou marcações mais aparentes em relação ao LO1904 nas concentrações 128 μ g/mL (39,5%) e 32 μ g/mL (8,2%), mas também não apresentou ligações às proteínas de membrana nas demais concentrações. Já o peptídeo LO1908oxi apresentou a melhor marcação, não somente na concentração de 128 μ g/mL (93,2%) mas também em 32 μ g/mL (48%) e 8 μ g/mL (11,5%). Como controle negativo, a carboxifluoresceína demonstrou uma pequena marcação na linhagem A549.

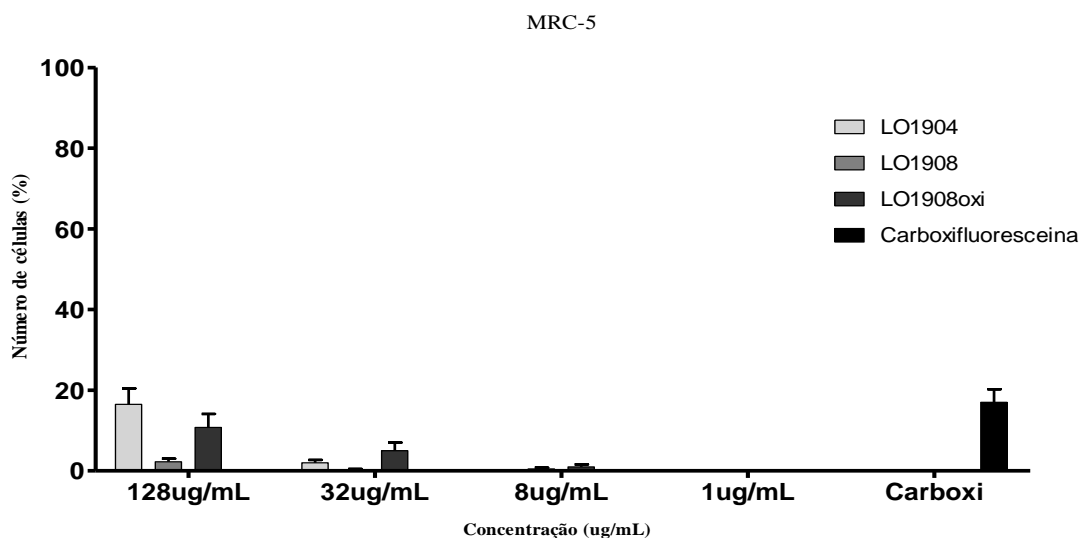
Figura 24: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular A549 considerando as marcações dos aptâmeros.



Fonte: Própria autora.

Para a linhagem não tumoral MRC-5 (Figura 25), o peptídeo LO1904 apresentou baixa marcação na concentração de 128 μ g/mL (16,5%), enquanto que nas demais concentrações (32 μ g/mL, 8 μ g/mL e 1 μ g/mL) as marcações são inexpressivas. O peptídeo LO1908 apresentou baixa marcação em concentração de 128 μ g/mL (2,5%), enquanto que nas demais concentrações não foram notadas. Já o peptídeo LO1908oxi apresentou pouca marcação na concentração de 128 μ g/mL (10,7%), e em 32 μ g/mL (5%). A carboxifluoresceína apresentou pouca marcação.

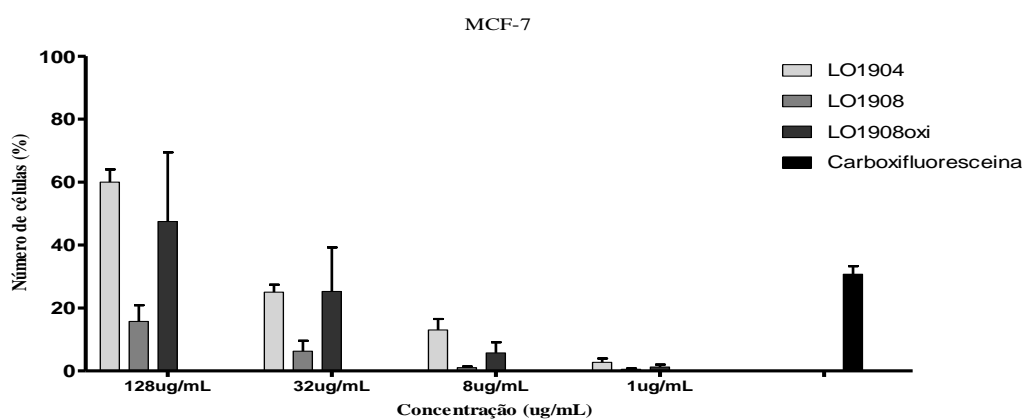
Figura 25: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular MRC-5 considerando as marcações dos aptâmeros.



Fonte: Própria autora.

Para MCF-7 (Figura 26), o peptídeo LO1904 apresentou marcações significativas na concentração de 128 μ g/mL (60%), 32 μ g/mL (25%). O peptídeo LO1908 apresentou pouca marcação em todas as concentrações testadas, já o peptídeo LO1908oxi apresentou marcação considerável na concentração de 128 μ g/mL (47,5%), 32 μ g/mL (25,2%), enquanto que nas demais concentrações não houve marcações.

Figura 26: Análise da citometria de fluxo com a linhagem celular MCF-7 considerando as marcações dos aptâmeros.



Fonte: Própria autora.

Com os resultados da citometria de fluxo para as linhagens A549, MRC-5 e MCF-7 tratadas com os peptídeos LO1904, LO1908 e LO1908oxi para quantificar as marcações desses peptídeos na membrana celular, foi possível observar que tanto o peptídeo LO1904 como o LO1908oxi apresentaram marcações expressivas, principalmente nas concentrações de 128 μ g/mL e 32 μ g/mL nas linhagens tumorais A549 e MCF-7. Além disso, foi observada

uma pequena marcação desses peptídeos em linhagem não tumoral observada, mostrando que realmente essas moléculas possuem maior afinidade por células tumorais. Para dar continuidade ao trabalho e realizar a síntese dos bioconjugados, o peptídeo LO1904 foi o escolhido, por apresentar uma síntese mais rápida em relação ao peptídeo LO1908oxi, visto que há a necessidade de oxidação dos resíduos de cisteína para este último. Além disso, a linhagem MCF-7, tumor de mama, será a linhagem escolhida para a testagem para o bioconjugado sintetizado.

É interessante lembrar que, como já citado acima, o câncer de mama é o que tem maior incidência nas mulheres, sendo o responsável pelo maior número de óbitos (BRAY *et al.*, 2018, OPAS, 2018).

De acordo com dados encontrados na literatura, espera-se que o peptídeo LO1904 tenha especificidade pelo marcador tumoral CD44 (PARK *et al.*, 2012). A proteína de membrana CD44 atua como precursor da propagação tumoral e a sua expressão em membranas celulares varia de acordo com cada tipo de linhagem e sua configuração (NAOR *et al.*, 2002). A glicoproteína CD44 é expressa em superfícies de células epiteliais de mama e está presente em células tumorais uma vez que está diretamente relacionada com o crescimento descontrolado, apoptose, angiogênese, motilidade e invasão celular, característicos das células tumorais, o que caracteriza a sua expressão mais acentuada em linhagens tumorais do que em células normais (HAN, CROWE, 2009; VESUNA *et al.*, 2009; PONTA, SHERMAN, HERRLICH, 2003; MARHABA, ZÖLLER, 2004; CALAF, PONCE-CUSI, ABARCA-QUINONES, 2018). Ainda que a CD44 seja expressa em maior quantidade em linhagens tumorais, a sua expressão em células normais não pode deixar de ser considerada, porém, a expressão é menos acentuada (RICHARDSON *et al.*, 2004; COLLINS *et al.*, 2005).

Em pesquisas de Li *et al.* (2007) a glicoproteína CD44 e outras glicoproteínas estiveram envolvidas no desenvolvimento e propagação de tumores pancreáticos, ou seja, há uma expressão acentuada dessas proteínas de membranas em linhagens de câncer de pâncreas, e que estão relacionadas também com o processo de angiogênese e aumento da expressão da sinalização celular. A expressão de CD44 é altamente acentuada em adenocarcinoma de pâncreas e representam uma população altamente tumorigênica.

4.5 Síntese e clivagem do peptídeo antitumoral

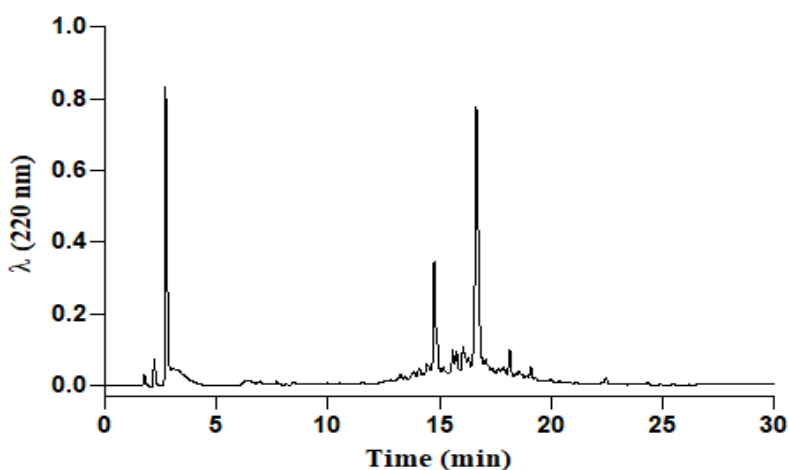
A melitina, de sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ e código LO2117, com peso molecular 2847,49 g/mol foi sintetizada por meio da SPFS, conforme já

mencionado. Nesta síntese, foi utilizada a resina Fmoc-Gln(Trt)-wang, com grau de substituição de 0,46mmol/g em escala 0,2mmol e 2x de excesso e 61,94 μ L de DIC e 61,26mg de HoBt.

Após a síntese da Melitina, a peptidil-resina foi pesada e a metade do peso final foi utilizada para clivagem do peptídeo e a outra metade utilizada para a síntese do bioconjugado LO2121.

Após a clivagem e antes da purificação, a Melitina foi analisada em cromatógrafo em coluna analítica, em gradiente de 5-95% de solvente B em 30 minutos, para análise do grau de pureza e estabelecer o gradiente de solvente B durante a purificação (Figura 27).

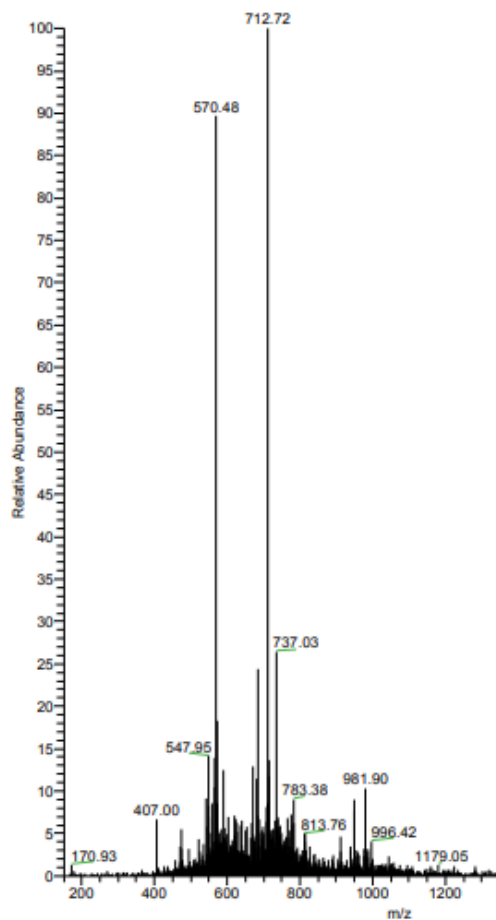
Figura 27: Perfil cromatográfico em coluna analítica da Melitina (bruto) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

Posteriormente, com o objetivo de analisar a massa molar do peptídeo e confirmar a obtenção do material desejado, foi realizada a espectrometria de massas da Melitina (Figura 28).

Figura 28: Espectro de massas da melitina (bruto).

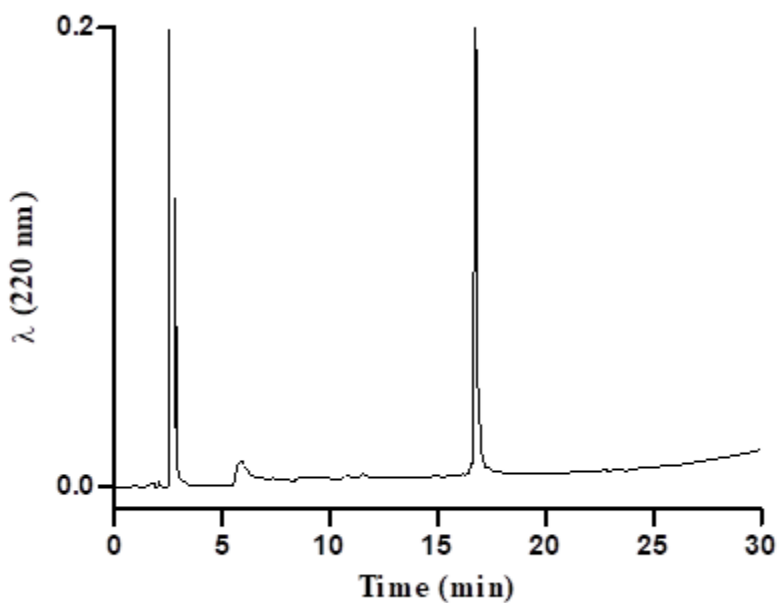


Fonte: Própria autora.

Segundo o espectro de massas da Melitina, foi observada a razão massa/carga de 712,87Da, correspondendo ao pico +4, e 570,49Da, correspondendo ao pico 5+. Logo, o peptídeo obtido pela síntese é o peptídeo de interesse.

Em seguida, foi realizada a purificação da Melitina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo em gradiente 25-75% em 120min. Conforme mostrado na figura 29, o peptídeo foi purificado com sucesso, apresentando alto grau de pureza.

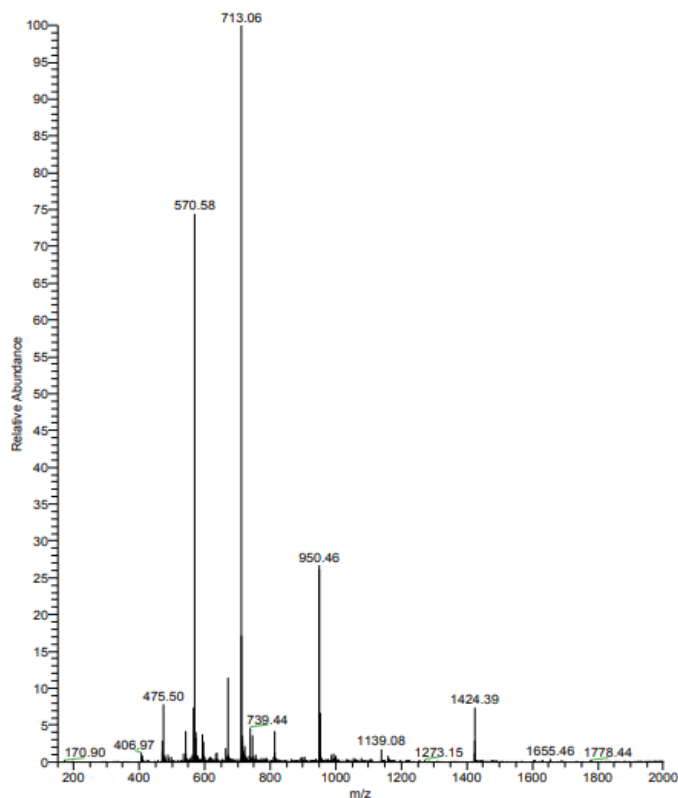
Figura 29: Perfil cromatográfico em coluna analítica da Melitina pura em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

Posteriormente, com o objetivo de analisar a massa molar do peptídeo purificado e confirmar a obtenção do material desejado, foi realizada a espectrometria de massas (Figura 30).

Figura 30: Espectro de massas da Melitina pura.



Fonte: Própria autora.

Analisando o espectro de massas do peptídeo LO2117 puro, pode-se observar picos com razão massa/carga de 1424,74Da, correspondendo ao pico +2; 950,16Da, correspondendo ao pico +3; 712,87Da, correspondendo ao pico +4; 570,49Da, correspondendo ao pico +5; e 475,58Da, correspondendo ao pico +6, podendo concluir que o peptídeo foi purificado de forma eficiente.

4.6 Síntese, clivagem e purificação dos bioconjugados

A partir dos resultados anteriormente descritos, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de três diferentes bioconjugados. São eles: 1) o bioconjugado Melitina-LO1903; 2) LO1903-Melitina e 3) Melitina-espaçador-LO1903, sendo o espaçador *2-[2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxy]acetic acid*. Os dois primeiros foram sintetizados, com o objetivo de analisar se a posição do aptâmero interfere na atividade do antitumoral/propriedades ligantes do bioconjugado, uma vez que trabalhos já realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram que modificações no N-terminal de peptídeos podem interferir nas suas atividades (Crusca et al., 2011, Santos-Filho et al., 2017, Santos-Filho et al., 2021). O terceiro bioconjugado foi desenhado com o intuito de observar se um espaçador pode melhorar a mobilidade das moléculas e conseqüentemente aumentar as propriedades ligação/atividade antitumoral do bioconjugado.

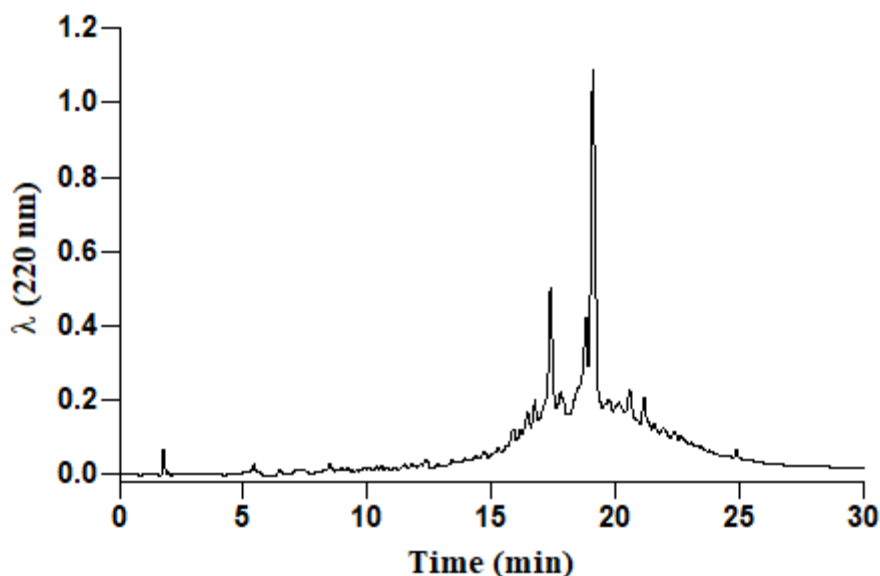
Assim, o bioconjugado nomeado como LO2121, composto pela a síntese da Melitina seguida do aptâmero LO1903, o qual possui a sequência FNLPLPSRPLLRGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ e peso molecular 4252,21g/mol foi sintetizado. Para tanto, foi utilizada a metade da peptidil-resina da síntese da Melitina (anteriormente descrito).

O protocolo de clivagem do peptídeo LO2121 se encontra na tabela 3. O sobrenadante resultante da extração contendo o peptídeo LO2121 foi congelado em nitrogênio, liofilizado e identificado como bruto.

Tabela 3: Protocolos de clivagem dos bioconjugados.

Peptídeos	Sequências	Métodos de clivagem
LO2121	FNLPLPSRPLLRGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	95% TFA 2,5% H ₂ O ultra pura 2,5% TIS
LO2122	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQFNLPLPSRPLL	95% TFA 2,5% H ₂ O ultra pura 2,5% TIS
LO2123	FNLPLPSRPLL-AEEA- GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	95% TFA 2,5% H ₂ O ultra pura 2,5% TIS

Antes da purificação, o peptídeo LO2121 foi analisado em cromatógrafo em coluna analítica para análise do grau de pureza e estabelecer o gradiente de solvente B durante a purificação (Figura 31).

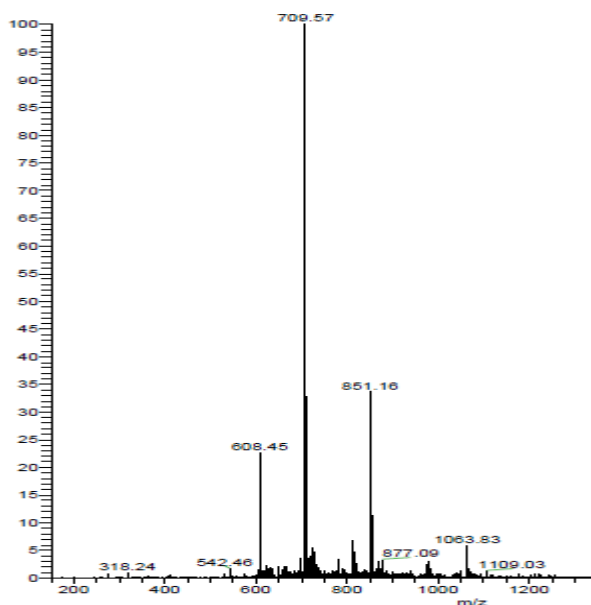
Figura 31: Perfil cromatográfico em coluna analítica do peptídeo LO2121 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.

Fonte: Própria autora.

O pico relativo ao peptídeo LO2121 possui tempo de retenção cerca de 19,07 min, o que, levando em consideração o gradiente linear, pode-se inferir que o peptídeo LO2121 possui eluição por volta de 57,21% de solvente B. Assim, para a purificação do peptídeo será utilizado o gradiente de 35-75% de solvente B em 120 minutos.

Posteriormente, com o objetivo de analisar a massa molar do peptídeo e confirmar a obtenção do material desejado, foi realizada a espectrometria de massas (Figura 32).

Figura 32: Espectro de massas do peptídeo LO2121 bruto.

