

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 16/12/2023.

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 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, tireóideo 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, detêm 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).

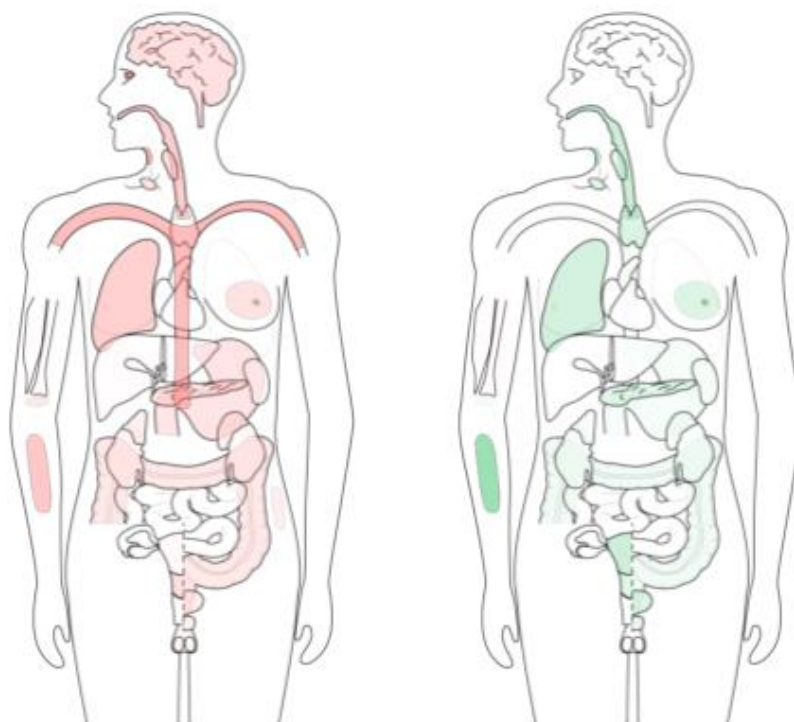
Figura 1: Estrutura tridimensional da glicoproteína CD44 obtida através de modelagem molecular pelo site I-Tasser e representada pelo programa Pymol versão 2.3.1.



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.

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. **Onco. Targets 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.; GALLEGGO, 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.

WIJAYA, 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 radiotherapyand/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.