**ARTIGO DE PEPTÍDEOS REVISADO**

**Parecer do revisor prof. Ferraz:**

**Linha 17:** célula e matriz ok

**Linha 32:** Já havia sido estudado antes? Não seria comprovam ou indicam? ok

**Linha 59:** medicamentos e quimioterapia são diferentes? Sim. Junto com a quimioterapia é comum existir o tratamento medicamentoso que inclui remédios de anticorpos monoclonais ou drogas químicas que são usadas apenas quando a quimioterapia sozinha não é eficiente.

**Linha 71:** entendo que a concentração empregada para causar o efeito desejado é importante. Portanto, seria relevante informar em qual faixa de concentração estes outros peptídeos demonstraram efeito desejado ok

**Figura 3:** A escala de x é logarítimoca. Portanto a unidade é Concentração de A9 em nM. Não requer indicação Log10 ok

**Linha 284:** Há duas condições experimentais: A9 adicionado somente uma vez (no tempo zero) e A9 adicionado a cada 24 h. A frase inicial afirma que as células retornaram normalmente o padrão de crescimento i=e indica Figura 5. No entanto há uma situaão na figura 5 em que isso não ocorre. Portanto, o texto deve descrever os dois fenômenos separadamente em termos do que ocorreu com a viabilidade celular e depois concluir do que se trata o efeito do A9s ok

**Linha 293:** A expectativa é que esta seja uma referência forte, pois o fenômeno é inusitado. Talvez fosse necessário estender a discussão do que foi efetivamente observado na ref 14 e dizer que por associação, algo similar deve ter ocorrido no presente estudo. ok

**Linha 361:** Uma frase não pode iniciar com “obtendo resultados...” ok

**Linha 366:** não é nM ok

**Linha 375:** Quem? Use frases assertivas ok

**Linha 397:** a ref 41 deveria aprecer aqui se é ela que indica o fenômeno observado ok

**Linha 403:** trata-se de uma interação química sem afetar o metabolismo e não um interação mecânica, mesmo porque as concentrações são muito baixas para haver efeito mecânicos de monocamada protetora, por exemplo. A mecânica molecular é uma expressão usada para definir um método computacional empregado no cálculo de geometrias e energias moleculares que considera as interações entre os núcleos e íons das moléculas. O peptídeo A9s foi desenhado por modelagem molecular com a intenção de que interagisse de forma mecânica, ou seja, que a interação fosse entre os íons. Por isso o termo “interação mecânica” é utilizado.