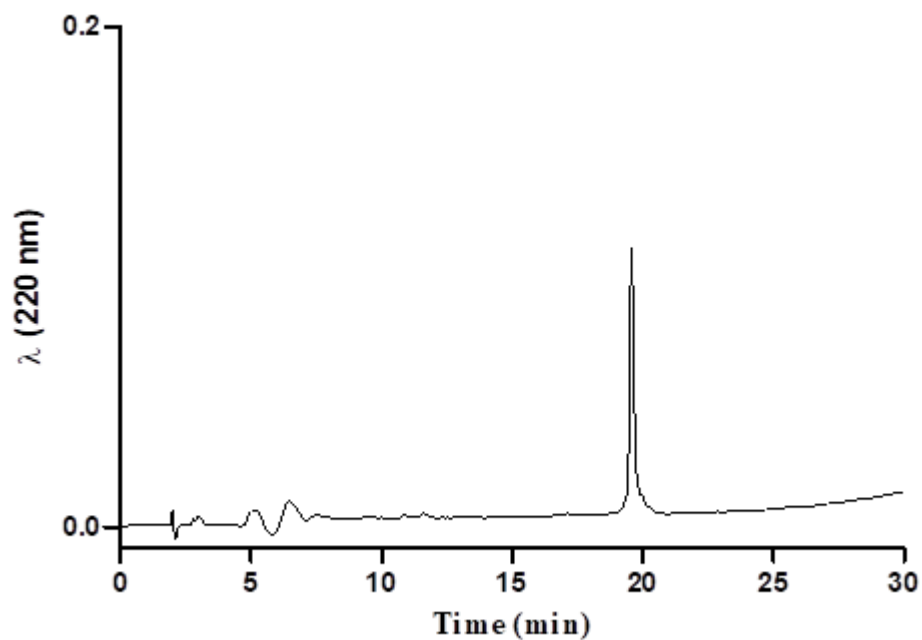


Fonte: Própria autora.

Segundo o espectro de massas do peptídeo LO2121 bruto, o espectro do peptídeo apresentou picos com razão massa/carga de 709,70Da, correspondendo ao pico +6, 608,45Da, correspondendo ao pico +7 e 851,44, correspondendo ao pico +5. Dessa forma, é possível afirmar que a síntese e clivagem correspondem ao bioconjugado de interesse.

Em seguida, foi realizada a purificação do peptídeo LO2121 (Figura 33) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo em gradiente 15-65% em 120min. Conforme mostrado na figura 40, o peptídeo foi purificado com sucesso, apresentando alto grau de pureza.

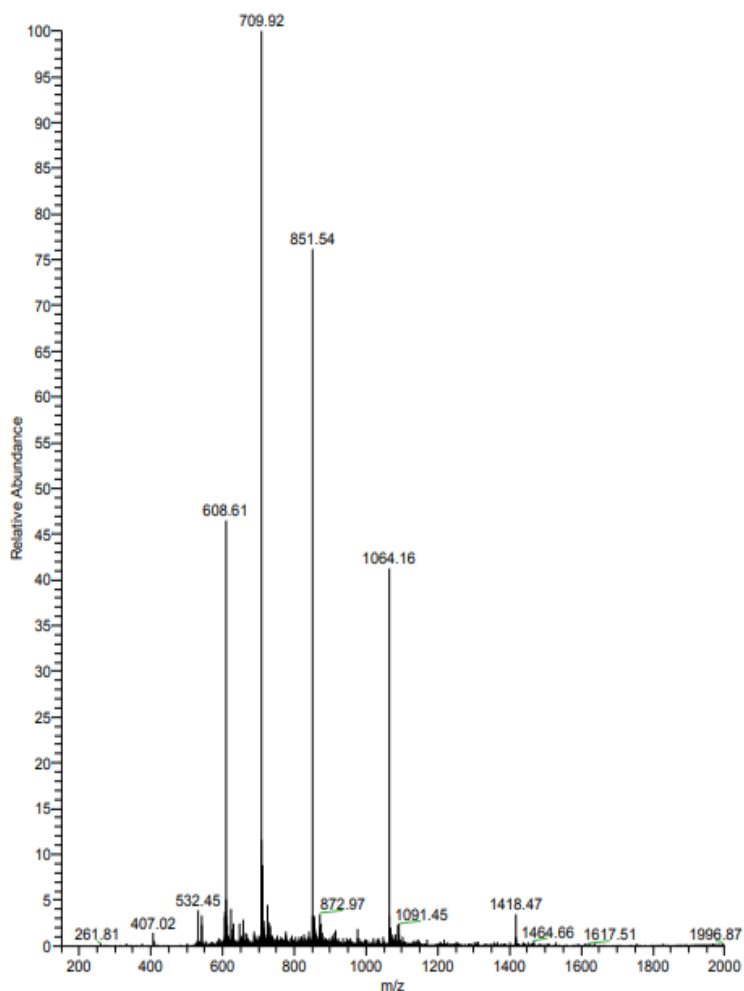
Figura 33: Perfil cromatográfico em coluna analítica do peptídeo LO2121 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

Posteriormente, com o objetivo de analisar a massa molar do peptídeo purificado e confirmar a obtenção do material desejado, foi realizada a espectrometria de massas (Figura 34).

Figura 34: Espectro de massas do peptídeo LO2121 puro.

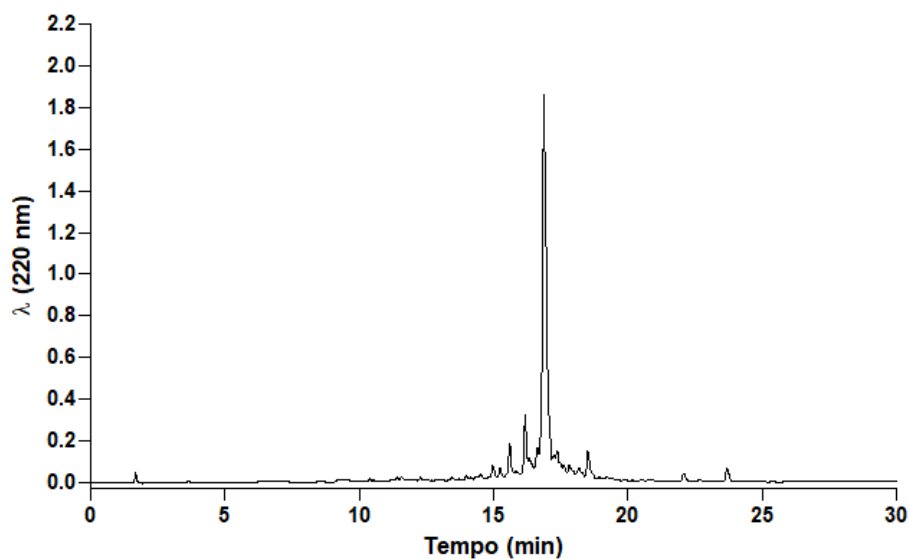


Fonte: Própria autora.

Analisando o espectro de massas do peptídeo LO2121 puro, pode-se observar picos com razão massa/carga de 1418,4Da, correspondendo ao pico +3; 1064,05Da, correspondendo ao pico +4; 851,44Da, correspondendo ao pico +5; 709,7Da, correspondendo ao pico +6; 608,45Da, correspondendo ao pico +7; e 532,52, correspondendo ao pico +8.

O bioconjugado nomeado como LO2122, composto pela a síntese do aptâmero LO1903 seguida pela Melitina, sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQFNLPLPSRPLL de peso molecular 4252,21g/mol foi sintetizado. Para tanto, foi utilizada a metade da peptidil-resina da síntese do peptídeo LO1903 (anteriormente descrito). Após a clivagem (tabela 3), o peptídeo LO2122 foi analisado em cromatógrafo em coluna analítica (Figura 35).

Figura 35: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2122 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.

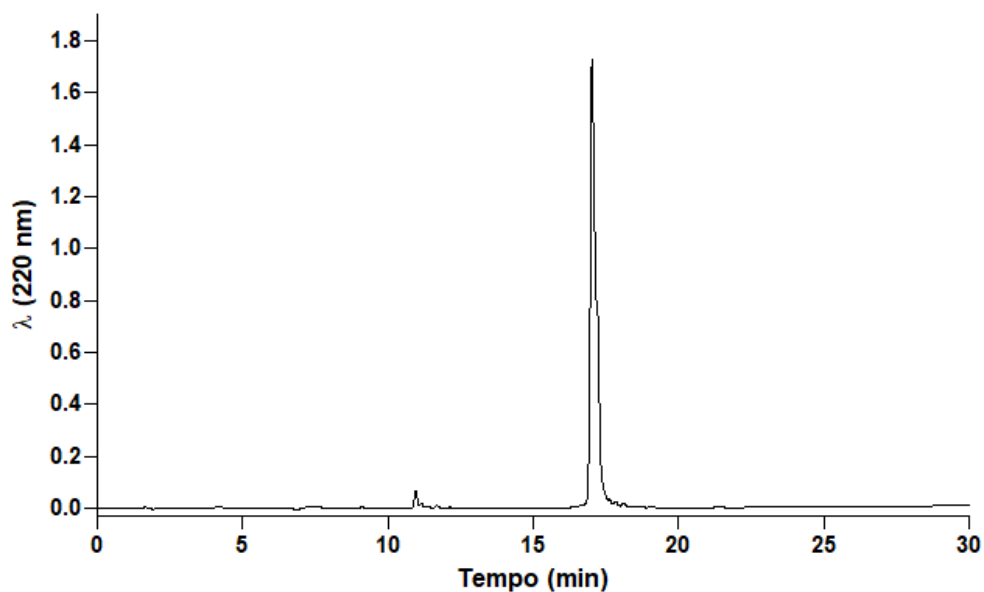


Fonte: Própria autora.

O peptídeo LO2122 possui tempo de retenção cerca de 16,9 min, sendo o gradiente de 25-70% de solvente B em 120 minutos o escolhido para a purificação.

Conforme mostrado na figura 36, o peptídeo foi purificado com sucesso.

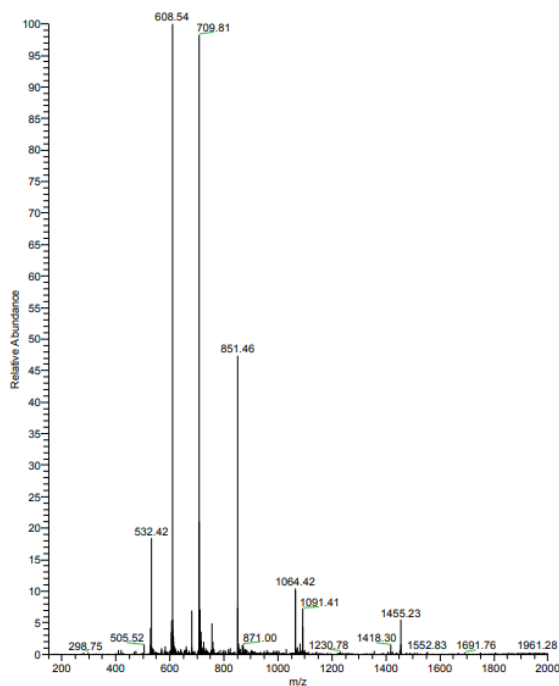
Figura 36: Perfil cromatográfico peptídeo LO2122 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

A espectrometria de massas (Figura 37) foi em seguida realizada, com o objetivo confirmar a obtenção do material desejado.

Figura 37: Espectro de massas do peptídeo LO2122 puro.



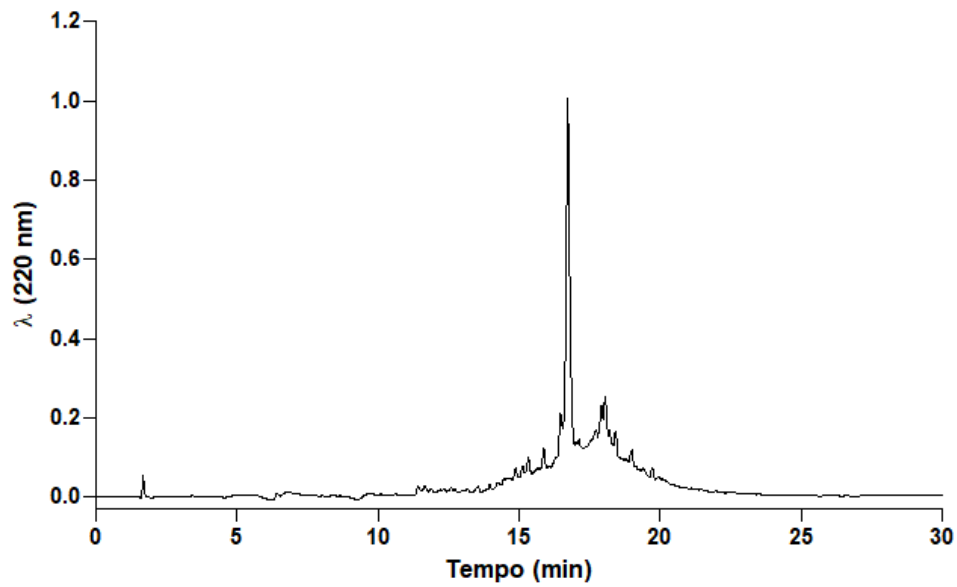
Fonte: Própria autora.

Ressaltam-se no espectro de massas do peptídeo LO2122 puro, os picos com razão massa/carga de 1418,4Da, (+3); 1064,05Da (+4); 851,44Da, (+5); 709,7Da, (+6); 608,45Da (+7) e 532,52 (+8).

O bioconjugado nomeado como LO2123, composto pela a síntese da Melitina, do espaçador, seguido pelo aptâmero, o qual possui a sequência FNLPLPSRPLLR-AEEA-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ de peso molecular 4397,62g/mol foi sintetizado e posteriormente clivado (Tabela 3).

O peptídeo LO2123 bruto foi analisado apresentando tempo de retenção de 16,7 min (Figura 38), sendo escolhido o gradiente de 25-75% de solvente B em 120 minutos para a purificação desta molécula.

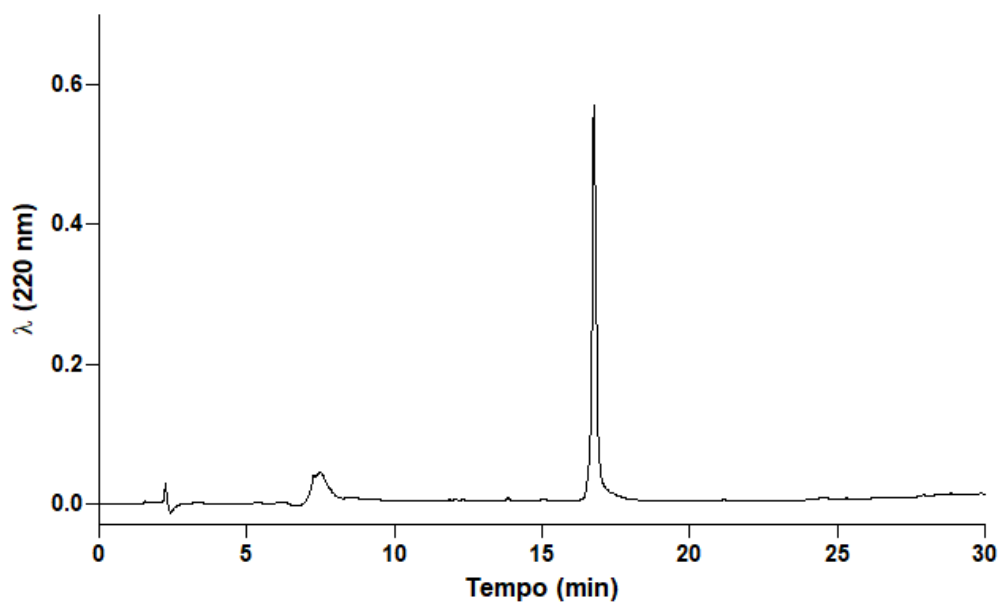
Figura 38: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2123 bruto em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

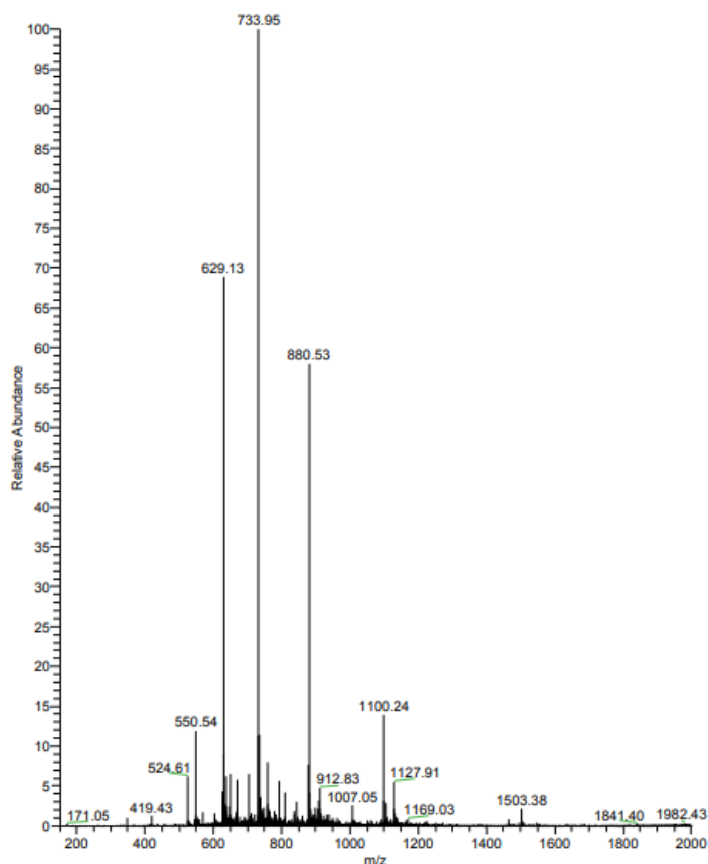
Conforme mostrado nas figuras 39 e 40, o bioconjugado foi purificado com sucesso.

Figura 39: Perfil cromatográfico do peptídeo LO2123 puro em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30min.



Fonte: Própria autora.

Figura 40: Espectro de massas do peptídeo LO2123 puro.



Fonte: Própria autora.

Com o espectro de massas do peptídeo LO2123 é possível confirmar que a purificação foi efetiva, onde, com a razão massa/carga de 1100,40Da (+4), 880,52Da (+5), 733,93 (+6), 629,23 (+7) e 550,70 (+8).

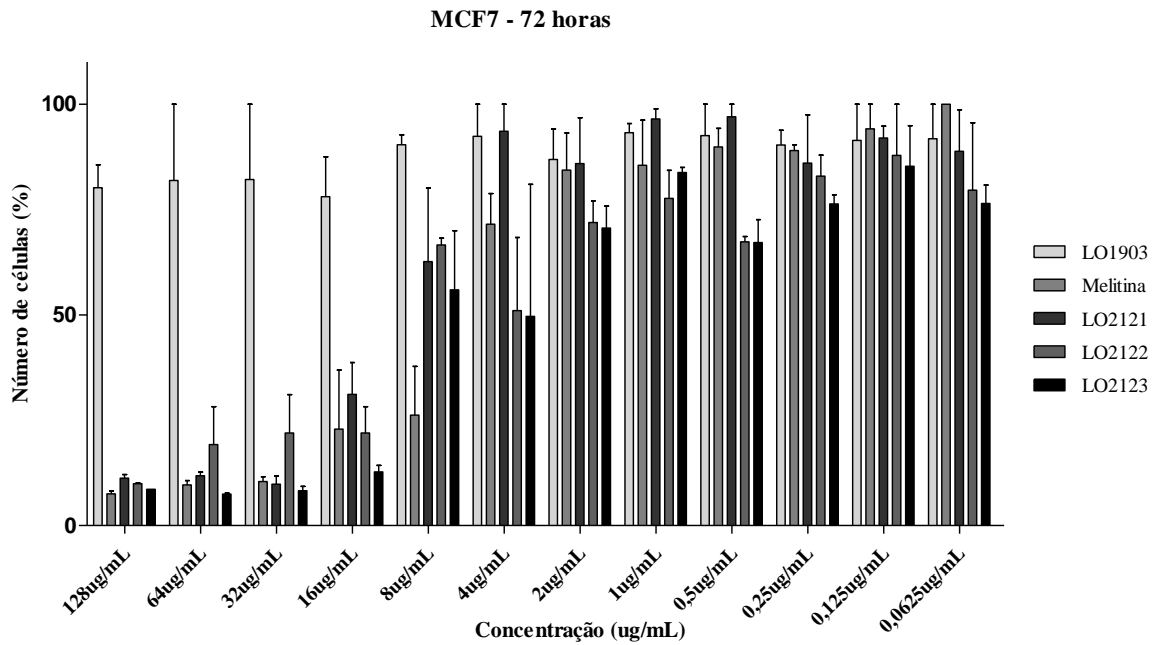
4.7 Avaliação da viabilidade celular após tratamento com os bioconjugados

Após a síntese e purificação dos bioconjugados e obtenção de um material puro, foi realizada a atividade de viabilidade celular nas linhagens A549, MRC-5 e MCF-7.

Os peptídeos utilizados foram o LO1903, Melitina, LO2121, LO2122 e LO2123. As concentrações dos peptídeos utilizadas foram 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL, 1µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL, 0,0625µg/mL. As placas foram tratadas com os peptídeos por 72 horas para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos em um período longo de exposição.

Para a linhagem MCF7, todos os bioconjugados apresentaram atividade semelhante à Melitina na concentração de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL e 16 µg/mL, dando ênfase à concentração de 16 µg/mL, onde o bioconjugado LO2123 obteve, inclusive, uma atividade maior do que Melitina (87,3% contra 77,1% da Melitina) (Figura 41).

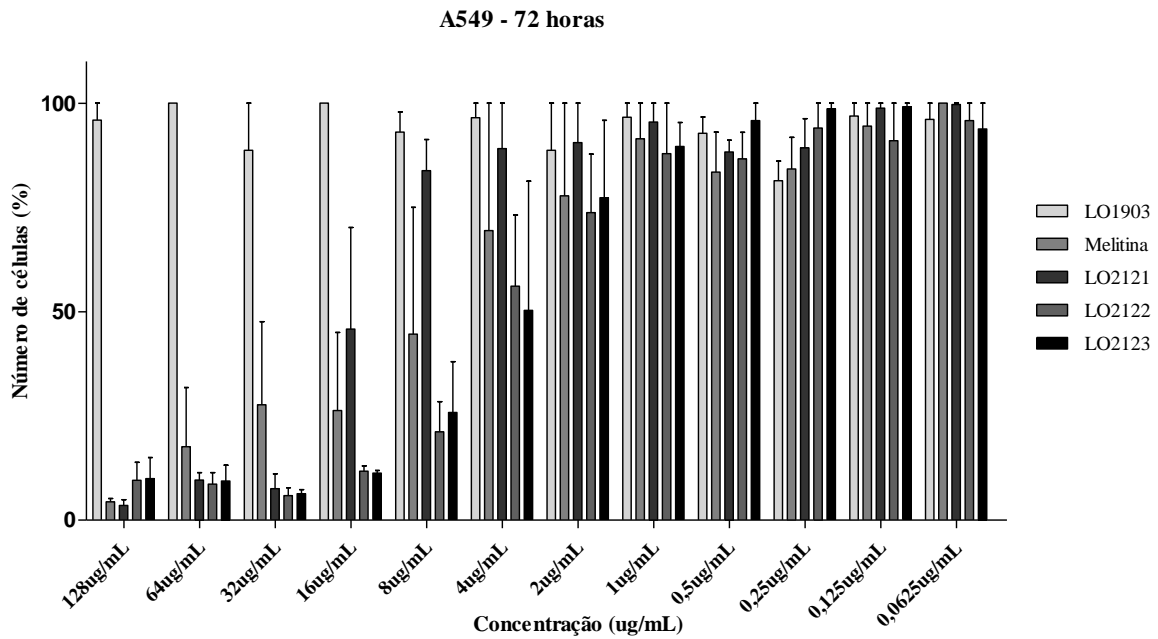
Figura 41: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF7 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.



