



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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS  
DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: EFEITOS SOBRE PATÓGENOS  
MICROBIANOS E CÉLULAS TUMORAIS**

Carlos José Correia de Santana

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília, 2022



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

Carlos José Correia de Santana

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS  
DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: EFEITOS SOBRE PATÓGENOS  
MICROBIANOS E CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília, 2022



**Universidade de Brasília**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PEPTÍDEOS  
DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: EFEITOS SOBRE PATÓGENOS  
MICROBIANOS E CÉLULAS TUMORAIS**

**Autor: Carlos José Correia de Santana**

**Comissão Examinadora:**

**Profa. Dra. Mariana S. Castro  
Presidente  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves  
Membro Titular  
Departamento de Farmácia  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. André Kipnis  
Membro Titular  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública  
Universidade Federal de Goiás**

**Dr. Daniel Carvalho Pimenta  
Membro Titular  
Instituto Butantan**

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Anália e João pelo esforço  
que fizeram para que eu chegasse até aqui.



## **Agradecimentos**

À minha orientadora professora Mariana, por ter me acolhido em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa. Por sua generosidade, paciência e compreensão. Pelas oportunidades que me deu e por acreditar em mim e no meu trabalho, apesar das minhas falhas e dificuldades.

Ao professor Osmino, por sempre ser um ombro amigo durante as dificuldades, pelos conselhos e por sempre estar disposto a ajudar em todos os momentos. Por confiar em mim e no meu trabalho.

À professora Graziella A. Joanitti e a Dra. Alicia Ombredane pela disponibilidade e generosidade durante os experimentos de citometria de fluxo.

Ao professor Wagner Fontes e aos estudantes Isabelle e Reynaldo pelo auxílio durante a análise proteômica.

Aos professores e colaboradores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Marcelo Valle de Sousa, Carlos André O. Ricart, Sébastien Olivier Charneau, Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Fabiane H. Veigas e aos técnicos Nuno Domingues e Dr. Jaques Miranda Ferreira de Souza, pelo esforço e trabalho em sempre manter o laboratório operacional para que pudéssemos desenvolver os nossos projetos.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina, Gabriel, João, Jéssica Oliveira, Jéssica Schneider, Isadora, Keven, Gislene, Katyelle, Felipe, Lucas, Farah, Agnelo, Agenor, Simone e todos os demais pela convivência e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À minha esposa Jaqueline, por todo apoio, carinho, generosidade e compreensão durante este período do doutorado.

Aos meus pais, Anália e João, por não medirem esforços para eu pudesse estudar. E demais membros da família, tios, avós, pelo apoio e por sempre transmitirem positividade quando mencionava que as coisas não iam bem.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq, FAPDF, FINEP e à UnB / PPG BioMol pelo apoio financeiro.

## Sumário

Apresentação .....	ix
Lista de figuras .....	x
Lista de tabelas .....	xiv
Lista de abreviatura e siglas .....	xv
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Peptídeos antimicrobianos .....	18
1.2. Estrutura e mecanismos de ação dos PAMs .....	19
1.3. Peptídeos bioativos de anuros .....	24
1.4. Câncer .....	25
1.5. Peptídeos anticâncer.....	26
1.6. Desenho racional de peptídeos .....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVO E METAS .....	32
3.1. Objetivo geral .....	32
3.2 Metas estabelecidas.....	32
4. CAPÍTULO 1.....	34
4.1. Artigo 1 – Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the chaco tree frog, <i>Boana raniceps</i> – publicado na revista <i>Biomolecules</i> .....	34
4.2. Artigo 2 – Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties - publicado na revista <i>Antibiotics</i> .....	53
5. CAPÍTULO 2.....	68
5.1. Introdução .....	69
5.2. Materiais e métodos .....	71
5.2.1. Obtenção dos análogos .....	71
5.2.2. Bioinformática estrutural dos análogos .....	71
5.2.3. Ensaio antibacteriano .....	71
5.2.4. Ensaio sobre células tumorais.....	72
5.2.4.1. Manutenção da cultura de células .....	72
5.2.4.2. Tratamento das células com os análogos.....	72
5.2.4.3. Viabilidade Celular (MTT).....	73
5.2.4.4. Efeitos apoptóticos .....	74

5.2.4.5. Potencial de membrana mitocondrial.....	75
5.2.4.6. Permeabilização de membrana lisossômica .....	75
5.2.5. Análise proteômica .....	76
5.2.5.1. Preparo das células .....	76
5.2.5.2. Extração das proteínas das células .....	76
5.2.5.3. Digestão trípica das proteínas .....	77
5.2.5.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) ..	78
5.2.5.5. Quantificação, identificação das proteínas e análise de dados .....	80
5.2.5.6. Análise de enriquecimento de vias e termos GO .....	81
5.3. Resultados e discussão.....	82
5.3.1. Características físico-químicas da pentadactilina e seus análogos .....	82
5.3.2. Atividade biológica dos análogos .....	85
5.3.3. Avaliação dos mecanismos de ação por citometria de fluxo.....	100
5.3.3.1. Morfologia celular .....	100
5.3.3.2. Exposição de fosfatidilserina .....	101
5.3.3.3. Avaliação de multicaspases .....	102
5.3.3.4. Potencial de membrana mitocondrial.....	102
5.3.3.5. Permeabilização de membrana lisossômica .....	105
5.3.3.6. Fragmentação de DNA e ciclo celular.....	107
5.3.4. Análise proteômica .....	114
5.4. Considerações sobre os resultados de citometria de fluxo e proteômica.....	157
5.5. Conclusões .....	159
6. Referências bibliográficas .....	162
7. ANEXOS.....	181

## **Apresentação**

A tese aqui apresentada está organizada em tópicos, a saber: **Introdução**, **Justificativa**, **Objetivos**, **Capítulo 1** (Artigo 1 - referente ao artigo **Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the chaco tree frog, *Boana raniceps*** publicado na revista *Biomolecules*; Artigo 2 - referente ao artigo **Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties** publicado na revista *Antibiotics*), **Capítulo 2** (referente ao estudos com os análogos do peptídeo pentadactilina sobre células cancerosas usando técnicas de citometria de fluxo e proteômica), **Referências bibliográficas** e **Anexos**.

A **Introdução** e a **Justificativa** fornecem um embasamento teórico sobre os temas abordados nesta tese e as razões para o desenvolvimento deste trabalho. Os **Objetivo** e **Metas** refletem a tese como um todo, embora haja objetivos detalhados e específicos dentro de cada capítulo. O **Capítulo 1** contém dois artigos publicados relacionados com o isolamento e a caracterização de peptídeos antimicrobianos do anuro *Boana raniceps*. Por se tratar de temas semelhantes, optamos por deixá-los agrupados em um mesmo capítulo. O **Capítulo 2** está estruturado contendo desde introdução até conclusão relacionada com a análise das propriedades moleculares e funcionais de análogos do peptídeo antimicrobiano pentadactilina.

As **Referências bibliográficas** contêm as referências de trabalhos citados em toda a tese com exceção do capítulo 1.