**Linha 407** Se está associado à frase anterior, deve estar no mesmo parágrafo ok

**Linha 418** Não seria um potencial agente, pois não se avaliou o composto em terapia até o momento ok

**Parecer dos revisores do grupo:**

* **Linha 46:** Reescrever “medeiam a adesão entre células e entre células e matriz extracelular (MEC)”. Sugestão de alteração: “promovem a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular” **ok**
* **Linha 47:** Sugestão de melhoria de texto: “Por promoverem a adesão, as integrinas estão envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos como o desenvolvimento embrionário, respostas imunológicas e mecanismos relacionados a oncogênese” **ok**
* **Linha 73:** Inverter a ordem das frases melhora o *link* entre a importância das desintegrinas na ação de inibição da adesão das integrinas de células tumorais: “As desintegrinas apresentam homologia com a proteína humana ADAM (proteína desintegrina e metaloprotease) [19] que possui uma região de interação em forma de loop, capaz de reconhecer integrinas [20,21]. Este *loop* é uma região de interesse para o desenho de inibidores sintéticos de integrinas*.*  As desintegrinas de veneno de serpente são um tipo de inibidor natural da interação entre integrina-ligante [17,18].” As desintegrinas já são utilizadas como inibidores de integrinas, mas por serem de veneno de serpente estas apresentam alta toxicidade. Por isso se procurou homologia da proteína desintegrina com proteínas naturais humanas, para diminuir a toxicidade e aumentar a especificidade. E foi então encontrado uma família de proteína humanas (ADAMs) que possuíam homologia com as desintegrinas. As ADAMs contém um loop chamado de desintegrina-like, esta é a região semelhante a desintegrina capaz de reconhecer as integrinas, por isso ela foi escolhida para o desenho de inibidores sintéticos. Por isso a ordem deve se manter como está no texto, pois foi a forma como foi montado e formulado o raciocínio científico para se chegar no local específico do desenho dos peptídeos.
* **Linha 86:** O termo “forte” é genérico, sugere-se usar o termo “potencial”. **ok**
* **Linha 92:** Retirar “para o presente trabalho foram utilizadas” e iniciar frase com “Empregou-se”. Aplicar assertividade nas demais ocorrências de texto. ok
* **Linha 101:** A sentença “modificada para melhor reconhecer as integrinas α4β1 e αVβ3, mas” pode ser retirada, sendo melhor empregada na seção de resultados e discussão. O Título da seção foi modificado para melhor se encaixar. Como esse reconhecimento é característica do peptídeo desenhado esse resultado se encontra na patente, sendo aqui apenas citado essa sua função.
* **Linha 108**: Substituir por : “Adesão celular da linhagem B16F10 foi realizada em três matrizes extracelulares na concentração de 5ug/mL: a fibronectina (*Sigma – Aldrich*), a laminina (*Sigma – Aldrich*) e o colágeno.” . Falta adicionar a fabricante e a fonte de colágeno. **ok**
* **Linha 116:** Substituir ação “plaqueadas” por “inoculadas”, sendo o termo mais adequado visto que a concentração celular é conhecida. Aplicar modificações nas demais ocorrências de texto. **ok**
* **Linha 128:** Abreviação do EDTA é suficiente para identificar o composto e não é necessário descrever por extenso. Neste paragrafo ainda, sugere-se “Empregou-se dois controles à avaliação da inibição da adesão celular. Controle positivo com inibição da adesão celular com EDTA na concentração de 50 µM substituindo a adição do peptídeo A9s.” **ok**
* **Linha 129:** Indica-se usar a sentença a seguir na seção de Ação do A9s e EDTA na adesão celular da linhagem B16F10. “Nesta condição experimental o EDTA deve inibir adesão das células de B16F10 à matriz de fibronectina [23], indicando o menor nível de adesão das células de B16F10 à matriz proteica.” Não é que ele indique o menor nível de adesão das células, ele indica a adesão mediada por interações iônicas, as outras interações permanecem, tanto que o EDTA não é capaz de remover todas as células aderidas à matriz proteica. A frase sugerida não está incorreta, mas ela pode tirar o foco principal do leitor.
* **Linha 180:** Reescrever de forma mais assertiva e objetiva. “Foram usadas células da linhagem B16F10 plaqueadas sobre fibronectina 5µg/mL em placas de 24 poços por 6 e 24h com e sem adição de peptídeo” **ok**
* **Linha 199:**  Especificar que “análises estatísticas da expressão gênica através do qPCR.” **ok**
* **Linha 206:** Evitar inicio de frase com adverbio de frequência, e.g “primeiramente”, usando termos mais diretos. Ajustar para demais ocorrências do texto. **ok**
* **Linha 208:** O percentual foi de 26%. Retirar “apenas”, visto que percentual É UM DADO. **ok**
* **Linha 259:** Alterar o título da seção. “A9s é capaz de inibir o crescimento de B16F10” **ok**
* **Linha 261 – 265:** Reformular o paragrafo e caracterizar o controle como positivo ou negativo “Para o ensaio de crescimento foram feitas três condições experimentais: (i) condição controle: linhagem B16F10 aderida à fibronectina sem adição de A9s; (ii) condição de tratamento 1: B16F10 adicionada junto com o peptídeo A9s (0,1nM e 100nM) no início do experimento; e (iii) condição de tratamento 2: onde foi adicionado o peptídeo A9s (0,1nM e 100nM) no início do experimento e novamente nos tempos de 24h e 48h.” ok