Fonte: Própria autora.

Na linhagem A549, o bioconjugado LO2121 apresentou atividade semelhante à Melitina na concentração de 128 µg/mL, com uma citotoxicidade de 96,5% e 95,6% respectivamente. Na concentração de 64 µg/mL e 32 µg/mL todos os bioconjugados apresentaram atividade maior que a Melitina (entre 82,4% e 72,2%), onde o LO2121 apresentou uma citotoxicidade de 90,4% e 92,5%, o LO2122 de 91,4% e 94,1% e o LO2123 de 90,6% e 93,7% respectivamente. Já na concentração de 8 µg/mL os peptídeos LO2122 (78,9%) e LO2123 (74,2%) apresentaram uma maior atividade quando comparados à Melitina (55,4%), porém, o bioconjugado LO2122 mostrou-se mais ativo (Figura 42).

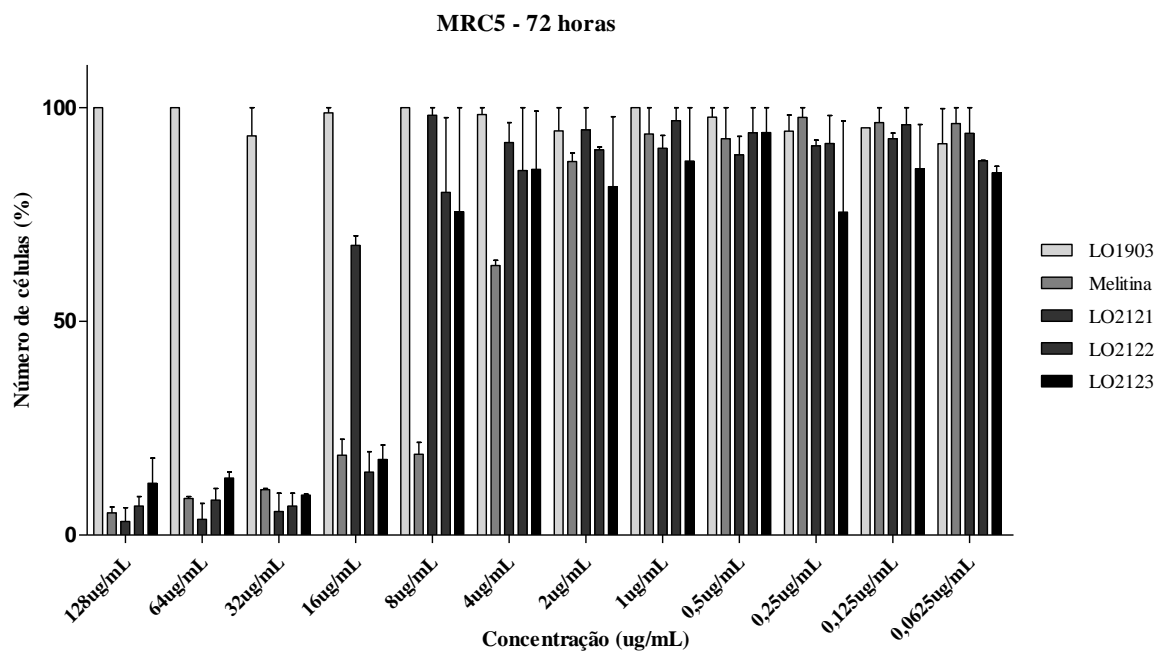
Figura 42: Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.



Fonte: Própria autora.

Já na linhagem MRC5, na concentração de 128 µg/mL o bioconjugado LO2123 apresenta uma citotoxicidade de aproximadamente 87%, menor do que a citotoxicidade da Melitina, que chega a 94,8%. Além disso, a Melitina apresenta 91,4% de toxicidade em 64 µg/mL e o LO2123 apresenta toxicidade de 86,6%. Para a concentração de 32 µg/mL o bioconjugado LO2123 apresenta uma atividade sendo semelhante a Melitina. Em 16 µg/mL, o peptídeo LO2121 apresentou menor citotoxicidade quando comparado com a Melitina e os outros bioconjugados, sendo a viabilidade celular de 67,8%. Já na concentração de 8 µg/mL, os três bioconjugados apresentaram menor citotoxicidade em relação a Melitina, de modo que o LO2121 apresentou citotoxicidade de 1,8%, LO2122 de 19,8% e LO2123 de 24,4%. O bioconjugado LO2121 apresenta uma menor citotoxicidade nessa linhagem (Figura 43).

Figura 43: Avaliação da viabilidade celular da linhagem MRC5 em 72 h de tratamento com os bioconjugados.



Fonte: Própria autora.

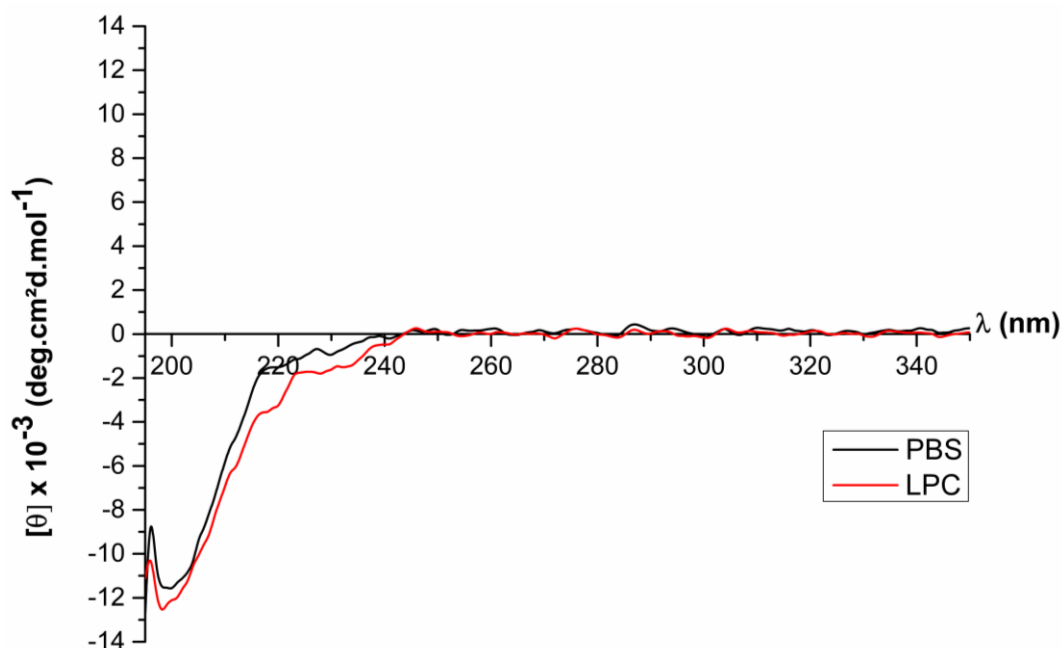
Com os resultados da viabilidade celular, é possível concluir que todos os bioconjugados apresentam potencial para trazer uma maior especificidade para a Melitina, ou seja, diminuindo sua atividade em células não tumorais e aumentando sua atividade em células tumorais. Deve-se ressaltar as concentrações 16 µg/mL e 8 µg/mL, as quais os bioconjugados apresentaram considerável atividade tóxica frente as linhagens tumorais e baixa atividade tóxica frente à linhagem MRC5 não tumoral.

4.8 Dicroísmo circular

A utilização da técnica de dicroísmo circular destina-se à determinação da estrutura secundária de peptídeos, proteínas e também ácidos nucleicos. As estruturas secundárias dos peptídeos e proteínas, tais como α -hélice, folha- β e estrutura randômica (sem uma estrutura definida), são observadas na região do far-UV (240-180 nm) (WEI et al., 2014).

Para o peptídeo LO1903 (Figura 44), os espectros obtidos na presença de tampão PBS bem como na presença de LPC, apresentaram uma estrutura em *random coil* (randômica), com banda negativa próxima em 200nm, não apresentando diferenciação em solução aquosa ou solução mimética de membrana.

Figura 44: Espectros de DC do peptídeo LO1903.

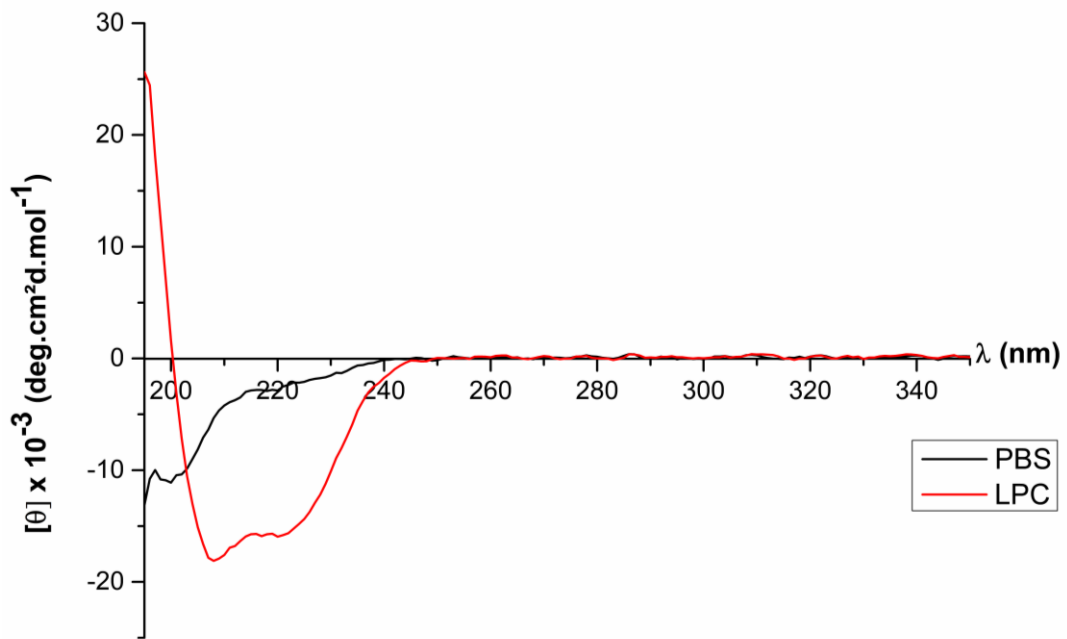


Fonte: Própria autora.

A Melitina (Figura 45) não apresentou estruturação em PBS com uma banda negativa em 200 nm, porém, na presença de LPC o peptídeo apresentou estruturação em hélice, com bandas negativas em 208 nm e 222 nm e banda positiva em 195 nm.

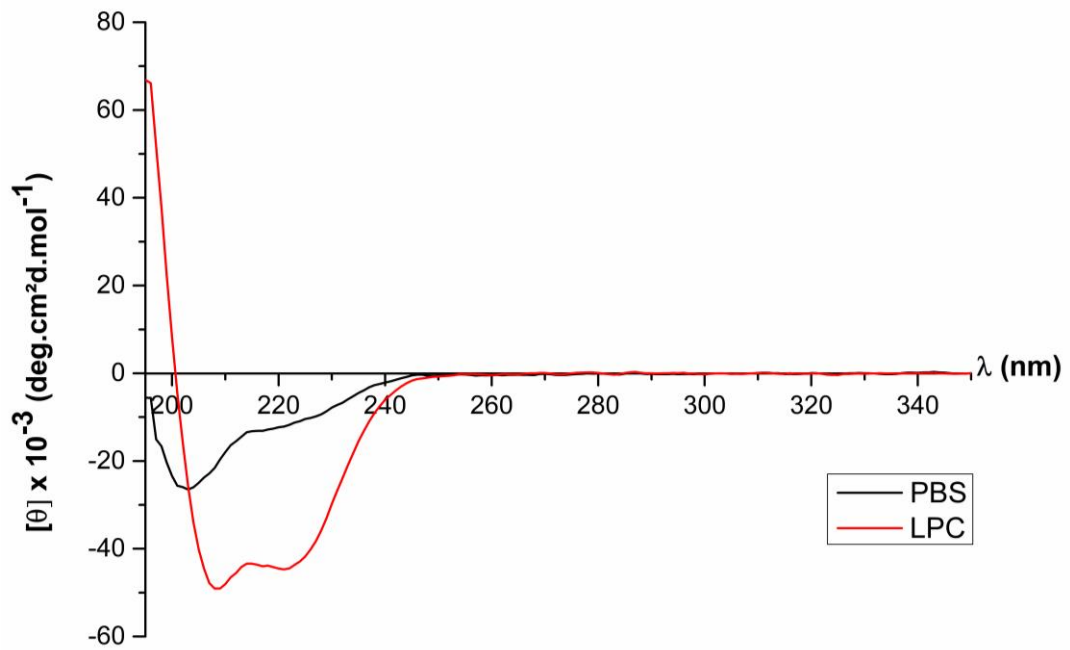
É importante apontar que a melitina é um peptídeo lítico de membrana contra uma variedade de linhagens celulares (Jamasbi, Mularski e Separovic, 2016). A estrutura da Melitina é bem característica e já foi estudada anteriormente. Os resíduos 1-20 da melitina são hidrofóbicos e os resíduos 21-26 são hidrofílicos (WESSMAN *et al.*, 2008). Em solução aquosa, a Melitina apresenta um estrutura não ordenada. Contudo, as interações hidrofóbicas com as membranas celulares induzem uma estrutura secundária em hélice. A estrutura secundária da Melitina também é afetada pela temperatura e pela presença de colesterol (LUNDQUIST *et al.*, 2008).

Figura 45: Espectros de DC da Melitina.

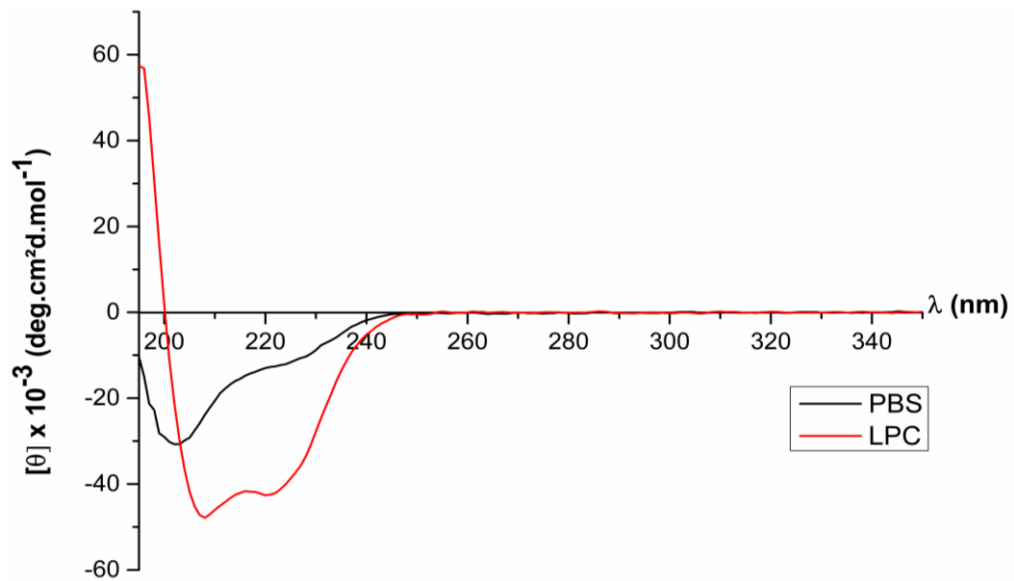


Fonte: Própria autora.

Os bioconjugados LO2121 (Figura 46), LO2122 (Figura 45) e LO2123 (Figura 46), em tampão PBS apresentaram estrutura desordenada, *random coil*, com banda negativa próxima de 200 nm. Porém, na presença de LPC, os peptídeos apresentaram uma estruturação em α -hélice, com bandas negativas em 208 nm e 222 nm e banda positiva em 195 nm. É interessante apontar que o aptâmero LO1903 apresentou estrutura desordenada em ambas as soluções. A estruturação visualizada em LPC dos bioconjugados mostra que a conjugação das moléculas não afeta a estrutura da Melitina, tampouco a atividade deste peptídeo (como visto no ensaio de viabilidade).

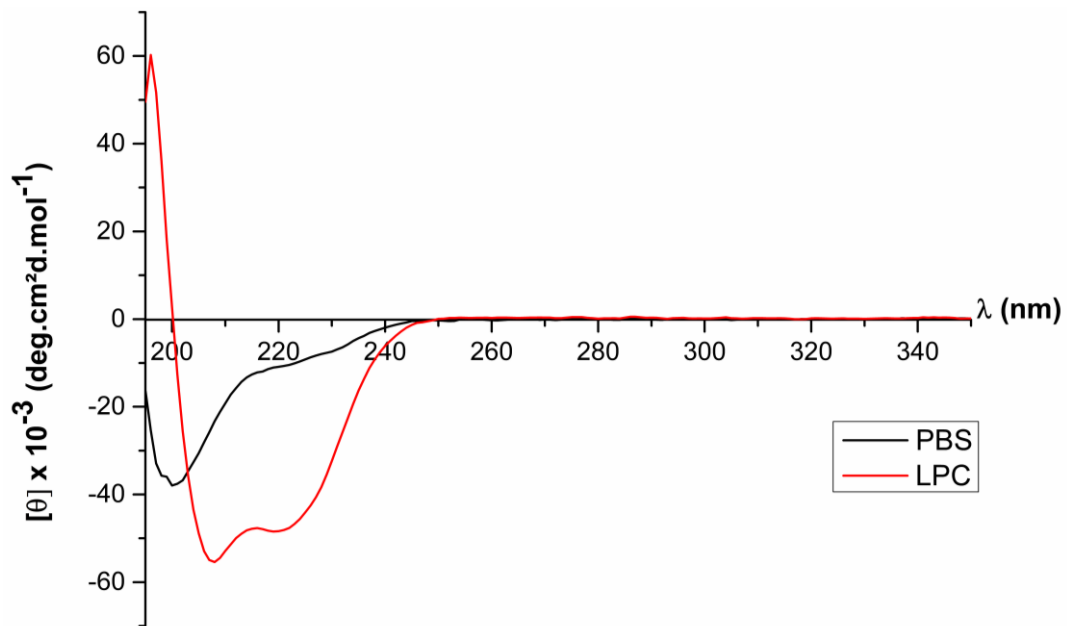
Figura 46: Espectros de DC do peptídeo LO2121.

Fonte: Própria autora.

Figura 47: Espectros de DC do peptídeo LO2122.

Fonte: Própria autora.

Figura 48: Espectros de DC do peptídeo LO2123.



Fonte: Própria autora.

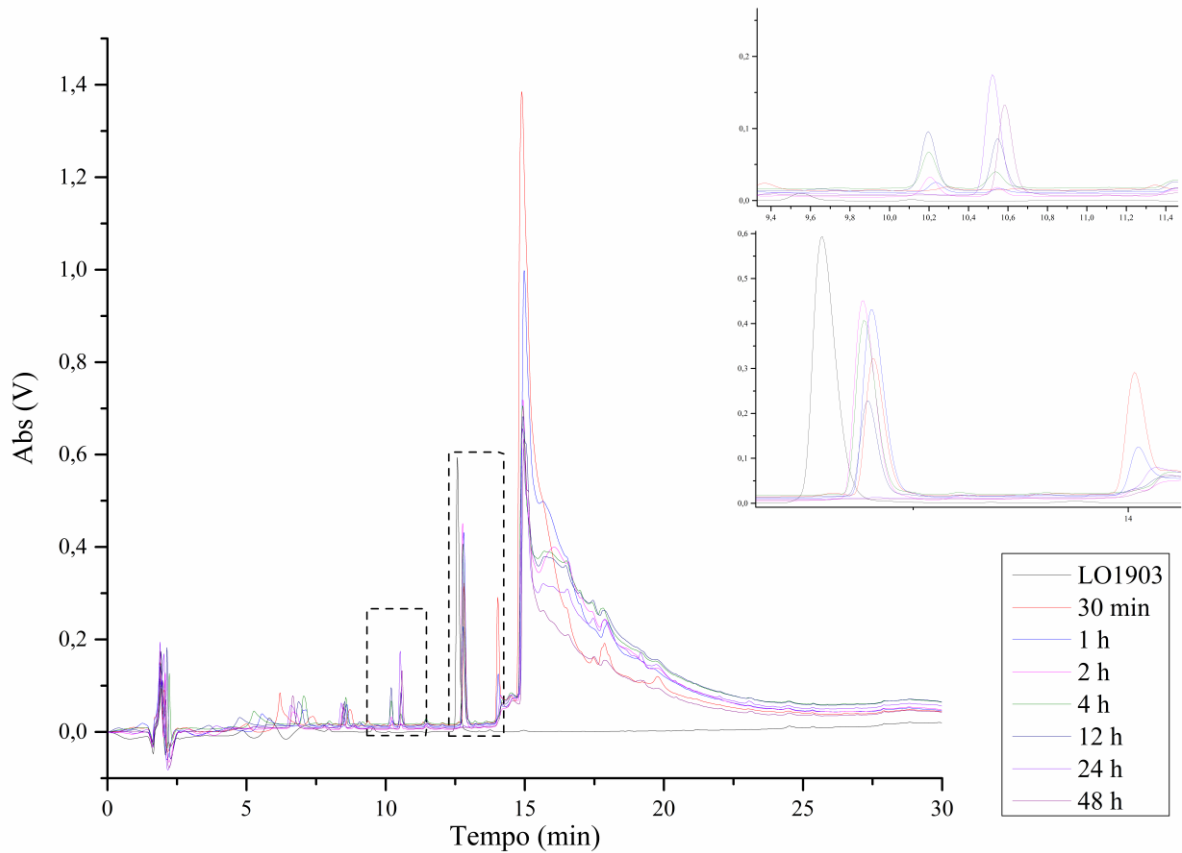
4.9 Estabilidade dos peptídeos em soro

Apesar do potencial terapêutico dos peptídeos de forma geral, eles têm algumas limitações, tais como a degradação proteolítica e baixa atividade em condições fisiológicas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2017). Devido a estas limitações, atualmente, o desenvolvimento dos peptídeos para utilização clínica tem sido limitado principalmente a aplicações tópicas (HANCOCK, SAHL, 2006). Assim, a caracterização do perfil de degradação proteolítica de moléculas com potencial utilização clínica é extremamente necessário.

