

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO E TESTES *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS**

KELLIANE ALMEIDA DE MEDEIROS

Brasília – DF

Fevereiro, 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO E TESTES *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS**

KELLIANE ALMEIDA DE MEDEIROS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, Como parte integrante dos requisitos para a Obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

ORIENTADOR: DR. LUCIANO PAULINO DA SILVA

CO-ORIENTADOR: DR. MARCELO PORTO BEMQUERER

Brasília – DF

Fevereiro, 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus que é a maior razão da minha vida e de minhas vitórias, por sempre me guiar e me fortalecer.

Aos meus pais pelos cuidados, dedicação, ensinamentos e, sobretudo, ao amor por mim mesmo quando não mereci. Não se orgulhem de mim, mas sim de vocês pelo o que sou hoje.

Ao meu amado marido Rodrigo por sempre me apoiar, encorajar, não me deixar desistir e viver meus sonhos comigo.

À minha irmã Kelly, minha sobrinha Angélica e minha filha do coração Maria Clara por me darem a satisfação de amá-las.

Ao meu orientador Luciano Paulino por seus ensinamentos, sua compreensão, amizade e incentivo.

Ao meu co-orientador Marcelo Bemquerer pelos ensinamentos.

À Maí, Nathy, Tati, Carol, Guíl, Mari, Flávio, Karla, Saulo e Bia por me auxiliarem na utilização de equipamentos, tirarem dúvidas, pelo companheirismo e pelas boas risadas.

À Graziella Joanitti por sua amizade, atenção, dedicação, por ter me ensinado e auxiliado nos ensaios antitumorais.

Ao Dr. Carlos Bloch e a todos os outros amigos do Laboratório de Espectrometria de Massa, onde foi desenvolvida a maior parte deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Bentes e ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese da Universidade de Brasília, onde foram realizados os ensaios antitumorais.

À Dr. Sônia Freitas e ao Laboratório de Biofísica da universidade de Brasília, em especial à Mary-Ann pela amizade e apoio na utilização do DLS/Zeta.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas pela utilização do citômetro de fluxo.

Às agências FAPDF e CNPq que fomentaram minha bolsa, em momentos distintos, e por financiarem este estudo, assim como a CAPES.

RESUMO

As alternativas comuns para o tratamento do câncer têm sido a quimioterapia e a radioterapia apesar destas terapias destruírem células tumorais e não tumorais, sendo necessária a busca por novas alternativas. Entretanto, muitas novas moléculas também podem causar toxicidade em células não tumorais, sendo necessários seus encapsulamentos em sistemas de liberação controlada. Uma das estratégias para a liberação controlada é o uso de nanopartículas com composição e natureza variadas para confinar o composto. O presente estudo tem como objetivo identificar peptídeos com função antitumoral a partir de bibliotecas de sequências (EMBRAPA) de moléculas, encapsular os peptídeos em nanopartícula contendo em sua composição quitosana e desenvolver um sistema de liberação controlada em células tumorais. Foram selecionados dois peptídeos encontrados em anfíbios (H-ALWKDLLKNVGVIAAGKAVLNKVTDMVNQ-OH e H-YIGWGYHDY-OH), um fragmento de uma proteína supressora de metástase (H-FINKAGKLQSQLRRTTVVAAAFLDAFQKVA-NH₂) e um peptídeo de veneno de abelha, como controle positivo (H-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂). Os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida e purificados em RP-HPLC. Tiveram pureza e identidade molecular aferidas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF e foram avaliados quanto à eficácia e potência *in vitro* contra as linhagens de células tumorais B16F10, MCF7, HeLa e HSG e contra a linhagem não tumoral de fibroblasto por meio de ensaio de viabilidade celular (MTT). Foram escolhidos para os ensaios seguintes, um dos peptídeos de anfíbio e a linhagem HeLa, por este peptídeo ter sido mais ativo sobre esta linhagem. Verificou-se que o peptídeo age sobre a membrana da célula e a mitocondrial hiperpolarizando-a. Em seguida, o peptídeo foi encapsulado pelo método de geleificação iônica. Obteve-se eficiência de encapsulamento de 73 e 80% para nanopartículas de quitosana e peptídeo e as de quitosana, polietilenoglicol e peptídeo, respectivamente. As nanopartículas mostraram-se polidispersas, com tamanho médio de 100 a 200 nm, estabilidade coloidal excelente a moderada e de liberação controlada lenta. Estas nanopartículas foram pouco mais ativas sobre a linhagem tumoral HeLa do que o peptídeo livre, apesar de tendo o mesmo resultado sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto. Assim, este sistema foi eficiente no encapsulamento do peptídeo podendo vir a ser entregue a alvo específico em estudos posteriores.

ABSTRACT

The common alternatives for the cancer treatment have been chemotherapy and radiation therapies despite these therapies destroy tumor and healthy cells, being necessary to search for new alternatives. However, many new molecules can also cause toxicity in non-tumor cells, requiring their encapsulation in controlled release systems. One strategy for the controlled release is the use of nanoparticles with varied composition and nature to confine the compound. The present study aims to identify peptides with antitumor function from sequence libraries (EMBRAPA) of molecules, encapsulate the peptides in nanoparticles containing chitosan in its composition and develop a controlled release system in tumor cells. We selected two peptides found in amphibians (H-ALWKDLLKNVGIAGKAVLNKVTDMVNQ-OH and H-YIGWGYHDY-OH), a fragment of a metastasis suppressor protein (H-FINKAGKLQSQLRRTTVVAAAFLDAFQKVA-NH₂) and a bee venom peptide, as positive control (H-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂). The peptides were synthesized manually by solid phase method and purified by RP-HPLC. Molecular identity and purity were measured in MALDI-TOF/TOF mass spectrometer and were evaluated for efficacy and potency *in vitro* against B16F10, MCF7, HeLa and HSG tumor cell lines, and against the healthy fibroblast cell line through cell viability test (MTT). For all other experiments, it was chosen a peptide of amphibian and the HeLa cell line due to the fact that this peptide was the more active against this cell line. It was found that the peptide acts on the cell membrane and promote mitochondrial hyperpolarization. Then, the peptide was encapsulated by the ionic gelation method. It was obtained efficiency of encapsulation of 73 and 80% for peptide and chitosan, and chitosan, PEG and peptide nanoparticles, respectively. The nanoparticles were polydisperse, with average size ranging from 100 to 200 nm, exhibited excellent colloidal stability, and moderately slow and controlled release. These nanoparticles were little bit more active on HeLa tumor cell line than free peptide, despite the fact that had the same effect on healthy fibroblast lineage cells. Thus, this system was efficient in encapsulating the peptide that may ultimately be delivered to specific target in future studies.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN (acetonitrila).
B16F10 (linhagem de melanoma de camundongos).
BSA (albumina sérica bovina).
DIPEA (*N, N'*-diisopropiletilamina).
DMF (*N, N*-dimetilformamida).
DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*).
DMSO (dimetilsulfóxido).
Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonila).
HeLa (linhagem de câncer cervical).
HSG (linhagem imortalizada de célula de glândula submandibular).
MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*).
Meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal, 1% antibiótico, 1% de DMSO).
Meio de cultura (DMEM completo, tamponado com bicarbonato de sódio, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% do antibiótico ampicilina-streptomina).
MCF7 (linhagem de câncer de mama humano).
MS/MS (espectrometria de massa *in tandem*).
MTT (brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]).
PBS (tampão fosfato salina).
PEG (polietilenoglicol).
PSLEM 0817 (dermaseptina identificada a partir do anfíbio *Phyllomedusa tomopterna*).
PSLEM 0850 (melitina).
PSLEM 0904 (peptídeo fragmento de uma proteína supressora de metástase).
PSLEM 0906 (peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus*).
QS (quitosana).
Rodamina 123- Cloreto de [6-amino-9-(2-metoxicarbonilfenil)xanten-3-ilideno]azanium.
RP-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa).
Solvente A (solução aquosa de TFA a 0,1% em volume).
Solvente B (TFA em acetonitrila a 0,1% em volume).
TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio).
TFA (ácido trifluoroacético).
TOF (*time-of-flight*).
Tripsina-EDTA (tripsina, 0,25% (1×) com EDTA 4Na).
TPP (Sal de pentassódio de [óxido(fosfonatooxi)fosforil]fosfato).
U.A. (unidades arbitrárias de absorbância).

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Anfíbio A) *Phyllomedusa centralis* B) *Trachycephalus venulosus* estudado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foto de Silva, L.P.

Figura 2: Representação de nanopartículas. A) nanoesfera com fármaco disperso na matriz polimérica; B) nanocápsula com fármaco dissolvido no núcleo oleoso.

Figura 3: Estrutura química representando a ligação entre a quitosana (cinza) e o polietilenoglicol (preto), modificado de PREGO e colaboradores (2006).

Figura 4: Representação em esquema da metodologia seguida ao longo do trabalho, na qual as setas indicam as etapas seguintes.

Figura 5: Melitina sintetizada (PSLEM 0850) **a)** Cromatograma analítico do produto sintético recromatografado. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna analítica Vydac C₁₈ 218TP54 (250 x 4,6 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 85 min) e fluxo de 1 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com duzentos disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

Figura 6: Melitina sintetizada (PSLEM 0850) **a)** Cromatograma analítico do produto sintético recromatografado. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 2845,7$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série y e as massas representadas das séries y e b em azul e vermelho, respectivamente.

Figura 7: Dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna*, sintetizada (PSLEM 0817) pelo método da fase sólida **a)** Cromatograma do peptídeo sintético bruto com o produto de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% TFA (em volume). O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 70 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com duzentos disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

Figura 8: Dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna*, sintetizada (PSLEM 0817) pelo método da fase sólida. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 3009,7$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série b e as massas dos fragmentos das séries b e y estão representadas em vermelho e azul, respectivamente.

Figura 9: Peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906), obtido por síntese em fase sólida **a)** Cromatograma do peptídeo sintético bruto com produto final de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 60 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento conduzido nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com 200 disparos de Laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

Figura 10: Peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906), obtido por síntese em fase sólida. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 1173,5$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos

para as séries *y* e *b* e as massas dos fragmentos estão representadas em azul e vermelho, respectivamente.

Figura 11: Peptídeo selecionado a partir do fragmento de uma proteína supressora de metástase (PSLEM 0904), obtido por síntese em fase sólida **a)** Cromatograma do produto sintético bruto com produto final de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 60 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com 200 disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

Figura 12: Peptídeo selecionado a partir do fragmento de uma proteína supressora de metástase (PSLEM 0904), obtido por síntese em fase sólida. Sequenciamento *de novo* [M + H]⁺ = 3205,8. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série *b* e as massas dos fragmentos das séries *b* e *y* estão representadas em vermelho e azul, respectivamente.

Figura 13: Porcentagem de células vivas (viabilidade) das linhagens A) HeLa e B) HSG por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850), dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna* (PSLEM 0817), peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906) e fragmento de proteína supressora de metástase (PSLEM 0904). Os símbolos *, #, !, ? representam diferenças significativas dos peptídeos PSLEM 0850, PSLEM 0817, PSLEM 0906 e PSLEM 0904 e as letras a, b, c, d se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos (P < 0,05).

Figura 14: Porcentagem de células vivas (viabilidade) das linhagens A) B16F10 e B) MCF-7 por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850), dermaseptina (PSLEM 0817), peptídeo do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906) e fragmento de proteína supressora de metástase (PSLEM 0904). Os símbolos *, #, !, ? representam diferenças significativas dos peptídeos PSLEM 0850, PSLEM 0817, PSLEM 0906 e PSLEM 0904 e as letras a, b, c, d se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos (P < 0,05).

Figura 15: Porcentagem de células vivas (viabilidade) da linhagem NIH/3T3 por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850) e dermaseptina (PSLEM 0817). O símbolo # representa diferenças significativas entre os peptídeos PSLEM 0850 e PSLEM 0817 e as letras a, b se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos (P < 0,05).

Figura 16: de membrana plasmática pela exposição de fosfatidilserina em células HeLa sem tratamento (controle) e de células tratadas com o peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) com 64 µg mL⁻¹ e incubação com 5µL de anexina por 15 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). *diferiu significativamente (P < 0,05).

Figura 17: Análise em citometria de fluxo da fragmentação do DNA (A) e das fases do ciclo celular (B) por iodeto de propídeo em células HeLa sem tratamento (controle) e tratadas com 64 µg mL⁻¹ do peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) e incubação com 200 µL de tampão de lise por 30 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). *diferiu significativamente (P < 0,05).

Figura 18: Análise em citometria de fluxo da marcação da membrana mitocondrial por rodamina 123 em células HeLa sem tratamento (controle) representadas em preto e tratadas com 64 µg mL⁻¹ do peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) representadas em cinza. Incubação com 0,5 µL da solução de rodamina 123 por 15 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 515 e 530 nm).

Figura 19: Fotomicrografias de células tumorais tratadas com o peptídeo Dermaseptina encontrado no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna* (PSLEM 0817). À esquerda (A, B, C, D) são células sem adição do peptídeo (controle) e à direita (A', B', C', D') com a adição do peptídeo na maior concentração testada ($256 \mu\text{g mL}^{-1}$). **a)** MCF7 **b)** HeLa **c)** B16F10 **d)** HSG.

Figura 20: Morfologia celular da linhagem HeLa por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato. Imagem obtida em modo contato. A e A' controle (sem tratamento); B e B' tratado com melitina na concentração $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PSLEM 0850); C e C' tratado com derma na concentração $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PSLEM 0817).

Figura 21: Curva de calibração obtida a partir de dados cromatográficos colocados em função da reta definida mostrando a variação da concentração do peptídeo dermaseptina PSLEM 0817.

Figura 22: Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo de dinâmico e aquisição mostrada de topografia (A e B). Histogramas da distribuição de classes com valores variados de diâmetro e altura das nanopartículas, com (C) e (D) sendo Quitosana (4 mg mL^{-1}) e peptídeo dermaseptina PSLEM 0817 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$); e (E) e (F) Quitosana (4 mg mL^{-1}), peptídeo dermaseptina PSLEM 0817 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e PEG ($4,16 \text{ mg mL}^{-1}$).

Figura 23: Liberação do peptídeo encapsulado em nanopartículas de quitosana (QSePep $4 \text{ mg}:100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e revestida de polietilenoglicol (PEGePep $4,16 \text{ mg}:100 \mu\text{g mL}^{-1}$) por horas (0, 1, 3, 5, 24 e 48).

Figura 24: Porcentagem de células vivas por variadas concentrações das nanopartículas com peptídeo dermaseptina PSLEM 0817. Quitosana com o peptídeo (QSePep) e PEG e peptídeo (PEGePep). Como controle, nanopartícula de quitosana vazia (QS), quitosana com PEG vazia (PEG) e peptídeo livre (Pep). **A)** linhagem tumoral HeLa; **B)** linhagem não tumoral de fibroblasto (NIH/3T3). Os símbolos *, #, !, ? representam diferença significativa de QS, QSePep, PEG, PEGePep e as letras a, b, c, d se referem a diferença da concentração 0 dentro destes respectivamente e \$ dentro do peptídeo ($P < 0,05$).

Tabela 1: Incidência de novos casos de câncer estimados para os anos de 2010 e 2011 no Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2010).

Tabela 2: Peptídeos com provável potencial antitumoral com base nas suas sequências de aminoácidos.

Tabela 3 – Representação das concentrações dos reagentes utilizados para cada nanopartícula.

Tabela 4: Estabilidade coloidal por potencial Zeta de nanopartículas em água (ASTM, 1985).

Tabela 5: Características físico-químicas das nanopartículas de quitosana (QS), quitosana e peptídeo dermaseptina (QSePep), quitosana revestidas com polietilenoglicol (PEG) e quitosana com peptídeo dermaseptina revertida com polietilenoglicol (PEGePep). $n=3$ medidas independentes.

Tabela 6: Características físico-químicas das nanopartículas de quitosana (QS), quitosana e peptídeo dermaseptina (QSePep), quitosana revestidas com polietilenoglicol (PEG) e quitosana com peptídeo dermaseptina revertida com polietilenoglicol (PEGePep). Eficiência de encapsulamento (EE) e $n=3$ medidas independentes.

SUMÁRIO

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Lista de abreviaturas	7
Lista de figuras e tabelas	8
Sumário	10
1 Introdução	12
1.1 Câncer	12
1.1.1 Características do câncer	12
1.1.2 Câncer e apoptose	13
1.2 Peptídeos membranoativos	14
1.3 Peptídeos antitumorais	16
1.4 Uso da nanobiotecnologia na liberação controlada de fármacos	17
2 Justificativa	20
3 Objetivos	21
4 Material e métodos	22
4.1 Materiais e reagentes	22
4.2 Equipamentos	22
4.3 Estratégia experimental	23
4.4 Seleção de peptídeos	24
4.5 Síntese dos peptídeos	25
4.6 Purificação dos peptídeos selecionados	26
4.7 Identificação molecular	27
4.8 Quantificação dos peptídeos	27
4.9 Manutenção das linhagens de células	28
4.10 Tratamento das células com os peptídeos	29
4.11 Avaliação do efeito citotóxico do peptídeo livre	30
4.11.1 Viabilidade celular por MTT	30
4.11.2 Detecção de morte celular por anexina-V⁺	31
4.11.3 Monitoramento de potencial de membrana mitocondrial	31

4.12	Fragmentação do DNA e ciclo celular	32
4.13	Morfologia celular	32
4.14	Produção de nanopartículas contendo o peptídeo PSLEM 0817	33
4.14.1	Nanopartícula de quitosana (QS)	33
4.14.2	Nanopartícula de quitosana e polietilenoglicol (PEG)	33
4.14.3	Eficiência de encapsulamento (EE)	34
4.14.4	Caracterização das nanopartículas com e sem peptídeo	34
4.14.5	Liberção controlada	35
4.14.6	Viabilidade celular com peptídeo encapsulado	35
4.15	Análise estatística	36
5	Resultados	37
5.1	Obtenção dos peptídeos	37
5.2	Efeito citotóxico	46
5.2.1	Viabilidade celular	46
5.2.2	Detecção de morte celular por anexina-v⁺	50
5.2.3	Fragmentação do DNA e ciclo celular	50
5.2.4	Monitoramento de potencial de membrana mitocondrial	51
5.3	Morfologia das células	52
5.4	Eficiência de encapsulamento	55
5.5	Caracterização das nanopartículas	57
5.5.1	Liberção controlada do peptídeo encapsulado	60
5.5.2	Viabilidade celular após tratamento com o peptídeo encapsulado	60
6	Discussão	62
7	Conclusões	69
	Referências Bibliográficas	70

1.INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

O câncer é ocasionado pela proliferação descontrolada de células levando ao acúmulo destas e à conseqüente formação de tumores, podendo realizar metástase e passar para tecidos adjacentes (CARVALHO, 2006). Pode ser denominado de carcinoma quando tem início em tecidos epiteliais ou de sarcoma quando tem início em tecidos conjuntivos (Instituto Nacional de Câncer, 2008).

O câncer é um dos maiores responsáveis por causas de morte por doença no mundo, sendo a segunda maior causa em países desenvolvidos. Em 2005 foram descritos no mundo 58 milhões de novos casos de câncer, dos quais 7,6 milhões de pessoas morreram, sendo 70% em países pouco e moderadamente desenvolvidos, uma vez que nestes há limitações no diagnóstico e prognóstico da doença (World Health Organization, 2008). No Brasil a taxa de mortalidade no ano de 2007 foi de 10.346 para homens entre 20 a 50 anos de idade e 12.625 para mulheres com a mesma faixa etária (Instituto Nacional de Câncer, 2010).

Há uma elevada incidência prevista de novos casos de câncer para os anos de 2010 e 2011 tanto para homens como para mulheres (Tabela1).

Tabela 1: Incidência de novos casos de câncer estimados para os anos de 2010 e 2011 no Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2010).

Tipo de câncer	Número de casos em mulheres	Número de casos em homens	Número de casos totais
Mama	49.240	-	49.240
Cervical	18.430	-	18.430
Próstata	-	52.350	52.350
Pulmão	9.830	17.800	27.630
Estômago	7.680	13.820	21.500
Cavidade oral	3.790	10.330	14.120
Melanoma	2.970	2.960	5.930
Total	91.940	97.260	189.200

Os custos com o tratamento atual do câncer são muito elevados, sendo que o estado brasileiro vem gastando anualmente com internação hospitalar, quimioterapia e radioterapia

em torno de 1,2 bilhão, já no setor privado, a empresa Unimed, gastou 35 milhões nos últimos 2 anos com tratamento de câncer (Instituto Nacional de Câncer, 2008). Apesar disto estes tratamentos não são tal eficazes devido à resistência do tumor as drogas utilizadas e ainda por causarem diversos efeitos colaterais no pacientes, já que a eficácia do tratamento pode variar de acordo com a idade do paciente e com a localização primária do tumor (KLIGERMAN, 2001).

As alternativas mais comuns para o tratamento de câncer no Brasil e no mundo têm sido a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Porém, estas intervenções destroem indistintamente células tumorais e não tumorais levando a efeitos colaterais como desfiguração do paciente, alterações gastrointestinais e queda de cabelo (ALVES *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer utilizando biomoléculas tem sido favorecido pela compreensão dos mecanismos apoptóticos que ocorrem em células tumorais.

1.1.2 CÂNCER E APOPTOSE

A morte celular programada, conhecida como apoptose, ocorre para eliminação de células garantindo, assim, a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos. Algumas alterações morfológicas ocorrem durante o processo de apoptose nas células, sendo elas a perda da aderência com a matriz extracelular e a células vizinhas, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Estas alterações morfológicas são causadas por uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares dentre os quais a sinalização para apoptose por caspases tem sido analisada. Dentre os quatorze tipos conhecidos de caspases humanas, as caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 participam da cascata de sinalização por meio de ativação por clivagem proteolítica e, depois de ativadas, as caspases clivam substratos que possuem resíduos de aspartato em sua cadeia levando à externalização de fosfolípidios de membrana e, também à fragmentação nuclear (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Os estímulos ocasionados pelas caspases no meio intracelular induzem ao aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas como a proteína Bax, a qual pode neste caso interagir com a mitocôndria levando ao desequilíbrio desta organela e a consequente indução de apoptose da célula pela liberação do citocromo *c* (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Assim têm-se buscado compreender os mecanismos das vias apoptóticas para o desenvolvimento de novas formas de tratamento para o câncer, uma vez que muitas moléculas

antitumorais possuem atividade sobre estes mecanismos. Estudos atuais têm revelado a eficiência de novas biomoléculas, principalmente peptídeos membranoativos extraídos de animais como nova alternativa para a terapia antitumoral.

1.2 PEPTÍDEOS MEMBRANOATIVOS

Os peptídeos membranoativos são geralmente de natureza anfifílica, ou seja, possuem regiões hidrofílicas com resíduos polares positivamente carregados e regiões hidrofóbicas (LEITE *et al.*, 2005; ZASLOFF, 2002). Muitos destes peptídeos são seletivamente tóxicos para as bactérias. Deste modo, as moléculas interagem com as membranas carregadas negativamente das bactérias por meio de interação eletrostática seguida de inserção na bicamada lipídica, desestabilizando-a e ocasionando a lise e morte celular (HOSKIN & RAMA OOTHY, 2008). De modo semelhante, podem interagir com as cargas negativas dos fosfolipídios expostos na camada externa da membrana de células tumorais (BAKER, *et al.*, 1993). Além da ação sobre as membranas celulares, alguns peptídeos entram no meio intracelular e podem inibir a síntese de proteínas, a ação de enzimas ou até mesmo interagir com o DNA ou RNA como no caso da buforina (PARK *et al.*, 1998).