* **Linha 270:** Qual a quantidade e a concentração do peptídeo que foi adicionado? “Ao adicionar mais peptídeo a cada 24h a inibição do A9s na concentração de 0,1 nM alcançou 55% de redução do crescimento celular em 24h e se manteve em 40% até 72h (Figura 4A).” A concentração é a de 0,1nM, a quantidade é proporcional ao volume do poço para alcançar a concentração desejada. Dados da metodologia
* **Linha 289:** Especificar a condição discutida no trecho. “Na condição de tratamento das células B16F10 onde foi adicionado mais peptídeo A9s a cada 24 horas observou-se diferença estatística significativa na porcentagem de viabilidade celular. ” **ok**
* **Linha 313:**  Retomar breviamente a analise de Image J usada para criar a curva (Figura 6) o ImageJ foi utilizado para contar o número de células que foram capazes de andar para o poço, esse cálculo é feito a partir das bordas da lesão e dentro da lesão, por conta disso os valores celulares são altos, mesmo que visualmente (a olho nu) pareça que não existe aquela quantidade de células. Os valores foram plotados no graphpad para montar o gráfico e fazer as análises estatísticas.
* **Linha 318:** Esclarecer a qual tratamento se refere os percentuais de redução da proliferação celular. “No ensaio de proliferação celular quando adicionado 0,1nM e 100nM de A9s às células B16F10 houve, **respectivamente**, uma redução de 35% (6h) e 37% (12h) da proliferação celular quando comparado ao controle (figura 6C).” **ok**
* **Linha 340:**Alterar titulo, evidenciando qual a técnica usada para obter resultado “Expressão das subunidades de integrinas em tempo real” **ok**
* **Linha 346:** Que células estão sendo abordadas no segundo trecho de: “Em condições normais de cultura a linhagem B16F10 expressou as subunidades α5, α6, α4, αv, β1 e β3 de integrinas, conhecidas por mediar os processos de adesão e migração celular (Figura suplementar). Quando essas células aderidas à fibronectina foram plaqueadas por 6h junto ao peptídeo A9s na concentração de 100nM, houve um aumento significativo na expressão de α5, esse aumento permaneceu até 24h.”? **ok**
* **Linha 369:** Padronizar o uso de “peptídeo cíclico A9s” ou o uso de “peptídeo A9s”. **ok**
* **Linha 384 – 387:** Reescrever de forma a passar a informação de maneira clara. “Contudo, o A9s apresentou baixa redução da proliferação de B16F10, mostrando que o peptídeo impede a interação entre B16F10-Fibronectina mas, uma vez aderidas, as células não têm sua proliferação celular em contínua redução.” **ok**
* **Linha 51:** Parágrafo como um todo está confuso, induz o pensamento de que as integrinas são proteínas negativas e estritamente associadas ao processo metastático de células cancerosas. Solicitamos reescrita. O parágrafo anterior indica como as integrinas são células essenciais a diversos processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário e respostas imunológicos. As células cancerígenas super-expressam essas proteínas (integrinas) que comumente se encontram na membrana celular para adquirir a capacidade de “sair do lugar”, logo em células cancerígenas as integrinas, assim como diversos genes que são naturais das células serão vistos como negativos.
* **Linha 64:** Alteração requerida: “Terapias empregando peptídeos tem as vantagens de serem biocompatíveis e específicas, além de baixa toxicidade[15], facilidade de síntese, facilidade de modificação estrutural e tamanho pequeno”. No entanto deve-se indicar a faixa de concentração da toxicidade (Concentração de toxicidade em células de mamíferos são extremamente relativas e dependem muitas vezes da estrutura química do composto, uma droga pode ser usada a 1mM e outra a 1μΜ e ambas não serem tóxicas) e especificar a massa molecular que atribui a característica de “pequeno” ao peptídeo (corrigir também na linha 296, onde a mesma abordagem foi empregada). A referência 15 apresenta outras duas referências para embasar a informação de toxicidade. É desejável aprofundar o conhecimento sobre as vantagens dos peptídeos para melhor discussão **ok**.

A baixa toxicidade de peptídeos não se da por conta da concentração e sim por conta da estrutura dos peptídeos. A característica pequeno é padrão da área de peptídeos como drogas, indica peptídeos com tamanhos aproximados de 21aa, mas o nome pequeno foi retirado do texto.

* **Linha 103:** Material complementar ou referencia com sequencia peptídica do A9s precisam estar indicadas ok
* **Linha 123:** Porque houve troca do comprimento de onda da absorbância de 592 nm indicado na referência para 570 nm do presente trabalho? Na referência o autor usou um leitor de ELISA (Tecan, Austria), já no presente estudo foi utilizado um leitor de microplaca (Gene5 microplate data collection), não foi utilizado anticorpos no ensaio de adesão. O novo protocolo foi adaptado e foi levado em consideração o tipo celular, o corante, a placa e o leitor para a escolha da absorbância para a leitura.
* **Linha 149:** Falta informar quais as concentrações do peptídeo A9s empregadas na dosagem do teste de crescimento celular **ok**