Para a determinação da estabilidade dos peptídeos em soro foram realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C18. Os peptídeos foram incubados em soro humano em diferentes tempos, sendo de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.

O peptídeo LO1903 possui um tempo de retenção de 12,9 min. Após a incubação com soro humano, o peptídeo apresentou estabilidade, uma vez que a taxa de degradação seguiu de forma pouco acelerada (Figura 49, 2), com ênfase nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 12 h. Na primeira visualização (Figura 49, 1) é demonstrada a formação de produto de degradação nos tempos de 1 h, 2 h, 4 h, 24 h e 48 h. É interessante observar que após 2 horas, o peptídeo é completamente degradado.

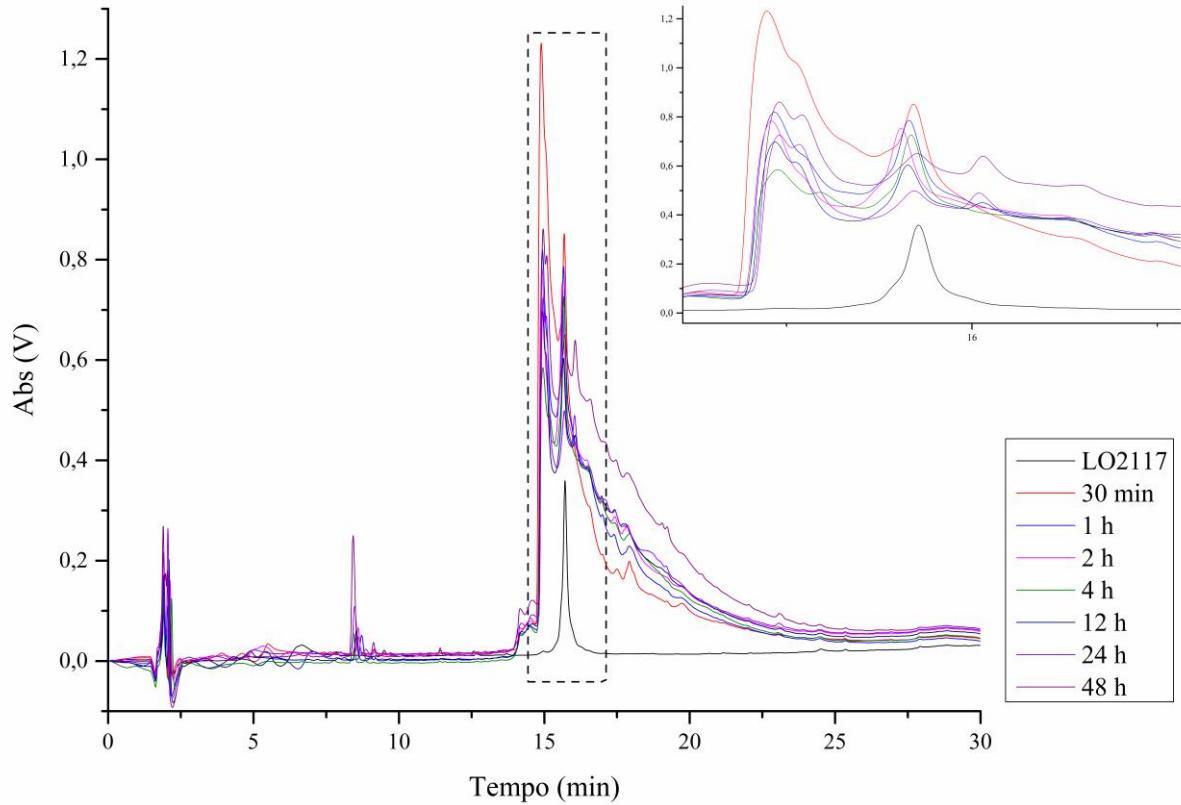
Figura 49: Estabilidade do peptídeo LO1903 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.



Fonte: Própria autora.

A Melitina (código LO2117) possui um tempo de retenção de 16,9 min e após a incubação do peptídeo em soro humano, não apresentou degradação nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h e 24 h, porém, em 48 h houve a degradação completa do peptídeo (Figura 50). Durante a degradação da Melitina não foi observado formação de produtos de degradação.

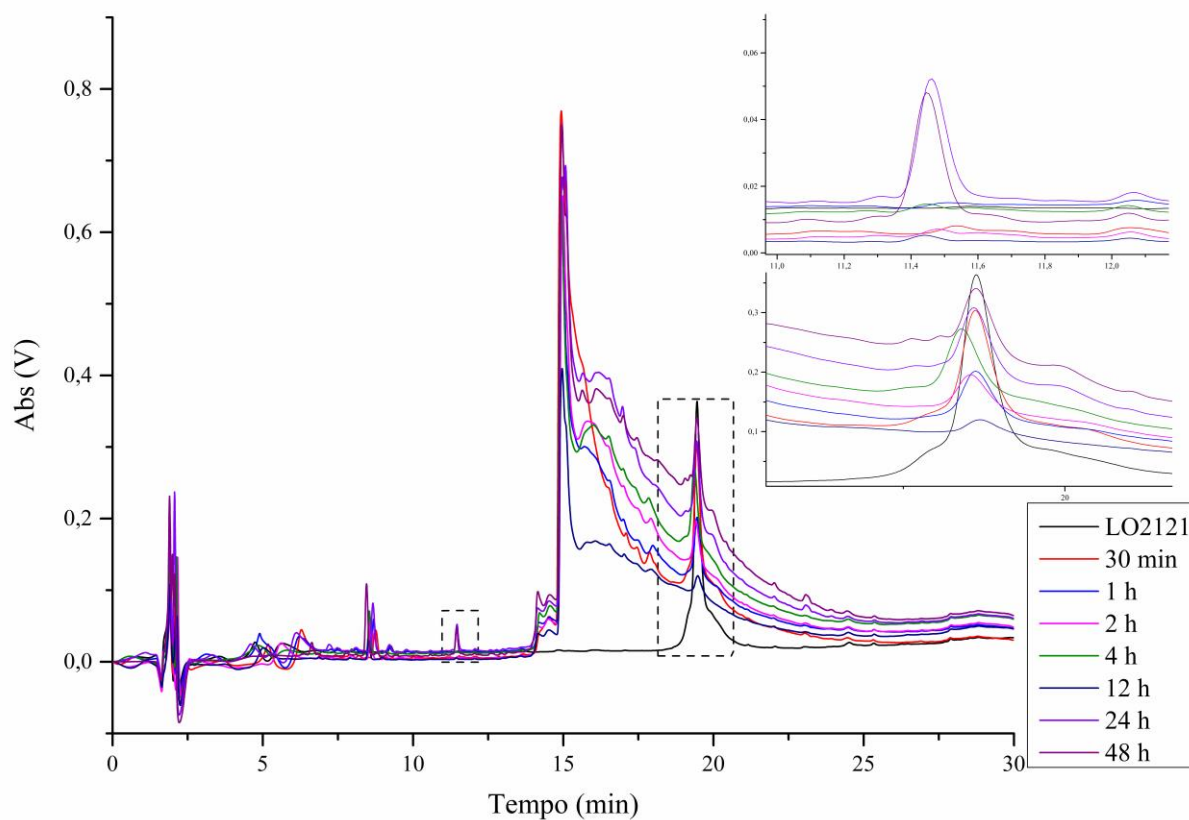
Figura 50: Estabilidade da Melitina observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.



Fonte: Própria autora.

O bioconjugado LO2121 (RT 19,07 min) não apresentou degradação após incubação em soro nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h e 24 h, porém, em 48 h houve a degradação completa do peptídeo (Figura 51, 2), mostrando um perfil semelhante ao da Melitina. Na primeira visualização (Figura 51, 1) é demonstrada a formação de produto de degradação nos tempos de 24 h e 48 h.

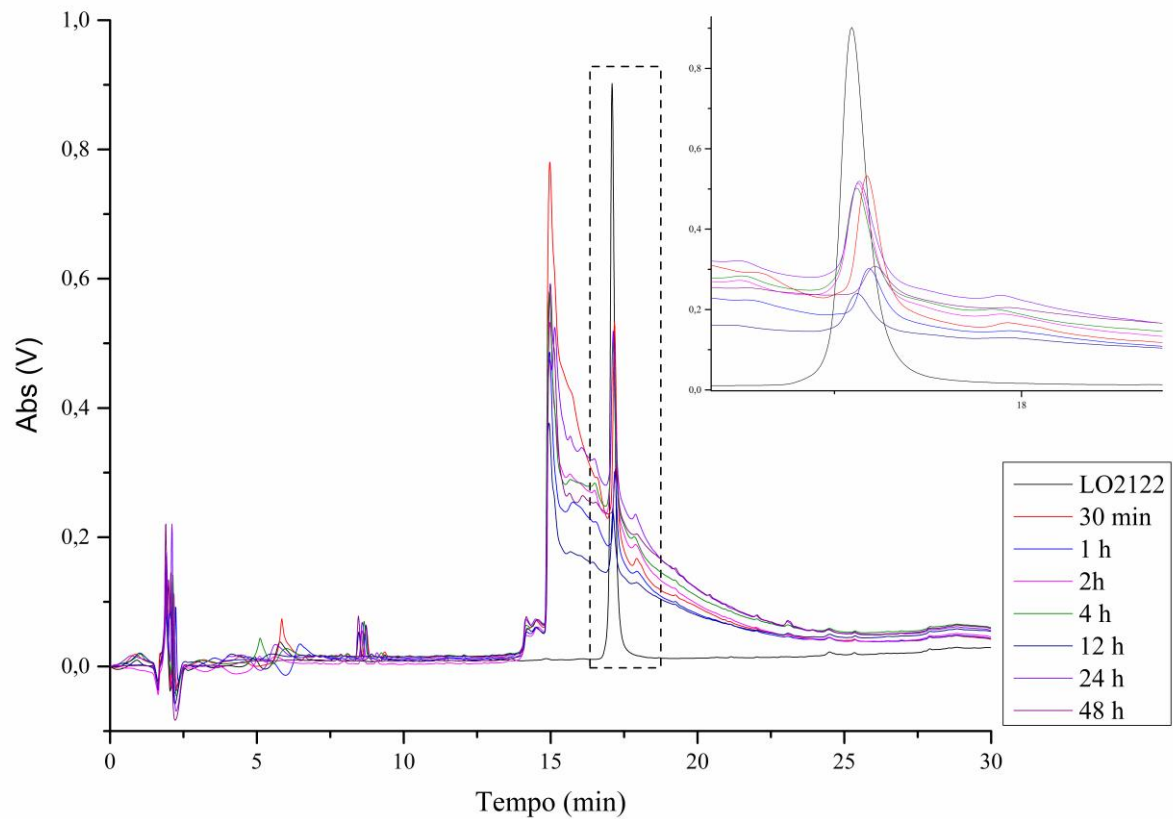
Figura 51: Estabilidade do peptídeo LO2121 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.



Fonte: Própria autora.

O bioconjugado LO2122 não apresentou degradação em nenhum intervalo de tempo (Figura 52), mostrando que a estratégia de síntese dessa molécula pode proteger contra proteases presentes no soro sanguíneo.

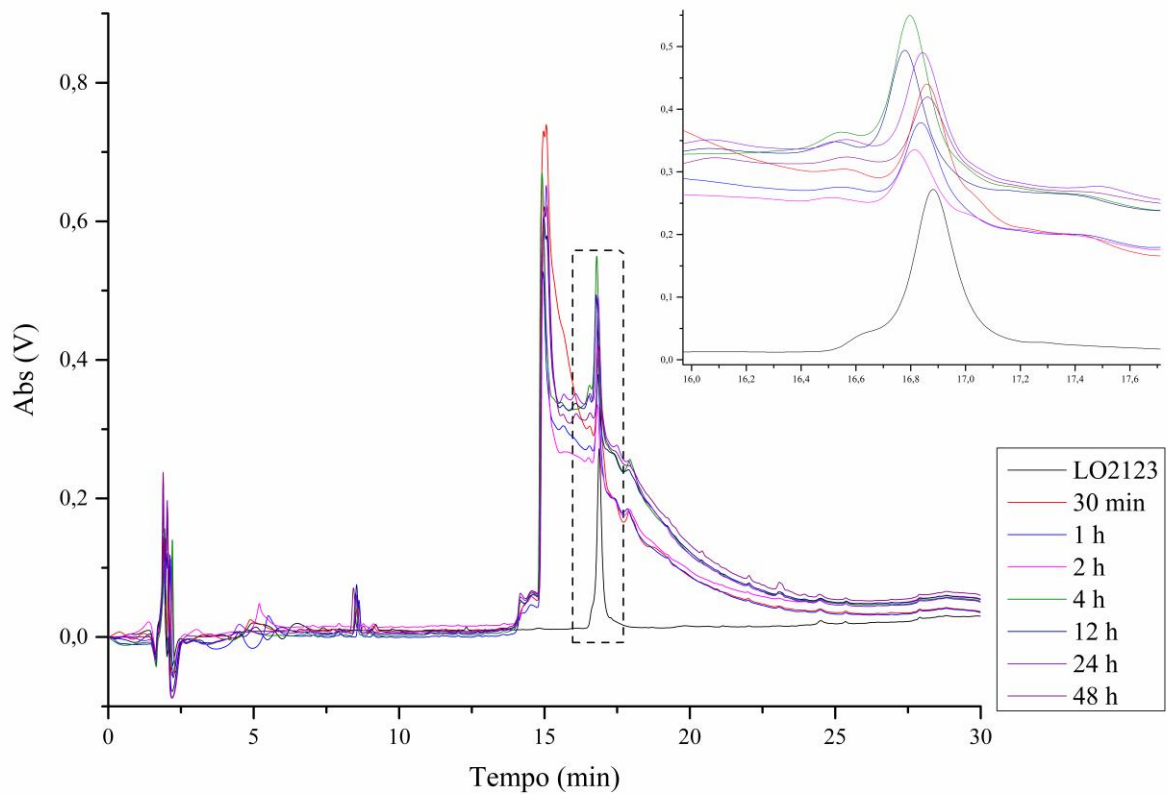
Figura 52: Estabilidade do peptídeo LO2122 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48h.



Fonte: Própria autora.

Por fim, o bioconjugado LO2123 também não apresentou degradação nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h. (Figura 51), não evidenciando a formação de produtos de degradação.

Figura 53: Estabilidade do peptídeo LO2123 observada em HPLC analítico em gradiente de 5-95% de solvente B após incubação em soro humano em 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h e 48 h.



Fonte: Própria autora.

Como citado anteriormente, a susceptibilidade de peptídeos às proteases sanguíneas é uma grande limitação em sua utilização na clínica. Com os resultados obtidos é possível observar que os bioconjugados LO2122 e LO2123 são estáveis em soro e que não sofrem degradação em diferentes intervalos de tempos. Além disso, podemos inferir dessa atividade que a conjugação de peptídeos, pode ser uma interessante estratégia para aumentar a meia vida de moléculas susceptíveis à degradação proteolítica.

5. Conclusões

Através do ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT constatou-se que os peptídeos aptâmeros não ocasionaram a morte celular nas linhagens A549, MRC-5 e MCF-7. Além disso, com o In Cell Analyzer e Citometria de fluxo é possível identificar marcações mais evidentes nas proteínas de membrana de linhagens tumorais, entre elas a MCF-7 que em células não tumorais.

A Melitina mostrou uma ação citotóxica em todas as linhagens celulares testadas, constatando a sua baixa seletividade em relação às células tumorais e não tumorais.

Espera-se que os peptídeos aptâmeros possam trazer maior especificidade e seletividade para moléculas antitumorais considerando a sua ligação em proteínas-alvo mais expressas em células tumorais do que em células normais.

Considerando que o aptâmeros LO1904 possui uma síntese mais rápida, principalmente por não necessitar a oxidação, bem como as marcações bem caracterizadas através da citometria de fluxo e os resultados na linhagem MCF7, tal molécula foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Os bioconjugados são promissores na busca por moléculas que sejam mais específicas em relação a sua ação antitumoral, de modo que o bioconjugado LO2122 apresentou uma maior citotoxicidade para as células tumorais em concentrações menores quando comparado a Melitina, enquanto que a viabilidade celular manteve-se alta na linhagem não tumoral.

É importante destacar que, quanto à degradação no soro, as moléculas LO2122 e LO2123 são estáveis e não sofrem degradação por proteases, além de inferir que a conjugação de peptídeos pode ser uma estratégia para aumentar a meia vida de moléculas que são susceptíveis à degradação proteolítica.

Como complemento, é válido destacar que a conjugação da Melitina com o aptâmeros não modifica sua estrutura secundária, muito menos sua atividade, como demonstrado nos ensaios de viabilidade celular, o que infere que os bioconjugados são moléculas que apresentam uma atividade maior em linhagens tumorais e menor em linhagens não tumorais.

Referências

ACS. **American Cancer Society**. Treatment types. 2020.

ADADE, C. M. *et al.* Melittin peptide kills Trypanosoma cruzi parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon.**, v. 69, p. 227–239, 2013.

AEBI, S. Chemotherapy--overview and future perspectives. **Breast**, v. 15 Suppl 2, p. S11-4, 2006.

AL-HAJJ, M. *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 3983–8, 2003.

ALIBOLANDI, M. *et al.* Epithelial cell adhesion molecule aptamer conjugated PEG–PLGA nanopolymerosomes for targeted delivery of doxorubicin to human breast adenocarcinoma cell line in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 241-251, 2015.

ALJABERY, F. *et al.* The expression profile of p14, p53 and p21 in tumour cells is associated with disease-specific survival and the outcome of postoperative chemotherapy treatment in muscle-invasive bladder cancer. **Urol. Oncol.**, v. 36, n. 12, p. 530, 2018.

ALLENDE, D.; SIMON, S.A.; MCINTOSH, T. J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: Evidence for toroidal pores. **Biophys. J.**, v. 88, n. 3, p. 1828-1837, 2005.

ARAVIND, A. *et al.* AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery. **Biotechnology and Bioengineering** v. 109, p. 2920-2931, 2012.

ARMBRECHT, L. *et al.* Characterization of anticancer peptides at the single-cell level. **Lab Chip**, v. 17, n. 17, p. 2933- 2940, 2017.

BAINES, I. C.; COLAS, P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug Discovery. **Drug Discov Today**, v. 11, p. 334-41, 2006.

BARTON, M. B. *et al.* Estimating the demand for radiotherapy from the evidence: a review of changes from 2003 to 2012. **Radiother Oncol.**, v. 112, n. 1, p. 140-4, 2014.

BEI, C. *et al.* Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. **J Mater Chem B.**, v. 3, n.1, p. 25–9, 2014.

BELYKH, E. *et al.* Intraoperative Fluorescence imaging for Personalized Brain Tumor Resection: Current State and Future Directions. **Front Surg.**, v. 3, n. 55, 2016.

BOOHAKER, R. J. *et al.* The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 3794–3804, 2012.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for**

clinicians., v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, p. 238–250, 2005.

BROOKS, S. A. *et al.* Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*, v. 112, p. 3-25, 2010.

CAI, Z. *et al.* Comparative effectiveness of preoperative, postoperative and perioperative treatments for resectable gastric cancer: a network meta-analysis of the literature from the past 20 years. *Surg. Oncol.*, v. 27, p. 563–574, 2018.

CALAF, G.; PONCE-CUSI, R.; ABARCA-QUINONES, J. Effect of curcumin on the cell surface markers CD44 and CD24 in breast cancer. *Oncology Reports.*, v. 39, p. 2741-2748, 2018.

CHAN, M. Y. *et al.* A randomized, repeat-dose, pharmacodynamic and safety study of an antidote-controlled factor IXa inhibitor. *J Thromb Haemost.*, v. 6, p. 789–796, 2008.

CHANG, H. Graphene fluorescence resonance energy transfer aptasensor for the thrombin detection. *Anal. Chem.*, v. 82, p. 2341–2346, 2010.

CHEN, L. *et al.* A new TAG-72 cancer marker peptide identified by phage display: *Cancer Lett.*, v. 272, p. 122-32, 2008.

CIBIEL, A.; PESTOURIE, C., DUCONGÉ, F. In vivo uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging. *Biochimie.*, v. 94, p. 1595-1606, 2012.

CÍCERO, A. F. G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review. *Br. J. Pharmacol.*, v. 174, p. 1378-1394, 2017.

COLLINS, A. T. *et al.* Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research.*, v. 65, n. 23, p. 10946–10951, 2005.

CRUSCA, E. *et al.* Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. *Biopolymers*. V. 96, p. 41-48, 2011.

DELAC, M. *et al.* Aptamer for imaging and therapeutic targeting of brain tumor glioblastoma. *Cytometry A.*, v. 87, n. 9, p. 806-810, 2015.

Development Therapeutics Program (DTP). **National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis**. 2021.

DIAO, Y. *et al.* Designed synthetic analogs of the alpha-helical peptide temporin-La with improved antitumor efficacies via charge modification and incorporation of the integrin alphavbeta3 homing domain. *J. Pept. Sci.*, v. 18, p. 476–486, 2012.

DO, N. *et al.* Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. **Exp. Dermatol.**, v. 23, p. 326–331, 2014.

DONG, T. T.; TIAN, Z. G.; WANG, J. H. Relationship between structural parameters and functional activity of α -helical antimicrobial peptides. **Chin. Biotechnol.**, v. 27, p. 116–119, 2007.

DOUGHERTY, C.A.; CAI, W.; HONG, H. Applications of aptamers in targeted imaging: State of the art. **Curr. Top. Med. Chem.** V. 15, p. 1138-1152, 2015.

ESG, Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: Phase II study results. **Ophthalmology**. v. 110, p. 979-986, 2003.

FELÍCIO, M. R. *et al.* Peptides with dual antimicrobial and anticâncer activities. **Front Chem.**, v. 21, n. 5, p. 5, 2017.

FERNANDEZ, D. I. *et al.* The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. **Phys Chem Chem Phys**, v. 14, p. 15739, 2012.

FOROUZANFAR, M. H. *et al.* Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study, **GBD**, 2013.

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 697-705, 2013.

GAO, D. *et al.* Melittin induces NSCLC apoptosis via inhibition of miR-183. **Oncotargets Ther.** v. 11, p. 4511–4523, 2018.

GBD 2015. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet.**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.

GEE, K.; KRYWORUCHKO, M.; KUMAR, A. Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 52, p. 13-26, 2004.

GNIAZDOWSKA, E. *et al.* ^{99m}Tc -labeled vasopressin peptide as a radiopharmaceutical for small-cell lung cancer (SCLC) diagnosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5986–5994, 2014.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol. Pathol.**, v. 52, p. 189-196, 1999.