A atração pela membrana, interação com bicamadas lipídicas e eventualmente a entrada do peptídeo no meio intracelular depende de algumas propriedades físico-químicas das biomoléculas, como a sequência de resíduos de aminoácidos, hidrofobicidade, anfipaticidade; e ainda de propriedades da membrana ou aspectos da interação entre o peptídeo e a bicamada, tais como, composição de fosfolipídeos e de colesterol da membrana, carga elétrica, estrutura e concentração dos peptídeos na interface lipídica (HOSKIN & RAMA OOTHY, 2008).

A estrutura dos peptídeos membranoativos pode variar bastante, porém a maioria é composta por resíduos de L-aminoácidos podendo ter estrutura secundária em α -hélices ou folhas- β . Peptídeos que possuem estrutura em α -hélice têm correlação positiva entre a atividade hemolítica e o aumento da anfipaticidade, sendo que, geralmente, estas moléculas que exibem propriedades hemolíticas, possuem atividades potenciais contra células tumorais, uma vez que são ambas células de eucariotos e, por isso, semelhantes (SHAI, 1999).

Estudos de prospecção de peptídeos secretados pela pele de anfíbios (Figura 1) e veneno de insetos realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia têm identificado muitas moléculas com atividade hemolítica elevada e provável atividade antitumoral, sendo necessária a realização de ensaios mais específicos para avaliar a ação efetiva destes em células cancerígenas.



Figura 1: Anfíbio A) *Phyllomedusa centralis* B) *Trachycephalus venulosus* estudado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foto de Silva, L.P.

1.3 PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS

Atualmente, têm sido realizados vários estudos buscando novos fármacos com ação antibiótica, fungicida, antiinflamatória, anti-hipertensiva e anticancerígena sendo muitos destes fármacos peptídeos encontrados em animais e plantas. Entretanto, como as quantidades destes produtos na natureza são mínimas, a síntese química constitui a alternativa utilizada para obtenção de quantidades moderadas (miligramas a gramas) destas moléculas para estudos (SNYDER *et al.*, 2004).

Dentre os peptídeos encontrados em animais, os membranoativos, geralmente com caráter catiônico, poderão vir a ser usados no tratamento de câncer, sendo que a eficácia na ação destes peptídeos em tipos diferentes de células tumorais varia entre eles e requer que sejam testados. Isto se deve a diferenças na composição das membranas das células, na área de superfície e na fluidez das bicamadas lipídicas (LEUSCHNER & HANSEL, 2004; MADER *et al.*, 2005). Assim, a membrana plasmática é o principal alvo do peptídeo e sua composição está diretamente relacionada à seletividade deste.

Uma das formas do peptídeo desestabilizar a membrana plasmática é por meio da formação de poros, o que leva a queda do gradiente eletroquímico na membrana, permitindo um fluxo maior de água e íons por esta, ocasionando assim o inchaço e osmólise da célula. Este modelo, conhecido como poro toroidal, explica a ação dos peptídeos em concentrações micromolares, uma vez que, a presença de poucos poros é suficiente para desestabilizar a membrana de maneira irreversível (SHAI, 2002).

Já peptídeos altamente seletivos em geral se ligam à camada fosfolipídica, sendo que sua face hidrofóbica fica em contato com os lipídeos e a face polar e catiônica fica em contato com os grupos carregados dos fosfolipídeos provocando uma curvatura na bicamada lipídica,

gerando uma permeabilização e desestabilização da membrana, a qual é colapsada por meio da formação de poros temporários. Este é denominado de modelo carpete (SHAI, 2002).

Outro modelo, conhecido como do tipo detergente ou “detergent-like”, ocorre quando peptídeos altamente hidrofóbicos estão em solução aquosa formando agregados que quando se encontram com os fosfolipídeos de membrana arrancam fragmentos desta formando estruturas parecidas com poros (BECHINGER & LOHNER, 2006).

Alguns peptídeos têm ação intracelular, com capacidade de penetrar nas células e romper a membrana mitocondrial de células cancerígenas. Estes peptídeos formam poros na membrana mitocondrial, alterando seu potencial transmembrana e liberando ativadores de caspases, como o citocromo c, levando, assim à apoptose desta (GREEN & REED, 1998). Ainda podem impedir a progressão tumoral pela inibição do desenvolvimento dos vasos sanguíneos ou pelo comprometimento da maquinaria de expressão ao se ligarem a ácidos nucléicos (MADER & HOSKIN, 2006).

Em células cancerígenas a fluidez de membrana é maior por possuir menor nível de colesterol, em relação às células normais. Desta forma, a atividade lítica e a capacidade de desestabilização da membrana por peptídeos antitumorais podem ser facilitadas quando comparada ao efeito sobre células normais (KOZLOWSKA *et al.*, 1999; SOK *et al.*, 1999). Estudos sugeriram que a atividade de peptídeos membranoativos diminuiu em linhagens de câncer de mama e de próstata, as quais possuem alto nível de colesterol na membrana, assim como as células não tumorais (HOSKIN & RAMAOTHY, 2008).

Outras mudanças também ocorrem na célula quando esta se torna cancerígena, como aumento de microvilosidades na superfície, que podem aumentar a superfície de contato e facilitar a ligação de peptídeos e, ainda, no âmbito molecular, mudanças no grau de glicosilação de membrana. (HOSKIN & RAMAOTHY, 2008).

O número de glicoproteínas presentes na membrana é aumentado devido à ativação de certas glicosiltransferases, que catalisam a biossíntese destas. O aumento da expressão destas moléculas aniônicas contribui para a carga negativa da membrana de células tumorais (HOSKIN & RAMAOTHY, 2008).

Alguns peptídeos com ação anticâncer que exercem seus efeitos sobre a membrana já foram citados na literatura, como os BMAP-28 e lactoferrina B, que são de origem bovina, HNP-1 (α -defensina) e LL-37, que são de origem humana, e melitina, que é um polipeptídeo catiônico composto por 26 resíduos de aminoácidos. Este último é originário do veneno de abelhas *Apis mellifera* e sua atividade anticâncer já está bastante citada na literatura (HOSKIN & RAMAOTHY, 2008). Outros peptídeos como as catelicidinas, cecropinas, defensinas e a

magainina 2 foram citotóxicos em células cancerígenas de leucemia humana, linfoma, e em células tumorais de mama, pulmão, ovário, útero e carcinoma de células escamosas orais (MADER & HOSKIN, 2006).

Alguns efeitos colaterais são observados em função do tratamento com peptídeos anticâncer, como por exemplo, náuseas e vômitos, hipomagnesemia, supressão da atividade da medula óssea, ototoxicidade e nefrotoxicidade (ANTUNES & BIANCHI, 2004). Isto se deve ao fato de muitas células normais terem composição de membrana semelhante à membrana de células tumorais levando, assim, à ação dos peptídeos sobre estas. Estes efeitos colaterais poderiam ser minimizados se o peptídeo antitumoral for liberado de maneira controlada ou seletiva no tecido específico ou na célula-alvo, sendo isso possível por meio de abordagens de base nanobiotecnológica.

1.4 USO DA NANOBIOTECNOLOGIA NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Novos estudos em busca de fármacos com liberação controlada, ou seja, de dispositivos voltados para liberação do ativo em situações específicas são de suma importância para ciência aplicada à saúde humana e animal, uma vez que têm como objetivo otimizar e controlar a administração, a absorção e a seletividade destes fármacos. Além disto, a liberação controlada possui maior eficiência terapêutica quando comparada aos medicamentos convencionais livres, já que esta possibilita a degradação progressiva e controlada do fármaco, direcionamento a alvo específico, diminuição da toxicidade, aumento de meia-vida na circulação e diminuição de doses (SILVA *et al.*, 2003).

A liberação controlada é realizada geralmente por meio de estruturas, em geral compostas por polímeros biodegradáveis, as quais são consideradas nanopartículas, uma vez que são menores que 1 μm (1000 nm) de diâmetro. As nanopartículas podem possuir estrutura de nanoesferas, nas quais o fármaco encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica; ou nanocápsulas, na qual se usa óleo o qual faz com que o fármaco fique envolto por uma membrana, geralmente polimérica, isolando assim o núcleo do meio externo (Figura 2) (SILVA *et al.*, 2003).

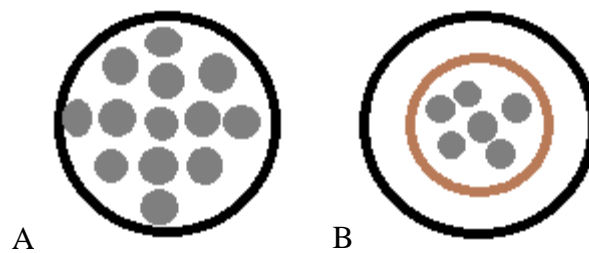


Figura 2: Representação de nanopartículas. A) nanoesfera com fármaco disperso na matriz polimérica; B) nanocápsula com fármaco dissolvido no núcleo oleoso.

Para o desenvolvimento de nanopartículas contendo peptídeos são utilizados polímeros orgânicos devido à sua elevada biocompatibilidade celular, biodegradabilidade e aprovação regulamentar. Estes polímeros podem ser naturais, como o colágeno, a queratina, a celulose e a quitosana; naturais modificados, nos quais são adicionados grupos polares às cadeias para tentar diminuir o tempo de degradação; e os sintéticos que, geralmente, possuem como características a hidrofílicidade e massa molecular menor, tornando-os, assim, mais fáceis de serem degradados (JAIN, 2000).

Dentre os polímeros naturais, a quitosana, um polímero catiônico obtido da desacetilação da quitina, que por sua vez, provém da carapaça de crustáceos e insetos, tem sido muito utilizada na produção de nanopartículas devido às suas propriedades físico-químicas. Além de ser biodegradável e biocompatível, esta biomolécula é mucoadesiva, o que facilita a sua passagem e conseqüentemente do princípio ativo por ela carregado através das barreiras epiteliais podendo ser administrada por via oral, nasal, ocular (TIYABOONCHAI, 2003). A utilização de copolímeros, como o poli (etileno glicol) (PEG), que é um surfactante hidrofílico não iônico, na produção de nanopartículas em conjunto à quitosana torna o dispositivo desenvolvido ainda mais biocompatível e mais estável em fluidos biológicos, pois diminui a tendência natural à agregação (Figura 3) (PREGO *et al.*, 2006).

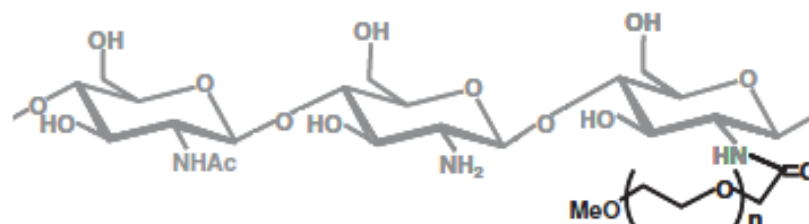


Figura 3: Estrutura química representando a ligação entre a quitosana (cinza) e o polietilenoglicol (preto), modificado de PREGO e colaboradores (2006).

Para a produção de nanopartículas e o encapsulamento de proteínas e peptídeos destinados à administração por via oral existem várias técnicas, como os métodos de coacervação, reticulação de suspensão, nebulização e fluidização. Entretanto, a maioria destes métodos utiliza solventes orgânicos que podem desnaturar os fármacos peptídicos; outros podem oferecer rendimento baixo de encapsulamento; outros requerem temperaturas elevadas e pH extremos que podem inativar alguns peptídeos (SILVA *et al.*, 2003). Outros métodos também se têm revelado adequados na encapsulação de proteínas e peptídeos. As técnicas de nebulização, deslocamento do solvente, emulsificação / geleificação interna e polimerização interfacial foram eficientes na encapsulação da insulina.

Têm-se buscado métodos para produção de nanopartículas que além de garantir a estabilidade da molécula e a manutenção de sua atividade biológica, possam formar estruturas estáveis, solúveis, com tamanho e carga favorável à aplicação desejada. Alguns métodos utilizando macromoléculas naturais, como a formação espontânea de complexos de quitosana e poliânion, têm sido muito estudados por sua simplicidade e eficiência na encapsulação de peptídeos como insulina e calcitonina (REIS *et al.*, 2006).

A técnica de encapsulamento em polímeros naturais tem-se relevado muito eficiente para a criação de materiais contendo peptídeos, já que tais polímeros intumescem em meio aquoso possibilitando, assim elevada produção de partículas neste meio, o que leva a uma maior biocompatibilidade. Além disto, neste método não são utilizados solventes orgânicos, nem temperaturas e nem pH extremos (PEPPAS *et al.*, 2000).

Contudo, o polímero utilizado, a seleção da dosagem, o pH e a natureza do fármaco são alguns parâmetros determinantes para o mecanismo de liberação, o qual deve manter e controlar a taxa de liberação (KHAN, 2001). Este mecanismo de liberação pode ser do tipo reservatório, quando ocorre uma reação química acompanhada pela degradação do polímero ou clivagem do fármaco pelo polímero, sendo esta liberação constante quando há concentração constante do fármaco no interior do reservatório (THACHARODI & RAO, 1996); ou monolítico, quando solventes são ativados gerando intumescimento do polímero ou efeito osmótico, sendo esta difusão dependente da hidrofiliabilidade e da hidrofobicidade do polímero, do tamanho dos poros, do grau de intumescimento e da hidrofiliabilidade do soluto (KOST & LANGER, 1991).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o câncer tem sido a causa de um índice elevado de mortalidade em todo o mundo, pois além de poder ser causado por alterações genéticas, pode ainda ser desenvolvido devido a hábitos alimentares ruins, sedentarismo, obesidade, consumo de álcool e tabaco, estresse, dentre outras causas. Segundo a *World Health Organization* (2008), a estimativa de mortes por câncer é de nove milhões de pessoas em 2015 e de 11,4 milhões em 2030.

Apesar de haver quimioterapia e radioterapia como formas de tratamento para esta doença, estes se mostram insuficientes uma vez que células cancerígenas tornam-se resistentes aos agentes quimioterápicos, que são ainda prejudiciais, já que também causam citotoxicidade em células normais e uma série de efeitos colaterais (HOSKIN & RAMA OOTHY, 2008).

Assim, é necessária a busca de novos fármacos, que atuem especificamente sobre células cancerígenas, sem prejudicar ou causando menos danos às células não tumorais, ou seja, que tenham baixa citotoxicidade; e que ainda não promovam o desenvolvimento de resistência pelas células, que previnam metástases, que ultrapassem tecidos e permaneçam mais tempo no organismo, reduzindo o número de dosagens, sendo estas as características dos sistemas de liberação controlada.

Dentre tais moléculas, os peptídeos anticâncer com ação sobre bicamadas lipídicas constituem uma das mais recentes possibilidades. Contudo, o estudo aprofundado da ação anticâncer de peptídeos membranoativos é de suma importância, uma vez que o efeito hemolítico destes já foi revelado. É ainda necessário desenvolver um sistema de liberação controlada para a entrega destes às células-alvo, já que muitos são tóxicos para células normais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular um peptídeo com potencial atividade antitumoral em nanopartículas a base de quitosana para liberação controlada *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar peptídeos com potencial atividade antitumoral com base em sequências de resíduos de aminoácidos de moléculas descritas na literatura ou mantidas em bancos de dados de uso restrito da Embrapa;
- sintetizar, purificar e caracterizar quimicamente os peptídeos selecionados;
- testar os peptídeos em linhagens de células tumorais e uma não tumoral *in vitro*;
- selecionar o peptídeo e a linhagem, na qual tenha tido maior atividade para ensaios de citotoxicidade e desenvolvimento do sistema de liberação controlada;
- desenvolver sistema nanoestruturado para liberação controlada do peptídeo com o polímero natural quitosana; e
- testar *in vitro* o sistema de liberação controlada nas linhagens HeLa e fibroblasto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os materiais utilizados neste trabalho foram os seguintes: Coluna cromatográfica (Vydac, C₁₈, 10 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, EUA); Criotubos (TPP, ALE); Frascos de Cultura (TPP, ALE); Garrafas de cultura de células (TPP, ALE); Lâminas de vidro (Perfecta, BRA); Lamínulas de vidro (Perfecta, BRA); Membranas com poros de 0,22 µm (TPP, ALE); Papel indicador de pH (Whatman, ALE); Placa do tipo MTP Massive (Bruker Daltonics, ALE); Placas de 96 poços de fundo chato (TPP, ALE); Tubos tipo eppendorf de 1,5 e 2,0 mL (Axygen, EUA); Tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL (TPP, ALE).

Os reagentes utilizados foram os seguintes: Acetonitrila (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido acético (Vetec Química Fina Ltda, BRA); Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido α-cyano-4-hidroxi- cinâmico (Bruker Daltonics, ALE); Albumina Sérica Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co., EUA); Anexina-V⁺ (Sigma-Aldrich); Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) (Gibco, USA); Azul Tripán (Sigma-Aldrich Co., EUA); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., EUA); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's); Hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio (TBTU) (Novabiochem); Iodeto de Propídio (Invitrogen, EUA); MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen, EUA); *N,N*-dimetilformamida (DMF); *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA); PEG (Polietilenoglicol 5000 éter monometílico, Sigma-Aldrich); Piperidina (Fluka analytical); Quitosana (Sigma-Aldrich); Resina Rink-Amide-MBHA (Peptides International); Rodamina 123 (Invitrogen, EUA); Sal de pentassódio de [óxido(fosfonatooxi)fosforil] fosfato (TPP, Sigma-Aldrich); Soro Fetal Bovino (Gibco, USA); Tampão fosfato-salina (PBS) (Laborclin, BRA); Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02 %) (Gibco, USA); Triton X-100 (Merck, ALE).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes: Agitador magnético (Ika); Balança (Shimadzu, JAP); Câmara de Neubauer (C. A. Hausser & Son, EUA); Câmera digital (Zeiss, ALE); Citômetro de fluxo (FACSCallibur Becton & Dickenson, EUA); Espectrofotômetro (Shimadzu, JAP); Espectrômetro de massa MALDI-TOF MS/MS (UltraFlex III Bruker Daltonics, ALE); Incubadora de CO₂ (Tecnal, BRA); Fluxo Laminar (Veco, BRA); Leitora de Microplaca Modelo 3550-V (BioRad, EUA); Microscópio de força

atômica SPM-9600 (Shimadzu, JAP); Microscópio invertido de contraste de fase (Unico, EUA); Pipetador automático (HTL); Cromatógrafo líquido de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Shimadzu, JAP); Vórtex (Ika).

4.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A metodologia seguiu o esquema representado abaixo (Figura 4), no qual foram selecionados quatro peptídeos sendo o primeiro a melitina que possui atividade citolítica já descrito na literatura e foi denominada neste trabalho de acordo com as regras do laboratório como PSLEM 0850. Os outros três peptídeos foram selecionados do banco de dados da Embrapa de acordo com as predições de atividade por suas sequências de aminoácidos, assim foram selecionados dois peptídeos de anfíbio que foram denominados de PSLEM 0817 e PSLEM 0909 e outro peptídeo que é um fragmento de uma proteína supressora de metástase que foi denominado de PSLEM 0904.

Todos os peptídeos foram sintetizados manualmente em suporte sólido, foram purificados em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC), tiveram a pureza e sequências confirmadas por MALDI-TOF/TOF e em seguida foram levados para o ensaio de viabilidade celular utilizando MTT. Assim, foi verificado o potencial dos peptídeos sobre as linhagens tumorais de melanoma (B16F10), cervical (HeLa) e de mama (MCF-7), também sobre a linhagem imortalizada de glândula salivar submandibular (HSG) e sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto (NIH/3T3).

Após o ensaio de viabilidade celular foi selecionado o peptídeo que foi ativo sobre todas as linhagens e a linhagem na qual ele foi mais ativo. Assim, foram selecionados o peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) e a linhagem HeLa para os ensaios seguintes sendo que apenas para comparação da morfologia, também foi utilizada a melitina (PSLEM 0817).

Com isto, seguiram-se dois caminhos, sendo o primeiro a investigação do mecanismo de ação no qual o peptídeo dermaseptina atuava sobre a membrana de HeLa, utilizando-se análises de morfologia celular, detecção de morte celular por anexina-V, fragmentação do DNA e ciclo celular e alteração do potencial de membrana mitocondrial. O segundo caminho foi o encapsulamento do peptídeo para verificar se ele mantinha sua atividade sobre as linhagens HeLa e fibroblasto, então foram produzidas quatro tipos de nanopartículas a base de quitosana, que foram avaliadas quanto a eficiência de encapsulamento (EE), a caracterização, a liberação controlada e a atividade sobre a viabilidade celular.

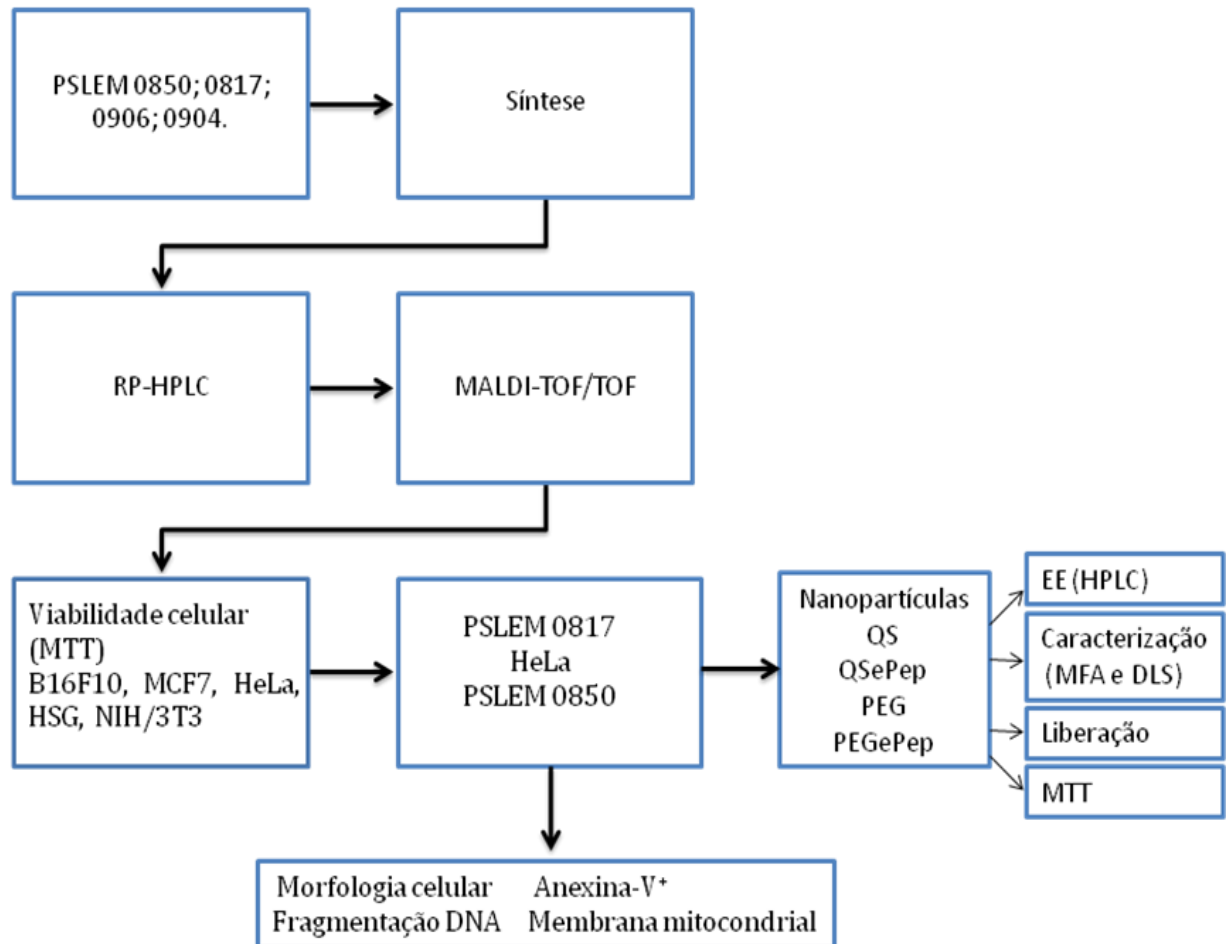


Figura 4: Representação em esquema da metodologia seguida ao longo do trabalho, na qual as setas indicam as etapas seguintes.