Os **Anexos** contêm duas tabelas referentes a dados de proteômica obtidos no capítulo 2 e trabalhos acadêmicos publicados durante o período de desenvolvimento do doutorado.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Variedade estrutural dos peptídeos antimicrobianos.....	19
<b>Figura 2.</b> Eventos que ocorrem quando os PAMs se associam a membrana plasmática de bactérias.....	23
<b>Figura 3.</b> Multi-alinhamento da pentadactilina e seus análogos..	83
<b>Figura 4.</b> Predição de estrutura secundária da pentadactilina e seus análogos..	84
<b>Figura 5.</b> Projeções de Schiffer-Edmunson da pentadactilina e seus análogos.....	85
<b>Figura 6.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN1 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	87
<b>Figura 7.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN2 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	88
<b>Figura 8.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN3 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	89
<b>Figura 9.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN4 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	89
<b>Figura 10.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN5 sobre células de melanoma murino (B16F10).....	90
<b>Figura 11.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN6 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	91
<b>Figura 12.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN7 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	92
<b>Figura 13.</b> Atividade antiproliferativa do peptídeo AN8 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3). .....	92
<b>Figura 14.</b> Atividade antiproliferativa do análogo AN9 sobre células de melanoma murino (B16F10).....	93
<b>Figura 15.</b> Atividade antiproliferativa do análogo AN10 sobre células de melanoma murino (B16F10).....	94

<b>Figura 16.</b> Avaliação da morfologia celular quanto à granulosidade (SSC-H) e ao tamanho (FSC-H) da linhagem B16F10.....	100
<b>Figura 17.</b> Efeito dos peptídeos AN6 e AN8 sobre as células tumorais da linhagem B16F10 (A) e MCF-7 (B) utilizando os marcadores anexina V/FITC (apoptose) e iodeto de propídio (necrose). .....	101
<b>Figura 18.</b> Avaliação da marcação de multicaspases em células da linhagem B16F10 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8.....	102
<b>Figura 19.</b> Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) usando rodamina 123 em células B16F10 e MCF-7 .....	104
<b>Figura 20.</b> Permeabilização de lisossomos marcados com laranja de acridina em células B16F10 e MCF-7 .....	106
<b>Figura 21.</b> Avaliação da integridade do DNA de células B16F10 e MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas de tratamento. ....	107
<b>Figura 22.</b> Avaliação do ciclo celular de células B16F10 e MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas de tratamento.....	108
<b>Figura 23.</b> Imagem representativa do padrão de expressão da proteína <i>Prohibitin</i> (ID Uniprot P67778) em células B16F10 quando tratadas com o controle (DMEM) e com peptídeo AN6 em diferentes tempos. ....	115
<b>Figura 24.</b> Proteínas categorizadas de acordo com processos biológicos com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.....	117
<b>Figura 25.</b> Proteínas categorizadas de acordo com os processos biológicos com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	118
<b>Figura 26.</b> Proteínas categorizadas de acordo com componente celular com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.....	119
<b>Figura 27.</b> Proteínas categorizadas de acordo com componente celular com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	120

<b>Figura 28.</b> Proteínas categorizadas de acordo com função molecular com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	121
<b>Figura 29.</b> Proteínas categorizadas de acordo com a função molecular com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	122
<b>Figura 30.</b> Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de processos biológicos que estão com a abundância aumentada e diminuída em células B16F10. ....	123
<b>Figura 31.</b> Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de componente celular que estão com a abundância aumentada ( <b>A</b> ) e diminuída ( <b>B</b> ) em células B16F10. ....	124
<b>Figura 32.</b> Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de função molecular que estão com a abundância aumentada (A) e diminuída (B) em células B16F10. ....	125
<b>Figura 33.</b> Via de exportação de proteínas. As proteínas em vermelho encontram-se com expressão aumentada em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. ....	128
<b>Figura 34.</b> Via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. ....	137
<b>Figura 35.</b> Via da fosforilação oxidativa. As proteínas / complexos que estão com a abundância aumentada estão destacadas em vermelho em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. ....	138
<b>Figura 36.</b> Via da ferroptose. As proteínas / complexos que estão com a abundância aumentada estão destacadas em vermelho em células da linhagem B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. ....	141
<b>Figura 37.</b> Análise de interação proteína-proteína usando o STRING DB de proteínas com a abundância aumentada em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. ....	144



<b>Figura 38.</b> Via de sinalização AMPK. As proteínas destacadas em verde estão com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle.....	151
<b>Figura 39.</b> Via de sinalização da necroptose. As proteínas destacadas em verde estão com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle.....	153
<b>Figura 40.</b> Análise de interação proteína-proteína usando o STRING DB de proteínas com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.....	156

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros físico-químicos da pentadactilina e de seus análogos.....	83
<b>Tabela 2.</b> Atividade antiproliferativa dos análogos da pentadactilina sobre as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . .....	86
<b>Tabela 3.</b> Enriquecimento de vias metabólicas usando a ferramenta KEGG contendo proteínas com a expressão aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	126
<b>Tabela 4.</b> Enriquecimento de vias usando a ferramenta KEGG contendo proteínas com a expressão diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6. ....	145
<b>Tabela 5.</b> Lista de proteínas com expressão aumentada em células B16F10 quando tratadas com o peptídeo AN6.....	181
<b>Tabela 6.</b> Lista de proteínas com expressão diminuída em células B16F10 quando tratadas com o peptídeo AN6.....	184

## Lista de abreviatura e siglas

**ACN** - Acetonitrila

**APD** – *Antimicrobial Peptide Database*

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**CFU** – *Colony-forming unit* – Unidade formadora de colônia

**Da** – Dalton

**DMEM** – *Dulbecco's modified Eagle medium*

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DTT** – Ditioneitol

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína

**GRAVY** – *Grand Average Hydropathy*

**IC<sub>50</sub>** – Concentração mínima capaz de inibir o crescimento em 50%

**PI** – Iodeto de propídio

**LA** – Laranja de acridina

**LC-MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

**MIC** – Concentração mínima inibitória

**Min** – Minuto

**MS** – Espectrometria de massas

**MS/MS** – Espectrometria de massas em tandem

**MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**Nm** – Nanômetro

**PAM** – Peptídeo antimicrobiano

**PAC** – Peptídeo anticâncer

**PBS** – Tampão salino fosfato

**RP-HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TEAB** – Brometo de tetraetilamônio

**TFA** – Ácido trifluoroacético

## Resumo

A resistência antimicrobiana representa um dos maiores desafios da medicina moderna e implica que esforços devem ser empenhados na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas sob o risco de retornarmos à era pré-antibiótica. Dentre as alternativas, os peptídeos antimicrobianos representam uma fonte interessante de moléculas que atuam principalmente na membrana plasmática das bactérias, um sítio de ação que é notadamente menos propenso ao desenvolvimento de resistência. Até o momento, mais de três mil peptídeos antimicrobianos já foram descritos, sendo a secreção cutânea de anfíbios a principal fonte dessas moléculas com quase um terço dos peptídeos descritos. Além da atividade antimicrobiana, muitos destes peptídeos também apresentam atividade sobre células tumorais. Na primeira parte desta tese, investigamos os efeitos de dois peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro *Boana raniceps* sobre bactérias, fungos e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além seus efeitos sobre células eucarióticas e eritrócitos. Na segunda parte, desenvolvemos dez análogos tendo como base o peptídeo citotóxico pentadactilina, isolada inicialmente da rã *Leptodactylus labyrinthicus*, com o objetivo de potencializar os efeitos biológicos desejados e, ao mesmo tempo, reduzir os efeitos deletérios. De maneira geral, observamos que alterações estruturais nos análogos foram associadas com uma atividade biológica mais potente. Por outro lado, observamos que algumas alterações nos peptídeos favoreceu substancialmente a atividade sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, enquanto que para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* houve diminuição na atividade. Por outro lado, outras mudanças estruturais culminou na perda total de atividade sobre bactérias e também sobre as células eucarióticas testadas. Para avaliarmos os efeitos dos análogos sobre células eucarióticas usamos técnicas de citometria de fluxo e proteômica. Usando a citometria de fluxo, observamos que os análogos 6 e 8 (AN6 e AN8), induziram várias alterações nas linhagens de células B16F10 e MCF-7, tais como mudanças no tamanho e granulosidade e marcação positiva para anexina V/FITC e iodeto de propídio, sugerindo a ocorrência de necrose. Também observamos que houve uma marcação expressiva para caspases quando testamos as células B16F10 tratadas com os peptídeos. O tratamento de células B16F10 e MCF-7 com os peptídeos AN6 e AN8 induziu a despolarização da membrana mitocondrial, já a permeabilidade lisossômica não foi afetada nas células B16F10, enquanto que houve uma permeabilidade lisossômica nas células MCF-7 tratadas com ambos os peptídeos com significância estatística. Observou-se também uma significativa fragmentação de DNA nas duas linhagens tratadas tanto com o AN6 quanto ao AN8. Por outro lado, as alterações no ciclo celular foram observadas majoritariamente nas células B16F10. Na análise proteômica, usamos a linhagem B16F10 tratada com o peptídeo AN6. Após análise estatística, encontramos 242 proteínas diferencialmente expressas das quais 103 estavam com o padrão de abundância aumentada e 139 proteínas com abundância diminuída em relação ao controle. Diferentemente do que observamos nos ensaios de citometria, não encontramos proteínas relacionadas com processos de morte celular com a expressão aumentada.