GUO, J. *et al.* Aptamer-functionalized PEG–PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. **Biomaterials**, v. 32, p. 8010-8020, 2011.

HAIN, N.; GALLEGO, M.; REVIKINE, I. Unraveling supported lipid bilayer

- formation kinetics: Osmotic effects. **Langmuir**, v. 29, n. 7, p. 2282-2288, 2013.
- HAN, J. S.; CROWE, D. L. Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines. **Int J Oncol.**, v. 34, p. 1449-1453, 2009.
- HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.
- HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol.**, v. 24, n. 12, p. 1551-7, 2006.
- HAO, X. *et al.* TAT modification of α -helical anticancer peptides to improve specificity and efficacy. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.
- HARRIS, F. *et al.* On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. **Med Res Rev.**, v. 33, p. 190-234, 2013.
- HEINEN, T. E.; VEIGA, A. B. G. Arthropod venoms and cancer. **Toxicon.**, v. 57, p. 497-511, 2011.
- HILL, A. *et al.* Cortactin underpins CD44-promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. **Oncogene.**, v. 25, n. 45, p. 6079-91, 2006.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.
- HU, C. *et al.* Design and Modification of Anticancer Peptides. **Drug Des.**, v. 5, p. 138, 2016.
- HUANG, Y. F. *et al.* Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. **Chem Bio Chem.**, v. 10, p. 862-868, 2009.
- HUIZENGA, D. E.; SZOSTAK, J. W. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. **Biochemistry**, v. 34, p. 656-665, 1995.
- IRUDAYAM, S. J.; BERKOWITZ, M. L. Influence of the arrangement and secondary structure of melittin peptides on the formation and stability of toroidal pores. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1808, n. 9, p. 2258-2266, 2011.
- IWAMA, T. *et al.* Vaccination with liposome-coupled glypican-3-derived epitope peptide stimulates cytotoxic T lymphocytes and inhibits GPC3-expressing tumor growth in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 469, n. 138-143, 2016.
- JAMASBI, E.; MULARSKI, A.; SEPAROVIC, F. Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 40-45, 2016.
- JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clin Chem.**, v. 45, n. 9, p. 1628-1650, 1999.

JHAVERI, S. D. Designed signaling aptamers that transduce molecular recognition to changes in fluorescence intensity. **J. Am. Chem. Soc.** v. 122, p. 2469-2473, 2000.

JO, M. *et al.* Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 258, p. 72–81, 2012.

KANG, D. *et al.* Selection of DNA aptamers against glioblastoma cells with high affinity and specificity. **PLoS One**, v. 7, n. 10, 2012.

KANG, S. J. *et al.* Antimicrobial Peptides: Their Physicochemical Properties and Therapeutic Application, **Archives of Pharmacal Research**. v. 35, n. 3, p. 409-13, 2012.

KARAN, D. *et al.* Expression of tumor-associated glycoprotein-72 (TAG-72) antigen in human prostatic adenocarcinomas. **Oncology Reports**. v. 8, p. 1123-1126, 2001.

KATILIUS, E.; KATILIENE, Z.; WOODBURY, N. W. Signaling aptamers created using fluorescent nucleotide analogues. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 6484–6489, 2006.

KEEFE, A. D.; PAI, S., ELLINGTON, A. Aptamers as therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 9, p. 537–550, 2010.

KLOCEK, G.; SEELING, J. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. **Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 2841-2849, 2008.

KOKOT, G.; MALLY, M.; SVETINA, S. The dynamics of melittin-induced membrane permeability. **Eur. Biophys. J.**, v. 41, n. 5, p. 461-474, 2012.

KREEGER, P. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Cancer systems biology: a network modeling perspective. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 2-8, 2010.

LEE, M.T. *et al.* Process of inducing pores in membranes by melittin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

LERGA, T. M.; O'SULLIVAN, C. K. Rapid determination of total hardness in water using fluorescent molecular aptamer beacon. **Anal. Chim. Acta**. v. 610, p. 105–111, 2008.

LI, C. *et al.* Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. **Cancer Research.**, v. 67, n. 3, p. 1030–1037, 2007.

LI, J. *et al.* Peptide aptamers with biological and therapeutic applications. **Curr Med Chem.**, v. 18, p. 4215-22, 2011.

LI, L. *et al.* Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1083-1096, 2014.

LI, X.; ZHAO, Q.; QIU, L. Smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. **J. Controlled Release**, v. 171, p. 152, 2013.

LI, Z. J. *et al.* A novel peptide specifically targeting the vasculature of orthotopic colorectal cancer for imaging detection and drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 3, p. 292–302, 2010.

LIU, C. C. *et al.* Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 78, n. 6, p. 1113–30, 2016.

LOHMULLER, J.; FINN, O. J. Current modalities in cancer immunotherapy: Immunomodulatory antibodies, CARs and vaccines. **Pharmacol Ther.**, v. 178, p. 31–47, 2017.

LU, M.; SU, Y. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: The past, the present, and the future. **Thorac Cancer**, v. 10, n. 4, p. 585–586, 2019.

LUNDQUIST, A. *et al.* Melittin–lipid interaction: A comparative study using liposomes, micelles and bilayer disks. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1778, n. 10, p. 2210–2216, 2008.

LUO, Q. *et al.* Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. **Cancer Lett.** v. 454, p. 191–203, 2019.

MA, Y. *et al.* Peptide-aptamer co-assembly nanocarrier for cancer therapy. **Bioconjugate Chemistry**. v. 30, p. 536–540, 2019.

MAHER, S. *et al.* Impact of amino acid replacements on in vitro permeation enhancement and cytotoxicity of the intestinal absorption promoter, melittin. **Int. J. Pharm.**, v. 387, n. 1–2, p. 154–160, 2010.

MALLICK, I.; WALDRON, J. N. Radiation therapy for head and neck cancers. **Semin Oncol Nurs**, v. 25, p. 193–202, 2009.

MARANGONI, E. *et al.* CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. **Br. J. Cancer**, v. 100, p. 918–922, 2009.

MARGUS, S. PIROGOVA, E.; PIVA, T. J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. **J Biomed Sci.**, v. 24, n.1, p. 21–36, 2017.

MARHABA, R.; ZÖLLER, M. CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. **J Mol Histol.**, v. 35, p. 211–231, 2004.

MARRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149–2154, 1963.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences.

Biochim Biophys Acta, v. 1805, p. 105-17, 2010.

MASCINI, M.; PALCHETTI, I.; TOMBELLI, S. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 51, p. 1316–1332, 2012.

MAYER, G. The chemical biology of aptamers. **Angew.Chem.**, v. 48, p. 2672–2689, 2009.

MIN, K. *et al.* Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (–) prostate cancers. **Biomaterials**, v. 32, p. 2124-2132, 2011.

MOORE, G. E. *et al.* The clinical use of fluorescein in neurosurgery; the localization of brain tumors. **J. Neurosurg.**, v. 5, v. 4, p. 392–8, 1948.

MY *et al.* Phase 1b randomized study of antidote-controlled modulation of factor IXa activity in patients with stable coronary artery disease. **Circulation.**, v. 117, p. 2865–2874, 2008.

NABAVINIA, M. *et al.* Anti-MUC1 aptamer: A potential opportunity for cancer treatment. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 6, p. 1518–1539, 2017.

NAOR, D. *et al.* CD44 in Cancer. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 39, p. 527–579, 2002.

NIMJEE, S. M. *et al.* Aptamers as therapeutics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 57, p. 61–79, 2017.

NOBUOKA, D. *et al.* Peptide vaccines for hepatocellular carcinoma. **Hum. Vacc. Immunotherapeut.**, v. 9, p. 210–212, 2013.

NURGALI, K.; JAGOE, R.T.; ABALO, R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? **Front Pharmacol.**, v. 9, p. 245, 2018.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Folha informativa – **Câncer**. Organização Mundial da Saúde. 2018.

ORSOLIC, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 1-2, p. 173-94, 2012.

PAN, X.; XU, J.; JIA, X. Research progress evaluating the function and mechanism of antitumor peptides. **Cancer Manag. Res.**, v. 12, p. 397–409, 2020.

PARK, H. Y. *et al.* Screening of peptides bound to breast cancer stem cell specific surface marker CD44 by phage display: **Mol Biotechnol**, v. 51, p. 212-20, 2012.

PEYRESSATRE, M. *et al.* Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to Peptide inhibitors. **Cancers**, v. 7, p. 179-237, 2015.

PLUMMER, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a

- synthetic analysis. **Lancet Glob Health**, v. 4, n. 9, p. 609-16, 2016.
- PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4, p. 33- 45, 2003.
- POWELL GRAY, B. *et al.* Tunable cytotoxic aptamer-drug conjugates for the treatment of prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 115, n. 18, p. 4761-4766, 2018.
- QI, G. B. *et al.* Self-Assembled Peptide-Based Nanomaterials for Biomedical Imaging and Therapy. **Adv. Mater.** v. 30, 2018.
- QIAN, C. Y. *et al.* Triple-controlled oncolytic adenovirus expressing melittin to exert inhibitory efficacy on hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 8, n. 9, p. 10403, 2015.
- QIAN, C. Y. *et al.* Triple-controlled oncolytic adenovirus expressing melittin to exert inhibitory efficacy on hepatocellular carcinoma. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, p. 10403–10411, 2015.
- QIAO, X.; WANG, Y.; YU, H. Progress in the mechanisms of anticancer peptides. **Chin. J. Biotechnol.**, v. 35, p. 1391–1400, 2019.
- RABBANI-CHADEGANI, A. *et al.* An in vitro study on the effect of vinca alkaloid, vinorelbine, on chromatin histone, HMGB proteins and induction of apoptosis in mice non-adherent bone marrow cells. **Drug Chem Toxicol**, v. 38, n. 2, p. 220-6, 2015.
- RADOM, F. *et al.* Aptamers: Molecules of great potential. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1260-1274, 2013.
- RADY, I. *et al.* Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. **Cancer Lett.**, v. 402, p. 16-31, 2017.
- RAUCHER, D.; RYU, J. S. Cell-penetrating peptides: Strategies for anticancer treatment. **Trends Mol Med.**, v. 21, p. 560-570, 2015.
- RICHARDSON, G. D. *et al.* CD133: a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. **J Cell Sci.**, v. 117, p. 3539–45, 2004.
- ROTHENBERG, M. L. *et al.* A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. **Annals of Oncology**, v. 7, n. 4, p. 347–353, 1996.
- ROZEK, T. *et al.* The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*: the solution structure of aurein 1.2. **Eur J Biochem.**, v. 267, p. 5330–5341, 2000.
- RUSCKOWSKI, M., S. *et al.* Evidence of specificity of radiolabeled phage display peptides for the TAG-72 antigen: **Cancer Biother Radiopharm**, v. 22, p. 564-72, 2007.
- SANTOS-FILHO, N. A. *et al.* Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and

alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX-I. **Peptide Science**. 2021.

SAUTER, A. *et al.* Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Int. J. Oncol.**, v. 30, p. 927-935, 2007.

SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **Eur. J. Pharmacol.** v. 625, p. 190–194, 2009.

SHI, W. *et al.* Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, p. 5059–5067, 2016.

SISA, K. H. T. *et al.* Bee venom induces apoptosis and suppresses matrix metalloproteinase-2 expression in human glioblastoma cells. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 27, p. 324–328, 2017.

SKALICHOVA, S. *et al.* Perspective of use of antiviral peptides against virus. **Viruses.**, v. 7, p. 5428–5442, 2015.

SOMAN, N. R. *et al.* Synthesis and characterization of stable fluorocarbon nanostructures as drug delivery vehicles for cytolytic peptides. **Nano Lett.**, v. 8, p. 1131–1136, 2008.

SONG, K. M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. **Sensors**, v. 12, n. 1, p.612-631, 2012.

SUN, D. The anticancer potency and mechanism of a novel tumor-activated fused toxin, DLM. **Toxins.**, v. 7, n. 2, p. 423-438, 2015.

SUN, H. *et al.* Oligonucleotide Aptamers: new tools for targeted cancer therapy. **Mol. Ther. Nuc. Ac.**, v.3, 2014.

SUNDARAM, P. *et al.* Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 48, p. 259–271, 2013.

THIBAUT, J. *et al.* A novel assay for the detection of anti-human platelet antigen antibodies (HPA-1a) based on peptide aptamer technology. **Haematologica**, v. 97, p. 696-704, 2012.

THUNDIMADATHIL, J. Cancer treatment using peptides: Current therapies and future prospects. **J Amino Acids**, 2012.

TIJINK, B. M. *et al.* A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 6064-6072, 2016.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TU, W. C. *et al.* Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. **Toxicon**, v. 52, p. 318–329, 2008.

TYAGI, A. *et al.* CancerPPD: A database of anticancer peptides and proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, 015.

VESUNA, F. *et al.* Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. **Neoplasia**, v. 11, p. 1318-1328, 2009.

VLIEGHE, P. *et al.* Synthetic therapeutic peptides: Science and market. **Drug Discov Today**, v. 15, p. 40-56, 2010.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res.**, v.44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

WANG, S.; JIA, M. Antibody Therapies in Cancer. In: ZHANG, S. **Progress in Cancer Immunotherapy**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016.

WANG, X. *et al.* Melittin-induced long non-coding RNA NONHSAT105177 inhibits proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cell Death Dis.**, v. 9, p. 940, 2018.

WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A.; LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2331-2337, 2014.

WESSMAN, P. *et al.* Melittin-lipid bilayer interactions and the role of cholesterol. **Biophys. J.**, v. 95, n. 9, p. 4324-4336, 2008.

WHITEMAN, D. C. *et al.* Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors: summary and conclusions. **Aust. N. Z. J. Public Health**, v. 39, p. 477-484, 2015.

WHITEMAN, D. C.; WHITEMAN, L. F. WILSON, C. M. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: a global review. **Cancer Epidemiol.**, v. 44, p. 203-221, 2016.

WHITNEY, M. A. *et al.* Fluorescent peptides highlight peripheral nerves during surgery in mice. **Nat Biotechnol.**, v. 29, n. 4, p. 352–6, 2011.

WHO. World Health Organization. 2021.

WIJAVA, C. A; MUCHTARIDI, M. Cancer treatment through gen therapy. **Farmaka**, v. 2, n. 1, p. 53-5, 2017.

WU, X. *et al.* Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy.

Theranostics, v. 5, n. 4, p. 322–344, 2015.

XU, H. *et al.* The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. **Onco Targets Ther.**, v. 8, p. 3783-92, 2015.

XU, X.; LAI, R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. **Chemical Reviews.**, v. 115, n. 4, p. 1760-846, 2015.

YAN, A, LEVY, M. Cell internalization SELEX: In vitro selection for molecules that internalize into cells. **Methods Mol Biol.**, v. 1103, p. 241–265, 2014.

YANG, E.J. *et al.* Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **J. Neuroinflammation.**, v. 8, n. 1, p. 69-77, 2011.

YAVARI, B. *et al.* The Potential Use of Peptides in Cancer Treatment. **Cur Protein Peptide Sci.**, v. 19, n. 8, p. 759–70, 2018.

YIN, H. *et al.* iRGD as a tumor-penetrating peptide for cancer therapy (Review). **Mol Med Rep**, v. 15, n. 5, p. 2925- 2930, 2017.

YU, W D. *et al.* Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. **Cancer Lett.**, v. 452, p. 66–70, 2019.

YÜCE, M.; ULLAH, N.; BUDA, K. H. Trends in aptamer selection methods and applications. **Analyst.**, v. 140, n. 16, p. 5379–5399, 2015.

ZARRINNAHAD, H. *et al.* Apoptotic effect of melittin purified from iranian honey bee venom on human cervical cancer Hela cell line. **Int. J. Pept. Res. Ther.**, v. 24, p. 563–570, 2018.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nat.** v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, B. *et al.* Serological antibodies against LY6K as a diagnostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. **Biomarkers**, v. 17, n. 4, p. 372–378, 2012.

ZHANG, Y.; HONG, H.; CAI, W. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 4185–4194, 2011.

ZHU, J. *et al.* Progress in aptamer-mediated drug delivery vehicles for cancer targeting and its implications in addressing chemotherapeutic challenges. **Theranostics**, v. 4, p. 931-944, 2014.

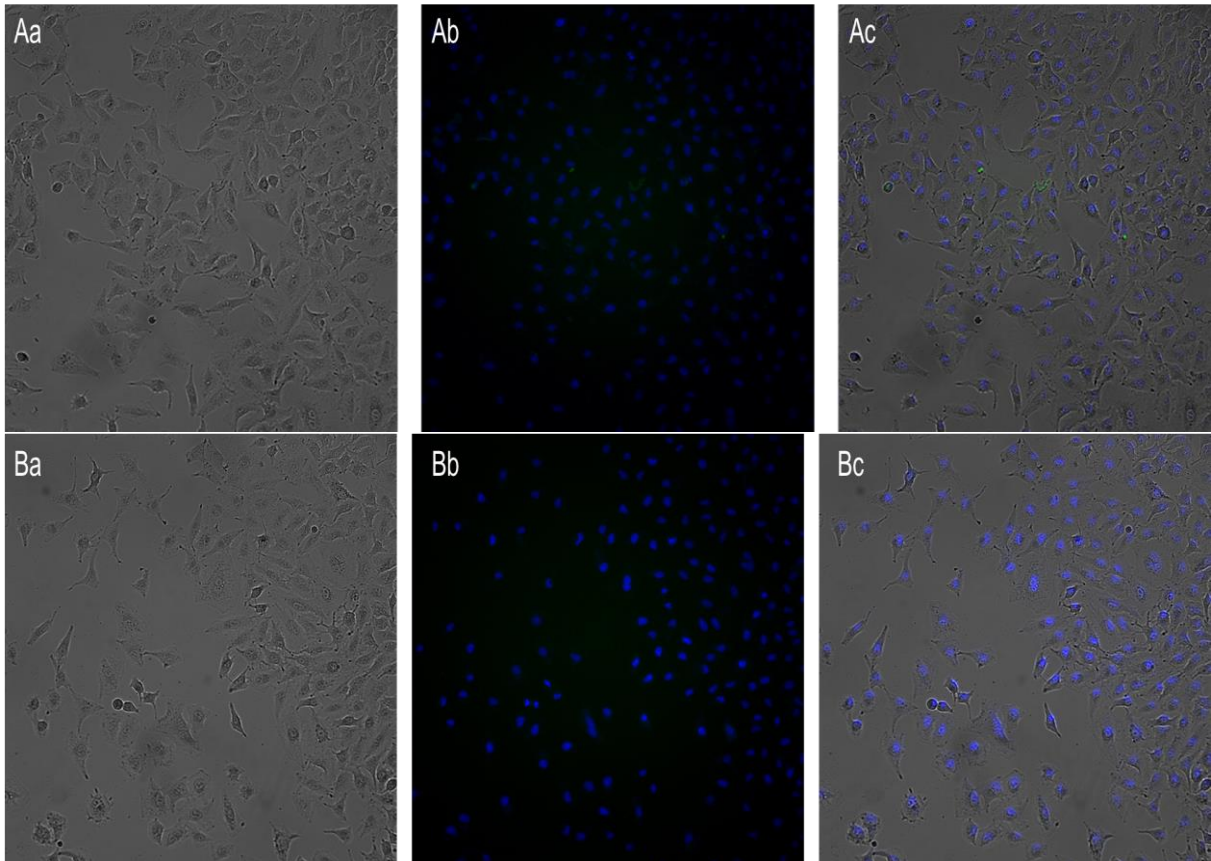
ZOLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat. Rev. Cancer.**, v. 11, p. 254-267, 2011.

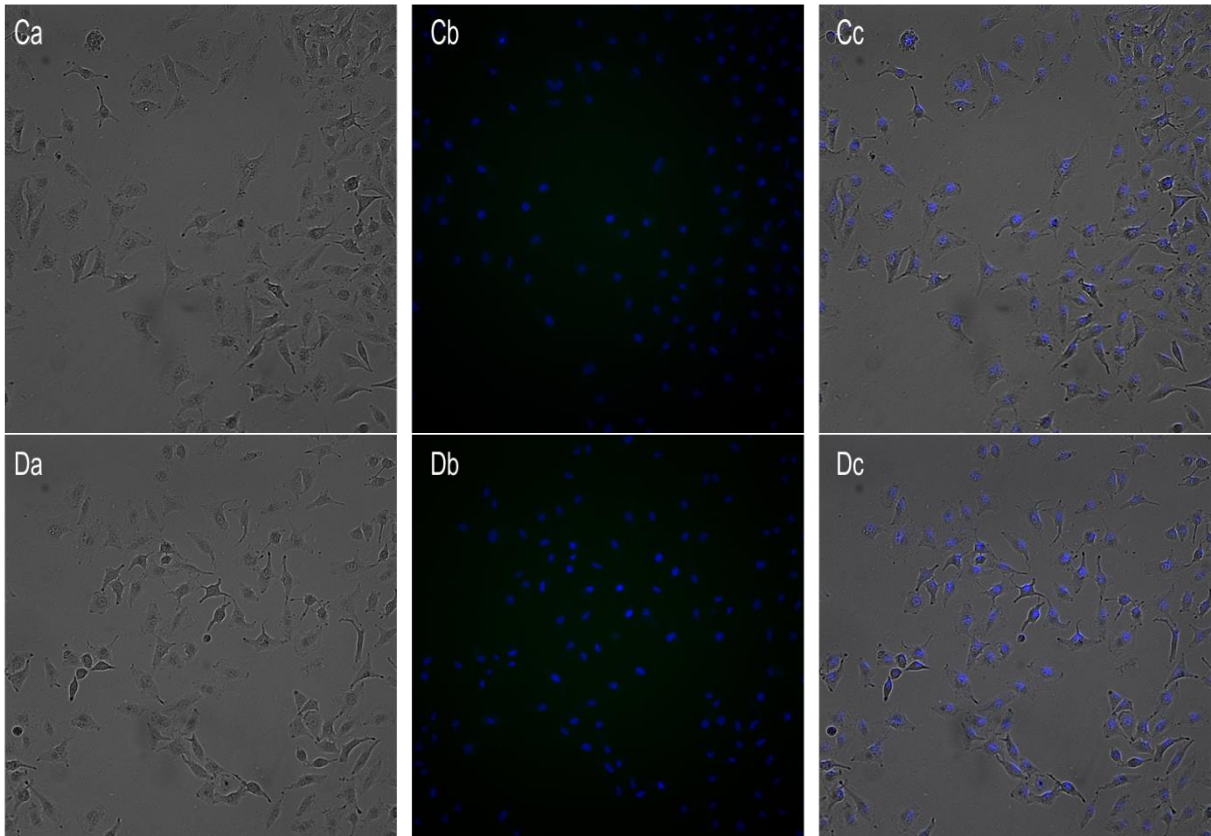
ZOU, W.; WOLCHOK, J. D.; CHEN, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations. **Sci Transl Med.**, v. 8:328, 2016.