4.4 SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS

Foram selecionados quatro peptídeos, dentre os quais dois foram identificados a partir da secreção cutânea de anfíbio, sendo que um deles apresentava atividade citolítica já conhecida, o qual é pertencente à classe das Dermaseptinas. O terceiro peptídeo foi selecionado utilizando estratégia de predição de função membranoativa previamente descrita (BRAND, 2007). Estes três peptídeos foram selecionados dentre outros peptídeos contidos no banco de dados da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia com base em suas sequências de aminoácidos. O quarto peptídeo, a melitina, foi utilizado como controle positivo nas análises de morfologia e viabilidade celular por apresentar atividade citolítica já descrita (WESTON & RAISON, 1998). Os peptídeos PSLEM 0817 e PSLEM 0904 haviam sido sintetizados anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Espectrometria de Massa (Tabela 2).

Tabela 2: Peptídeos com possível potencial antitumoral com base nas suas sequências de aminoácidos.

Peptídeo	Origem	[M+H] ⁺	Sequência
PSLEM 0817	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	3009,7	H-ALWKDLLKNVGVIAAGKAVLNKVTDMVNQ-OH
PSLEM 0906	<i>Trachycephalus venulosus</i>	1173,5	H-YIGWGYHDY-OH
PSLEM 0904	Fragmento de uma proteína supressora de metástase	3205,8	H-FINKAGKLQSQLRTTVVAAAFLDAFQKVA-NH ₂
PSLEM 0850	Veneno de abelha	2845,7	H-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂

4.5 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila)/t-butila de síntese manual em suporte sólido (CHAN & WHITE, 2000), sendo Fmoc-Tyr(tBu)-Wang Resin (Peptides International), com grau de substituição de 0,44 mmol g⁻¹ o suporte para a síntese de PSLEM 0906, a resina Rink-Amide-MBHA, 0,35 mmol g⁻¹ (Merck S.A.), o suporte para síntese da melitina, Rink-Amide, 0,52 mmol g⁻¹ (Peptides International), o suporte para o PSLEM 0904 e Fmoc-Gln(Trt)-Wang Resin (Peptides International), 0,50 mmol g⁻¹.

Primeiramente foi conduzida a desproteção do grupo Fmoc, o qual protege o grupamento funcional amina da resina, utilizando-se uma solução de piperidina a 20% (em volume) em *N,N*-dimetilformamida (DMF), já que o grupo Fmoc é lábil à base (CHAN & WHITE, 2000). A resina foi tratada com esta solução duas vezes, por 15 minutos cada, sob agitação.

Em seguida, foi conduzido o acoplamento do primeiro derivado de Fmoc-aminoácido, o qual foi adicionado de acordo com sua massa molecular, em um excesso molar de quatro vezes. Também foram adicionados 178 mg (0,55 mmol) de hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio (TBTU), 2,0 mL de DMF e 200 µL (1,17 mmol) de *N, N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) e, por fim, deixado sob agitação pendular durante 90 min.

As etapas de desproteção do grupamento Fmoc e acoplamento dos respectivos derivados de aminoácido (Fmoc-AA-OH) foram repetidas, sucessivamente, até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido, sendo que, após cada uma destas, a resina era lavada com DMF e 2-propanol, alternadamente por três vezes.

O sucesso de cada etapa foi confirmado pelo teste de Kaiser (ninhidrina), que detecta a presença de aminas livres na cadeia peptídica. Assim, quando o grupo protetor Fmoc tinha sido removido, após a etapa de desproteção, o resultado era azul e quando havia a ligação peptídica entre o derivado de aminoácido adicionado e o grupamento N-terminal da cadeia em formação, após a etapa de acoplamento, o resultado era uma coloração amarelada (KAISER, *et al.*, 1970).

Após a síntese, a reação de desproteção das cadeias laterais reativas e a clivagem da ligação peptidil-resina foi conduzida adicionando-se ácido trifluoroacético (TFA):metilsulfanilbenzeno:água:1,2-etanoditiol:triisopropilsilano (89,0:5,0:2,5:2,5:1,0; v:v:v:v:v) e fenol cristalino (50-100 mg, massa não determinada exatamente). Este processo de clivagem durou 90 minutos, em seguida borbulhou-se nitrogênio dentro do tubo de reação para remover o TFA.

Por fim, o peptídeo foi lavado com éter diisopropílico gelado com nitrogênio líquido, para precipitá-lo e extrair o excesso de produtos de reação dos grupamentos protetores com os de sequestradores de carbocátions. O peptídeo foi então extraído sucessivamente com água e com água e solução aquosa de acetonitrila (1:1, v:v) e recolhido sob filtração, com auxílio de um funil com placa porosa. O material obtido foi, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado para a obtenção do peptídeo bruto.

4.6 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

Para purificar o produto bruto resultante da síntese foram aplicados 1,5 mg da amostra, ressuspendida em 500 μ L de água tipo I (Milli-Q) com 0,1% (em volume) de TFA, em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC, Shimadzu). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa 218TP510 (Vydac, C₁₈, 10 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, EUA), a qual foi inicialmente lavada com solução de TFA em acetonitrila a 0,1% em volume (solvente B) e posteriormente equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% em volume (solvente A).

O gradiente utilizado foi linear, variando-se a concentração do solvente B de cinco a 95% durante 60 a 85 min, dependendo do peptídeo, após cinco minutos de condição isocrática com 5% (em volume) de solvente B. A concentração do solvente B variou durante 70 min, 85 min e 60 min na purificação dos peptídeos PSLEM 0817 e PSLEM 0904, PSLEM 0850, e PSLEM 0906, respectivamente. O fluxo durante a eluição foi de 2,4 mL min⁻¹, com monitoramento a 216 nm e 280 nm, sendo as separações cromatográficas conduzidas à temperatura ambiente. As frações foram coletadas manualmente e liofilizadas. O peptídeo PSLEM 0850 (melitina) foi recromatografado em coluna analítica 218TP54 (Vydac, C₁₈, 4 x

250 mm, 300 Å, Hesperia, EUA) sob as mesmas condições e utilizando-se gradiente linear semelhante ao utilizado para esta mesma amostra na coluna semi-preparativa.

4.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os componentes moleculares presentes nas frações obtidas nas separações cromatográficas foram confirmados quanto à pureza e identidade em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker, Daltonics, Alemanha), equipado com laser *SmartBeam* e análise de dados em programa computacional controlado pelo software FlexControl 3.0.

As frações foram ressuspensas em água ultra-pura e misturadas a uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg) dissolvida em água (200 μ L), acetonitrila (250 μ L) e solução aquosa de TFA a 3% (50 μ L), na proporção de 1:3 (v:v); em seguida, foram aplicadas em duplicata em uma placa do tipo MTP Massive (384 poços) e deixadas secar à temperatura ambiente.

Para avaliar o grau de pureza e confirmar a identidade dos peptídeos, as massas moleculares foram determinadas por MS sob modo de operação refletido – positivo e as sequências peptídicas confirmadas por MS/MS sob modo de operação LIFTTM, ambas com calibração externa com mistura de peptídeos de acordo com a especificação do fabricante (*Peptide Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros de massa foram adquiridos com duzentos disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 4000.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Para a realização dos ensaios biológicos foi necessário fazer a medida de concentração das soluções dos peptídeos. Para o peptídeo PSLEM 0904 a quantificação foi realizada seguindo o método descrito por MURPHY E KIES (1960), no qual a absorbância da solução em diluições diferentes foi medida nos comprimentos de 205, 215 e 225 nm. A concentração final foi determinada pela seguinte equação, considerando-se os fatores de diluição (*d*):

$$X = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

$$Y = (A_{205}) \times 31$$

$$[\mu\text{g mL}^{-1}] = d \times (X + Y) / 2$$

Já para os outros peptídeos, a quantificação foi feita pela absorvância de luz do resíduo de triptofano seguindo a lei de Lambert-Beer:

$$A = a.b.c$$

onde “A” é a absorvância a 280 nm; “a” é o coeficiente de extinção molar, obtido na literatura (Expasy) ($5550 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); “b” é o caminho óptico (1 cm); e “c” é a concentração desejada (mol L^{-1}).

4.9 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE CÉLULAS

Foram descongeladas três linhagens de células tumorais, todas de origem epitelial, mantidas no Laboratório de Morfologia e Morfogênese, do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília, sendo a melanoma (B16F10), de camundongo e as demais, câncer de mama (MCF7) e câncer cervical (HeLa) e, também, células imortalizadas de glândula salivar submandibular (HSG) humana. Como controle foi utilizada a linhagem de fibroblasto de camundongo (NIH/3T3), de origem conjuntiva. Com exceção da B16F10, que foi proveniente do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e fibroblasto, que foi doada gentilmente pelo Prof. Dr. Rui Curi do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo; as demais linhagens são provenientes da coleção American Type Culture Collection (ATCC).

Quinhentos microlitros do meio contendo cada linhagem congelada em nitrogênio líquido foram transferidos para três mL de meio de cultura (DMEM completo, tamponado com bicarbonato de sódio, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% do antibiótico ampicilina-streptomicina) em tubos de plástico do tipo Falcon de 15 mL. As células foram centrifugadas a 750 g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em um mL de meio de cultura. Transferiu-se um mL de meio acrescido das células para um frasco de cultura de células, contendo cinco mL de meio e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas.

24 horas após o descongelamento, o meio do frasco de cultura de células foi descartado, e em seguida, mais cinco mL de meio de cultura foram adicionados ao frasco para fornecer mais nutrientes e permitir o crescimento das células. Antes de cada troca de meio de cultura e durante o tratamento, as células foram observadas em microscópio de luz invertido e monitoradas quanto aos aspectos morfológicos, crescimento celular e presença de contaminantes.

Durante todo o experimento, após esta etapa, os meios de cultura de cada um dos frascos das linhagens foram trocados a cada 48 horas para evitar confluência (densidade elevada de células em uma região), ou seja, para garantir a qualidade das células, evitando a morte.

Assim, o meio de cultura foi descartado e três mL da solução de tripsina-EDTA (Tripsina, 0,25% (1x) com EDTA. tetrassódico) adicionada ao frasco de cultura para remover a camada de células. O frasco foi levado para estufa a 37°C e 5% de CO₂ por três minutos, e em seguida as células foram analisadas ao microscópio de luz invertido para confirmar a remoção. Foram adicionados mais três mL de meio de cultura para neutralizar a ação da tripsina sobre as células, uma vez que esta se liga à albumina presente no meio. A suspensão de células foi transferida para um tubo plástico de 15 mL e centrifugada a 750 g por cinco min. Retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado com um mL de meio de cultura, do qual 200 µL foram transferidos para o frasco, com cinco mL de meio de cultura novo, que foi levado para a estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após 24 horas as linhagens mantidas no frasco foram tripsinizadas, centrifugadas, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuscitadas em meio de congelamento (DMEM, soro fetal, antibiótico, de DMSO, 78:20:1:1, v:v:v:v). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, 500 µL em cada, os quais foram mantidos a -80°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

Para avaliar se o peptídeo selecionado, a dermaseptina, induzia efeitos relacionados ao bloqueio da proliferação e do ciclo celular foram realizados os ensaios descritos a seguir.

4.10 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM OS PEPTÍDEOS

Após tripsinizar e ressuscitar as células, que estavam mantidas na estufa a 37°C, em 1 mL de meio de cultura, um volume de 10 µL desta suspensão foi misturado a 50-60 µL, da solução de azul de tripan (0,4%, p/v, em PBS: 50 mmol L⁻¹ fosfato de potássio; 150 mmol L⁻¹ NaCl; pH 7,2) para determinar o número de células. 8 -10 µL desta mistura foram depositados em uma câmara de Neubauer, onde as células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas por meio de microscópio de luz invertido. O número de células foi determinado pela fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Assim o número de células padronizado para todas as linhagens (8×10^6) era dividido pelo número de células obtido no cálculo representado acima se obtendo, com isto, a quantidade de células em volume as quais eram misturadas ao meio de cultura em um tubo de polipropileno de 50 mL, transferidas para uma placa de 96 poços, com 200 μL da mistura em cada poço, e levadas para uma estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 12 horas. No dia seguinte a placa foi observada no microscópio de luz invertido para verificar a morfologia das células e a distribuição das mesmas na placa. Então, o meio de cultura foi substituído por uma solução contendo concentrações seriadas dos peptídeos (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e $256 \mu\text{g mL}^{-1}$) dissolvido no meio de cultura, em triplicata, sendo o controle composto por meio de cultura e água ultrapura no mesmo volume adicionado com os peptídeos. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas.

4.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO PEPTÍDEO LIVRE

4.11.1 VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Esse método colorimétrico, estabelecido por MOSMANN (1983), é um dos mais utilizados em testes preliminares para a identificação e determinação das concentrações ativas de novas moléculas ativas sobre células tumorais em cultura. Neste teste de atividade, enzimas mitocondriais, como succinato desidrogenase, catalisam a redução do substrato MTT (brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) com FADH_2 como agente redutor, produzindo formazan, o qual é um produto de coloração azulada. Assim, a quantificação da produção de formazan por células submetidas ao tratamento é diretamente relacionada à viabilidade celular.

Após 24 horas do tratamento com o peptídeo, em estufa a 37°C , o meio de cultura com peptídeo foi retirado, foram adicionados 150 μL de solução de MTT a cada poço (15 μL de MTT a 5 mg mL^{-1} diluído em 135 μL de meio DMEM completo) e deixado em estufa por mais três horas. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para solubilizar o formazan formado.

Por fim, a placa foi levada a um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (BioRad 3550-UV) e realizada a quantificação do formazan pela medida da absorbância da solução dos poços no comprimento de onda de 595 nm.

A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, pela média das triplicatas de acordo com a equação abaixo, na qual A é absorbância, B é o branco e C é o controle:

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{C}} \times 100$$

C

4.11.2 DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR ANEXINA-V⁺

A indicação de apoptose pela marcação de fosfatidilserina com anexina-V⁺ seguiu o protocolo descrito por PERES e colaboradores (2005), neste teste a anexina-V⁺ marca células que expõem a fosfatidilserina por apresentar afinidade alta a esta que é uma molécula sinalizadora para fagocitose, uma vez que fica naturalmente na face interna da membrana e é exposta apenas durante o processo de apoptose para a célula ser removida (GRIVICICH *et al.*, 2007). Após 24 horas de tratamento com 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo PSLEM 0817, as células que estavam na placa foram tripsinizadas, neutralizadas com meio de cultura e transferidas para tubo eppendorf, o qual foi levado para centrifugação. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação, adicionado 5 μL de anexina-V e o sistema de ensaio foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação e, imediatamente antes da leitura em citômetro de fluxo, foi adicionado 50 μL de iodeto de propídeo. A amostra foi analisada em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) e os dados obtidos foram analisados no programa CellQuest 3.0.1.

4.11.3 MONITORAMENTO DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Seguiu-se o protocolo descrito por PERES e colaboradores (2005), que utiliza o composto rodamina 123, o qual é um corante fluorescente catiônico capaz de ultrapassar a membrana celular e ser capturado pela mitocôndria. Então, se o potencial mitocondrial transmembrânico for alterado a célula emitirá menor fluorescência pelo efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria podendo levar à despolarização, quando o histograma de intensidade de emissão de fluorescência desloca-se para a esquerda, ou a hiperpolarização, quando se desloca para direita.

Após o tratamento com 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo PSLEM 0817, tripsinização e centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 μL de PBS. Deixou-se incubar no escuro, por 15 minutos e à temperatura ambiente, com 0,5 μL de solução de rodamina 123 (5mg mL^{-1} diluídos em etanol). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo cada lavagem seguida por centrifugação e descarte do sobrenadante. Por fim, foram adicionados 300 μL de PBS para incubação por 30 minutos, e após este período, a amostra foi analisada em citômetro de fluxo sob as mesmas condições já descritas.

4.12 FRAGMENTAÇÃO DO DNA E CICLO CELULAR

Para analisar se houve fragmentação do DNA e alteração no ciclo celular, seguiu-se o protocolo descrito por PERES e colaboradores (2005). Neste utilizou-se iodeto de propídeo, que se liga ao DNA de células íntegras emitindo fluorescência alta, por citometria de fluxo, ou se liga a fragmentos de DNA de células não íntegras emitindo fluorescência baixa (ZAMAI *et al.*, 1996). Assim, as células foram ressuspensas em 200 μL de tampão de lise (0,1% em massa de citrato de sódio, 0,1% em massa de Triton X-100 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídeo diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo a incubação realizada no escuro. A amostra foi analisada em citômetro de fluxo como já descrito no item 4.11.2. Foram consideradas apenas as células com DNA não fragmentado para o cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular.

4.13 MORFOLOGIA CELULAR

Para analisar se ocorreram alterações morfológicas após o período de tratamento com todas as concentrações testadas do peptídeo (256 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as células foram observadas em microscópio invertido de contraste de fase (UNICO, EUA), sendo a aquisição das imagens obtidas com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e programa computacional de aquisição Scope (versão 1.0.0.0, 2003).

As células também foram analisadas por microscopia de força atômica. Foram preparadas lamínulas de vidro contendo a linhagem celular HeLa, das quais uma foi analisada sem tratamento, e as demais nas concentrações letais estimadas em torno de 50%, ou seja, a tratada com melitina (PSLEM 0850) na concentração 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a tratada com dermaseptina na concentração 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PSLEM 0817). As imagens foram obtidas em ar por modo de operação contato utilizando o equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão), com resolução de 512 x 512 pixels por modo de operação contato com aquisição de topografia, utilizando scanner de dimensão máxima de 125 μm x 125 μm de varredura, em área de varredura de 100 μm x 100 μm . Foi utilizada ponteira de nitreto de silício integrada a cantilever de formato triangular com constante de mola de 0,15 N/m. Em seguida, as imagens foram processadas com correção de plano pelo software SPM-9600 off-line que acompanha o microscópio.

4.14 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO O PEPTÍDEO PSLEM 0817

4.14.1 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA (QS)

Foi utilizada a técnica de geleificação iônica descrita por CALVO e colaboradores (1997). Para o desenvolvimento desta técnica, foi preparada uma solução de ácido acético a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (570 μL de ácido acético para 100 mL de água Milli-Q), chamada de solução 1. Na solução 2 foram dissolvidos 40 mg de quitosana (75% desacetilada, Sigma-Aldrich) em 20 mL da solução 1, durante 1h 30 min e sob agitação magnética, sendo esta filtrada após este período, (filtro-Millex GV, poro 0,22 μm).

Em seguida, preparou-se a solução 3, na qual 40 mg de sal de pentassódio de [óxido(fosfonatooxi)fosforil] fosfato (TPP, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em 20 mL de água Milli-Q. Por fim, foi transferido para outro béquer um volume de 4 mL da solução 2 filtrada, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo PSLEM 0817 e 2 mL da solução 3 adicionada com pipetador automático de forma lenta e constante, e sob agitação magnética. As soluções foram adicionadas na respectiva ordem e permaneceram sob agitação por cinco minutos formando as nanopartículas denominadas QSePep. As nanopartículas vazias, denominadas QS, foram desenvolvidas seguindo estes passos, porém sem a presença do peptídeo (Tabela 1).

4.14.2 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E POLIETILENOGLICOL (PEG)

O desenvolvimento de nanopartículas de PEGePep ocorreu pela mesma técnica de geleificação iônica descrita anteriormente, sendo que o PEG (Polietilenoglicol 5000 éter monometílico, Sigma-Aldrich) foi acrescentado para uma concentração de $4,16 \text{ mg mL}^{-1}$ na solução final após adição do peptídeo e anterior à adição do TPP. As nanopartículas vazias, denominadas PEG, também, foram desenvolvidas seguindo estes passos e sem a presença do peptídeo (Tabela 3).

Tabela 3 – Representação das concentrações dos reagentes utilizados para cada nanopartícula.

Nanopartículas	Solução de QS ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$)	PEG ($4,16 \text{ mg mL}^{-1}$)	PSLEM 0817 ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$)
QS	X		
PEG	X	X	
QSePep	X		X
PEGePep	X	X	X

4.14.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE)

A eficácia de encapsulamento foi determinada por RP-HPLC, na qual se aplicou o filtrado da solução de nanopartículas, uma vez que esta solução foi centrifugada em microcon (YM-100, Millipore) a 4000 g por 60 minutos e em temperatura ambiente. A concentração do peptídeo livre foi determinada com base nos cálculos de integração da área da fração obtida, por meio de uma curva padrão de concentrações conhecidas. O cálculo da eficiência de encapsulamento foi o seguinte:

$$EE = \frac{\text{total do peptídeo} - \text{peptídeo livre}}{\text{total do peptídeo}} \times 100$$

4.14.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM E SEM PEPTÍDEO

O raio hidrodinâmico das nanopartículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico, assim como a polidispersividade da amostra, enquanto a carga das nanopartículas foi determinada por medidas de potencial Zeta considerando a estabilidade dos colóides de acordo com ASTM (1985) (Tabela 4). Estes foram adquiridos no equipamento Zetasizer (Malvern) em cubeta tipo zeta celular descartável clara e nos modos de análise geral e modo automático, respectivamente. O espalhamento de luz foi detectado em um ângulo de 173 graus e a 25°C e para análise dos dados o dispersante (água) teve viscosidade 0,8872 cP e índice de refração 1,330.

Tabela 4: Estabilidade coloidal por potencial Zeta de nanopartículas em água (ASTM, 1985).

Potencial Zeta (mV)	Estabilidade do colóide
0 ± 5	Rápida coagulação
± 10 a ± 30	Instável
± 30 a ± 40	Moderada
± 40 a ± 60	Boa
Mais de ± 61	Excelente

Foram preparadas amostras das nanopartículas depositadas sobre folhas recém clivadas de mica muscovita para análise no microscópio de força atômica. Uma fina camada de mica foi montada em um suporte metálico por meio de fita dupla-face e foi acrescentado 1 µL das soluções de nanopartículas em cada. Após terem secado ao ar protegidas por uma placa de Petri, em temperatura ambiente, foram obtidas imagens com resolução de 512 x 512 pixels por modo de operação dinâmico e aquisição em topografia e fase utilizando scanner de

dimensão máxima de 125 μm x 125 μm de varredura, em áreas de varredura de 50 μm x 50 μm e 25 μm x 25 μm . Foi utilizada ponteira de silício cônica acoplada a cantilever de formato retangular com constante de mola de 42 N/m e operando a uma frequência de ressonância de aproximadamente 250 kHz. As imagens contendo as nanopartículas foram processadas com correção de plano pelo software SPM-9600 off-line que acompanha o microscópio sendo que os diâmetros e alturas das partículas foram medidos automaticamente com o modo de segmentação e análise de partículas que acompanha o software.