## Abstract

Antimicrobial resistance represents one of the greatest challenges of modern medicine and implies that efforts must be devoted to the research and development of new drugs at the risk of returning to the pre-antibiotic era. Among the alternatives, antimicrobial peptides represent an interesting source of molecules that act mainly on the plasma membrane of bacteria, a site of action that is notably less prone to the development of resistance. To date, more than three thousand antimicrobial peptides were described, with amphibian skin secretions as the main source of these molecules, with almost a third of the peptides described. In addition to antimicrobial activity, many of these peptides also have activity on tumor cells. In the first part of this thesis, we investigated the effects of two peptides isolated from the cutaneous secretion of the anuran *Boana raniceps* on bacteria, fungi and epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*, in addition to their effects on eukaryotic cells and erythrocytes. In the second part, we developed ten analogs based on the cytotoxic peptide pentadactylin, initially isolated from the frog *Leptodactylus labyrinthicus*, with the aim of potentiating the desired biological effects and, at the same time, reducing the deleterious effects. Overall, we observed that structural changes in the analogs were associated with more potent biological activity, for example, substantially increased the activity on the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* while the activity on the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* decreased. On the other hand, we observed that some structural changes culminate in the total loss of activity on bacteria and on the eukaryotic cells tested. To evaluate the effects of the analogs on eukaryotic cells we used flow cytometry and proteomics methods. Using flow cytometry, we observed that analogs 6 and 8 (AN6 and AN8) induced several changes in the B16F10 and MCF-7 cell lines such as changes in size and granularity and positive staining for annexin V/FITC and propidium iodide, suggesting occurrence of necrosis. We also observed expressive labeling for caspases when B16F10 cells were treated with peptides. The treatment of B16F10 and MCF-7 cells with AN6 and AN8 peptides induced mitochondrial membrane depolarization, whereas lysosomal permeability was not affected in B16F10 cells, while there was a significant lysosomal permeability in MCF-7 cells treated with both peptides. A significant DNA fragmentation in the two strains treated with both AN6 and AN8 was detected. On the other hand, changes in the cell cycle were observed mostly in B16F10 cells. In the proteomic analysis, we used the B16F10 strain treated with the AN6 peptide. After statistical analysis, we found 242 differentially expressed proteins of which 103 were with the pattern of increased abundance and 139 proteins with decreased abundance compared to the control. Unlike what we observed in the cytometry assays, we did not find proteins related to cell death processes with increased expression.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Peptídeos antimicrobianos

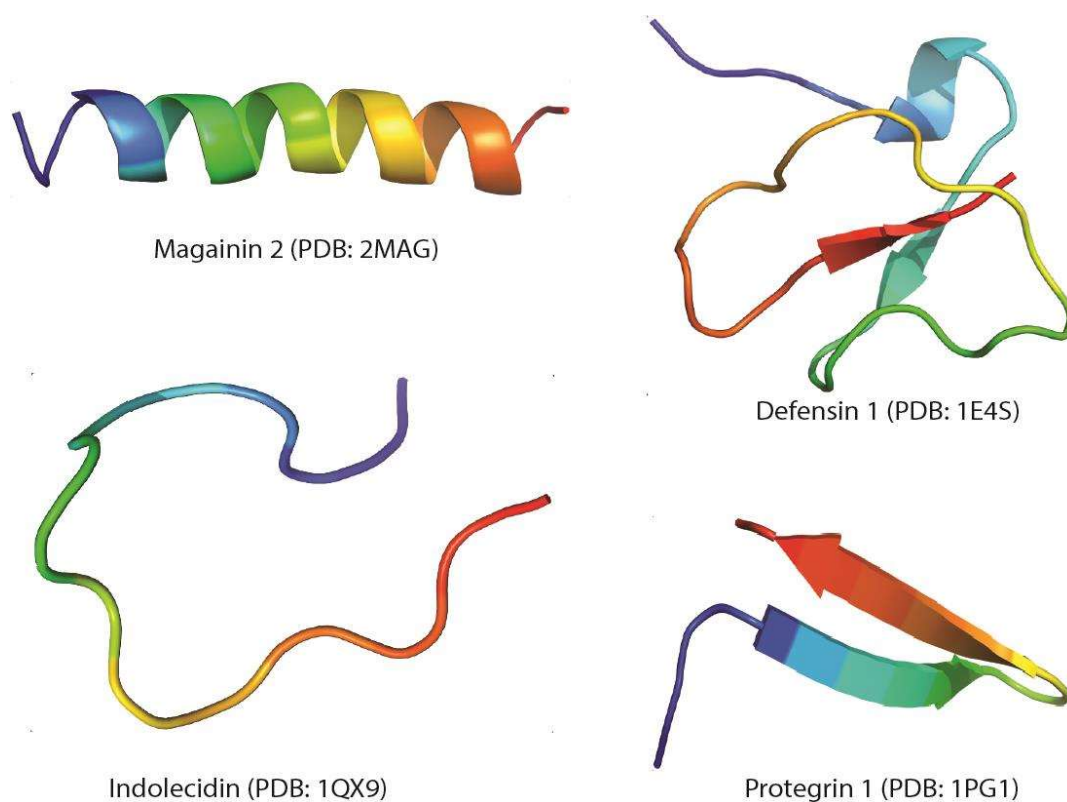
Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão distribuídos em praticamente todos os organismos vivos desde Archaeas até os seres humanos e constituem uma arma importante e eficiente contra micro-organismos. Como bem descreveu Michael Zasloff, estes peptídeos têm como alvo “um calcanhar de Aquiles microbiano”, onde a membrana celular microbiana se distingue da dos demais seres vivos eucarióticos, favorecendo a interação e a seletividade dessas moléculas. O amplo espectro de atividade dos PAMs aliado a um baixo índice de resistência quando comparado com os antibióticos convencionais vem atraindo esforços para o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos (Zasloff, 2002; Magana *et al.*, 2020).

Os PAMs caracterizam-se por apresentarem uma cadeia relativamente curta (10-50 resíduos de aminoácidos), geralmente são carregados positivamente (+2 até +9) e apresentam um percentual elevado de aminoácidos hidrofóbicos ( $\geq 30\%$ ). Essas propriedades permitem que esses peptídeos adotem uma conformação anfipática quando em contato com a membrana de um micro-organismo (Hancock e Sahl, 2006). Embora em menor quantidade, mais de uma centena de peptídeos aniônicos também já foram identificados em invertebrados, vertebrados e plantas (Harris *et al.*, 2009; Nakatsuji e Gallo, 2012).