APÊNDICE A - Microscopia automática para análise em In Cell Analyzer de placas de cultura das linhagens A549, MRC5 e MCF7

1 Linhagem A549

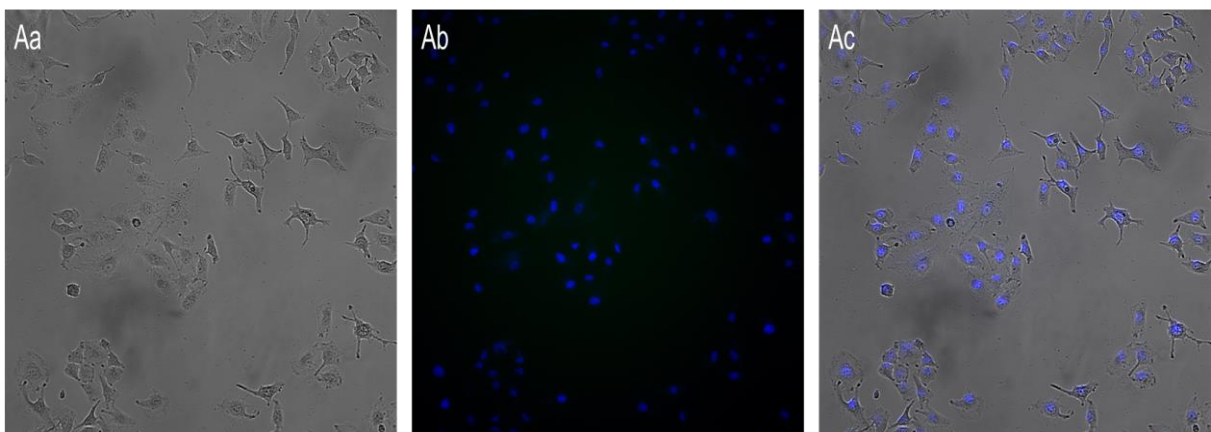
1.1 Microscopia automática para análise de placas de cultura da linhagem A549 para o peptídeo LO1904. Campo claro em $32\mu\text{g/mL}$ (Aa). Marcação do peptídeo em diluição $32\mu\text{g/mL}$ no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo em diluição $32\mu\text{g/mL}$ (Ac). Campo claro da linhagem em $4\mu\text{g/mL}$ (Ba). Marcação do peptídeo em diluição $4\mu\text{g/mL}$ no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo em diluição $4\mu\text{g/mL}$ (Bc). Campo claro da linhagem em $0,5\mu\text{g/mL}$ (Ca). Marcação do peptídeo em diluição $0,5\mu\text{g/mL}$ no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo em diluição $0,5\mu\text{g/mL}$ (Cc). Campo claro da linhagem em $0,0625\mu\text{g/mL}$ (Da). Marcação do peptídeo em diluição $0,0625\mu\text{g/mL}$ no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo em diluição $0,0625\mu\text{g/mL}$ (Dc).

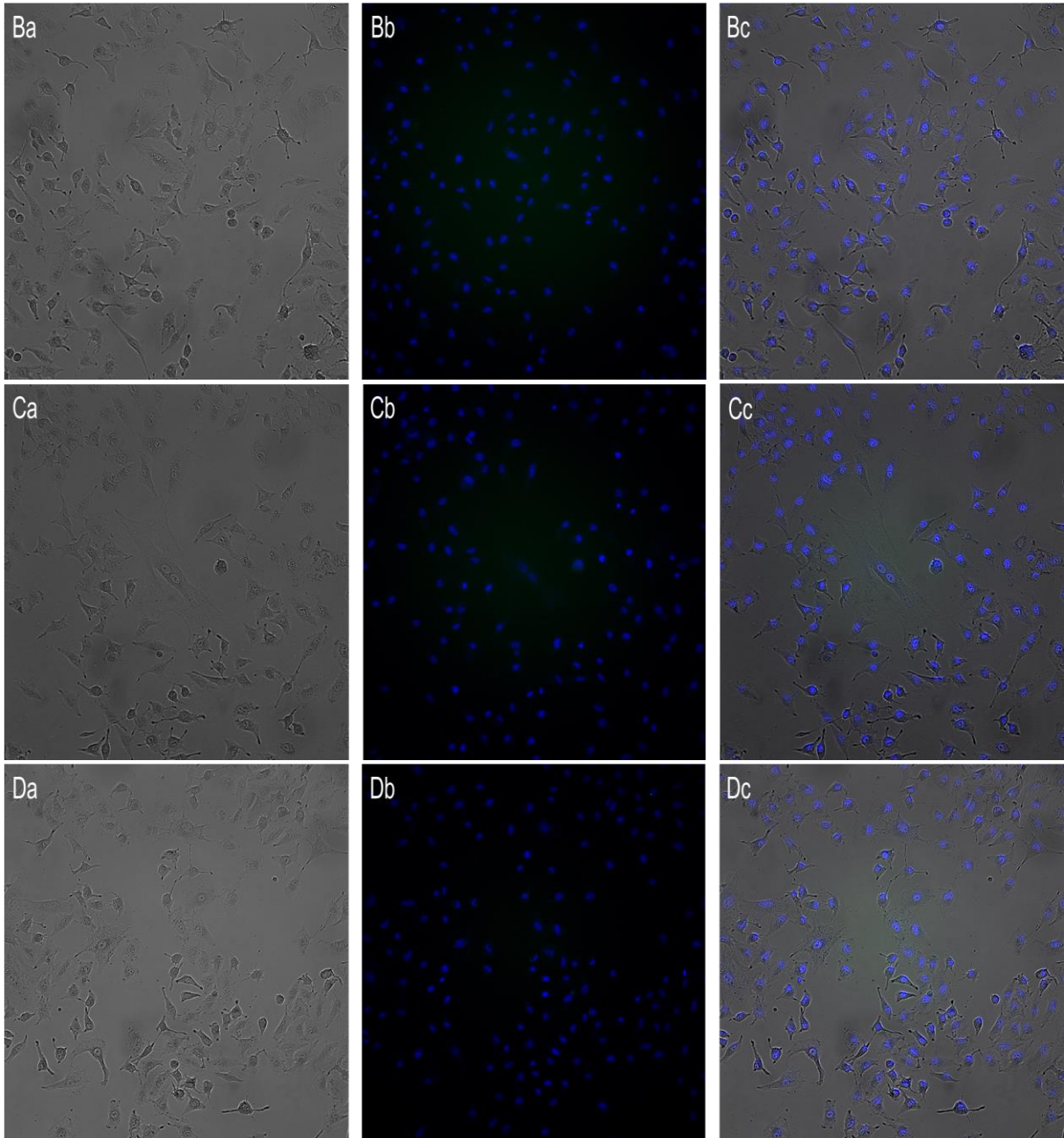




Fonte: Própria autora.

1.2 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares para o peptídeo LO1908. Campo claro da linhagem A549 em 128µg/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128µg/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128µg/mL (Ac). Campo claro da linhagem A549 em 32µg/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32µg/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32µg/mL (Bc). Campo claro da linhagem A549 em 8µg/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 8µg/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 8µg/mL (Cc). Campo claro da linhagem A549 em 2µg/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 2µg/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 2µg/mL (Dc).

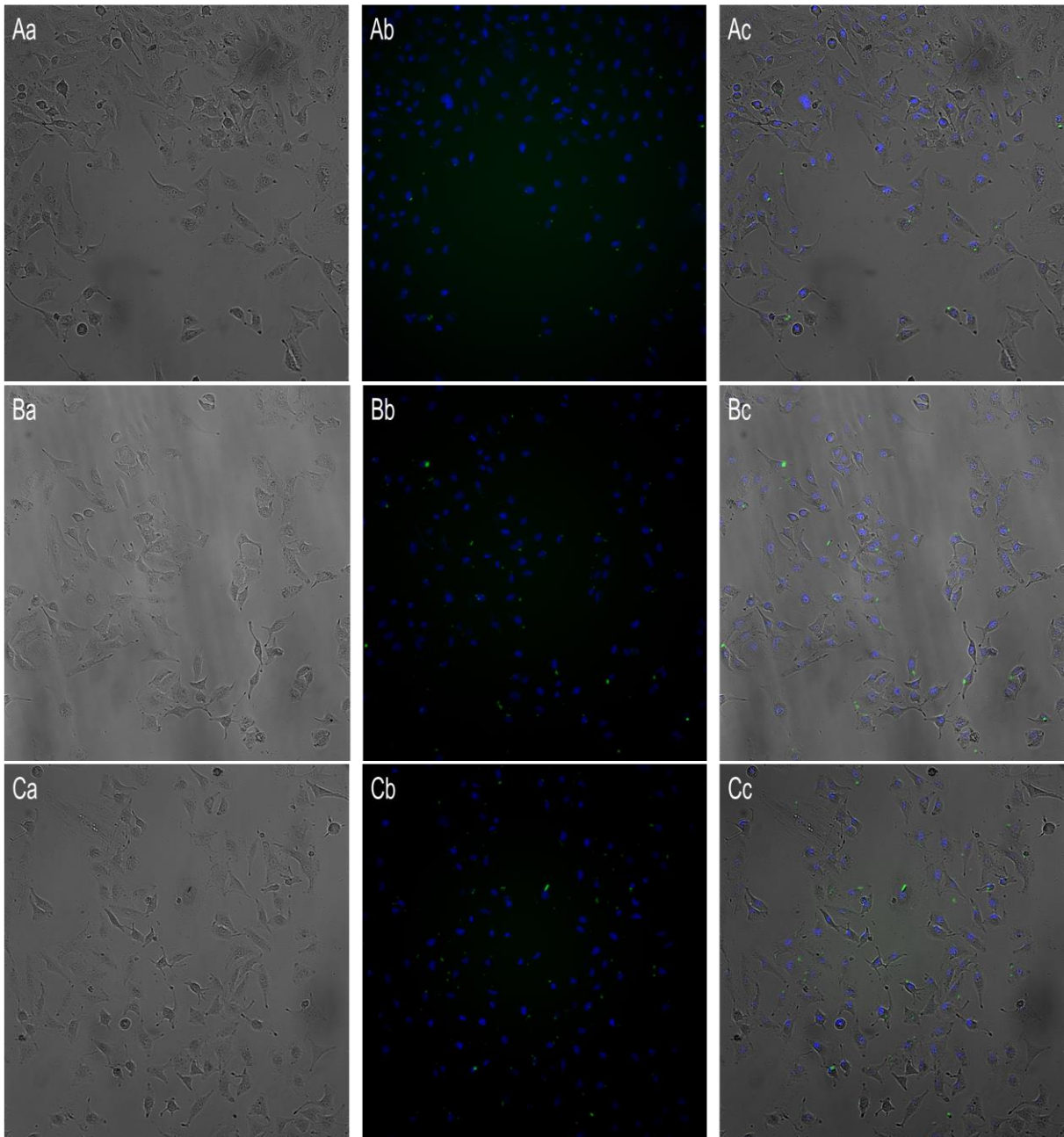


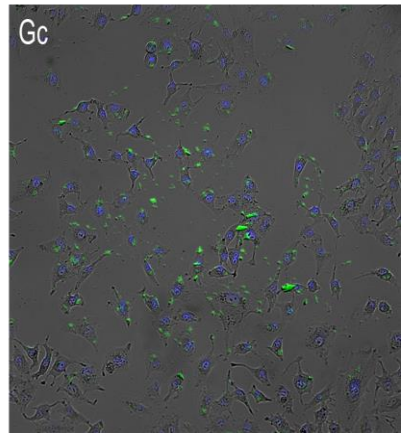
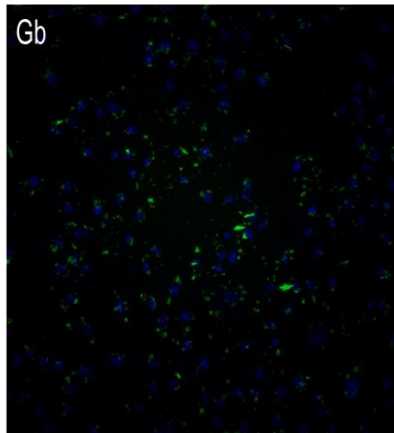
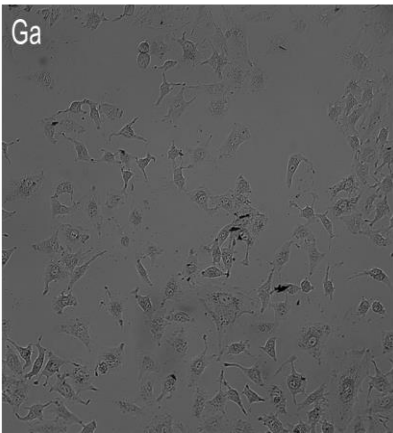
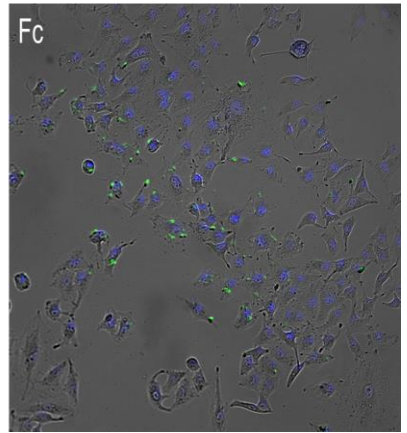
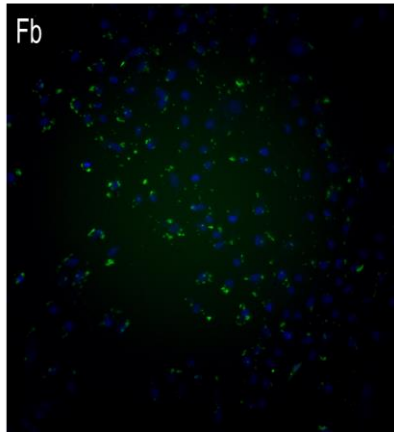
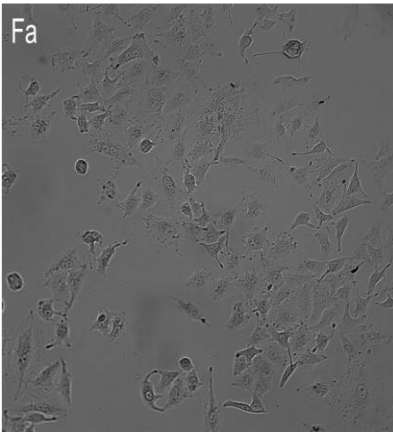
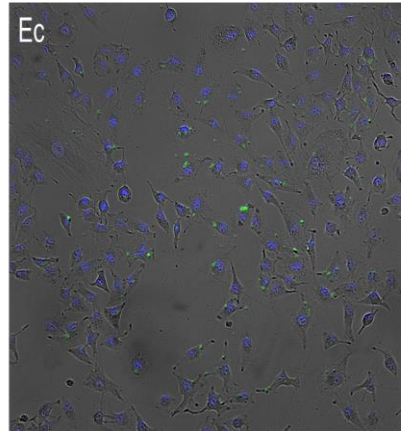
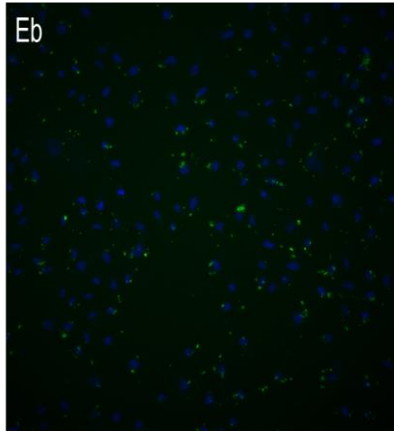
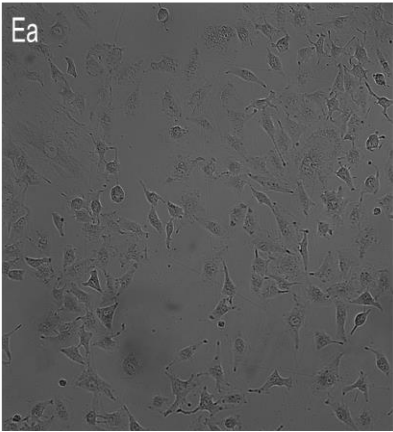
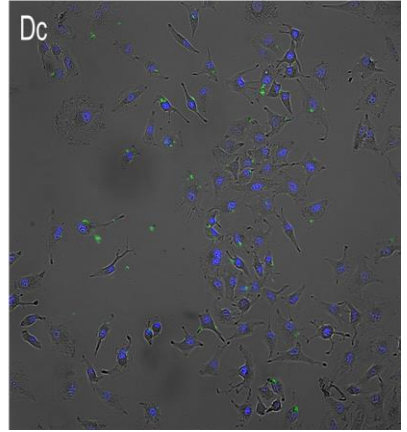
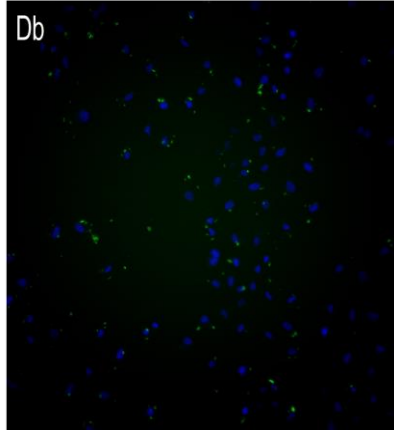
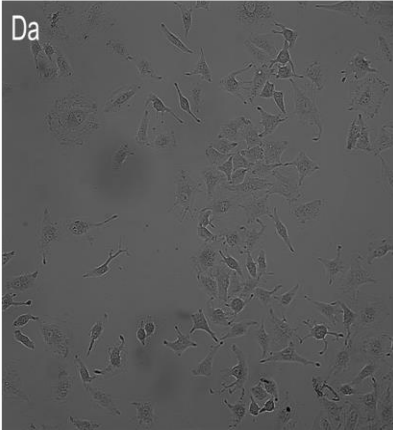


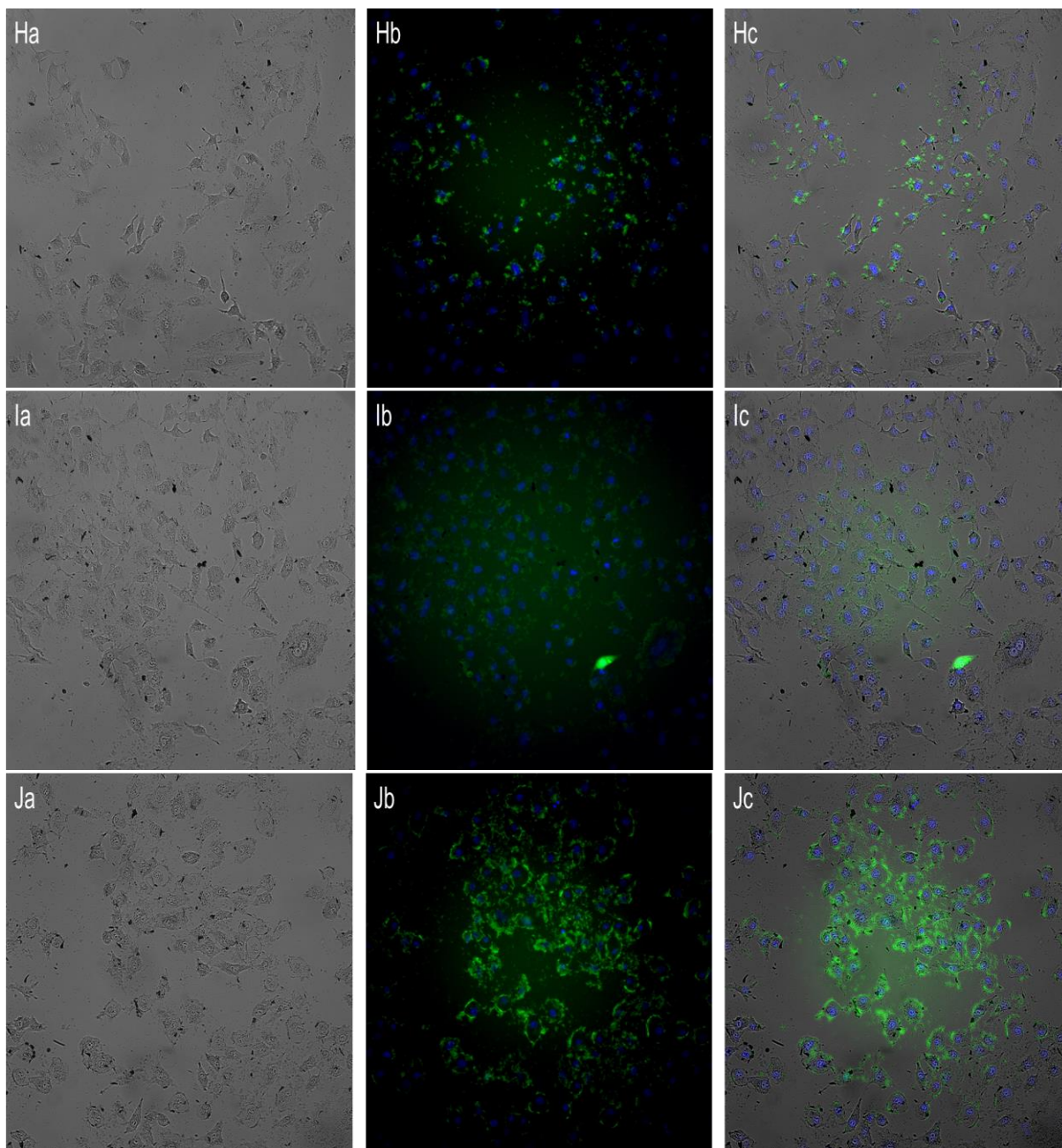
Fonte: Própria autora.

1.3 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares. Campo claro da linhagem A549 em 128 μ g/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 128 μ g/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 128 μ g/mL (Ac). Campo claro da linhagem A549 em 64 μ g/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 64 μ g/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 64 μ g/mL (Bc). Campo claro da linhagem A549 em 32 μ g/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32 μ g/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32 μ g/mL (Cc). Campo claro da linhagem A549 em 16 μ g/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16 μ g/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16 μ g/mL (Dc). Campo claro da linhagem A549 em 8 μ g/mL (Ea). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8 μ g/mL no campo escuro (Eb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8 μ g/mL (Ec). Campo

claro da linhagem A549 em 4 μ g/mL (Fa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4 μ g/mL no campo escuro (Fb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4 μ g/mL (Fc). Campo claro da linhagem A549 em 2 μ g/mL (Ga). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2 μ g/mL no campo escuro (Gb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2 μ g/mL (Gc). Campo claro da linhagem A549 em 1 μ g/mL (Ha). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1 μ g/mL no campo escuro (Hb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1 μ g/mL (Hc). Campo claro da linhagem A549 em 0,5 μ g/mL (Ia). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5 μ g/mL no campo escuro (Ib). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5 μ g/mL (Ic). Campo claro da linhagem A549 em 0,25 μ g/mL (Ja). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,25 μ g/mL no campo escuro (Jb). Campo claro da linhagem A549 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,25 μ g/mL (Jc).