4.14.5 LIBERAÇÃO CONTROLADA

Para analisar o tempo e a forma (rápida / lenta) de liberação do peptídeo das nanopartículas, foram separadas seis alíquotas de 1 mL de cada amostra (QSePep; PEGePep), as quais foram mantidas em estufa a 37°C. Nos pontos 0, 1, 3, 5, 24 e 48 horas, uma alíquota de cada amostra era retirada da estufa e centrifugada a 20.000 g por uma hora em temperatura ambiente e, em seguida, 100 μg do sobrenadante era analisado por RP-HPLC para verificar a quantidade de peptídeo que estava livre, como descrito no item 4.14.3.

4.14.6 VIABILIDADE CELULAR COM PEPTÍDEO ENCAPSULADO

Para verificar os possíveis efeitos das nanopartículas contendo peptídeo PSLEM 0817 encapsulado em comparação com o peptídeo livre, sobre a linhagem tumoral HeLa, foi testada a viabilidade celular como descrito nos itens 4.11.1. As concentrações do peptídeo nas nanopartículas testadas foram de 0, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já que esta maior concentração foi a que diminuiu a viabilidade celular em 50%, sendo considerada como concentração letal estimada em torno de 50%. Também, foram testadas soluções do peptídeo sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto nas concentrações 32 e 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, uma vez que após os resultados obtidos com a linhagem celular HeLa verificou-se atividade somente nestas concentrações.

Foi utilizada neste ensaio a solução das nanopartículas que haviam ficado na parte superior do microcon após a centrifugação descrita no item 4.14.3. O cálculo da concentração do peptídeo nas nanopartículas foi realizado pela medida de eficiência de encapsulamento obtida, considerando que 150 μg do peptídeo na solução representavam 100%, uma vez que esta foi a concentração total adicionada à solução. Com isto, foi verificada a quantidade do peptídeo presente por mL de solução e se retirava o volume que seria necessário para alcançar as concentrações desejadas.

O mesmo cálculo foi realizado para as nanopartículas vazias, que foram utilizadas como controle, considerando que estas teriam potencialmente a mesma eficiência de encapsulamento das que continham o peptídeo, ainda que não se possa assegurar que as partículas vazias seriam semelhantes morfologicamente àquelas preparadas com o peptídeo.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram representados como média e erro padrão da média para obtenção de gráficos a partir dos resultados obtidos utilizando o programa computacional Origin 8.0 (Microcal). Em seguida, os tratamentos foram comparados com os controles pelo teste de Tükey, utilizando o programa computacional Statview. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo estatisticamente.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Após a síntese manual dos peptídeos selecionados, todos foram cromatografados em RP-HPLC para obter-se um produto final puro. Em seguida a pureza dos peptídeos e suas respectivas massas moleculares foram verificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF, assim como suas sequências confirmadas por experimentos de MS/MS.

Assim o rendimento final após a síntese da melitina (PSLEM 0850) foi de 527,5 mg e como a cromatografia utilizando coluna semi-preparativa em fase reversa não foi eficiente para obter um produto final puro esta foi recromatografada em coluna analítica em fase reversa, na qual o produto puro eluiu próximo a 60% de acetonitrila (Figura 5A). A massa molecular foi verificada em MALDI-TOF/TOF $[M+H]^+ = 2845,7$ assim como a presença da dupla carga $[M+2H]^+ = 1422,8$ (Figura 5B). A confirmação da sequência também foi realizada por MALDI-TOF/TOF na qual foi mostrada a código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série *y* e, também, foram assinalados os íons das séries *y* e *b* (Figura 6).

O rendimento final após a síntese da dermaseptina (PSLEM 0817) foi de 460 mg. Este foi purificado utilizando coluna semi-preparativa na qual o produto puro eluiu em uma concentração de aproximadamente 60% de acetonitrila (Figura 7A). A massa molecular $[M+H]^+ = 3009,7$ e dupla carga $[M+2H]^+ = 1505,4$ foram verificadas por MALDI-TOF/TOF (Figura 7B) no modo linear refletido (MS), assim como a sequência, por modo LIFT™ (MS/MS), sendo utilizado o código de uma letra para os resíduos de aminoácidos com a marcação das séries *y* e *b* e, também, foram assinalados os íons destas séries (Figura 8).

O rendimento final após a síntese do peptídeo do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906), foi de 391,6 mg. Este peptídeo também foi purificado utilizando coluna semi-preparativa, porém o produto puro eluiu em uma concentração de aproximadamente 45% de acetonitrila. Sua massa molecular $[M+H]^+ = 1173,5$, sequência utilizando código de uma letra para os resíduos de aminoácidos com as séries *y* e *b* e massas dos íons fragmentos tendo sido verificadas por MALDI-TOF/TOF no modo MS e MS/MS, respectivamente (Figura 9 e 10).

O peptídeo proveniente de um fragmento da proteína supressora de metástase teve rendimento final após a síntese de 210 mg. Este foi também foi purificado utilizando coluna semi-preparativa na qual o produto puro eluiu em uma concentração de aproximadamente 60% de acetonitrila. A massa molecular $[M+H]^+ = 3205,8$ e dupla carga $[M+2H]^+ = 1602,9$ foram verificadas por MALDI-TOF/TOF no modo MS, assim como sua sequência da série *b* e massa dos fragmentos das séries *y* e *b* foram verificados por modo MS/MS (Figura 11 e 12).

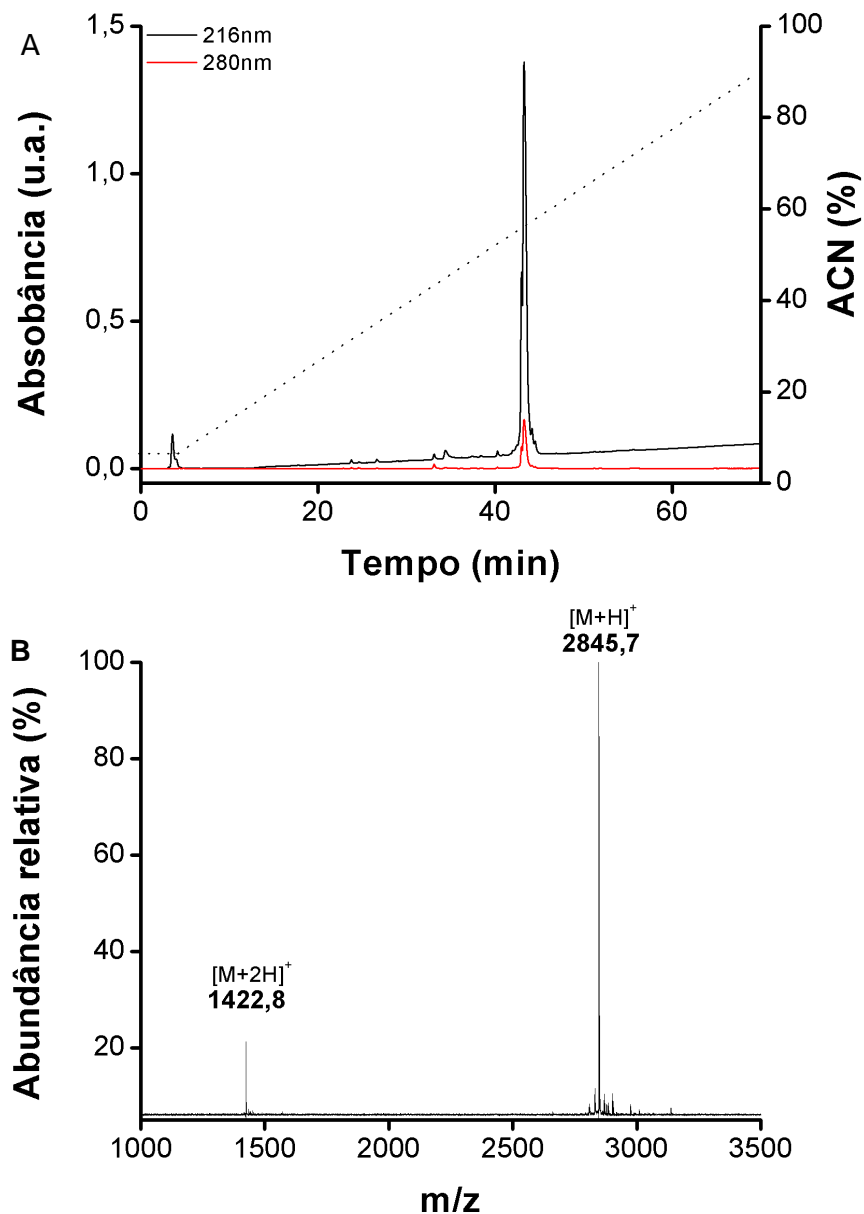


Figura 5: Melitina sintetizada (PSLEM 0850) **a)** Cromatograma analítico do produto sintético recromatografado. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna analítica Vydac C₁₈ 218TP54 (250 x 4,6 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 85 min) e fluxo de 1 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com duzentos disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

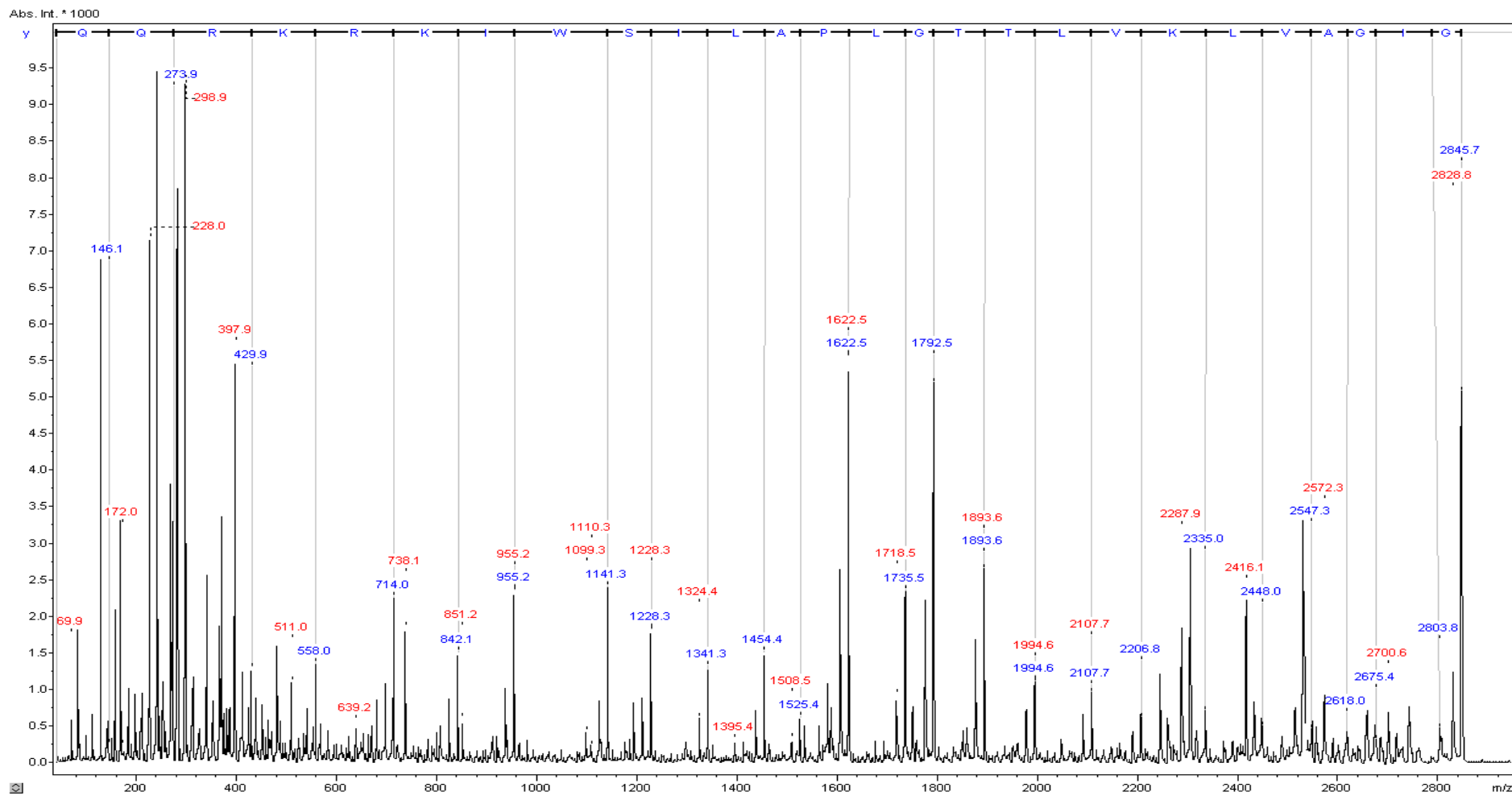


Figura 6: Melitina sintetizada (PSLEM 0850) a) Cromatograma analítico do produto sintético recromatografado. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 2845,7$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série y e as massas representadas das séries y e b em azul e vermelho, respectivamente.

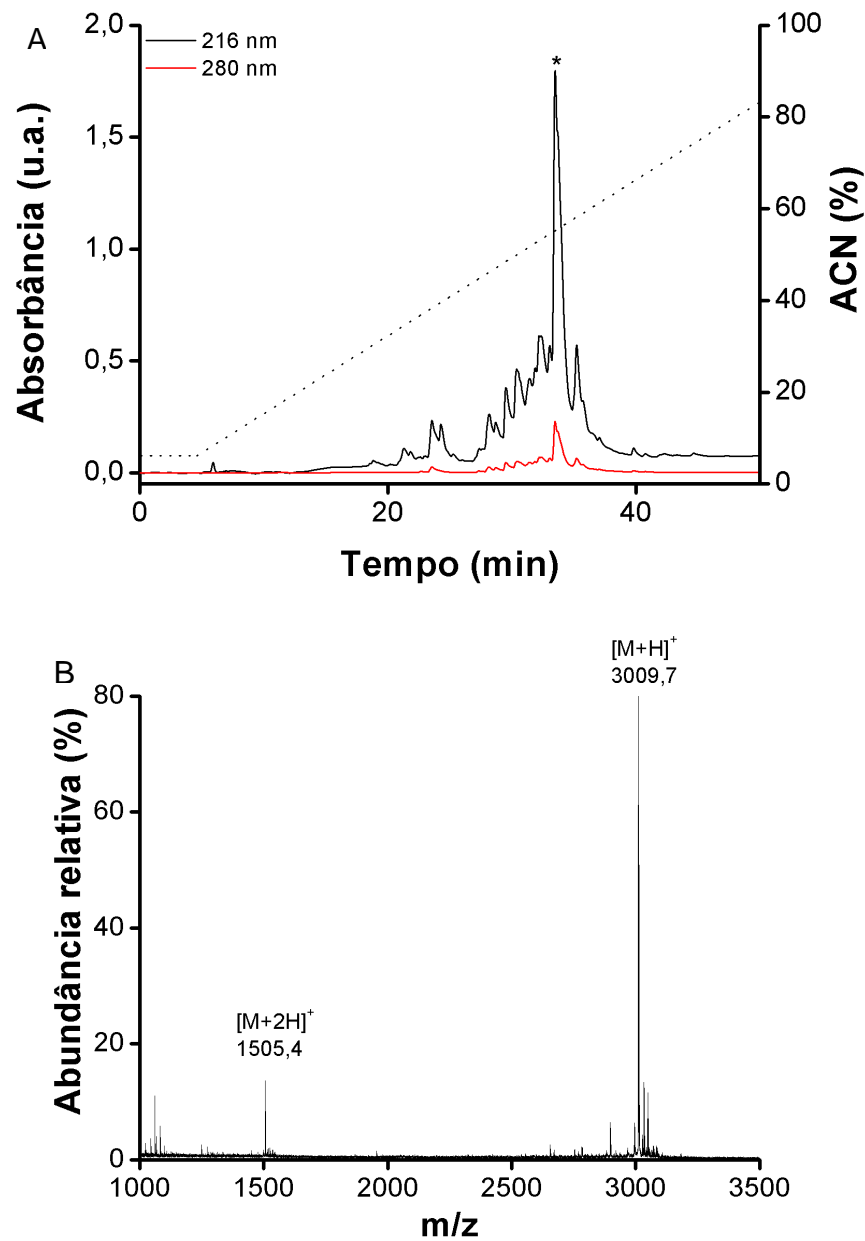


Figura 7: Dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna*, sintetizada (PSLEM 0817) pelo método da fase sólida **a)** Cromatograma do peptídeo sintético bruto com o produto de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% TFA (em volume). O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 70 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com duzentos disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

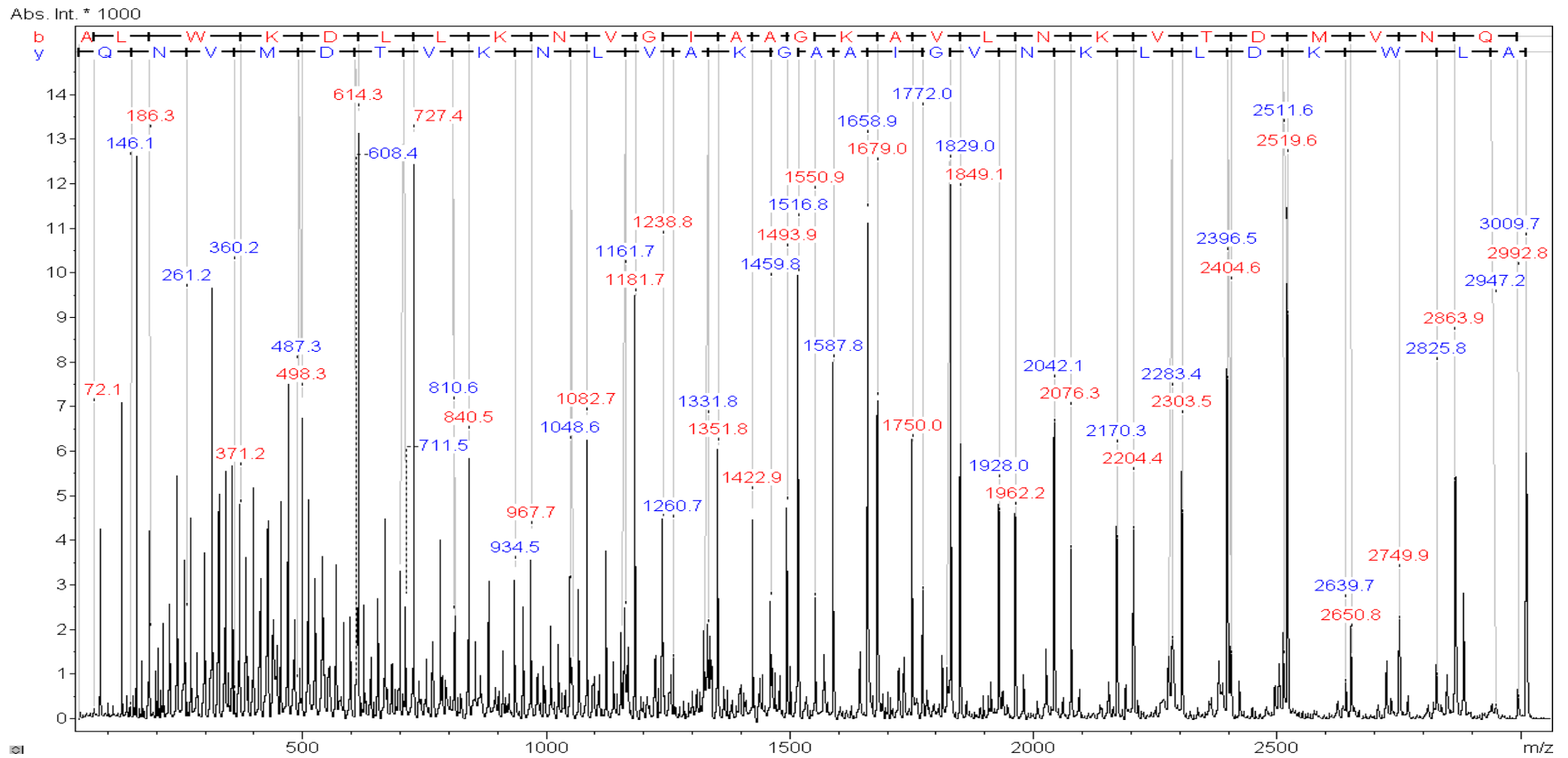


Figura 8: Dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna*, sintetizada (PSLEM 0817) pelo método da fase sólida. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 3009,7$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série *b* e as massas dos fragmentos das séries *b* e *y* estão representadas em vermelho e azul, respectivamente.