Até o presente momento, já foram catalogados perto de três mil PAMs, sendo os vertebrados a principal fonte dessas moléculas, e dentro do grupo dos vertebrados, mais de um terço de todos os PAMs descritos foram isolados da classe Amphibia (Wang *et al.*, 2016).

## 1.2. Estrutura e mecanismos de ação dos PAMs

Com o avanço do conhecimento sobre os PAMs, observou-se que essas moléculas podem ser divididas em quatro categorias principais de acordo com sua estrutura tridimensional: 1) peptídeos que apresentam sua estrutura em  $\alpha$ -hélice; 2) peptídeos com folhas-beta estabilizadas por pontes dissulfeto; 3) peptídeos com estrutura estendida e 4) peptídeos que apresentam estruturas em alça (*loop*) (Lai e Gallo, 2009) (Figura 1).



**Figura 1.** Variedade estrutural dos peptídeos antimicrobianos. Magainin,  $\alpha$ -hélice; Defensin 1, mista; Indolecidin, estendida; Protegrin 1, folha  $\beta$ .

Além da elucidação de seus aspectos estruturais, compreender os mecanismos de ação dos PAMs é de suma importância para aprimorar o desenvolvimento de novas drogas, bem como efeitos que eles podem causar no corpo humano (Wimley e

Hristova, 2011). Embora não esteja totalmente claro, é consenso que a maioria dos PAMs promovem uma desestruturação da membrana plasmática dos micro-organismos. Como os micro-organismos têm a membrana carregada negativamente, composta por fosfolipídios como fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina, favorecendo sua interação com os peptídeos, o que não é esperado que ocorra com células de mamíferos, que tem suas membranas compostas geralmente por fosfolipídeos neutros (Brogden, 2005; Nguyen *et al.*, 2011). Os PAMs não se restringem apenas à lise de potenciais patógenos na primeira linha de defesa. Com o avanço das pesquisas, vem sendo possível observar que esse grupo de moléculas desempenham um importante papel além da imunidade inata, contribuindo para uma resposta adaptativa de diversos organismos (Mansour *et al.*, 2014; Mansour *et al.*, 2015; Zhang e Gallo, 2016).

Dentre os modos de ação dos PAMs, os mecanismos de formação de poros transmembrana são os mais estudados. O mecanismo de poro toroidal (Figura 2A) é formado quando os peptídeos aderem-se perpendicularmente na membrana e induzem cada monocamada lipídica a dobrar-se, de modo que as partes hidrofílicas dos lipídios e dos peptídeos ficam expostas no interior do poro (Brogden, 2005). Outro modelo denominado de poro toroidal desordenado (Figura 2B) foi proposto quando o interior do poro não é bem estruturado, mantendo uma distribuição difusa em todo o poro (Leontiadou *et al.*, 2006).

O modelo ripas de barril (Figura 2C) é formado quando os peptídeos se agrupam formando poros transmembranares com a face hidrofílica revestindo totalmente o lúmen do poro e sem intercalação com a face polar dos grupos lipídicos (Li *et al.*, 2012).

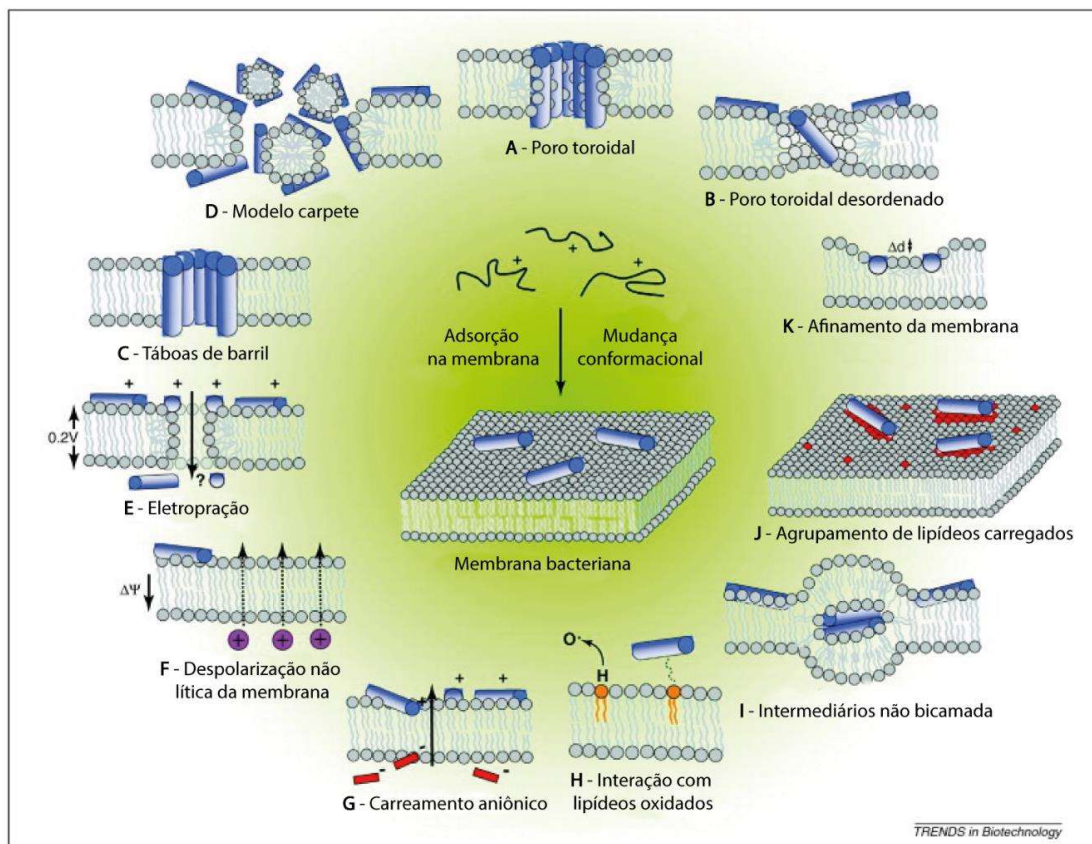


O modelo carpete (Figura 2D) é sugerido quando a concentração limiar de peptídeos ligados à membrana é alcançada, formando poros, micelas e podendo ocorrer a desintegração da membrana (Shai, 2002).

O modelo unificador de Shai-Matsuzaki-Huang propõe que os peptídeos formam um carpete na camada exterior da membrana plasmática promovendo seu afinamento, sendo que posteriormente há a formação de poros, ligação dos peptídeos com o lado interno da membrana podendo resultar em colapso, fragmentação da membrana e formação de micelas, ou ainda, a interação dos peptídeos com alvos intracelulares (Zasloff, 2002).