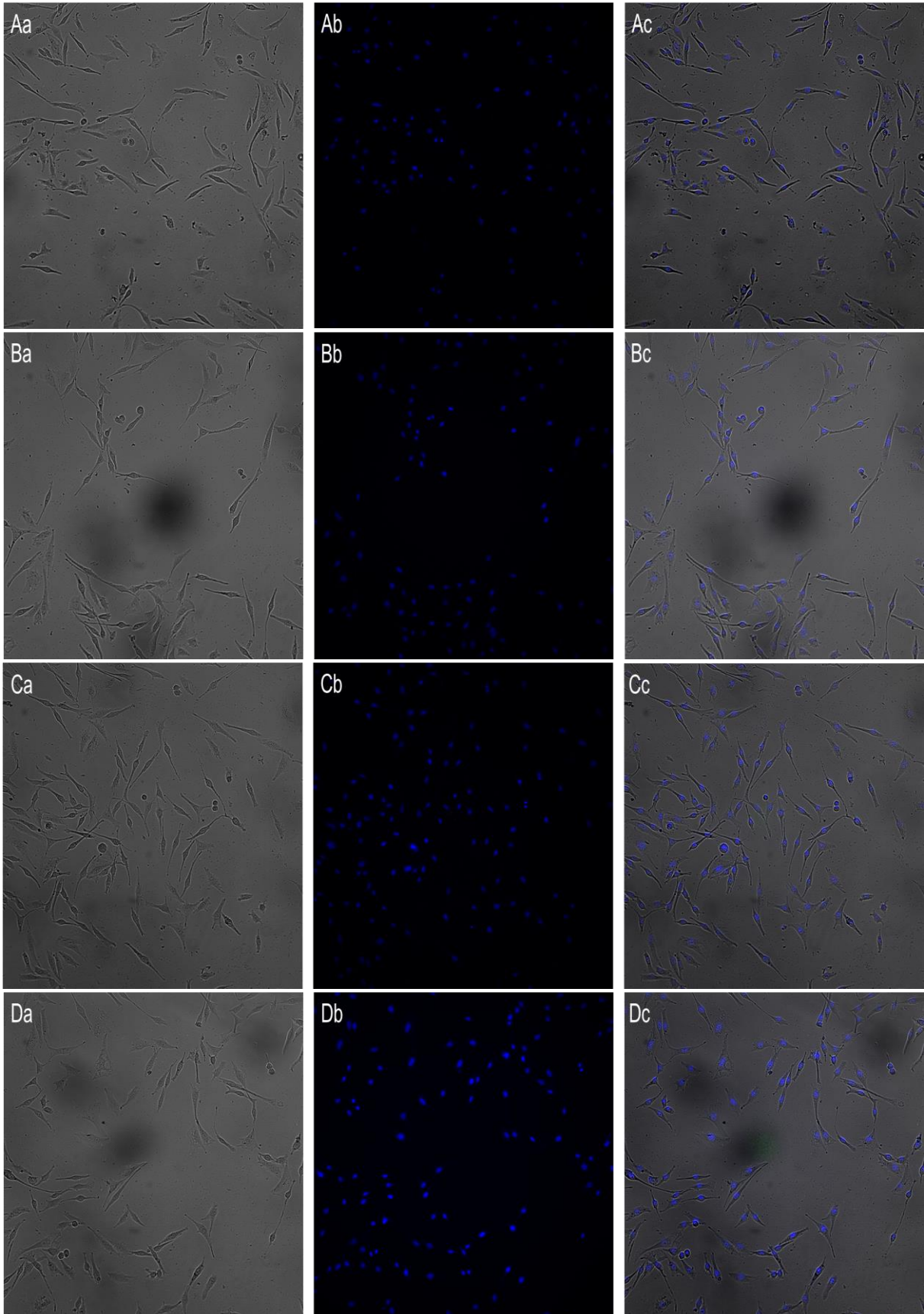


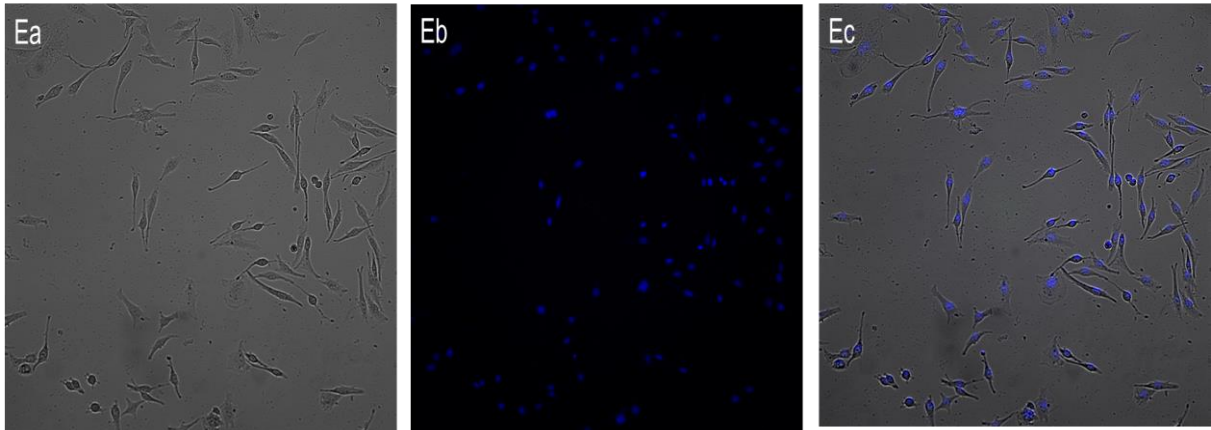
Fonte: Própria autora.

2 Linhagem MRC5

2.1 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares para o peptídeo LO1904. Campo claro da linhagem MRC-5 em 128µg/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 128µg/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 128µg/mL (Ac). Campo claro da linhagem MRC-5 em 64µg/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 64µg/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 64µg/mL (Bc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 32µg/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 32µg/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 32µg/mL (Cc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 16µg/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 16µg/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 16µg/mL (Dc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 8µg/mL (Ea). Marcação do

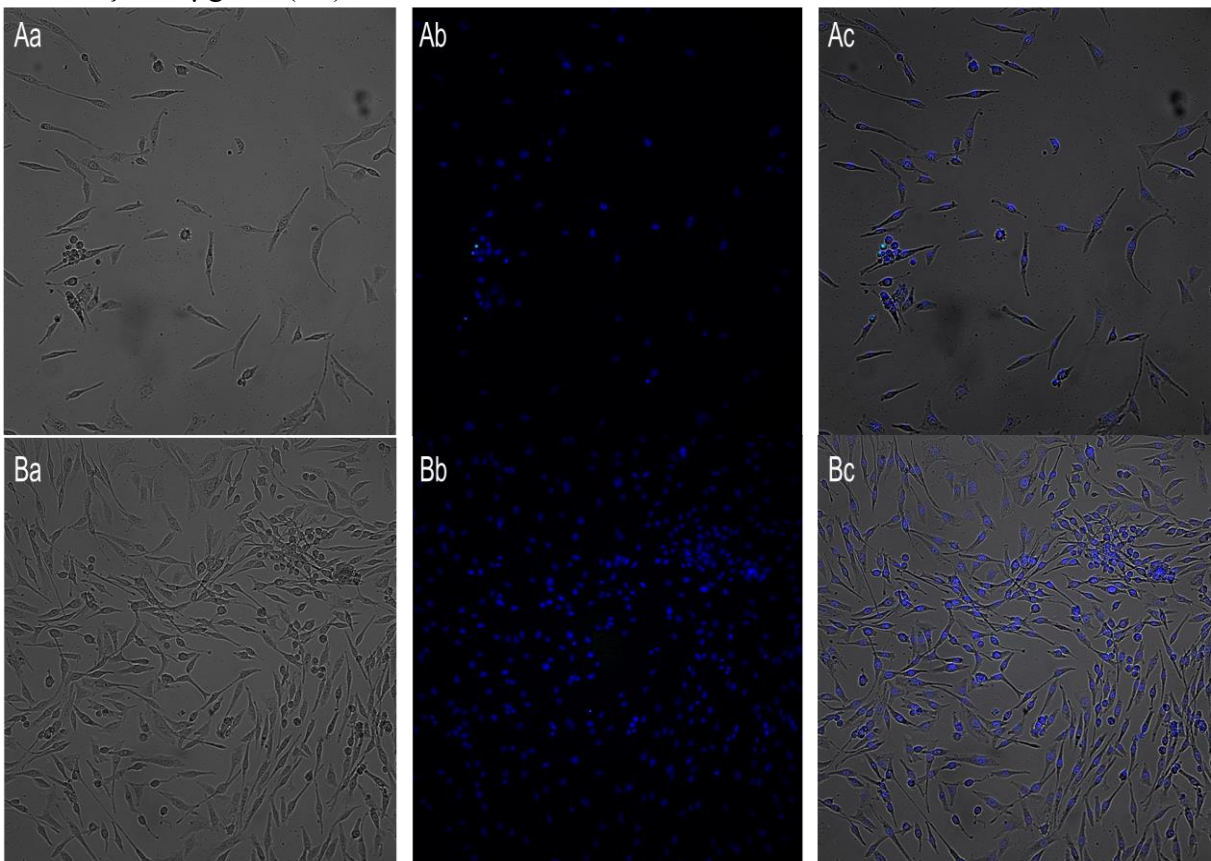
peptídeo LO1904 em diluição 8 μ g/mL no campo escuro (Eb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 8 μ g/mL (Ec).

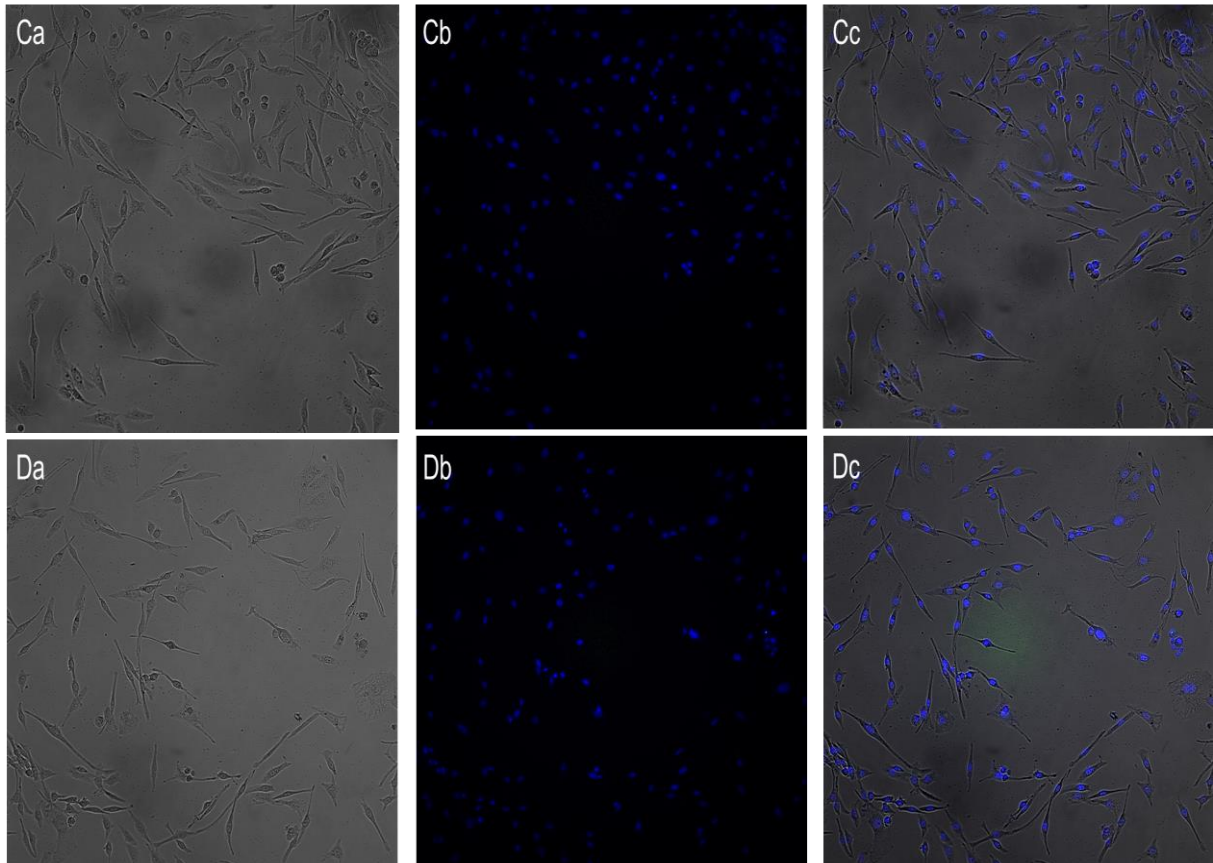




Fonte: Própria autora.

2.2 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares para o peptídeo LO1908. Campo claro da linhagem MRC-5 em 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Aa). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ac). Campo claro da linhagem MRC-5 em 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ba). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ca). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Da). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Dc).

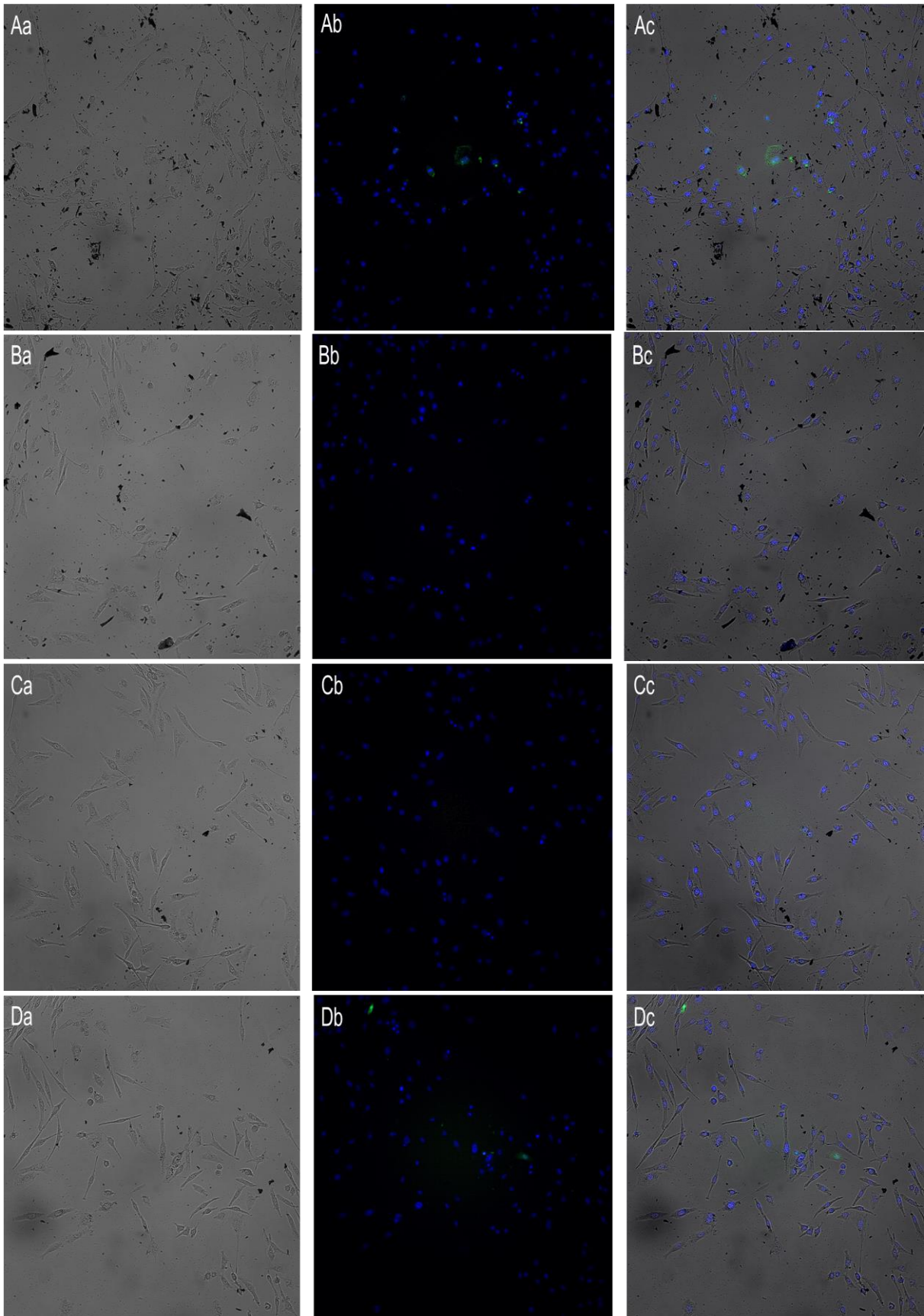


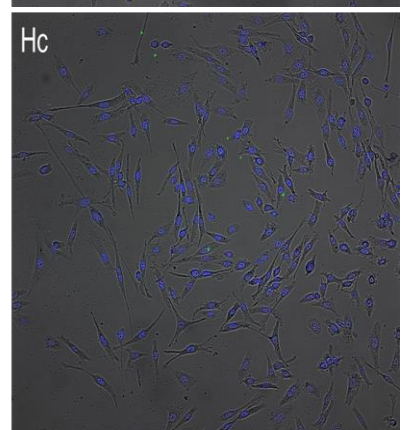
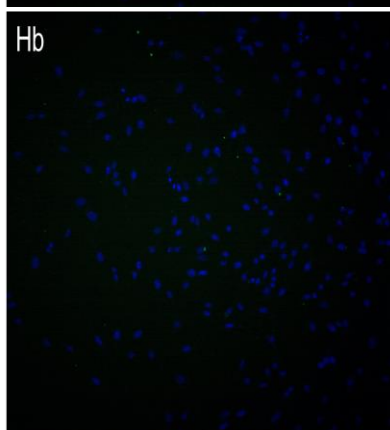
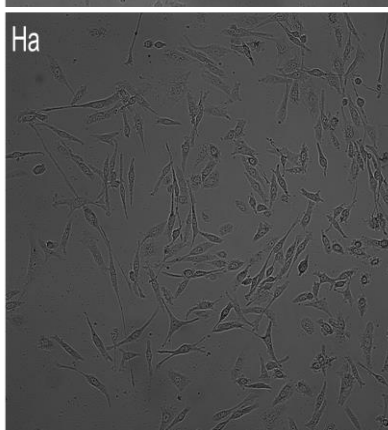
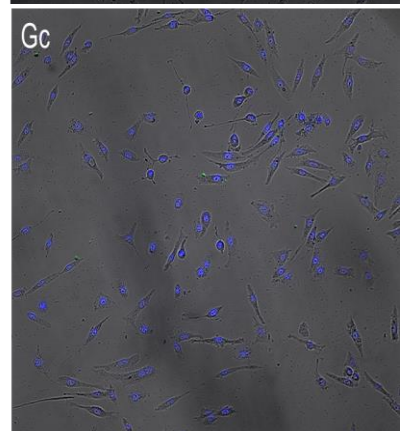
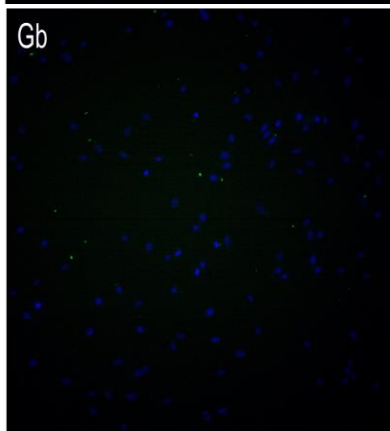
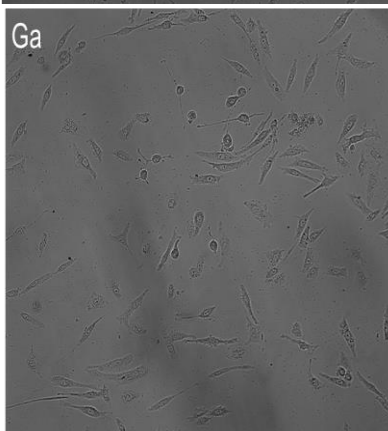
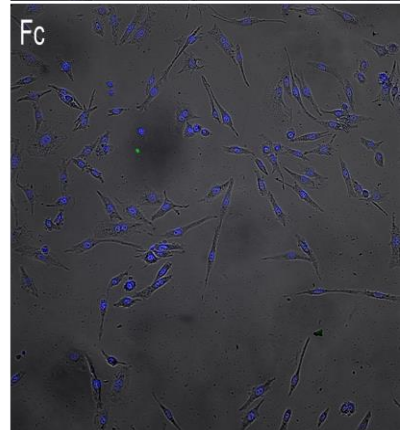
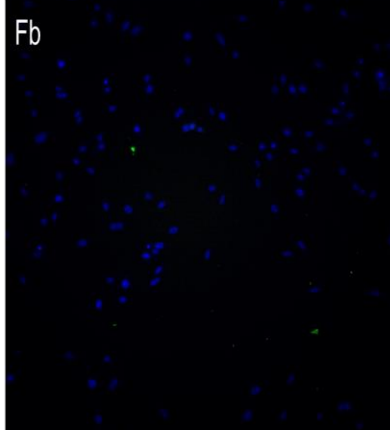
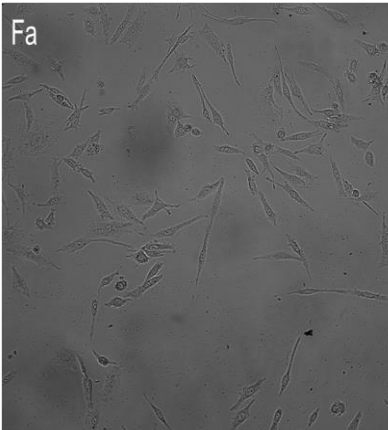
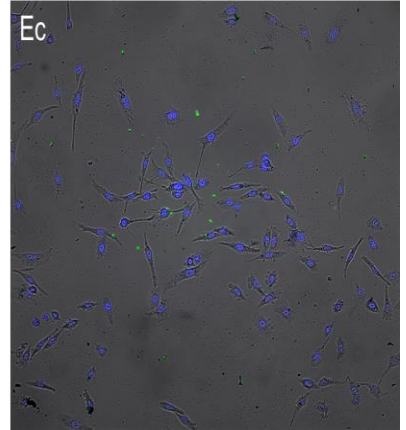
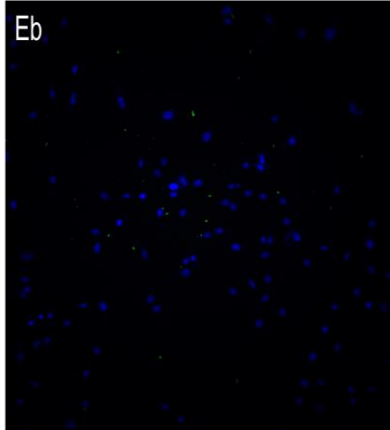
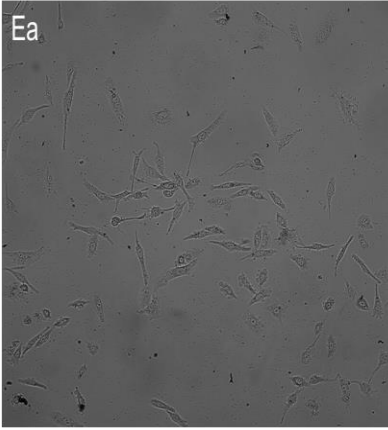


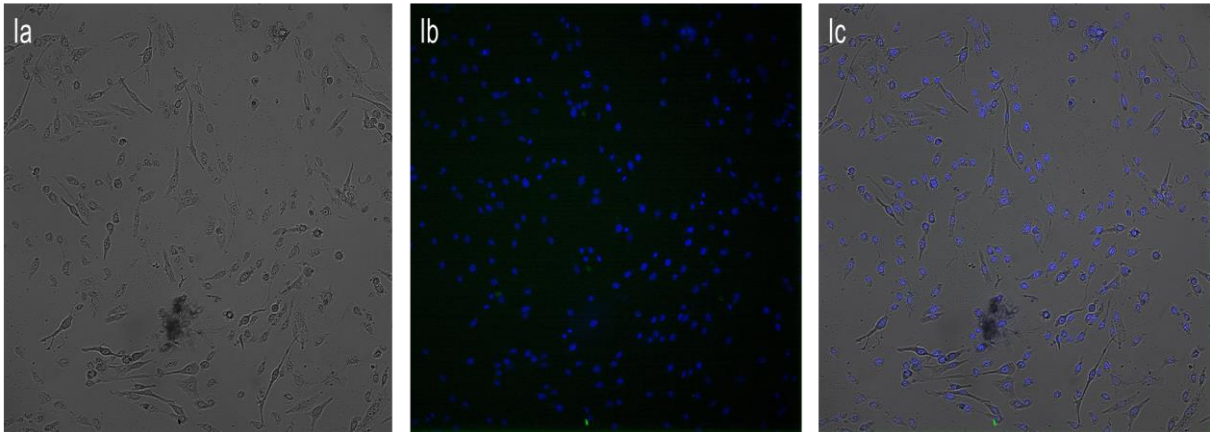
Fonte: Própria autora.