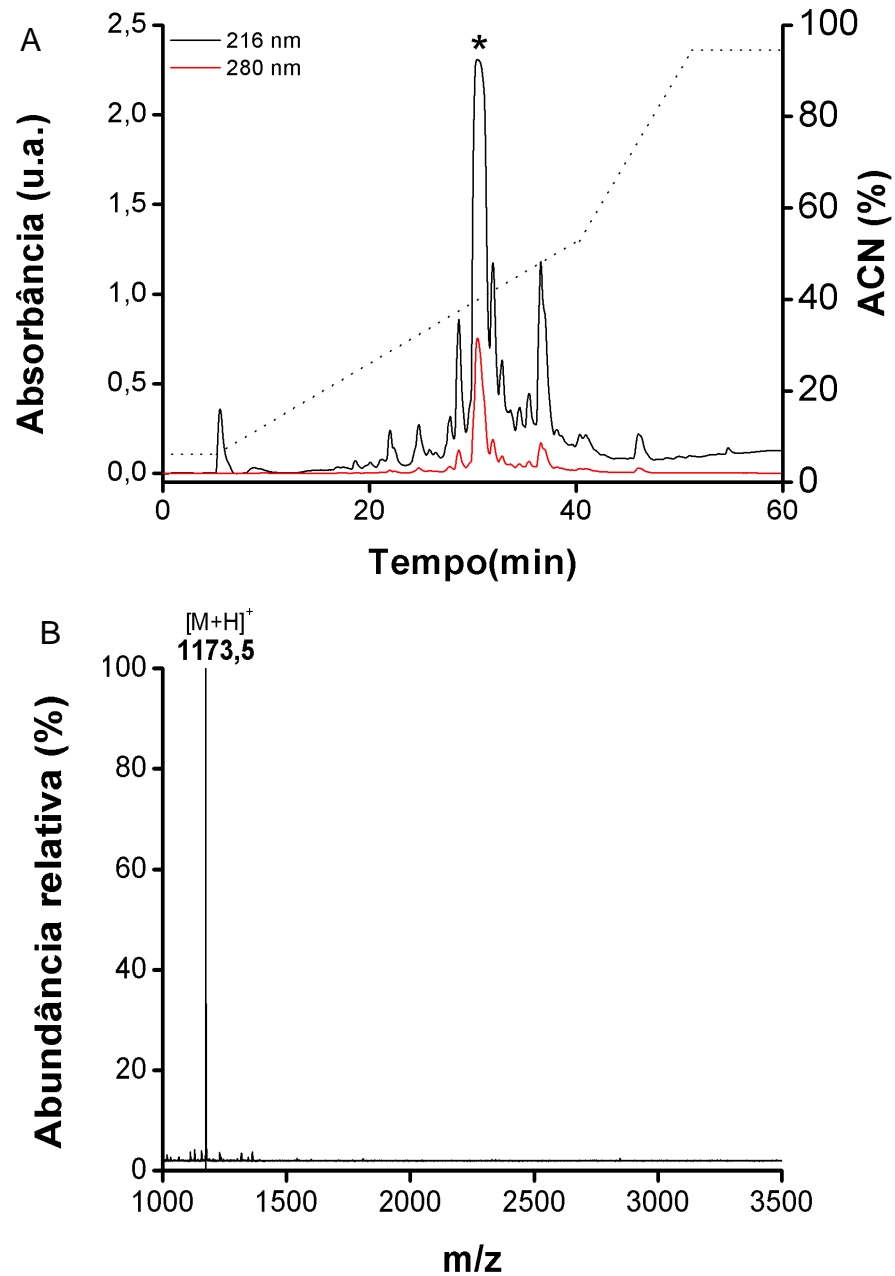


Figura 9: Peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906), obtido por síntese em fase sólida **a)** Cromatograma do peptídeo sintético bruto com produto final de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 60 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento conduzido nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com 200 disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

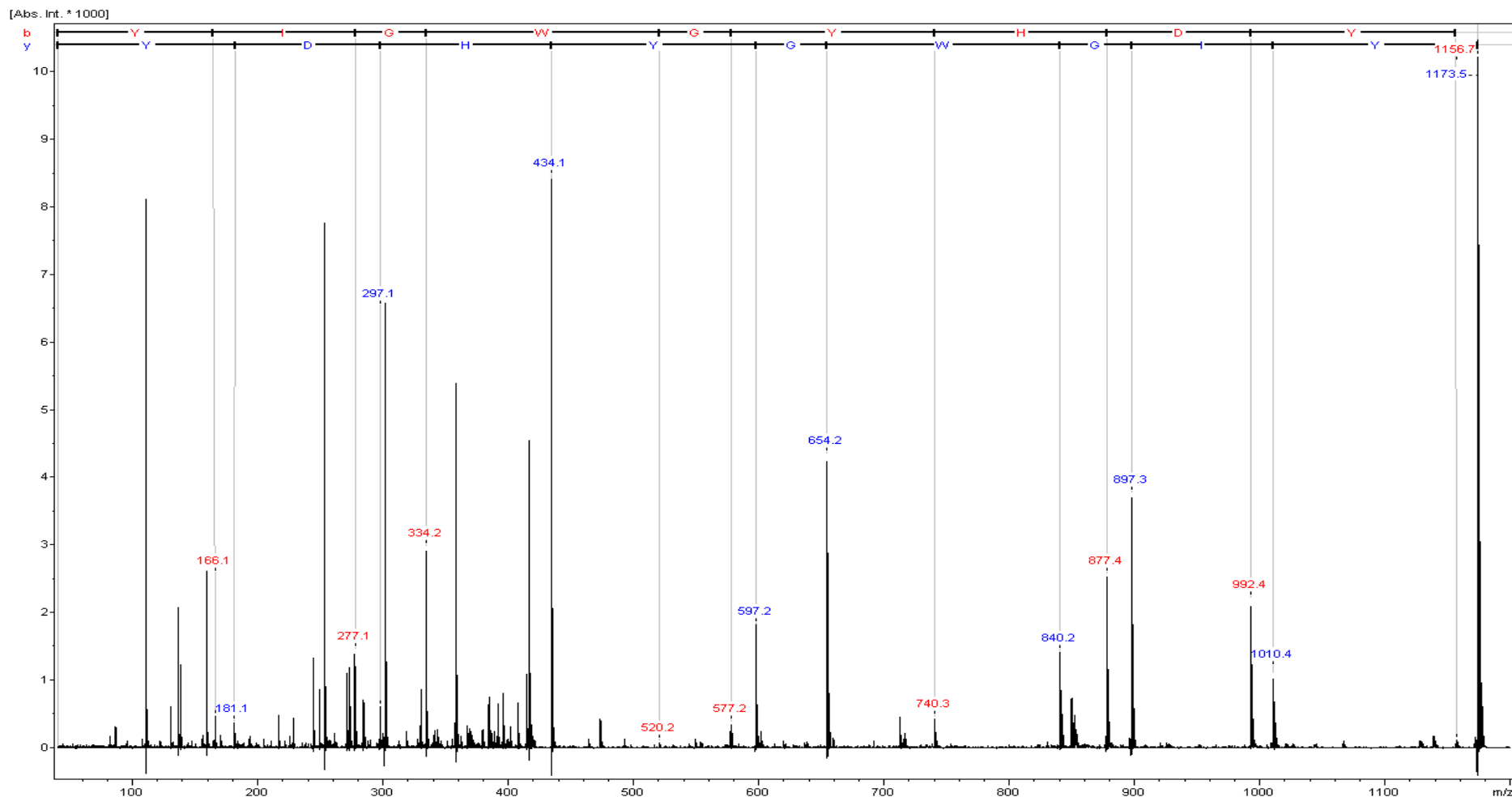


Figura 10: Peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906), obtido por síntese em fase sólida. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 1173,5$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para as séries *y* e *b* e as massas dos fragmentos estão representadas em azul e vermelho, respectivamente.

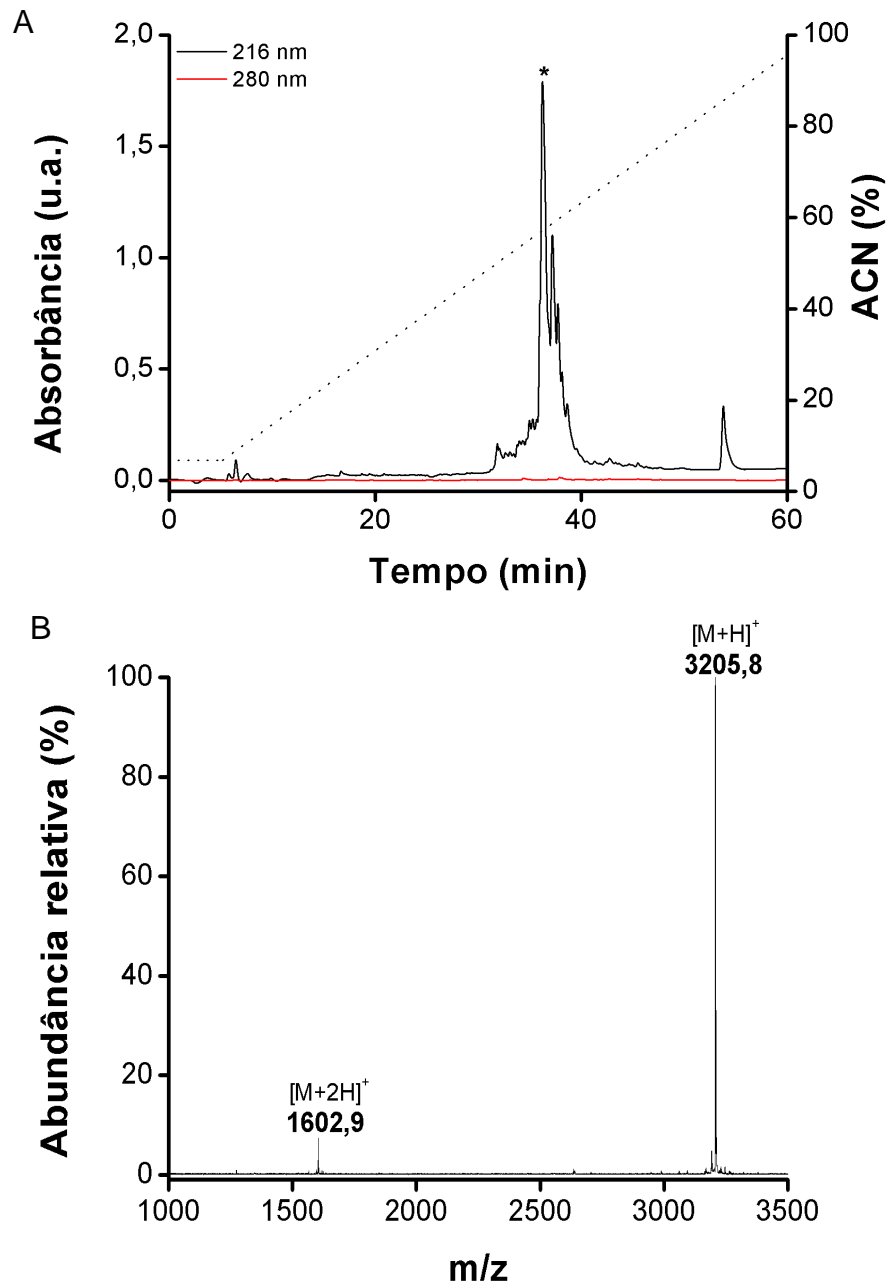


Figura 11: Peptídeo selecionado a partir de um fragmento de uma proteína supressora de metástase (PSLEM 0904), obtido por síntese em fase sólida **a)** Cromatograma do produto sintético bruto com produto final de interesse representado por *. A amostra foi fracionada à temperatura ambiente em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈ 218TP510 (250 x 10 mm) e equilibrada com água contendo 0,1% (em volume) TFA. O gradiente utilizado foi linear de ACN (5 a 95% em 60 min) e fluxo de 2,4 mL min⁻¹. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). **b)** Espectro de massa obtido em MALDI-TOF/TOF adquiridos com 200 disparos de laser a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa na faixa de m/z 1000 a 3500.

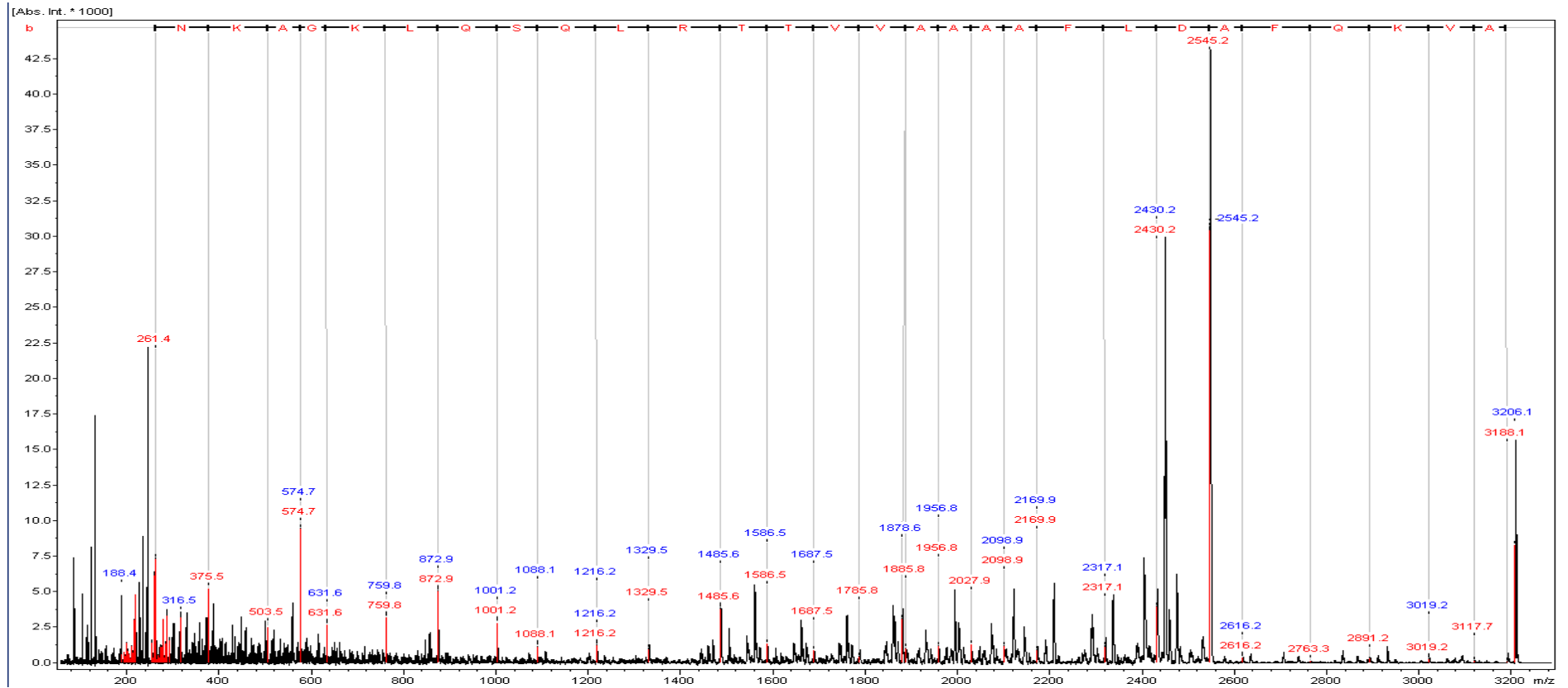


Figura 12: Peptídeo selecionado a partir do fragmento de uma proteína supressora de metástase (PSLEM 0904), obtido por síntese em fase sólida. Sequenciamento *de novo* $[M + H]^+ = 3206,1$. A confirmação da sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra dos resíduos de aminoácidos para a série *b* e as massas dos fragmentos das séries *b* e *y* estão representadas em vermelho e azul, respectivamente.

5. 2 EFEITO CITOTÓXICO

5.2.1 VIABILIDADE CELULAR

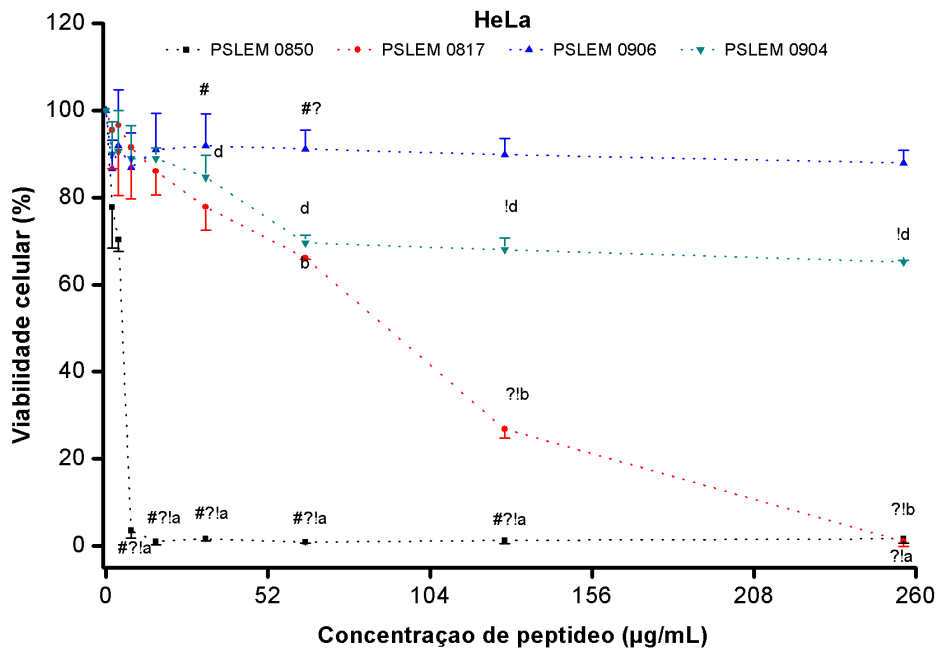
A possível atividade citotóxica dos peptídeos foi testada nas linhagens tumorais de melanoma de camundongos (B16F10), câncer de mama humano (MCF7), câncer cervical (HeLa) humano, em células imortalizadas de glândula salivar submandibular humano (HSG) e na linhagem de fibroblasto (NIH/3T3) nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Utilizou-se a melitina (PSLEM 0850) como controle positivo e para confirmar se as alterações na viabilidade celular eram significativas foi utilizado teste de Tükey, com $P < 0,05$.

Sobre as linhagens HeLa e HSG o peptídeo melitina (PSLEM 0817) diminuiu a viabilidade celular em quase 100% quando tratada de 8 a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, assim como com o peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) quando tratada com 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Porém o PSLEM 0817 diminuiu significativamente 70% da viabilidade de HeLa na concentração de 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto em HSG diminuiu significativamente 50% nesta mesma concentração. O peptídeo PSLEM 0904 diminuiu significativamente 30% da viabilidade de HeLa quando foi tratada de 32 a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e não diminuiu a viabilidades em nenhuma das concentrações testadas sobre HSG. Já o peptídeo PSLEM 0906 não diminuiu significativamente a viabilidade nem em HeLa e nem em HSG em nenhuma das concentrações testadas (Figura 13).

Nas linhagens MCF-7 e B16F10 os peptídeos PSLEM 0850 e 0817 também foram mais ativos, sendo que o primeiro diminuiu significativamente a viabilidade quando tratada de 8 a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o segundo nas concentrações de 128 e 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os peptídeos PSLEM 0906 e 0904 não diminuíram a viabilidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 14).

Sobre a linhagem NIH/3T3 a melitina foi tão ativa como foi sobre as linhagens HeLa e HSG nas mesmas concentrações, e quando tratadas com dermaseptina (PSLEM 0817) o resultado também foi similar ao tratamento de HeLa, porém diminuiu significativamente em 80% a viabilidade celular na concentração de 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 15).

A



B

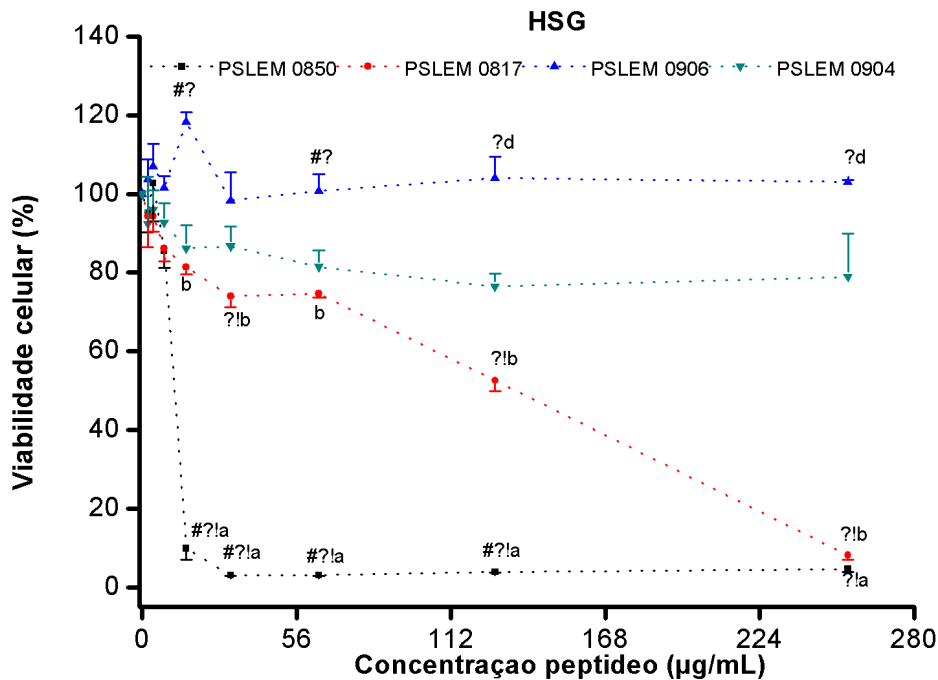


Figura 13: Porcentagem de células vivas (viabilidade) das linhagens A) HeLa e B) HSG por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850), dermaseptina encontrada no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna* (PSLEM 0817), peptídeo identificado a partir do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906) e fragmento de proteína supressora de metástase (PSLEM 0904). Os símbolos *, #, !, ? representam diferenças significativas dos peptídeos PSLEM 0850, PSLEM 0817, PSLEM 0906 e PSLEM 0904 e as letras a, b, c, d se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos ($P < 0,05$).

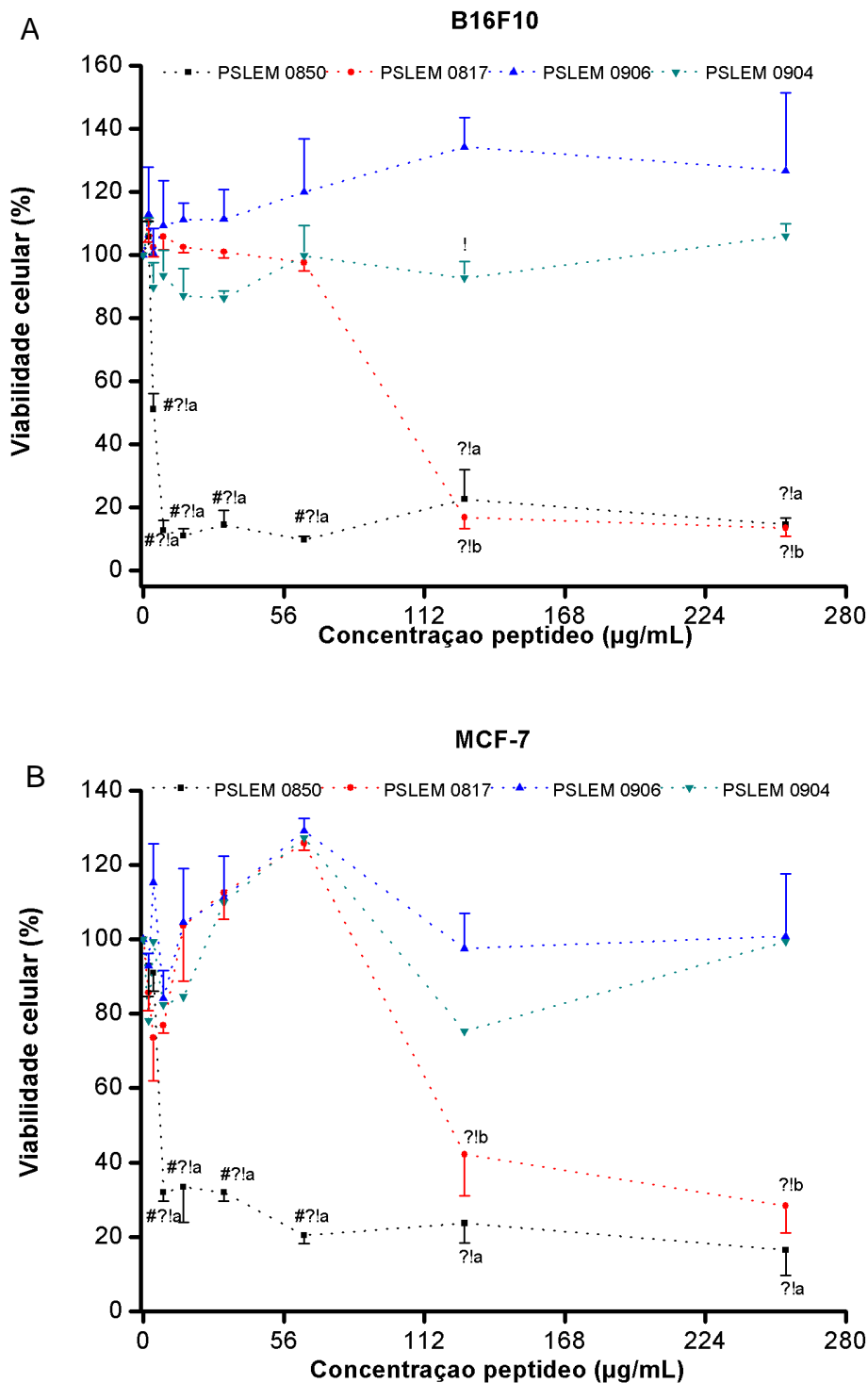


Figura 14: Porcentagem de células vivas (viabilidade) das linhagens A) B16F10 e B) MCF-7 por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850), dermaseptina (PSLEM 0817), peptídeo do anfíbio *Trachycephalus venulosus* (PSLEM 0906) e fragmento de proteína supressora de metástase (PSLEM 0904). Os símbolos *, #, !, ? representam diferenças significativas dos peptídeos PSLEM 0850, PSLEM 0817, PSLEM 0906 e PSLEM 0904 e as letras a, b, c, d se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos ($P < 0,05$).