Além dos principais modelos para ação dos PAMs, outros mecanismos de ação têm sido observados. No mecanismo de eletroporação (Figura 2E), o peptídeo catiônico se associa com a membrana gerando uma diferença de potencial elétrico através da membrana, sendo que quando ocorre uma diferença de 0,2 Volts, há formação de poros (Miteva *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2006). O lipopeptídeo daptomicina e o peptídeo derivado da lactoferrina bovina apresentam uma atividade não lítica que induz uma despolarização da membrana (Figura 2F), onde o peptídeo afeta o potencial da membrana causando uma despolarização e a entrada dos peptídeos na bactéria resultando em perturbações de vias metabólicas (Gifford *et al.*, 2005; Kohanski *et al.*, 2010). A atividade de carreador aniônico (Figura 2G), onde o peptídeo promove a translocação de compostos lipídicos não carregados através da membrana foi observada em estudos envolvendo o peptídeo endolicidina, perturbando o equilíbrio osmótico de forma não lítica (Rokitskaya *et al.*, 2011). Foi observado que peptídeos como temporina B e indolicidina podem interagir com fosfolipídios neutros oxidados na membrana plasmática (Figura 2H) (Mattila *et al.*, 2008). O mecanismo de formação de intermediários não bicamada (Figura 2I), onde o peptídeo liga-se e induz

uma curvatura negativa da membrana que ocorre sem ruptura ou vazamento do conteúdo intracelular, posteriormente a membrana volta a sua conformação natural e o peptídeo fica livre para atuar em um alvo intracelular (Haney *et al.*, 2010). Um interessante mecanismo de ação de alguns PAMs é a indução de agrupamento lipídico (Figura 3J) devido à alta densidade de carga positiva, induzindo um vazamento lento do conteúdo celular e despolarização da membrana, causando a morte do micro-organismo (Epanand e Epanand, 2011). Alterações na espessura da membrana plasmática (Figura 2K) quando em contato com alguns PAMs também têm sido relatadas. O peptídeo PLG<sub>a</sub> promove o espessamento da membrana, enquanto o peptídeo LL-37 promove um afinamento da membrana, resultando posteriormente na formação de poros (Chen *et al.*, 2003; Lohner, 2009). Na Figura 2 estão esquematizados os principais mecanismos de ação dos PAMs.



**Figura 2.** Eventos que ocorrem quando os PAMs se associam a membrana plasmática de bactérias. Nos modelos clássicos de ruptura das membranas, os peptídeos que se encontram na membrana atingem uma concentração limiar e se inserem através da membrana para formar poros revestidos de peptídeos no modelo “*ripas de barril*”, solubilizam a membrana em estruturas micelares no modelo “*carpete*” ou formam poros com uma estrutura peptídeo-lipídeo no modelo “*poro toroidal*”. modelo revisto de *poros toroidais desordenados*, a formação de poros é mais estocástica e envolve menos peptídeos. A espessura da bicamada pode ser afetada pela presença dos peptídeos, ou a própria membrana pode ser remodelada para formar domínios ricos em lipídeos aniônicos que rodeiam os peptídeos. Em casos mais específicos, *intermediários não-bicamada* na membrana podem ser induzidos; adsorção peptídica para a membrana pode ser melhorada, direcionando-os para fosfolipídios oxidados; um peptídeo pode acoplar-se com pequenos ânions através da bicamada, resultando no seu efluxo; o potencial de membrana pode ser dissipado sem danos perceptíveis; ou, inversamente, no modelo de *eletroporação* molecular, o acúmulo de peptídeo na face externa aumenta o potencial de membrana acima de um limiar que torna a membrana transitoriamente permeável a várias moléculas, incluindo os próprios peptídeos. Figura retirada e modificada de Nguyen *et al.*, 2011.

### 1.3. Peptídeos bioativos de anuros

Embora o primeiro peptídeo com atividade hemolítica, denominado bombinina, tenha sido isolado da espécie *Bombina variegata* por Csordas e Michl em 1970, os peptídeos oriundos da pele de anfíbios só ganharam notoriedade quando Michael Zasloff, em 1987, isolou e caracterizou os peptídeos antimicrobianos magaininas do anuro *Xenopus leavis*. Desde então, mais de um terço dos peptídeos biologicamente ativos descritos até o momento foram identificados na classe Amphibia e a ordem Anura representa mais de 90% desse total (Wang *et al.*, 2016). Em uma extensa revisão, Xu e Lai (2015) reportaram cerca de 1900 PAMs de 178 espécies de anfíbios distribuídos em 28 gêneros.

Os peptídeos antimicrobianos de anfíbios são geralmente curtos, variando entre 10-50 resíduos de aminoácidos, em sua grande maioria são catiônicos, geralmente devido à presença do aminoácido Lisina, o segundo mais abundante nos PAMs, e apresentam um elevado percentual de aminoácidos hidrofóbicos, sendo Leucina e Alanina os mais comumente encontrados (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon, 2011; Wang, 2017),

Além dos peptídeos com atividade antimicrobiana, a secreção cutânea de anfíbios possuem peptídeos com uma numerosa gama de atividades, como peptídeos miotrópicos, peptídeos opióides, peptídeos liberadores de corticotropina, angiotensinas, peptídeos inibidores de proteases, neuropeptídeos, peptídeos antioxidantes, lectinas, peptídeos que liberam insulina, peptídeos que auxiliam na degranulação de mastócitos/peptídeos liberadores de histamina, peptídeos cicatrizantes, peptídeos imunomoduladores, peptídeos inibidores neuronais da enzima óxido nítrico sintase, peptídeos antivirais, peptídeos antitumorais, peptídeos

antiparasitários, feromônios, graninas e outros peptídeos (Xu e Lai, 2015; Guimarães *et al.*, 2016).

Apesar da ampla gama de atividades biológicas, os peptídeos de anuros que possuem atividade antimicrobiana (não excluindo as outras funções) são os mais procurados devido à crescente resistência aos antibióticos convencionais e à necessidade de novos antibióticos para a terapia humana. Potenciais peptídeos antimicrobianos devem apresentar uma toxicidade seletiva, rápida ação, amplo espectro antimicrobiano e não selecionar mecanismos de resistência nos micro-organismos (Hancock e Sahl, 2006; Conlon, Iwamuro, *et al.*, 2009).

#### **1.4. Câncer**

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Estima-se que em 2020 surgiram cerca de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes relacionadas ao câncer, sendo os cânceres de pulmão, mama e colorretal os de maior incidência (Ferlay *et al.*, 2021).

O termo câncer refere-se a mais de 100 doenças que afetam diversos tecidos e se caracterizam pela divisão desordenada de células resultante de um pequeno número de mutações (Hanahan e Weinberg, 2000).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), para uma célula se tornar cancerosa, são necessárias seis alterações essenciais: a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais do inibidor de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e a invasão de tecidos e formação de metástases.

O tratamento para o câncer é baseado em três abordagens principais: a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia (Shewach e Kuchta, 2009). A quimioterapia

envolve o uso de drogas que visam destruir o tumor ou impedir a proliferação das células durante o processo de metástases. Essas drogas podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, como agentes interativos de DNA, antimetabólitos, agentes antitubulina, agentes de direcionamento molecular, hormônios, anticorpos, entre outros (Nussbaumer *et al.*, 2011).

### **1.5. Peptídeos anticâncer**

Devido ao seu amplo espectro, muitos peptídeos com atividade antimicrobiana têm apresentado efeitos deletérios sobre células cancerosas (Riedl *et al.*, 2011; Deslouches e Di, 2017). De acordo com Papo e Shai (2005), as características desejáveis que os peptídeos anticâncer (PACs) devem apresentar são: possuir um amplo espectro de atividade, matar as células cancerosas rapidamente, não ser afetado pelas mutações clássicas de resistência à quimioterapia, não selecionar variantes resistentes à quimioterapia, apresentar sinergia com os quimioterápicos clássicos, destruir tumores primários, prevenir metástases e não afetar os órgãos vitais.

Assim como as bactérias que apresentam a membrana carregada negativamente devido à presença de fosfolipídios como fosfatidilglicerol, (PG), cardiolipina (CL), ou fosfatidilserina (PS), células cancerosas apresentam uma expressão elevada de PS além de mucinas O-glicosiladas e um potencial de membrana negativo que devem contribuir para o efeito seletivo dos PACs (Dobrzyńska *et al.*, 2005; Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Em contraste, a membrana de células não cancerosas é composta basicamente por fosfolipídios neutros (zwitteriônicos) e esteróis que não favorecem a interação com os PACs. Além disso, foi postulado que o colesterol interfere na atividade lítica dos PACs (Schweizer, 2009;

Gaspar *et al.*, 2013). Entretanto, é pertinente ressaltar que células cancerosas que expressam uma grande quantidade de colesterol pode se beneficiar dessa característica (Li *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ação dos PACs não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que algumas dessas moléculas podem atuar na membrana plasmática formando poros (ação lítica), enquanto outras podem penetrar nas células e, por exemplo, desencadear apoptose (ação não lítica) (Harris *et al.*, 2013; Deslouches e Di, 2017).