2.3 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares. Campo claro da linhagem MRC-5 em 128µg/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 128µg/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 128µg/mL (Ac). Campo claro da linhagem MRC-5 em 64µg/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 64µg/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 64µg/mL (Bc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 32µg/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32µg/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32µg/mL (Cc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 16µg/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16µg/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16µg/mL (Dc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 8µg/mL (Ea). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8µg/mL no campo escuro (Eb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8µg/mL (Ec). Campo claro da linhagem MRC-5 em 4µg/mL (Fa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4µg/mL no campo escuro (Fb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4µg/mL (Fc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 2µg/mL (Ga). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2µg/mL no campo escuro (Gb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2µg/mL (Gc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 1µg/mL (Ha). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1µg/mL no campo escuro (Hb). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1µg/mL (Hc). Campo claro da linhagem MRC-5 em 0,5µg/mL (Ia). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5µg/mL no campo escuro

(Ib). Campo claro da linhagem MRC-5 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5 μ g/mL (Ic).



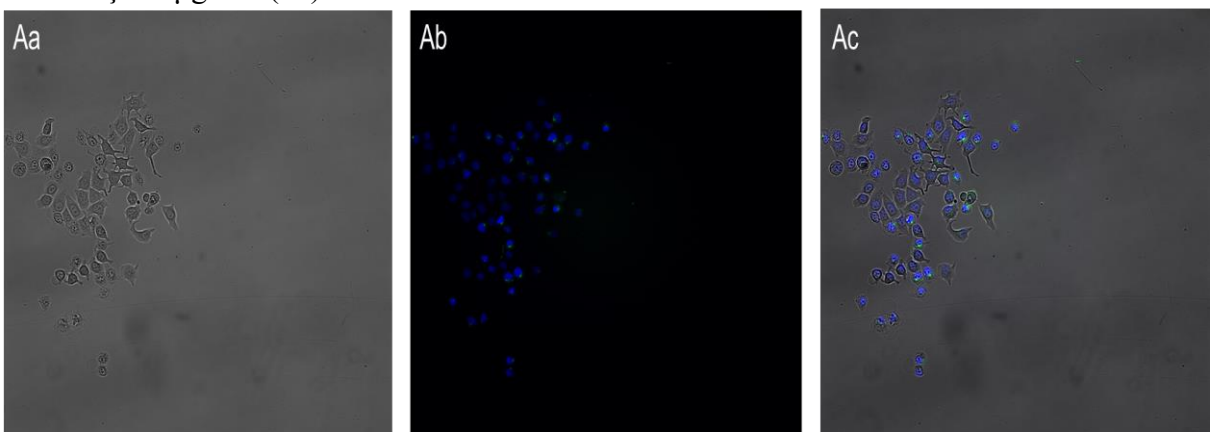


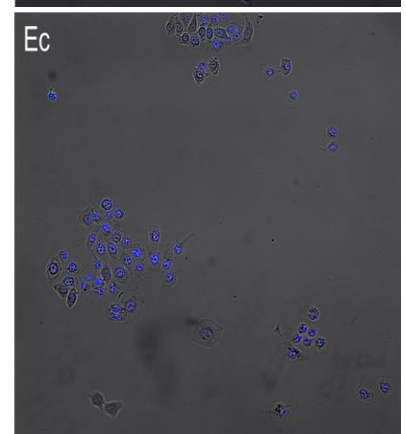
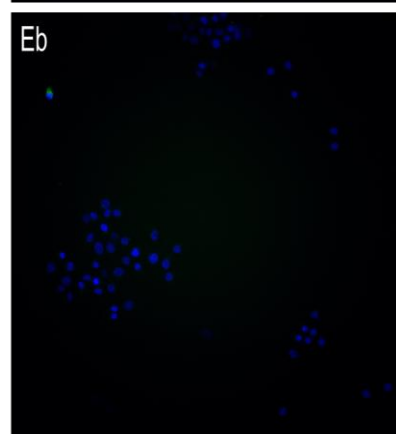
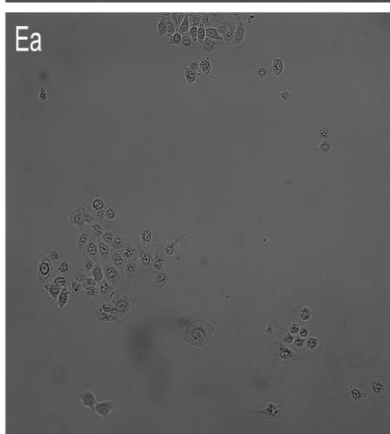
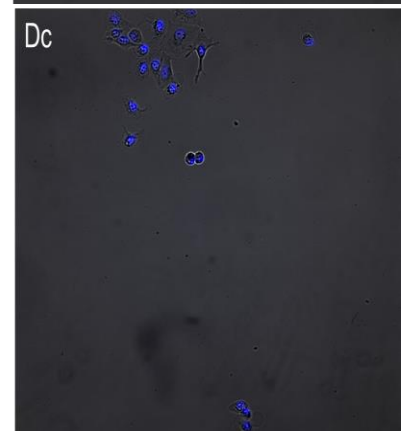
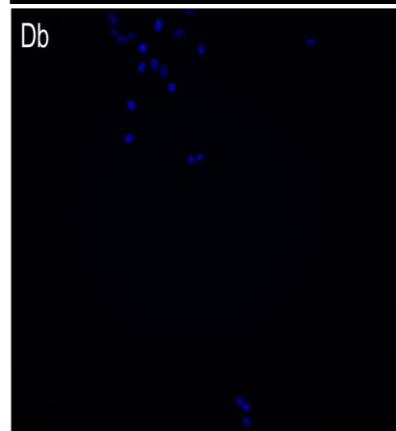
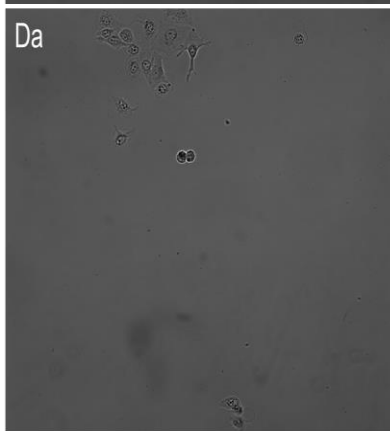
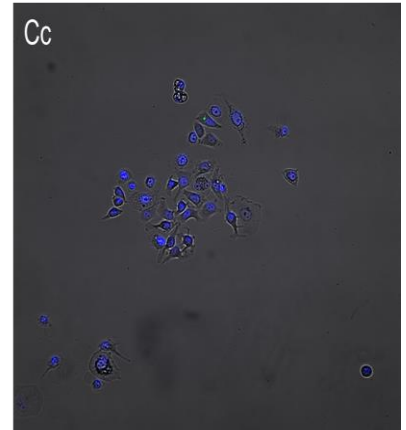
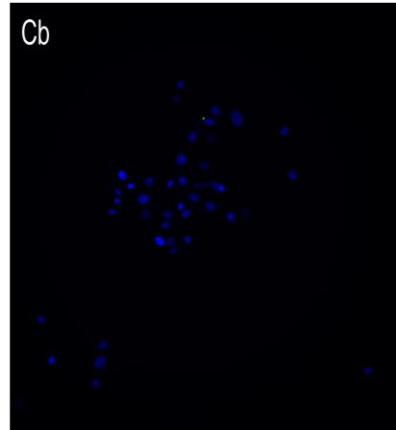
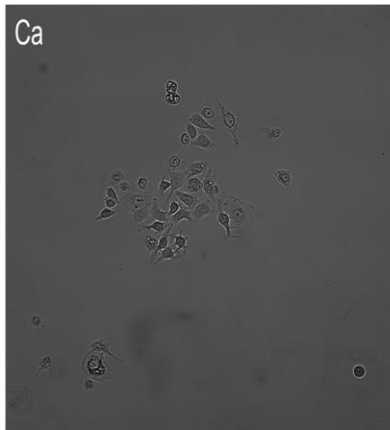
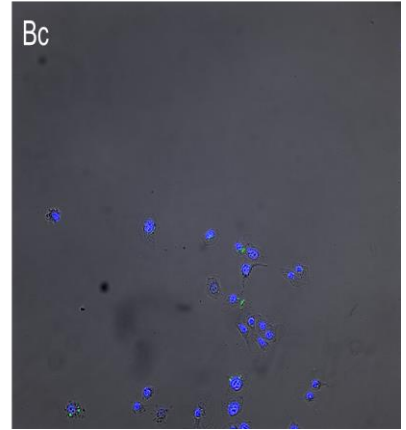
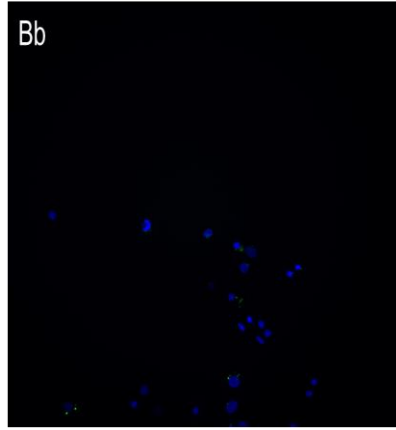
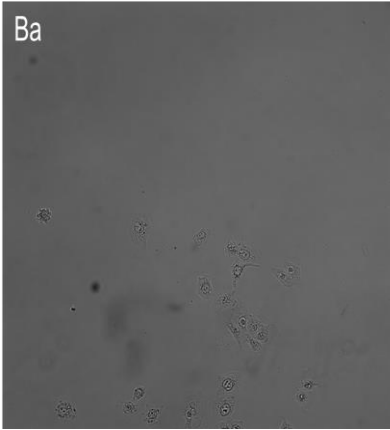


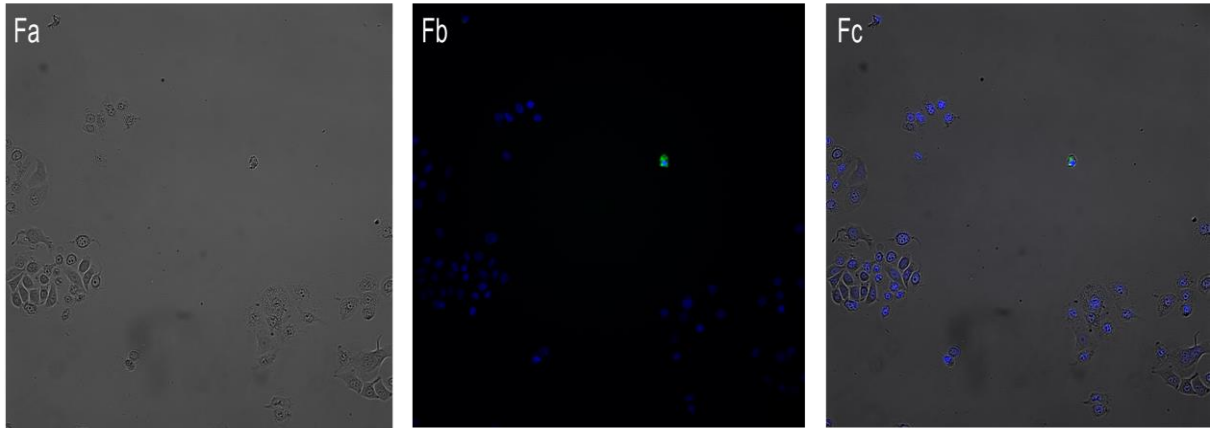
Fonte: Própria autora.

3 Linhagem MCF7

3.1 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares para o peptídeo LO1904. Campo claro da linhagem MCF-7 em 32 μ g/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 32 μ g/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 32 μ g/mL (Ac). Campo claro da linhagem MCF-7 em 16 μ g/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 16 μ g/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 16 μ g/mL (Bc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 8 μ g/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 8 μ g/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 8 μ g/mL (Cc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 4 μ g/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 4 μ g/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 4 μ g/mL (Dc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 2 μ g/mL (Ea). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 2 μ g/mL no campo escuro (Eb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 2 μ g/mL (Ec). Campo claro da linhagem MCF-7 em 1 μ g/mL (Fa). Marcação do peptídeo LO1904 em diluição 1 μ g/mL no campo escuro (Fb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1904 em diluição 1 μ g/mL (Fc).

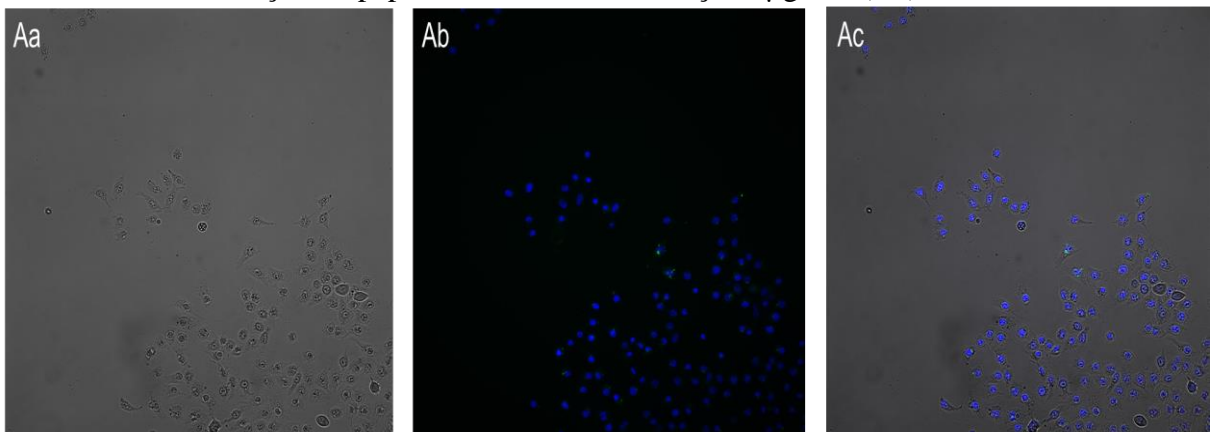


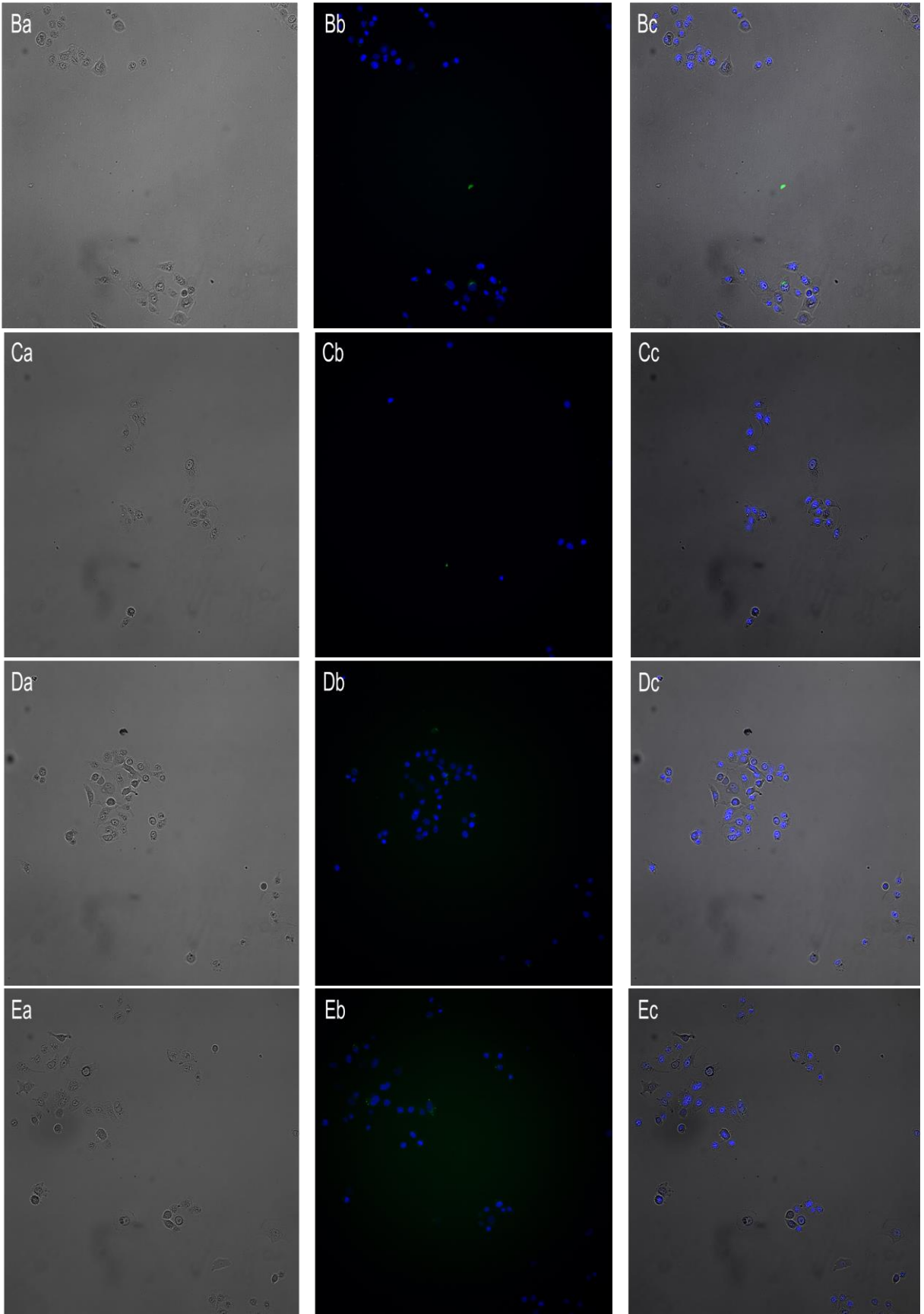




Fonte: Própria autora.

3.2 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares para o peptídeo LO1908. Campo claro da linhagem MCF-7 em 128 μ g/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128 μ g/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 128 μ g/mL (Ac). Campo claro da linhagem MCF-7 em 64 μ g/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 64 μ g/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 64 μ g/mL (Bc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 32 μ g/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32 μ g/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 32 μ g/mL (Cc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 16 μ g/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 16 μ g/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 16 μ g/mL (Dc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 8 μ g/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908 em diluição 8 μ g/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908 em diluição 8 μ g/mL (Dc).





Fonte: Própria autora.

3.3 Microscopia automática de análise de placas de cultura de linhagens celulares. Campo claro da linhagem MCF-7 em 32 μ g/mL (Aa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32 μ g/mL no campo escuro (Ab). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 32 μ g/mL (Ac). Campo claro da linhagem MCF-7 em 16 μ g/mL (Ba). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16 μ g/mL no campo escuro (Bb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 16 μ g/mL (Bc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 8 μ g/mL (Ca). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8 μ g/mL no campo escuro (Cb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 8 μ g/mL (Cc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 4 μ g/mL (Da). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4 μ g/mL no campo escuro (Db). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 4 μ g/mL (Dc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 2 μ g/mL (Ea). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2 μ g/mL no campo escuro (Eb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 2 μ g/mL (Ec). Campo claro da linhagem MCF-7 em 1 μ g/mL (Fa). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1 μ g/mL no campo escuro (Fb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 1 μ g/mL (Fc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 0,5 μ g/mL (Ga). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5 μ g/mL no campo escuro (Gb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,5 μ g/mL (Gc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 0,25 μ g/mL (Ha). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,25 μ g/mL no campo escuro (Hb). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,25 μ g/mL (Hc). Campo claro da linhagem MCF-7 em 0,125 μ g/mL (Ia). Marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,125 μ g/mL no campo escuro (Ib). Campo claro da linhagem MCF-7 com a marcação do peptídeo LO1908oxi em diluição 0,125 μ g/mL (Ic).