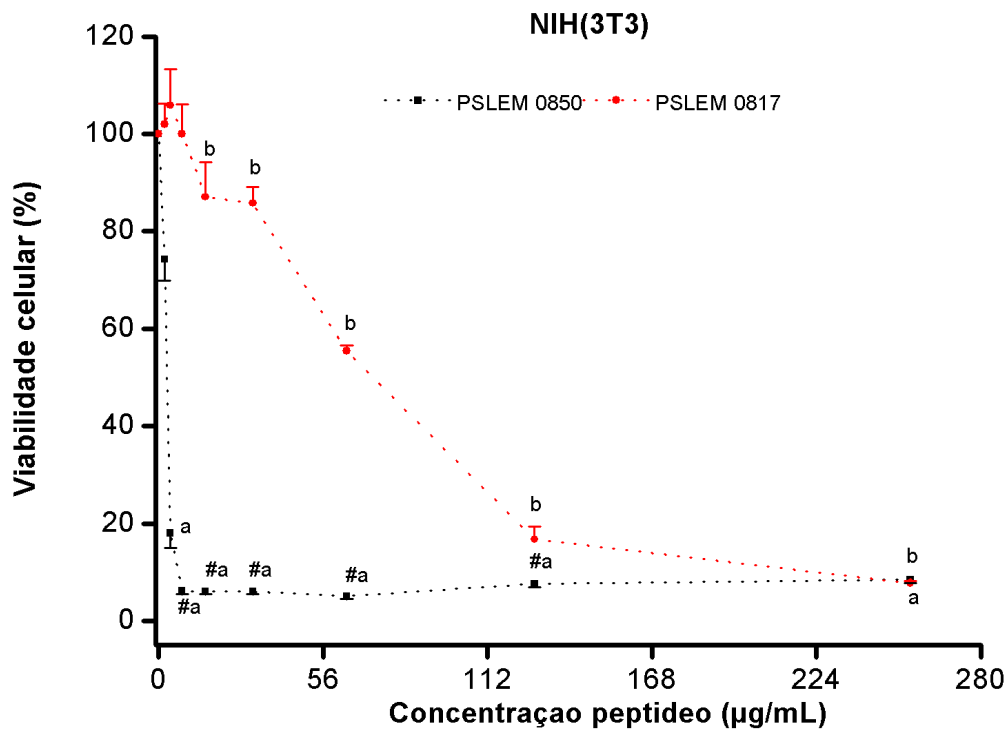


Figura 15: Porcentagem de células vivas (viabilidade) da linhagem NIH/3T3 por concentração dos peptídeos melitina (PSLEM 0850) e dermaseptina (PSLEM 0817). O símbolo # representa diferenças significativas entre os peptídeos PSLEM 0850 e PSLEM 0817 e as letras a, b se referem a diferenças entre as demais concentrações e o controle (0 µg/mL) nos respectivos peptídeos ($P < 0,05$).

Uma vez que o peptídeo PSLEM 0817 apresentou maior atividade citotóxica contra todas as linhagens tumorais dentre aqueles previamente testados, com exceção da melitina, que foi adotada como controle positivo nesses estudos, este peptídeo foi selecionado para os ensaios subsequentes. Após a escolha do peptídeo foi escolhida, em seguida, a linhagem tumoral em que o peptídeo PSLEM 0817 foi muito ativo. Assim, a linhagem HeLa foi utilizada para os ensaios seguintes.

5.2.2 DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR ANEXINA-V⁺

Na busca dos mecanismos de ação possíveis em que o peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) induz a morte de células HeLa, foi testada a detecção de morte celular por anexina-V⁺, a qual marca células que expõem a fosfatidilserina. Notou-se que as células sem tratamento com peptídeo não foram marcadas com anexina-V⁺ enquanto as células tratadas foram marcadas e diferiram significativamente daquelas sem tratamento com um aumento de 57% ($P < 0,05$). Isto sugere que o peptídeo tenha atuado sobre a membrana das células alterando-as e, conseqüentemente, iniciando um processo de apoptose e/ou necrose (Figura 16).

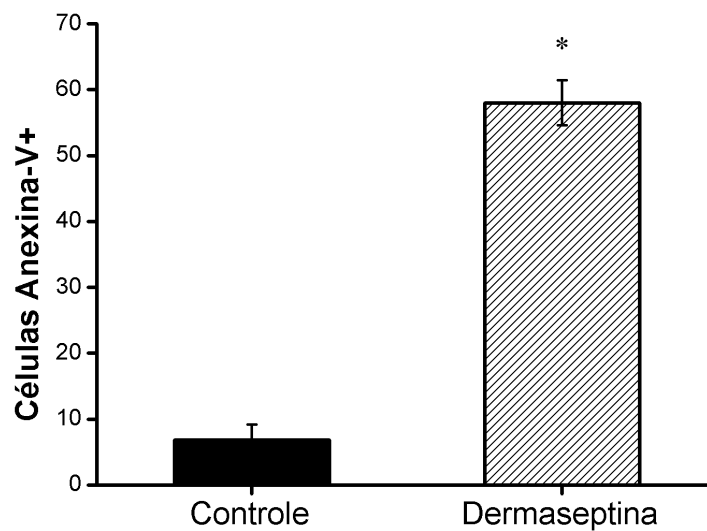


Figura 16: Análise em citometria de fluxo da alteração de membrana plasmática pela exposição de fosfatidilserina em células HeLa sem tratamento (controle) e de células tratadas com o peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) com $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubação com $5 \mu\text{L}$ de anexina por 15 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). *diferiu significativamente ($P < 0,05$).

5.2.3 FRAGMENTAÇÃO DO DNA E CICLO CELULAR

Como foi verificado que o peptídeo alterou a membrana das células, ainda analisando o mecanismo de ação investigou-se se a molécula alterava o núcleo e a proliferação celular utilizando iodeto de propídeo. Notou-se que as células tratadas com dermaseptina (PSLEM 0817) diferiram significativamente das células sem tratamento aumentando em 15% o número de células fragmentadas, assim houve fragmentação do DNA (Figura 17A). Porém não houve diferença significativa nas fases do ciclo celular das células com tratamento em comparação as sem tratamento confirmando, assim, que o peptídeo não altera a proliferação celular (Figura 17B).

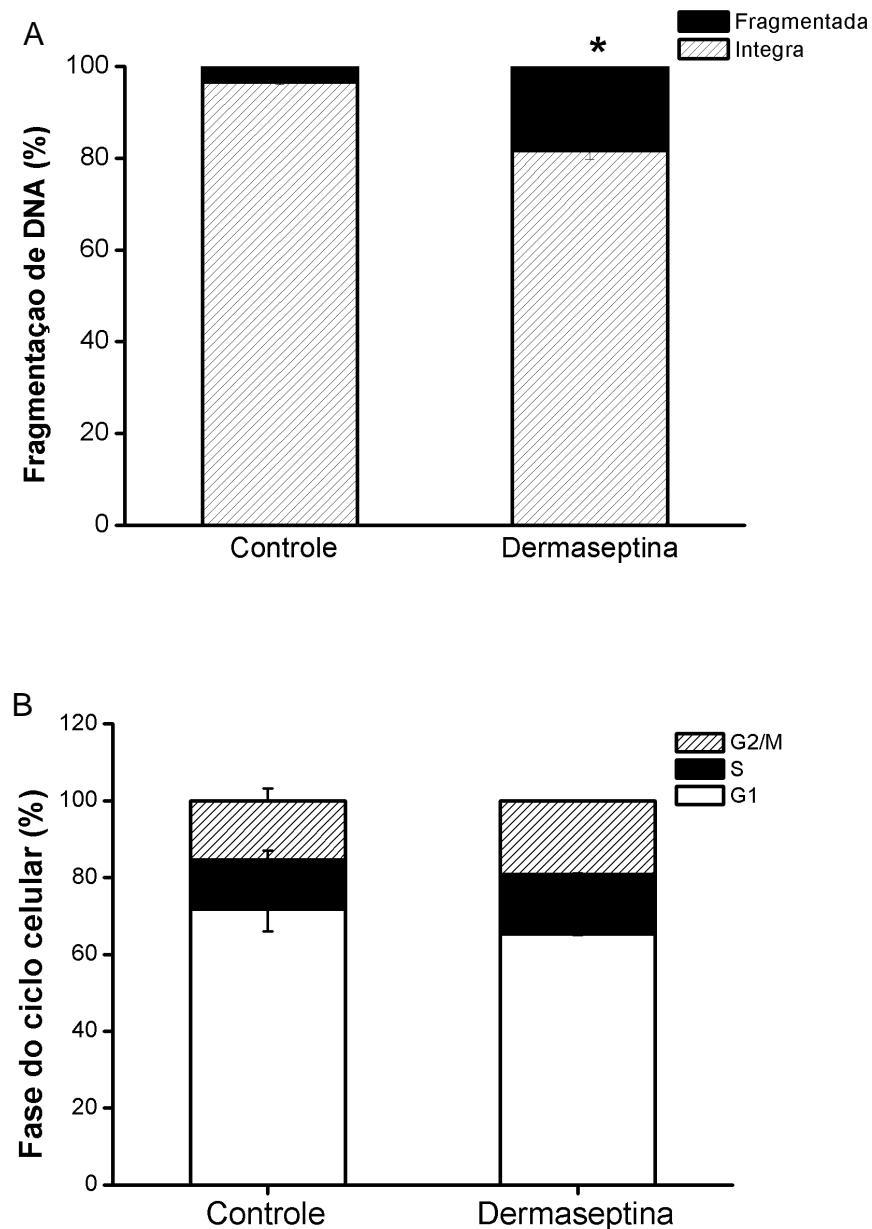


Figura 17: Análise em citometria de fluxo da fragmentação do DNA (A) e das fases do ciclo celular (B) por iodeto de propídeo em células HeLa sem tratamento (controle) e tratadas com $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) e incubação com $200 \mu\text{L}$ de tampão de lise por 30 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). *diferiu significativamente ($P < 0,05$).

5.2.4 MONITORAMENTO DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Já na investigação das possíveis alterações da membrana mitocondrial utilizado o composto rodamina 123, notou-se que o potencial mitocondrial transmembrânico foi alterado com uma diminuição de 48% no número de células, uma vez que houve uma menor

fluorescência pelo efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria levando a hiperpolarização desta, já que teve deslocamento para a direita.

Assim, o peptídeo alterou o potencial mitocondrial transmembrânico de células HeLa tornando-o hiperpolarizado, quando comparado às células sem tratamento (Figura 18).

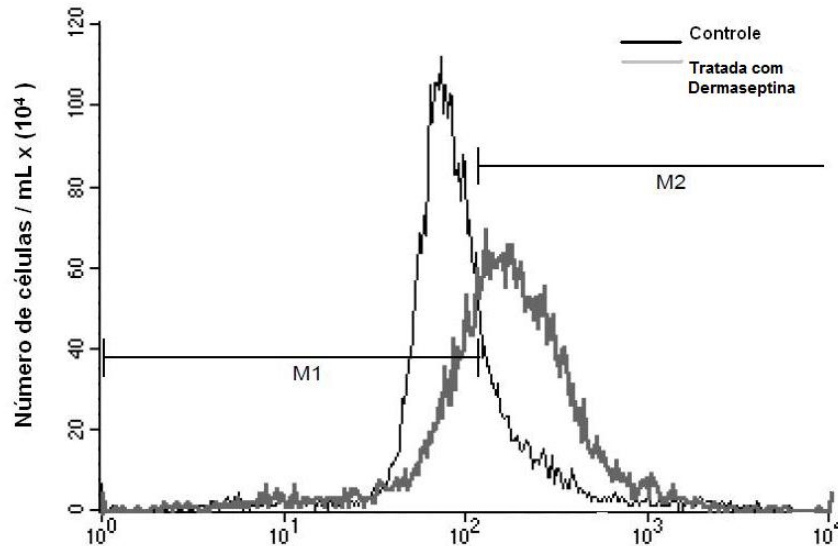


Figura 18: Análise em citometria de fluxo da marcação da membrana mitocondrial por rodamina 123 em células HeLa sem tratamento (controle) representadas em preto e tratadas com 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo Dermaseptina (PSLEM 0817) representadas em cinza. Incubação com 0,5 μL da solução de rodamina 123 por 15 minutos no escuro. Leitura realizada no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 515 e 530 nm).

5.3 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS

Foram adquiridas imagens utilizando microscópio de luz invertido em contraste de fase para avaliar possíveis alterações na morfologia das linhagens HeLa, MCF-7, B16F10 e HSG após 24 horas de tratamento com o peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) em relação às células controle. Assim, observou-se que nos controles as células estavam aderidas na placa, possuíam formação de colônias, prolongamentos entre as células e com núcleo e nucléolos bem definidos, enquanto nos as células tratadas nota-se que as células estão soltas da placa, sem nenhum formato definido, assim como não possuem mais prolongamentos, nem núcleo e nucléolo definidos (Figura 19).

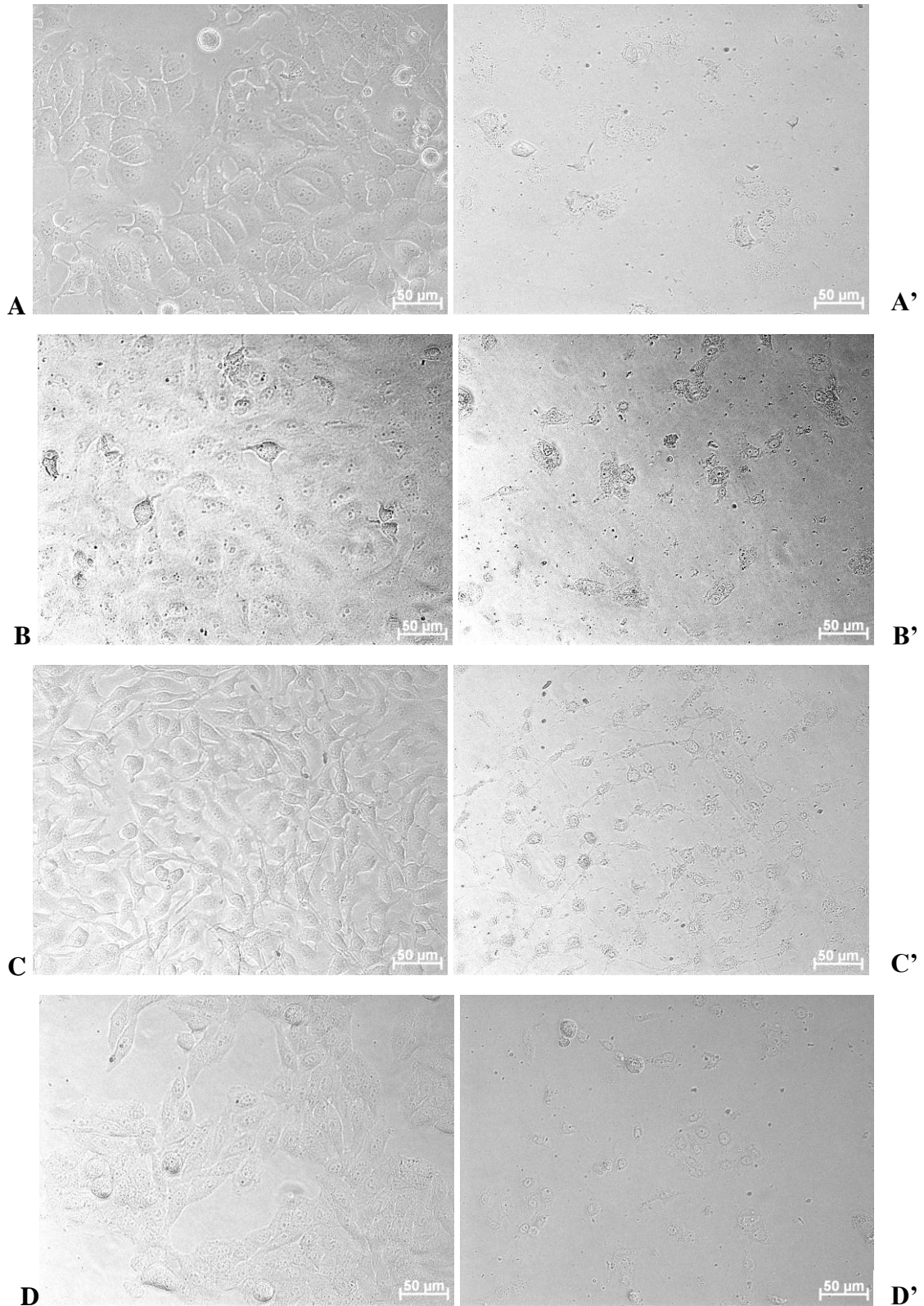


Figura 19: Fotomicrografias de células tumorais tratadas com o peptídeo Dermaseptina encontrado no anfíbio *Phyllomedusa tomopterna* (PSLEM 0817). À esquerda (A, B, C, D) são células sem adição do peptídeo (controle) e à direita (A', B', C', D') com a adição do peptídeo na maior concentração testada ($256 \mu\text{g mL}^{-1}$). a) MCF7 b) HeLa c) B16F10 d) HSG.

Também foram obtidas imagens das células por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato após o tratamento com os peptídeos melitina (PSLEM 0850), como controle positivo, e a dermaseptina (PSLEM 0817), nas concentrações estimadas que diminuiriam a viabilidade celular em 50%, ou seja, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Pode-se observar que as células sem tratamento possuem região central elevada (eixo z) quando visualizada tridimensionalmente e com acentuado contraste quando vista bidimensionalmente. Na imagem obtida das células tratadas com melitina revela uma célula com princípio de alterações morfológicas, apresentando poucas regiões elevadas vistas bidimensionalmente e outra célula ao lado sem dano algum aparente o que era esperado ver nos tratamentos, já que foi usada a concentração que só diminuiria a viabilidade em 50%. Já nas células tratadas com o peptídeo PSLEM 0817, obteve-se imagem de profundas alterações da célula, uma vez que a região central estava em forma de vales profundos (orifícios) com baixo contraste de áreas mais altas (Figura 20).

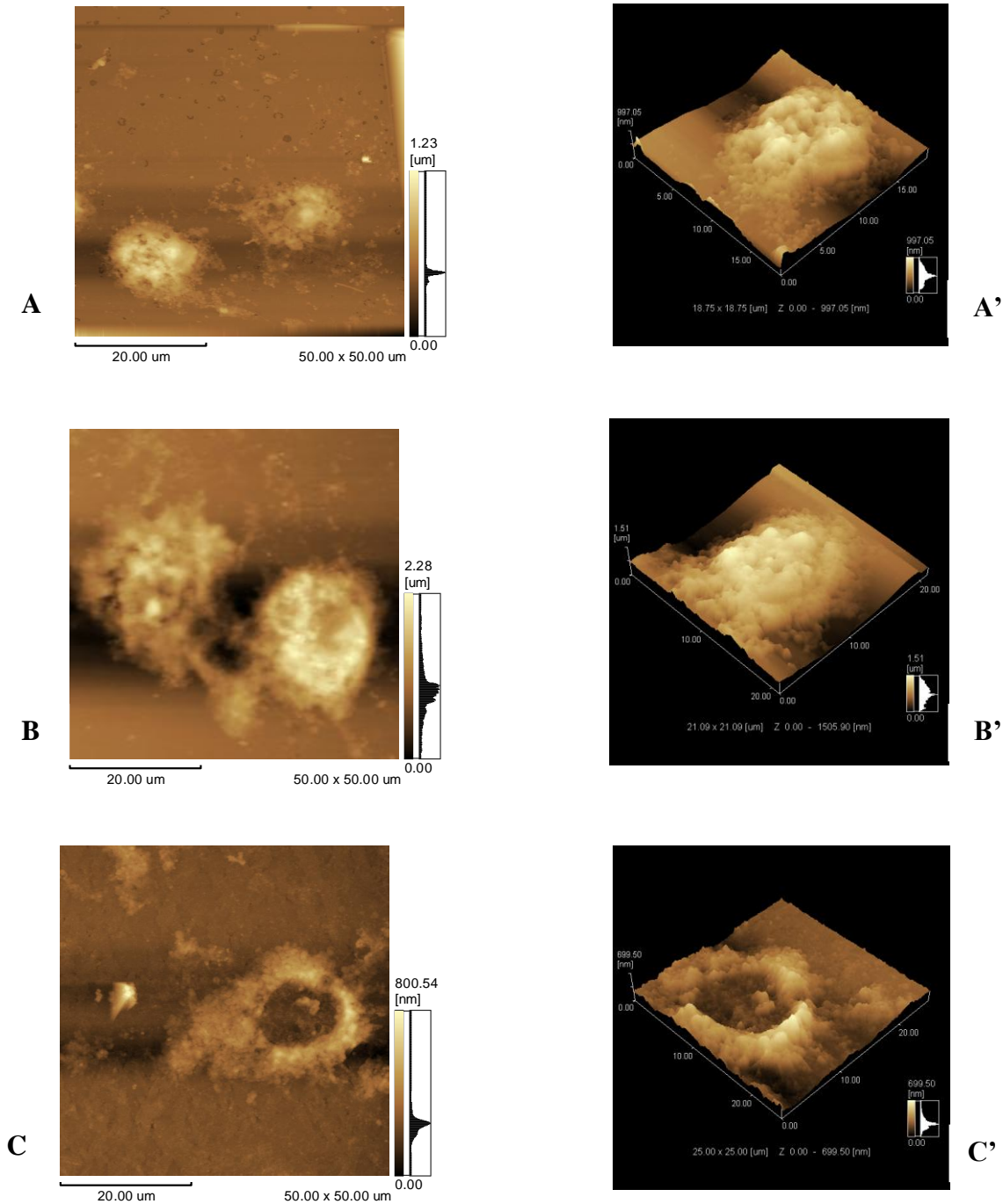


Figura 20: Morfologia celular da linhagem HeLa por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato. Imagem obtida em modo contato. A e A' controle (sem tratamento); B e B' tratado com melitina na concentração $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PSLEM 0850); C e C' tratado com derma na concentração $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PSLEM 0817).

5.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Após os estudos acerca dos mecanismos de ação do peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) livre, a molécula foi encapsulada em nanopartículas, que tiveram monitorado a eficiência de encapsulamento, reprodutibilidade e estabilidade. A eficiência de encapsulamento foi determinada de acordo com os dados cromatográficos, ou seja, após a

centrifugação da solução de nanopartículas descrita no item 4.14.3 o filtrado da solução era injetado em HPLC e a área da fração obtida foi integrada a uma curva de calibração de concentrações conhecidas (0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 µg) do peptídeo dermaseptina (Figura 21), assim se obtinha a quantidade de peptídeo livre na solução. Houve uma variação na eficiência de encapsulamento das nanopartículas de QSePep de 43 a 95% e PEGePep de 74 a 95%, porém as nanopartículas utilizadas nos ensaios tiveram eficiência de encapsulamento 73% e 80%, respectivamente, por serem estas as mais reprodutíveis.