O peptídeo mastoparan polybia MP-1 (da vespa *Polybia paulista*) e seu análogo obtido a partir de uma substituição da amida C-terminal por uma tioamida mostrou-se efetivo contra linhagens tumorais e exibiu baixa atividade contra células não cancerosas, sendo o análogo mais efetivo do que o peptídeo natural. Além disso, o mecanismo de ação observado é sugestivo para necrose, indicando que o peptídeo age sobre a membrana plasmática das células (Zhang *et al.*, 2010). Um resultado semelhante foi observado por Dennison *et al.* (2017) estudando o peptídeo maximina H5. Já o peptídeo temporina-1CEa (da rã *Rana chensinensis*), além de promover a ruptura de células cancerosas, também possui efeitos intracelulares como colapso do potencial de membrana mitocondrial, superexpressão de espécies reativas de oxigênio e liberação de cálcio intracelular (Wang *et al.*, 2013).

O peptídeo pantadactilina, isolado da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, que é a base para elaboração dos análogos testados nesse trabalho é mais efetivo contra células de câncer (B16F10) do que para células não cancerosas (FHN). Esse peptídeo apresenta vários efeitos nas células, como ruptura da membrana, fragmentação de DNA, interrupção do ciclo celular e alterações no potencial de membrana mitocondrial (Libério *et al.*, 2011).

A revisão elaborada por Huang *et al.* (2015) destaca uma série de peptídeos catiônicos de diversas fontes e seus mecanismos de ação contra várias linhagens de células cancerosas.

### **1.6. Desenho racional de peptídeos**

O desenho racional de peptídeos visa melhorar as propriedades físico-químicas dessas moléculas com o objetivo de potencializar os efeitos desejados além de reduzir os efeitos adversos como como baixa especificidade e atividade hemolítica, por exemplo (Fosgerau e Hoffmann, 2015). Alterações na hidrofobicidade, cationicidade, anfipaticidade e helicidade vêm trazendo avanços importantes no desenho racional de peptídeos com propriedades antimicrobianas e anticâncer (Chen *et al.*, 2005; Matsuzaki, 2009; Huang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015).

Os peptídeos bioativos sintéticos podem ser obtidos resumidamente por três abordagens (Fjell *et al.*, 2012):

- 1) *Modificações de sequências de peptídeos conhecidos (usar um peptídeo como template)* – emprega-se um peptídeo com uma atividade conhecida e são produzidos novos peptídeos com uma ou mais substituições com o objetivo de aumentar a atividade biológica desejada e ao mesmo tempo reduzir os efeitos tóxicos indesejados. As mudanças de carga, hidrofobicidade e extensão da cadeia peptídica são as propriedades mais abordadas nesse modelo. Os peptídeos magainina, cecropina, melitina e LL-37 são amplamente usados como modelos para a produção de novos peptídeos bioativos.
- 2) Baseados em estudos biofísicos – em contraste com o método anterior, esse modelo baseia-se em simulações computacionais como os baseados em



perturbação de energia livre e simulação de dinâmica molecular para modelar as características desejadas dos peptídeos.

- 3) Triagem virtual – baseia-se em métodos computacionais (*in silico*), como os modelos quantitativos de relação estrutura/atividade (QSAR - Quantitative Structure/Activity Relationships), onde um ou mais peptídeos podem ser usados como um modelo inicial, posteriormente é definido um modelo estrutural ( $\alpha$ -hélice, por exemplo), sendo gerada uma biblioteca de peptídeos, sendo feita uma seleção e, finalmente, a validação experimental (Raventos *et al.*, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, um grande número de antibióticos vêm sendo usados para o tratamento de doenças infecciosas. Os antibióticos representaram um marco importante na história da medicina e contribuíram para que um número incalculável de vidas fossem salvas. Por outro lado, o surgimento de resistência antimicrobiana ameaça impedir ou até mesmo reverter esse progresso. Nos Estados Unidos, onde há mais dados sobre infecção por organismos multirresistentes, estima-se que ocorrem mais de dois milhões de casos e 29.000 mortes, enquanto que na Europa mais de 33.000 mortes por ano em razão de infecções relacionadas a microrganismos resistentes (Marston *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2020). Infelizmente, à medida que cresce o número de linhagens de microrganismos resistentes, há uma diminuição considerável dos antibióticos efetivos disponíveis no mercado. Durante a época de ouro dos antibióticos, que compreende as décadas de 1940 até 1960, mais de vinte classes de antibióticos foram descritas, entretanto, depois desse período apenas duas novas classes de antibióticos foram descobertas (Coats *et al.*, 2011).

Os peptídeos antimicrobianos se apresentam como uma ferramenta de estudo interessante que podem resultar em uma nova classe de antibióticos dado os seus mecanismos de ação mencionados anteriormente. Até o momento, há por volta de quinze peptídeos antimicrobianos em fase clínica de testagem (Magana *et al.*, 2020).

Em relação ao câncer, este conjunto de doenças continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo e com uma tendência de aumentar consideravelmente em razão dos hábitos de vida e do envelhecimento da população. O termo câncer compreende uma série de doenças que caracterizam-se por apresentarem comportamentos específicos no qual o controle do crescimento é

perdido, levando a formação do tumor. O tratamento contra a maioria dos cânceres, em linhas gerais, consiste em três abordagens: cirurgia, radioterapia, e quimioterapia, podendo uma ser complemento da outra a depender do tipo de câncer, estágio da doença e condições do paciente. Recentemente, com o avanço das pesquisas, estão surgindo novas abordagens de tratamento usando imunoterapia, terapia gênica e reprogramação celular. A quimioterapia, todavia, é uma das estratégias mais usadas e, dependendo do mecanismo de ação, os quimioterápicos podem ser divididos em agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores de fuso mitótico, dentre outros (Bukowski *et al*, 2020).

É inegável o avanço que a quimioterapia trouxe para o tratamento do câncer desde a década de 1940 quando começou seu uso. Entretanto, muitos destes quimioterápicos apresentam a desvantagem de induzirem efeitos colaterais potencialmente graves como problemas cardíacos e supressão de medula óssea, por exemplo (Monsuez *et al.*, 2010; Nussbaumer *et al.*, 2011). Um outro problema da quimioterapia é a resistência das células às drogas. As adaptações das células tumorais como o aumento do efluxo de drogas, mutação no alvo do medicamento, aumento da reparação do DNA, resistência a apoptose podem contribuir para uma deficiência no tratamento e conseqüentemente diminuir a sobrevivência do paciente (Ramos e Bentires-Alj, 2014; Bukowski *et al*, 2020).

Nas últimas décadas, estudos revelaram que muitos peptídeos inicialmente identificados como antimicrobianos também apresentavam atividade anticâncer. Embora os mecanismos de ação dos PACS ainda não estejam totalmente elucidados, estudos têm mostrado que possam ocorrer por mecanismos membranolíticos e não membranolíticos e que alterações estruturais na membrana celular de células cancerosas podem contribuir para modular a seletividade desses peptídeos em

relação as células normais (Gaspar *et al.*, 2013). Assim, o presente estudo visa explorar o potencial anticâncer de análogos do PAC pentadactilina, com vistas a avaliar os efeitos de alterações estruturais nas propriedades dos derivados produzidos.