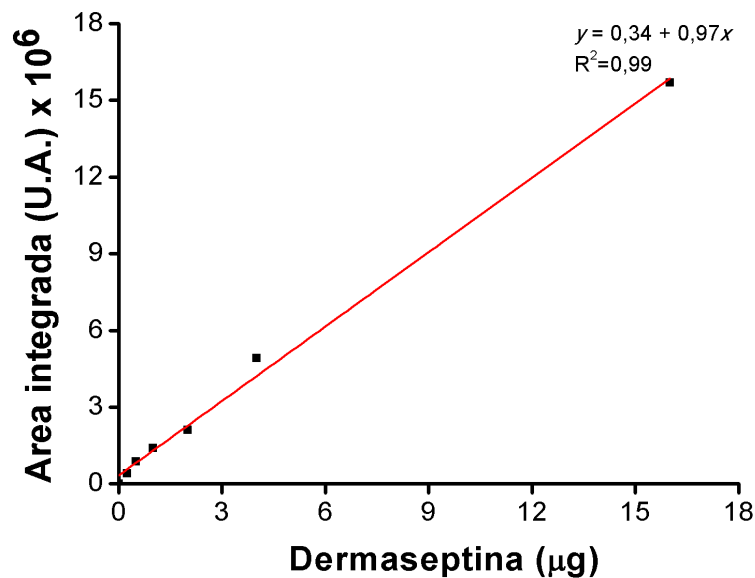


Figura 21: Curva de calibração obtida a partir de dados cromatográficos colocados em função da reta definida mostrando a variação da concentração do peptídeo dermaseptina PSLEM 0817.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram caracterizadas quanto à forma, potencial de superfície e polidispersão de tamanho, buscando-se partículas menores (< 200 nm), com maior taxa de encapsulamento (> 70%), de tamanho e formato mais homogêneos.

Por meio de microscopia de força atômica a caracterização das nanopartículas vazias não foi possível, uma vez que estas apresentavam pequenas dimensões, eram instáveis e contaminavam facilmente a ponteira e não se obtinha imagem com detalhamento estrutural. Entretanto, verificou-se que as nanopartículas de QSePep têm formato aproximadamente esférico, são polidispersas apresentando distribuição unimodal do diâmetro, variando de 100 a 700 nm, e distribuição bimodal da altura, variando de 16 a 34 nm (Figura 22 A e C, Tabela 5). As nanopartículas de PEGePep também possuem formato aproximadamente esférico, foram polidispersas, mas com tamanho maior, ou seja, o diâmetro apresentou distribuição bimodal e

variou de 100 a 1500 nm enquanto a altura teve distribuição unimodal e variou de 69 a 84 nm (Figura 22 B e D, Tabela 5).

Tabela 5: Características físico-químicas das nanopartículas de quitosana (QS), quitosana e peptídeo dermaseptina (QSePep), quitosana revestidas com polietilenoglicol (PEG) e quitosana com peptídeo dermaseptina revertida com polietilenoglicol (PEGePep). n=3 medidas independentes.

Nanopartículas	Diâmetro (nm)	Altura (nm)
QS	-	-
PEG	-	-
QSePep	$X_1 = 185,9 \pm 9,9$	$X_1 = 18,42 \pm 0,12$ $X_2 = 23,06 \pm 0,42$
PEGePep	$X_1 = 128,4 \pm 4$ $X_2 = 879,9 \pm 69,1$	$X_1 = 70,79 \pm 0,00$

X_1 , X_2 e X_3 representam as médias de cada pico (unimodal / bi ou trimodal) com seus desvios.

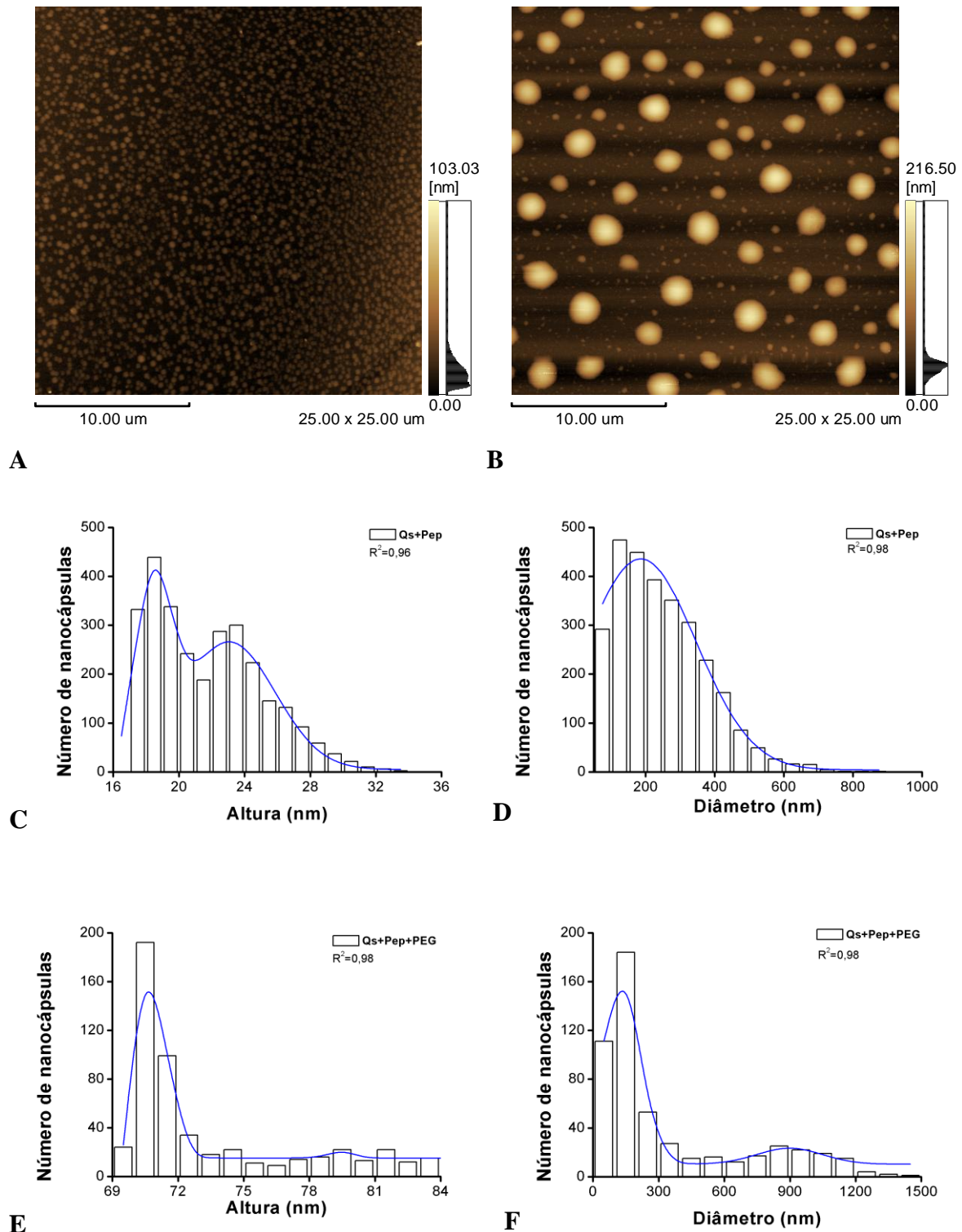


Figura 22: Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo de dinâmico e aquisição mostrada de topografia (A e B). Histogramas da distribuição de classes com valores variados de diâmetro e altura das nanopartículas, com (C) e (D) sendo Quitosana (4 mg mL^{-1}) e peptídeo dermaseptina PSLEM 0817 ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); e (E) e (F) Quitosana (4 mg mL^{-1}), peptídeo dermaseptina PSLEM 0817 ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e PEG ($4,16 \text{ mg mL}^{-1}$).

Por meio de espalhamento de luz dinâmica, as nanopartículas também se revelaram polidispersas e apresentaram maior número de partículas entre 100 e 200 nm de diâmetro hidrodinâmico assim como observado por microscopia de força atômica. Tornou-se necessário filtrá-las, uma vez que agregados podem se posicionar na frente das nanopartículas e assim mascarar o tamanho delas no momento das análises. Porém, mesmo após a filtragem nota-se pelo tamanho maior que as nanopartículas de quitosana tendem a agregar-se novamente, provavelmente por ter grupamentos livres.

As nanopartículas vazias de Qs e as de QSePep tiveram distribuição bi e trimodal e a estabilidade coloidal considerada boa e excelente, respectivamente (ASTM, 1985). Já as nanopartículas vazias de PEG e as de PEGePep tiveram distribuição bi e unimodal, respectivamente, e a estabilidade coloidal considerada moderada para ambas (Tabela 6). Estas mesmas características foram mantidas após um mês, no qual as nanopartículas ficaram mantidas a 4°C em solução aquosa a pH=5.

Tabela 6: Características físico-químicas das nanopartículas de quitosana (QS), quitosana e peptídeo dermaseptina (QSePep), quitosana revestidas com polietilenoglicol (PEG) e quitosana com peptídeo dermaseptina revertida com polietilenoglicol (PEGePep). Eficiência de encapsulamento (EE) e n=3 medidas independentes.

Nanopartículas	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm) após filtração (0,22 µm)	Potencial zeta (mV)	EE (%)
QS	$X_1 = 209,1 \pm 21,0$	$X_1 = 1498 \pm 44,0$	+ 42	--
	$X_2 = 23,0 \pm 4,7$	$X_2 = 197,6 \pm 24$		
		$X_3 = 5085 \pm 435,5$		
QS e Pep	$X_1 = 739,5 \pm 182,2$	$X_1 = 172,3 \pm 3,5$	+ 67	73
	$X_2 = 154,4 \pm 49,2$			
	$X_3 = 4398 \pm 353$			
PEG	$X_1 = 392,1 \pm 42,5$	$X_1 = 224,9 \pm 20,9$	+ 39	--
	$X_2 = 85,7 \pm 28,9$			
PEG e Pep	$X_1 = 145,0 \pm 43,3$	$X_1 = 195,6 \pm 11,7$	+ 30	80
		$X_2 = 4233 \pm 224,8$		

X_1 , X_2 e X_3 representam as médias de cada pico (unimodal / bi ou trimodal) com seus desvios.

5.5.1 LIBERAÇÃO CONTROLADA DO PEPTÍDEO ENCAPSULADO

Observou-se que não houve liberação do peptídeo em nenhum dos tempos testados, uma vez que a taxa de encapsulamento deste variou entre 97 e 99% durante 0, 1, 3, 5, 24 e 48 horas quando as nanopartículas estavam em solução (água), pH=5 e armazenadas a 37°C (Figura 23).

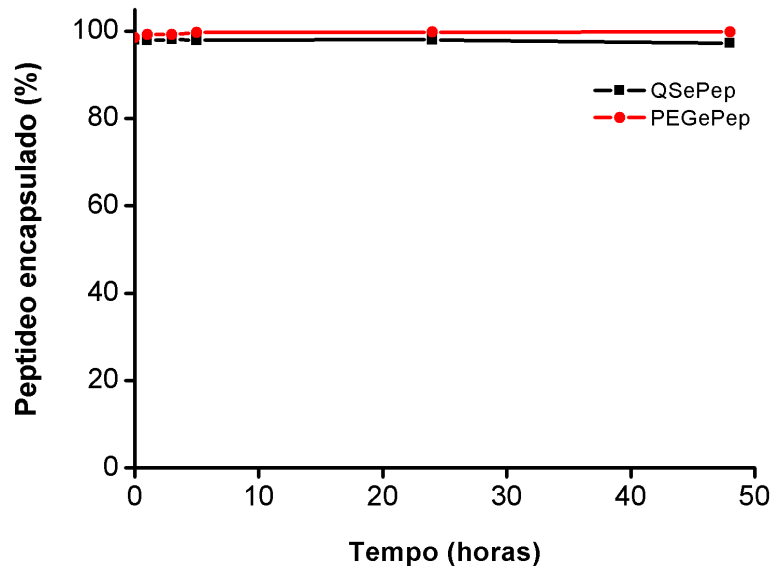


Figura 23: Liberação do peptídeo encapsulado em nanopartículas de quitosana (QSePep 4 mg:100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e revestida de polietilenoglicol (PEGePep 4,16 mg:100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por horas (0, 1, 3, 5, 24 e 48).

5.5.2 VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM O PEPTÍDEO ENCAPSULADO

Quando misturadas a meio de cultura as nanopartículas mudaram o pH da solução para sete e liberaram o peptídeo durante as 24 horas de tratamento. Assim as nanopartículas contendo o peptídeo encapsulado diminuiriam significativamente a viabilidade das linhagens HeLa e fibroblasto nas concentrações de 64 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que as nanopartículas com PEGePep foram mais ativas em seguida as de QSePep e, quando comparado ao peptídeo livre, este foi um pouco menos ativo que as nanopartículas. Já as nanopartículas vazias de quitosana e com PEG não foram ativas, ou seja, os seus efeitos não diferiram significativamente do controle (células sem tratamento), em nenhuma das linhagens celular (Figura 24).

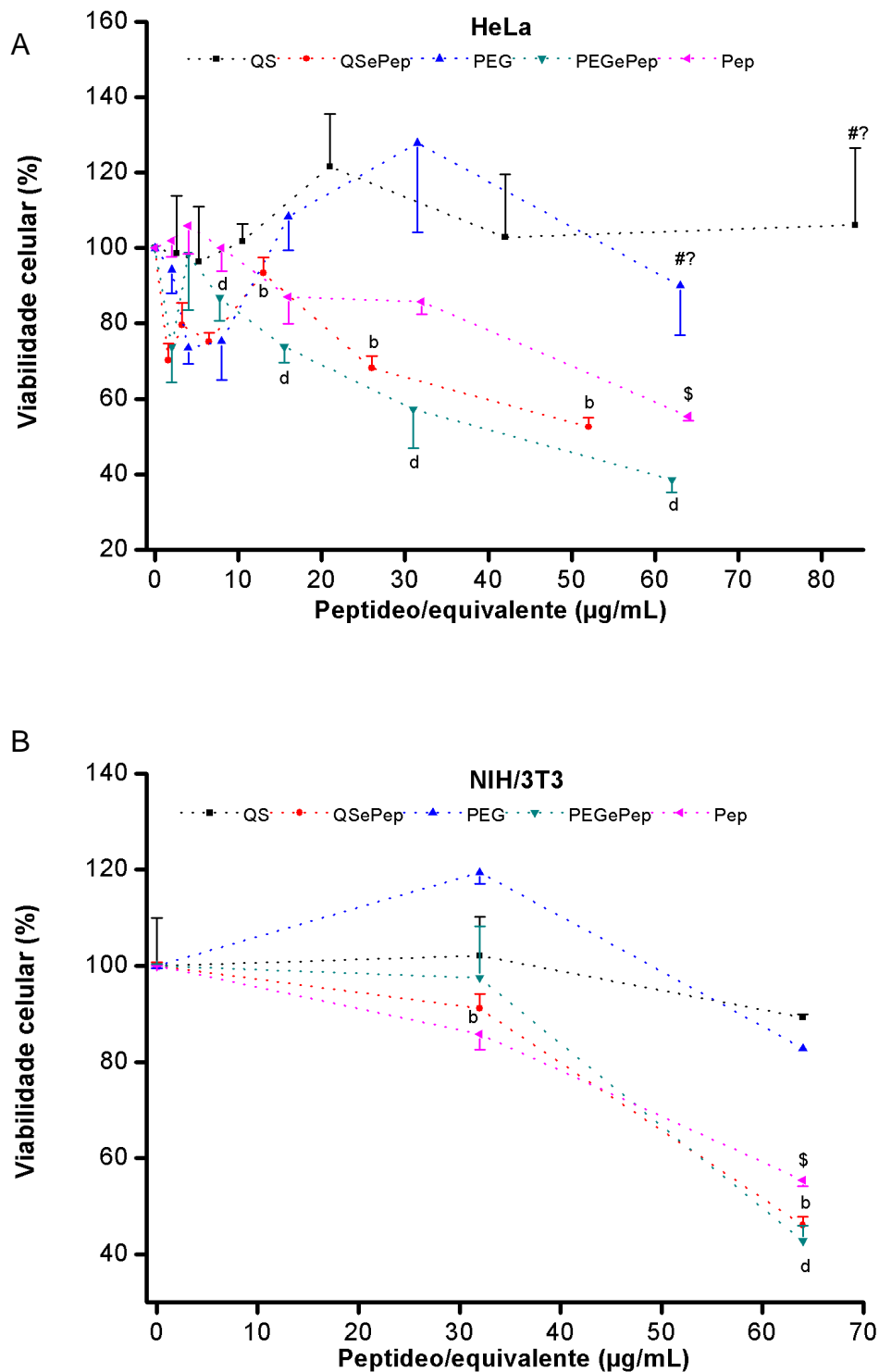


Figura 24: Porcentagem de células vivas por variadas concentrações das nanopartículas com peptídeo dermaseptina PSLEM 0817. Quitosana com o peptídeo (QSePep) e PEG e peptídeo (PEGePep). Como controle, nanopartícula de quitosana vazia (QS), quitosana com PEG vazia (PEG) e peptídeo livre (Pep). **A)** linhagem tumoral HeLa; **B)** linhagem não tumoral de fibroblasto (NIH/3T3). Os símbolos *, #, !, ? representam diferença significativa de QS, QSePep, PEG, PEGePep e as letras a, b, c, d se referem à diferença da concentração 0 dentro destes respectivamente e \$ dentro do peptídeo ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O conjunto de doenças que levam ao crescimento descontrolado de células é denominado câncer, sendo este o responsável por elevada taxa de mortes por doenças no mundo (HOSKIN & RAMA OOTHY, 2008). Esta doença vem sendo tratada pelos métodos convencionais de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, mas como estes ocasionam diversos efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida do paciente, têm-se buscado novas formas de tratamento que seja eficiente e não cause efeitos colaterais (NIH, 2005). Estudos têm revelado moléculas potentes encontradas em animais com variadas atividades terapêuticas. Dentre estas moléculas, os peptídeos encontradas em invertebrados e anfíbios possuem potente atividade antimicrobiana e citolítica agindo sobre membranas celulares.

O presente estudo confirmou a melitina (PSLEM 0850) como um agente antitumoral *in vitro* muito potente, uma vez que foi o peptídeo que apresentou atividade mais alta contra todas as linhagens tumorais testadas em toda a faixa de concentração investigada e por isso, foi escolhida como controle positivo deste estudo. Este resultado já era esperado, uma vez que trabalhos anteriores descrevem o potencial citotóxico da melitina encontrada naturalmente como componente peptídico majoritário do veneno de abelhas. MAHER & MCCLEAN (2006) investigaram a citotoxicidade *in vitro* da melitina em células gastrointestinais e sua atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro. Esta molécula causou hemólise significativa, sendo ativa em concentrações na mesma ordem de grandeza que a sua também atividade antimicrobiana previamente determinada é exercida. WESTON & RAISON (1998) examinaram o efeito citolítico em uma linhagem celular humana de linfoblastóides e revelaram uma toxicidade da melitina que variava linearmente com a concentração no intervalo de 0,875 a 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A potente atividade citolítica da melitina também foi mostrada por TOSTESON *et al.*, (1985) sobre eritrócitos humanos e em outras células eucarióticas, agindo por meio da ligação rápida aos glóbulos vermelhos, em concentrações da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$, induzindo a liberação da hemoglobina pelo aumento da permeabilidade da membrana e a consequente lise celular.

Tanto na literatura como neste estudo a melitina revelou-se muito potente em baixas concentrações, variando um pouco de acordo com o tipo de célula, provavelmente devido a estas terem composição de membrana diferente, já que este peptídeo atua na membrana celular formando poros, provavelmente pelo mecanismo tipo barril (HOSKIN & RAMA OOTHY, 2008). A ligação da melitina a membranas dá-se por interações

eletrostáticas, nas quais a melitina tem maior afinidade por membranas com carga global negativa de bicamadas lipídicas (BESCHIASCHVILI & SEELIG, 1990). As membranas das células cancerígenas possuem carga negativa devido a uma maior expressão de moléculas aniônicas como as mucinas O-glicosiladas cujo caráter ácido é devido à presença de ácidos carboxílicos de resíduos de ácido siálico e de grupamentos sulfato (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008; MINER WILLIAMS *et al.*, 2009). Já a membrana de células eucarióticas não tumorigênicas contém cerca de 10% de lipídeos aniônicos, localizados principalmente no folheto interior da membrana celular e a membrana externa contém predominantemente lipídios eletricamente neutros (ZIEGLER, 2008). Portanto, diferenças na composição da membrana celular em diferentes tipos de células tumorais e em relação às células não tumorais podem ser responsáveis pela variação na atividade antitumoral de diferentes peptídeos, podendo torná-los seletivos a determinados tipos de linhagens tumorais (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Dentre os peptídeos previamente prospectados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Espectrometria de massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, constantes em um banco de dados de moléculas de acesso restrito, e estudados neste trabalho; o peptídeo PSLEM 0906 de *Trachycephalus venulosus*, não foi ativo em nenhuma das concentrações testadas e sobre nenhuma das linhagens, provavelmente por não ser catiônico ou anfifílico como os outros. Já o peptídeo PSLEM 0904, um fragmento de uma proteína supressora de metástase, apesar de ter dimensões semelhantes a peptídeos membranoativos e ser catiônico, não apresentou a mesma atividade, a qual atua suprimindo tumores. Com isto, nota-se que muito mais do que simplesmente observar as propriedades físico-químicas ou as sequências, a identificação de moléculas bioativas se dá mediante testes de atividade. De fato, o presente estudo mostrou que apesar de todos os peptídeos testados terem algumas das características de moléculas ativas em células tumorais, apenas um dentre eles, ou seja, o PSLEM 0817 (análogo de dermaseptina) revelou-se ativo contra todas as linhagens testadas.

O peptídeo PSLEM 0817 apresentou atividade citotóxica significativa contra todas as linhagens tumorais testadas, sendo que na linhagem do tipo HeLa, este peptídeo diminuiu em 100% a viabilidade na maior concentração testada, assim como a melitina. Este peptídeo pertence à classe das dermaseptinas, encontradas em anfíbios do gênero *Phyllomedusa* e possui estrutura primária semelhante, identidade 86%, à dermadistinctina (DD) L (H-ALWKTLKKNVKGKAAGKAALNAVTDVMVQNQ-NH₂ [M+H]⁺ = 2925,6), que pertence a esta mesma classe e possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. BATISTA e colaboradores (1999) analisaram o efeito hemolítico de algumas

dermaseptinas, sendo que a DD L foi a única que apresentou atividade lítica significativa sobre hemácias na concentração inicial de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e quando colocada em meio menos polar, este peptídeo assume a forma de α -hélice anfipática, na qual as cargas positivas das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos básicos ficam expostas para interagir com as cargas negativas dos fosfolipídeos e das glicoproteínas das membranas.

Segundo MORTON e colaboradores (2007), peptídeos catiônicos com estrutura em α -hélice, como as dermaseptinas, rompem a membrana celular para induzir sua morte. Outros peptídeos catiônicos antimicrobianos, como magainina, cecropina e melitina também apresentam atividade antitumoral, mas apesar do mecanismo de ação destes peptídeos sobre as células ser pouco conhecido, sabe-se que induzem apoptose pela exposição da fosfatidilserina, fragmentação do DNA e despolarização de membrana mitocondrial (CÉRON *et al.*, 2010, LIU *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação do peptídeo PSLEM 0817 testado no presente estudo foi diferente ao descrito na literatura, uma vez que houve a indução de hiperpolarização da membrana mitocondrial e ocorreu a fragmentação do DNA logo após o tratamento, mas não a alteração do ciclo celular. A hiperpolarização pode ter ocorrido devido à entrada do peptídeo pela interação deste com a membrana celular e, em seguida, com a membrana externa da mitocôndria que impediria a troca de ATP do meio interno com o citossol levando a hiperpolarização, a qual precede a ruptura mitocondrial com a liberação de fatores promotores de apoptose, que levam a clivagem e fragmentação do DNA e a externalização da fosfatidilserina (LY *et al.*, 2003). Este resultado foi similar ao encontrado por ALCÁZAR e colaboradores (2000), o qual tratou linfócitos T com camptotecina e observou a membrana mitocondrial inicialmente hiperpolarizada e, após 3 horas do tratamento, encontrou citocromo C no citossol iniciando o processo de apoptose. Assim pode-se sugerir que no presente trabalho foram observados os efeitos que precedem a fragmentação do DNA, ou seja, a hiperpolarização da membrana mitocondrial com possível liberação de sinalizador para externalização da fosfatidilserina.