### **3. OBJETIVO E METAS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos biológicos de peptídeos de anuros (naturais e análogos) sobre bactérias e células cancerosas de modo a compreender melhor seus mecanismos de ação, esperando assim aperfeiçoar suas propriedades biológicas e seletividade.

#### **3.2 Metas estabelecidas**

1. Identificar, caracterizar e avaliar os efeitos biológicos dos peptídeos bioativos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana raniceps*;
2. Realizar o desenho racional de análogos peptídicos tendo como base o PAC pentadactilina, levando em consideração a extensão da cadeia peptídica, a cationicidade e a hidrofobicidade;
3. Avaliar as estruturas dos análogos propostos usando ferramentas de bioinformática para a melhor compreensão dos efeitos biológicos observados;
4. Realizar a triagem inicial dos análogos contra bactérias patogênicas;
5. Avaliar as atividades antiproliferativa e citotóxica dos análogos sobre linhagens de células cancerosas e não cancerosas;

6. Avaliar os efeitos dos análogos sobre células cancerosas por meio de citometria de fluxo;
7. Realizar análise proteômica quantitativa *label-free* comparando as células humanas tratadas e não tratadas com os análogos AN6 e AN8.

## 4. CAPÍTULO 1

**4.1. Artigo 1** – Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the chaco tree frog, *Boana raniceps* – publicado na revista *Biomolecules*.











































**4.2. Artigo 2** – Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties - publicado na revista *Antibiotics*.































## **5. CAPÍTULO 2**

Análise proteômica quantitativa e por citometria de fluxo dos efeitos de análogos de peptídeos anticâncer sobre células tumorais

Dados não publicados



## 5.1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma denominação abrangente que agrupa mais de cem tipos de doenças que se caracterizam por crescimento desordenado de células, podendo invadir tecidos adjacentes e órgãos a distância. Células cancerosas se caracterizam pela rápida divisão e tendem a apresentar um crescimento descontrolado, formando tumores que podem se espalhar para outros órgãos do corpo, formando metástases (INCA, 2020). Estima-se que em 2020 ocorreram a nível global aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer e por volta de 10 milhões de mortes (Sung *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o câncer vem sendo um dos principais objetos de pesquisas em todo o mundo, buscando entender melhor sua biogênese e sobretudo novas formas de tratamento. A busca por tratamentos eficientes para o câncer evoluiu imensamente nas últimas décadas com o objetivo de alcançarem drogas que sejam efetivas e com baixos efeitos colaterais (Gaspar *et al.*, 2013).

A quimioterapia costuma ser uma das principais abordagens para o tratamento do câncer e se baseia em moléculas como alcaloides, agentes alquilantes de DNA, agonistas e antagonistas hormonais, que por muitas vezes não apresentam uma boa seletividade, afetando células saudáveis e causando sérios efeitos colaterais (Kalyanaraman *et al.*, 2002; Oun *et al.*, 2018). Além disso, em razão das modificações adquiridas pelas células cancerosas como efluxo da droga, reparo de DNA danificado, alteração do sítio da droga, inibição da morte celular, entre outras, tem sido cada vez mais recorrente o aparecimento de resistência associados ao uso de quimioterápicos (Housman *et al.*, 2014).

Em razão do seu amplo espectro, o uso de peptídeos antimicrobianos tem sido postulado como possíveis moléculas anticâncer. Nas últimas três décadas mais de

3000 peptídeos antimicrobianos já foram descritos, dos quais 255 também possuem atividade sobre células cancerosas (Wang *et al.*, 2016).

Estes peptídeos caracterizam-se por serem relativamente curtos (variando de 10 a 50 resíduos de aminoácidos), são catiônicos e apresentam uma estrutura anfipática e podem ser do tipo  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ , hélice estendida e do tipo *loop* (em razão da ligação S-S) (Deslouches e Di, 2017).

O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos está relacionado principalmente com a interação da membrana plasmática das bactérias, sendo favorecida pela presença de componentes com carga negativa como lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicoico. Segundo essa mesma linha, o fato de que células cancerosas também apresentam em sua membrana compostos com carga negativa como heparan sulfato, mucinas O-glicosiladas além de fosfatidilserina, podem contribuir para elevar a carga negativa e favorecer a interação com peptídeos catiônicos (Gaspar *et al.*, 2013).

Em uma extensa revisão, Gaspar e colaboradores (2013) compila dezenas de peptídeos com atividade sobre vários tipos de linhagens celulares e é possível observar que, além da atividade sobre a membrana plasmática, vários peptídeos também foram capazes de ativar vias apoptóticas.

Diante do exposto, este trabalho buscou avaliar o efeito de peptídeos análogos da pentadactilina sobre células tumorais, usando como ferramentas a citometria de fluxo e a proteômica com o objetivo de identificar seus mecanismos de ação.

## **5.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1. Obtenção dos análogos**

Os dez análogos propostos foram encomendados junto à empresa Genone Biotecnologies (Rio de Janeiro, Brasil). As moléculas foram sintetizadas usando a técnica F-moc e a pureza foi determinada por RP-HPLC (> 95%) e a massa confirmada por LC-MS.

### **5.2.2. Bioinformática estrutural dos análogos**

O algoritmo ExPasy pI/Mw tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) (Bjellqvist et al., 1993) foi utilizado para o cálculo da massa teórica monoisotópica dos peptídeos; o Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al., 2011) foi usado para o alinhamento de múltiplas sequências; a ferramenta NetWhells (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) foi usado para predição helicoidal dos peptídeos; a ferramenta I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015), foi usada para predição de estrutura secundária; o GRAVY (Grand Average Hydropathy) foi determinado pelo APD (APD3: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor [http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction\\_main.php](http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php)) (Wang et al., 2016).

### **5.2.3. Ensaio antibacteriano**

As cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram gentilmente cedidas pelo LACEN-DF. As bactérias foram cultivadas ressuspensando 200 µL do estoque de bactérias em 6,8 mL de meio Mueller-Hinton sob agitação a 37°C por 24 horas e a densidade óptica foi ajustada para 1 a 590 nm. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e

1:100 para as Gram-positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 5 x 10<sup>5</sup> CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50 µL de amostra ressuspendida em água Milli-Q estéril. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

## **5.2.4. Ensaios sobre células tumorais**

### *5.2.4.1. Manutenção da cultura de células*

As linhagens de células de câncer de melanoma murino B16-F10 (ATCC CRL-6475), carcinoma mamário humano MCF-7 (ATCC HTB-22) e fibroblasto humano não tumoral NIH3T3 (ATCC CRL-1658) foram cultivadas utilizando o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, para as células MCF-7 foi adicionado 0,1% de insulina (10 mg/ml), todas as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as MCF-7. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e à medida que as células apresentavam um estágio de confluência superior a 70% foi realizado a passagem para outra garrafa.