A alteração na morfologia das células analisadas por microscopia de contraste de fase foi similar as alterações ocorridas no estudo de JOANITTI (2008), com a linhagem tumoral MCF-7. No presente estudo foi observado que após o tratamento com o peptídeo PSLEM 0817, as células estavam sem forma típica, sem presença de núcleo, em suspensão na placa de cultura e com a presença de alguns fragmentos celulares (debris). Alterações morfológicas em HeLa após o tratamento com os peptídeos PSLEM 0817 (dermaseptina) e PSLEM 0850 (melitina) também foram observadas por microscopia de força atômica, porém apesar desta

metodologia ser amplamente utilizada para diversos estudos, como de bactérias e hemácias (LEITE *et al.*, 2005), até o momento esta técnica não foi utilizada para caracterizar células tumorais alteradas por tratamentos com peptídeos antitumorais. De qualquer modo, as alterações estruturais observadas nas células corroboraram o padrão de alterações também observado por meio de microscopia de contraste de fase.

Assim muitos destes peptídeos não podem ser utilizados diretamente em terapias antitumorais, uma vez que não são seletivos a tumores, podendo danificar células não tumorais e, principalmente, por perder sua função pela ação de enzimas proteolíticas, bem como ser facilmente reconhecido e retirado do organismo por macrófagos (ZOGGEL *et al.*, 2010). Para evitar tais efeitos colaterais ou a perda precoce da função do peptídeo é necessário encapsulá-lo em nanopartículas, as quais podem protegê-los da degradação por enzimas, passar despercebidas pelo sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) e, ainda pode vir a ser entregues em alvos específicos (DASS & CHOONG, 2006).

Estudos que investigam técnicas para biodisponibilidade oral de peptídeos têm utilizado o polímero natural quitosana em sua formulação, uma vez que ela é biocompatível, biodegradável e possui característica de ser mucoadesiva (AGNIHOTRI *et al.*, 2004). Dentre as técnicas utilizando quitosana, as chamadas de coacervação, peneiramento, gotas de emulsão, micelar reverso e geleificação iônica são as principais utilizadas na produção de nanopartículas, sendo esta última muito interessante por não ser tóxica às células e ser de simples produção (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Desta forma, o peptídeo utilizado neste estudo foi encapsulado pelo método de geleificação iônica em nanopartículas com formato esférico e diâmetro médio variando principalmente entre 100 a 200 nm, sendo este resultado semelhante quando analisado por microscopia de força atômica e por espalhamento de luz dinâmico. Estas técnicas devem ser utilizadas de forma complementar, pois além de poder corroborar o tamanho das nanopartículas pode-se verificar por meio da primeira técnica, se as nanopartículas estão agregadas ou não e o formato das estruturas formadas (esférica, achatada, estrelar, entre outras) o que não é possível pela segunda técnica (SITTERBERG *et al.*, 2010).

Utilizando esta mesma técnica de encapsulamento DOUGLAS e colaboradores (2006) e PAN e colaboradores (2002) obtiveram nanopartículas de quitosana com tamanhos semelhantes aos observados no presente estudo, sendo que o do primeiro foi de nanopartículas contendo alginato com diâmetro médio de 157 nm e o do segundo nanopartículas contendo

insulina com diâmetro entre 250-400 nm. Segundo HUGHES (2005), o tamanho da nanopartícula é muito importante para sistemas de liberação controlada, devendo ser menores que 100 nm quando se querem atravessar barreiras como a hematoencefálica, as ramificações do sistema pulmonar ou junções da pele. Por outro lado, devem ser maiores que 100 nm quando se quer penetrar tumores, os quais possuem microvasculatura com poros variando de 100 a 1000 nm. Assim, as nanopartículas desenvolvidas no presente estudo são apropriadas para penetrar tumores, mas a biodistribuição delas *in vivo* precisa ser investigada em estudos futuros.

Também caracterizando as nanopartículas de insulina produzidas por geleificação iônica por meio de microscopia de força atômica, JINTAPATTANAKIT e colaboradores (2007) observaram que as nanopartículas revestidas com PEG eram maiores e apresentavam formato esférico, assim como as nanopartículas apresentadas no presente estudo. Além disso, no presente trabalho observou-se que as nanopartículas apresentavam superfície homogênea, o que pode sugerir que o peptídeo e demais componentes das nanopartículas possam estar dispersos homogeneamente nelas. O oposto foi verificado por SIMON e colaboradores (2004), que ao analisar as nanopartículas de insulina, também em modo dinâmico operando em aquisição de fase, observaram uma distribuição heterogênea de componentes na superfície das nanopartículas, uma vez que havia rugosidades pela presença de poros, e sugeriram uma distribuição heterogênea de insulina, a qual seria liberada rapidamente através destes poros. Deste modo, é possível sugerir que a baixa taxa de liberação do peptídeo *in vitro* (< 3%) mostrada no presente estudo e discutida posteriormente possa ter relação direta com a área superficial das nanopartículas obtidas e a homogeneidade observada.

A elevada eficiência de encapsulamento das nanopartículas apresentadas neste estudo, variando de 43 a 95%, mas principalmente por volta de 75%, foi semelhante aquelas descritas na literatura, nas quais também o método de geleificação iônica foi empregado. PAN e colaboradores (2002) obtiveram encapsulamento de 80% da insulina. WU e colaboradores (2005) encapsularam glicirrizinato de amônio tendo eficiência de encapsulamento de 83% para as partículas de quitosana e de 90% para o material composto de quitosana e PEG. FUENTES e colaboradores (2005) também obtiveram taxa de encapsulamento de calcitonina da ordem de 90%. Logo, a eficiência de encapsulamento obtida no presente estudo pela técnica de geleificação iônica torna tal procedimento viável do ponto de vista de obtenção de nanodispositivos deste tipo visando à liberação controlada.

O potencial zeta observado para as nanopartículas QSePep, de +67 mV, foi bastante maior do que o descrito na literatura por DOUGLAS e colaboradores (2006), que relataram um valor de 32 mV. A excelente estabilidade coloidal das nanopartículas em solução deste estudo pode ter sido favorecida pelo aumento da solubilidade de quitosana já relatado em outro estudo (WU *et al.*, 2005) ou mesmo ser relacionado ao caráter catiônico do peptídeo PSLEM 0817. Já a estabilidade coloidal moderada das nanopartículas PEGePep, que apresentaram potencial zeta de +30 mV, ocorreu devido ao fato que este polímero tem a característica de diminuir a carga superficial da estrutura pelo fato de ser neutro e, ainda aumentar o tamanho das nanopartículas, sendo que este último efeito é ocasionado pela fraca ligação entre os átomos de oxigênio do PEG e o grupo amino da quitosana, que deixam a estrutura mais flexível e, conseqüentemente, maior (WU *et al.*, 2005). Isto foi evidenciado no presente estudo, ou seja, observou-se que o PEG aumentava bastante o diâmetro das nanopartículas em relação às que não possuíam PEG em sua composição.

A liberação inicial muito lenta apresentada pelo sistema desenvolvido nesta Dissertação segue padrão diferente dos descritos na literatura, em que o princípio ativo é dissociado rapidamente no início e depois se mantém liberado de maneira lenta e constante (WU *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2001). Esta taxa de liberação lenta deve-se às características morfológicas, como pouca rugosidade na superfície das nanopartículas verificadas neste trabalho, e ainda estar relacionada ao grau de desacetilação da quitosana utilizada no presente estudo, o qual era maior que 75%. Este efeito foi verificado previamente por XU & DU (2003), que variaram o grau de desacetilação da quitosana e observaram que quanto maior o grau de desacetilação, mais lenta era a liberação de albumina sérica bovina (BSA), pois as ligações com o TPP se tornavam mais fortes fazendo com que diminuísse a permeabilidade das nanopartículas.

Adicionalmente, segundo LEFFLER & MULLER (2000), o tipo de ácido em que a quitosana é inicialmente dissolvida também pode alterar a forma de liberação da droga, ou seja, quando dissolvida em ácido clorídrico a liberação é rápida e estável; quando dissolvida em ácido cítrico a liberação é rápida e desintegradora; e quando é dissolvida em ácido acético a liberação é lenta e sustentada, pois as nanopartículas tornam-se mais compactas. No presente estudo a quitosana utilizada para preparação das nanopartículas foi inicialmente dissolvida em ácido acético, o que também pode ter contribuído para as características de liberação do ativo (peptídeo PSLEM 0817) observada para o sistema desenvolvido.

Entretanto quando adicionadas a meio de cultura para ensaio de viabilidade celular as nanopartículas liberavam o peptídeo durante as 24 horas de ensaio. Deve ter ocorrido, provavelmente, pela presença de materiais presentes no meio de cultura e ao metabolismo das células que juntos levaram a liberação do peptídeo.

As nanopartículas contendo o peptídeo PSLEM 0817 mostraram-se pouco mais ativas sobre as linhagens testadas, quando comparadas ao peptídeo livre, enquanto as nanopartículas vazias (sem peptídeo) não foram ativas quanto à inibição de crescimento em nenhuma das linhagens seja ela tumoral (HeLa) ou não tumoral (fibroblasto). Estes resultados são corroborados por FUENTES e colaboradores (2005), os quais mostraram que nanopartículas vazias revestidas com quitosana e outras com PEG não foram tóxicas em células Caco-2. Adicionalmente, MITRA e colaboradores (2001) mostraram uma maior eficácia terapêutica, com regressão do tumor, diminuição de toxicidade e maior tempo de vida em camundongos tratados com nanopartículas de quitosana e doxorrubicina em relação ao tratamento com o fármaco livre. Nota-se que as nanopartículas apresentadas no presente trabalho foram efetivas e eficazes tornando o peptídeo um pouco mais ativo contra as linhagens tumorais *in vitro*.

O sistema nanoparticulado de liberação controlada desenvolvido no presente estudo poderá ser de extrema importância para ensaios futuros *in vivo*, uma vez que o peptídeo livre pode ter alta toxicidade local ou sistêmica, baixa permeabilidade em tecidos ou ser degradado por enzimas, enquanto as nanopartículas de quitosana possuem característica de serem mucoadesivas, o que facilita a entrada do peptídeo pelo epitélio e, ainda, podem passar despercebida pelo sistema imunitário se diminuir seu tamanho (PREGO *et al.*, 2006). Outra importante utilização das nanopartículas produzidas neste trabalho poderá ser testá-las posteriormente no mesmo tipo de células *in vivo*, uma vez que é promissora a entrega do peptídeo no cólon, já que sua adsorção é melhorada pela presença da quitosana, a qual ainda será biodegradada pela flora bacteriana do local (AGNIHOTRI *et al.*, 2004) ou mesmo este sistema de liberação controlada poderá se torna específico, conjugando a ele hormônio ou anticorpos monoclonais, e ser aplicado a outros tipos de tumores que tenham receptores para o reconhecimento destes.

7. CONCLUSÕES

- Quatro peptídeos foram sintetizados manualmente e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com sucesso. Dentre os peptídeos previamente prospectados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Espectrometria de massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, disponíveis em banco de dados de moléculas com acesso limitado, a dermaseptina (PSLEM 0817) foi o peptídeo que apresentou atividade citotóxica significativa contra todas as linhagens tumorais B16F10, MCF7 e HeLa; a linhagem imortalizada HSG; e contra a linhagem não tumoral de fibroblasto, sendo que juntamente com a melitina foram os peptídeos mais ativos contra a linhagem HeLa.
- Quanto a mecanismo de ação do peptídeo dermaseptina (PSLEM 0817) contra a linhagem HeLa, pode-se sugerir com o presente trabalho de acordo com as alterações morfológicas e ensaios de citotoxicidade que este peptídeo interage com membranas, levando à hiperpolarização da membrana mitocondrial com liberação de sinalizador para externalização da fosfatidilserina, e em seguida ocorre a fragmentação do DNA.
- Visando modular e controlar a liberação do peptídeo PSLEM 0817 e também evitar a perda da função do peptídeo por vias de degradação foi obtido sucesso e alta eficiência (> 70%) no encapsulamento do peptídeo PSLEM 0817 em nanopartículas poliméricas de quitosana com formato esférico, diâmetro médio entre 100 a 200 nm, estabilidade coloidal elevada, liberação lenta e prolongada sob condições de teste de liberação.
- Também, observou-se que o PEG diminui a estabilidade coloidal e aumenta bastante o diâmetro das nanopartículas sendo estes efeitos potencialmente moduladores de suas propriedades físico-químicas.
- As nanopartículas de quitosana contendo o peptídeo PSLEM 0817 foram pouco mais ativas *in vitro* sobre a linhagem tumoral HeLa do que o peptídeo livre, sendo este mesmo resultado observando sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., AMINABHAVI, T. M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery B. **J. Contr. Release.** v. 100, p. 5 –28.

ALCÁZAR, S. J. A., AULT, J. G., KHODJAKOV, A., SCHNEIDER, E. 2000. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. **Cell Death Differ.** v. 7(11), p.1090-100.

ALVES, C. H. B. S.; KUPERMAN, H., DICHTCHEKENIAN, V.; DURVAL DAMIANI, D.; MANNA, T. D.; CRISTÓFANI, L. M.; ODONE FILHO V.; SETIAN, N. 2004. Growth and puberty after treatment for acute lymphoblastic leukemia. **Rev. Hosp. Clin.** v. 59, n. 2, p.67-70.

American Society for Testing and Materials. 1985. Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water ASTM Standard D 4187-82.

ANTUNES, L. M. G., BIANCHI, M. L. P. 2004. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Rev. Nutr.** v.17 n.1. Campinas.

BATISTA C.V; DA SILVA L.R; SEBBEN A.; SCALONI A.; FERRARA L.; PAIVA G.R.; OLAMENDI-PORTUGAL T.; POSSANI L.D; BLOCH C. Jr. 1999. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptide** v. 20. n. 6. p.679-86.

BAKER, M. A.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M.; JACOB, S. L. 1993. Anticancer Efficacy of Magainin2 and Analogue Peptides. **Cancer Res.** v. 53, p. 3052-3057.

BRAND, G. D. 2007. Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. 219 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BECHINGER, b. & LOHNER, K. 2006. Detergent – like actions of linear amphipatic cationic antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1758. p.1529-39.

BESCHIASCHVILI, G., & SEELIG, J. 1990. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. **Biochemistry.** v. 29, p. 52-8.

CALVO, P. C. REMUNˆAˆ N-LOˆ PEZ, J. L. VILA-JATO, M. J. ALONSO. 2007. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 63, p. 125-132.

CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A., ALONSO, M. J. 2001. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **Int. J. Pharm.** v. 224, p. 159-168.

CARVALHO, E. 2006. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **MultiCiência.** v. 7, p. 1-18.

CERÓN, J. M., MORENO, J. C., PUERTOLLANO, E., CIENFUEGOS, G. A., PUERTOLLANO M. A., PABLO, M. A. 2010. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Peptide.** v. 31(8), p. 1494-1503.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. 2000. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach. **Ed. Oxford.** Nova Iorque.

DASS, C. R. & CHOONG, P. F. M. 2006. Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. **Peptide.** v. 27, p. 3020 – 3028.

DOUGLAS, K. L., PICCIRILLO, C. A., TABRIZIAN, M. 2006. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. **J. Contr. Release.** v.115 (3), p. 354-361.

FUENTES, M. G.; PREGO, C.; TORRES, D, ALONSO, M. J. 2005. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 25, p. 133-143.

GREEN D. R. & REED J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis : Apoptosis. **Science.** v. 281, (5381), p. 1309-1312.

GRIVICICH, I., REGNER, A. AND ROCHA, A. B. 2007. Morte Celular por Apoptose. **Rev. Bras. Cancerologia.** v. 53(3), p. 335-343.

HOSKIN D. W. & RAMAMOORTHY, A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1778, p. 357–375.

HUGHES, G. A. 2005. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: NBM** v.1, p. 22– 30.

Instituto Nacional de Câncer. INCA. 2010. Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil.

Instituto Nacional de Câncer. INCA. Ministério da Saúde. 1996 – 2008. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 . Acesso em: 12/08/2008.

JAIN, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**. v. 21. p.2475-2490. Amsterdam.

JINTAPATTANAKIT, A., JUNYAPRASERT, V. B., MAO, S., SITTERBERG, J. BAKOWSKY, U., KISSEL, T. 2007. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. **Inter. J. Pharm.** v. 342, p. 240–249.

JOANITTI, G. A. 2008. Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases – BTCl– e peptídeos derivados em células de câncer de mama (mcf-7). Dissertação de mestrado. p. 1-102. Brasília.

JOHANNES SITTERBERG, J., ÖZCETIN, A., EHRHARDT, C., BAKOWSKY, U. 2010. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 71(1), p. 2-13.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER C. D.; P. I. COOK. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.** v. 34 (2), p. 595-598.

KHAN, G. M. 2001. Controlled Release Oral Dosage Forms: Some Advances in Matrix Type Drug Delivery Systems. **J. Medical Sci.** v.1 (5), p. 350-354.

KLIGERMAN, J. 2001. Assistência oncológica e incorporação tecnológica. **Canc. Care Cont. Tech. Devel.** v.47(3), p.239-243.

KOZLOWSKA, K.; NOWAK, J.; KWIATKOWSKI, B.; CICHOREK, M. 1999. ESR study of plasmatic membrane of the transplantable melanoma cells in relation to their biological properties. **Exp. Toxicol. Pathol.** v. 51, p. 89-92.

KOST, J.; LANGER, R. 1991. Responsive polymeric delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 6, p. 19-50.

LEFFLER, C. C. & MULLER, B. W. 2000. Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan–gelatin sponges. **Int. J. Pharm.** v. 194, p. 229–237.

LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M.I.S.; PRATES, M.V.; BRAND, G.D.; LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B.; BOCCA, A.L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH JR, C. 2005. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptide**. v. 26, p. 565–73.

LEUSCHNER, C. & HANSEL, W. 2004. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments, **Curr. Pharm. Des.** v. 10, p. 2299-2310.

LIU, S., YANG, H., WAN, L., CAI, H. W., LI, S. F., LI, Y. P., CHENG J., LU, X. 2010. Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery. **Ac. Pharm. Sinica**. v. 32, p. 79–88.

LY, J. D., GRUBB, D. R., LAWEN, A. 2003. The mitochondrial membrane potential in apoptosis, an update. **Apoptosis**. v. 8, p. 115-128.

MADER, J. S.; SALSMAN, J.; CONRAD, D. M.; HOSKIN, D. W. 2005. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. **Mol. Cancer Ther.** v. 4, p. 612–624.

MADER, J. S. & HOSKIN, D. W. 2006. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. **Expert Opin. Investig. Drugs**. v.15, p. 933-946.

MANDEL, S. M. S. 2008. Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. Dissertação de mestrado. p. 1-69. Brasília.

MAHER, S. & MCCLEAN, S. 2006. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Bioch. Pharm.** v. 71:9, p. 1289-1298.

MITRA, S., GAUR, U., GHOSH, P.C., MAITRA, A.N. 2001. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier, **J. Control. Release**. v. 74, p. 317–323.

MORTON, C. O., SANTOS, S.C., COOTE, P. 2007. An amphibian-derived, cationic, α -helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. **Mol. Microb.** v. 65(2), p. 494–507.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v. 65, p. 55-63.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). 2005. What do you need to know about breast cancer. **NIH Publication**, n. 05, p.1556.

PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H., WEI, G., HAO J. AND CUI, F. 2002. Chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **Int. J. Pharm.** v. 249, p. 139–147.

PARK, C.B., KIM, H.S., KIM, S.C. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commum.** v. 244, p. 253-7.

PERES, C. M.; CURI, R. 2005. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Editora Guanabar Koogan S.A. p. 283.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. 2000. Hydrogeis in pharmaceutical formulations. **Eur. J. Pharm. BioPharm.** v.50, p. 27-46.

PREGO, C., FABRE, M., TORRES, D., ALONSO, M. J. 2006. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. **Pharm. Research.** v. 23 (3), p. 549-556.

PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E., ALONSO, M. J. 2006. Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. **J. Contr. Rel.** v. 111 (3), p. 299-308.

REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO P. A. J., VEIGA, F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded Polymeric nanoparticles. **Nanomedicine.** v. 2, p. 8-21.

ROLLINS-SMITH, L. A., REINERT, L. K., O'LEARY, C. J., HOUSTON, L. E., WOODHAMS, D. C. 2005. Antimicrobial Peptide Defenses in Amphibian Skin. **Integ. Comp. Biol.** v. 45 (1), p. 137-142.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. 2003. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Rev. Bras. de Ciên. Farm. Braz. J. Pharm. Scien.** v. 39 (1), p.1-20.

SIMON, M., WITTMAR, M., BAKOWSKY, U., KISSEL, T. 2004. Self-assembling nanoplexes from insulin and water-soluble branched polyesters, poly[(vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]- graft-poly(L-lactic acid): A novel carrier for transmucosal delivery of peptides. **Bioconj. Chem.** v. 15, p. 841–849.

SHAI, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers.** v. 66, p 236-48.

SNYDER, E. L., MEADE, B. R., SAENZ, C. C., DOWDY, S. F. 2004. Treatment of Terminal Peritoneal Carcinomatosis by a Transducible p53-Activating Peptide. **PLoS Biology.** v. 2 (2), p. 0186- 0193.

SOK, M.; SENTJURC, M.; SCHARA, M. 1999. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. **Cancer Lett.** v. 139, p. 215–220.

THACHARODI, D. & RAO, K. P. 1996. Rate-controlling biopolymer membranes transdermal delivery system for nifedine: development and in vitro evaluations. **Biomaterials.** v.17 (13), p.1307-11.

TIYABOONCHAI, W. 2003. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. **Nar. Uni. J.** v. 11(3), p. 51-66.

TOSTESON, M. T., HOLMES, S. J., RAZIN, M., TOSTESON, D. C. 1985. Melittin lysis of red cells. **J. Membr. Biol.** v. 87, p. 35-44.

XU, Y. & DU, Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **Int. J. Pharm.** v. 250, p. 215- 226.

ZAMAI, L., FALCIERI, E., MARHEM, G., VITALE, M. 1996. Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptotic Cells in the Absence of Nucleosomal DNA Fragmentation. **Cytometry.** v. 23, p. 303-311.

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

ZIEGLER, A. 2008. Thermodynamic studies and binding mechanism of cellpenetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 60 (4-5), p. 580-97.

ZOGGEL, H. V., KOURBALI, Y. H., GALANTH, C., LADRAM, A., NICOLAS, P., COURTY, J., AMICHE, M., DELBE, J. 2010. Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. **Amino Acids.** p. 1-11.

WEI, H.; BOWEN, R.; ZHANG, X. 1998. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two stage skin carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis.** v.19 (8), p.1509-1514. New York .

WESTON, K. M., & RAISON, R. L. 1998 Interaction of melittin with a human lymphoblastoid cell line, HMy2. **J. Cell. Biochem.** v.68, 164-73.

WILLIAMS, M., MOUGHAN, P. J., FULLER, M. F. 2009. Methods for Mucin Analysis: A Comparative Study. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 6029–6035.

World Health Organization. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Acesso em: 22/08/2008.

WU, Y., YANG, W., WANG, C., HU, J., FU, S. 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **Int. J. Pharm.** v, 295 (1-2), p. 235-245.