### *5.2.4.2. Tratamento das células com os análogos*

Para a realização dos ensaios, as células foram removidas da garrafa com uma solução de tripsina-EDTA, posteriormente a tripsina foi neutralizada com o meio DMEM, centrifugado, o sobrenadante descartado e sedimento de células ressuspenso em 1 mL de meio. Para a determinação do número de células, um volume de 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 90 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 10 µL dessa mistura foi depositada

gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. Para ensaios de viabilidade celular por MTT foram plaqueadas um total de 5 x 10<sup>3</sup> células/poço. Os peptídeos foram ressuspensos em ¼ de água e completados com ¾ do meio de cultura e plaqueados por diluição seriada das soluções estoque (512 µM) em meio de cultura, sendo que a concentração final por poço variou de 128 µM (mais concentrada) a 1 µM (menos concentrada). Os grupos controle (ausência dos peptídeos) continham apenas ¼ de água e ¾ de meio de cultura, seguindo as mesmas proporções que foram adicionadas aos outros grupos experimentais. O meio de cultura das placas foi substituído pelo meio contendo os peptídeos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.2.4.3. Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada de acordo com o método MTT descrito por (Mosmann, 1983). As células cancerosas das linhagens B16F10 e MCF-7, e fibroblasto não canceroso (NIH3T3) foram cultivadas e tratadas com os peptídeos como descrito no item anterior. Após o período de incubação, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células

foram incubadas por 3 horas em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorvância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

A viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada. A concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 50% e foi calculada utilizando-se o software *GraphPad Prism 5*.

#### 5.2.4.4. Efeitos apoptóticos

Durante o processo de apoptose, o fosfolípido fosfatidilserina é translocado para a camada externa da membrana funcionando assim como sinalizador para a fagocitose. A anexina V é uma proteína utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose por possuir uma alta afinidade à fosfatidilserina. Nas análises por citometria de fluxo, a anexina está associada a um fluorocromo tipo FITC e é usada simultaneamente com o iodeto de Propídio (PI). Somente as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI, que é um indicador de apoptose tardia e/ou de morte celular por necrose (BD Pharmigen).

O pellet das células B16F10 e MCF-7 tratadas foram ressuspendidos em 500 µL de PBS gelado e centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de tampão de ligação (0,1 M de HEPES pH 7.4, 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl<sub>2</sub>) foi adicionado ao pellet. Em seguida, 5 µL de solução de anexina V (BD, EUA) e 10 µL de solução de PI (50 µg/mL) foram acrescentados em cada microtubo. A mistura foi deixada por 15 minutos protegida da luz a temperatura ambiente. Logo em seguida, 300 µL de tampão de ligação foram acrescentados.

As amostras foram colocadas em gelo e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ (BD, EUA).

#### *5.2.4.5. Potencial de membrana mitocondrial*

A solução estoque de rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. O volume de 300 µL de rodamina 123 (5 µg/mL) em PBS foi adicionado ao pellet das células de melanoma murino (B16F10) e da linhagem MCF-7 tratadas e incubado por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 800 g, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 300 µL de PBS foram acrescentados. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de rodamina 123. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo e analisadas por citometria de fluxo.

#### *5.2.4.6. Permeabilização de membrana lisossômica*

A permeabilização da membrana lisossômica foi avaliada usando o fluorocromo laranja de acridina (LA). Quando excitado com luz azul, LA emite fluorescência vermelha em altas concentrações quando está presente nos lisossomos e fluorescência verde em baixas concentrações (quando está presente no citosol e no núcleo) (Boya e Kroemer, 2008). As células foram tratadas com LA 50 µM por 30 minutos no escuro, então foram colocadas em gelo e analisadas no citômetro de fluxo.

#### *5.2.4.7. Fragmentação de DNA e ciclo celular*

A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas com os peptídeos foram determinadas pelo marcador iodeto de propídio (PI). O *pellet* de células de melanoma (B16F10) e carcinoma mamário tratadas foram ressuspensos em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado a -20°C por, pelo menos, 24 horas ou até o dia da análise. No dia da análise, cada microtubo foi centrifugado a 800 g, por

5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com PBS 1× e centrifugadas novamente. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de PBS 1x contendo RNase (50 µM) foram adicionados ao *pellet*. As amostras então foram incubadas na estufa a 37°C por 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, 100 µL de PI (20 µg/mL) (Molecular Probes – Thermo Fisher, EUA) preparado em PBS foram adicionados à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos da luz. Após esse procedimento, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

## **5.2.5. Análise proteômica**

### *5.2.5.1. Preparo das células*

Após o tempo de tratamento com peptídeo (3, 9 e 24 hs), as células foram removidas das garrafas com o auxílio de um “rodinho” (cell scraper) na presença de um kit inibidor de protease cOmplete (Roche, Mannheim, Alemanha). A tripsina comumente usada para a remoção de células aderentes não foi usada nesta etapa para evitar a clivagem de possíveis proteínas que pudessem ser relevantes nas etapas posteriores deste estudo. Em seguida, as células foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 800 g, então o sobrenadante foi descartado e foram feitas três lavagens e usando PBS pH 7,4. As lavagens foram feitas com o intuito de remover resquícios de meio de cultura.

### *5.2.5.2. Extração das proteínas das células*

Após a etapa de lavagem, as células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e então foi adicionado tampão de lise (dodecil sulfato de sódio (SDS) 4% (m/v), TEAB 20 mM pH 8,5 e DTT 0,1 M), contendo um coquetel de inibidores de proteases cOmplete (Roche, Manheim, Alemanha). Em seguida, as amostras submetidas a um processo de sonicação com 3 pulsos de 15s com intervalos de 45 segundos com uma



amplitude de 50% em um processador ultrassônico (Qsonica, Modelo Q125 20 kHz). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 90°C por 5 min em um Thermomixer, seguido de centrifugação a 16000 g por 15 min em temperatura ambiente. Então, o sobrenadante foi recolhido, uma alíquota foi diluída a níveis adequados e a quantificação de proteínas totais foi realizada usando o kit Qubit® protein assay no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

#### 5.2.5.3. Digestão triptica das proteínas

As amostras contendo as proteínas foram submetidas à digestão triptica usando a metodologia de digestão de amostras em unidades de filtração (FASP) elaborado por Wisniewski et al. (2009). As etapas seguidas foram baseadas no protocolo FASP disponibilizadas pela The University of Washington's Proteomics Resource, disponível no link <https://proteomicsresource.washington.edu/protocols03/FASPprotocols.php> com algumas modificações. Foram adicionados 200 µL de uma solução de ureia (8 M de ureia em bicarbonato de amônio 50 mM) a 100 µg de extrato de proteínas em uma unidade de filtração Microcon® Ultracel® PL-30 com *cutt-off* de 30 kDa (Merck Millipore, Cork, Irlanda) e colocados em um microtubo de 1,5 mL. Esse conteúdo foi centrifugado a 10000 g por 15 min. Foram adicionados, novamente, 200 µL da solução de ureia no filtro e centrifugado a 10000 g por 15 min. Essa etapa foi repetida por mais uma vez. A porção não retida pela peneira molecular do filtro foi descartada.

Em seguida, 100 µL de iodoacetamida 15 mM na solução de ureia foram adicionados nos filtros e estes foram mantidos por 20 min no escuro em temperatura ambiente. Então, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, adicionados 200 µL da solução de ureia e centrifugado a 10000 g por 15 minutos (esta etapa foi realizada duas vezes). Em seguida, foi adicionado 100 µL de bicarbonato de amônio

50 mM pH 8, esta etapa foi repetida por duas vezes. Finalmente, 100 µL de bicarbonato de amônio 50 mM pH 8 contendo tripsina (Promega, Madison, Estados Unidos) foi adicionado 1 µg tripsina para 50 µg de proteínas das amostras, homogeneizados e mantidas sob incubação no Thermomixer com agitação de 200 rpm e a 37°C por 16 horas.

Após a digestão enzimática, as unidades filtrantes contendo as amostras foram transferidas para novos microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 14000 g por 10 min, em seguida foi adicionado mais 80 µL de bicarbonato de amônio 50 mM pH 8 e repetiu-se a centrifugação. Para interromper a atividade da tripsina, foi adicionado TFA na concentração final de 0,1% (v/v).

A dessalinização dos peptídeos trípticos foi realizada usando microcolunas de C18 preparadas usando ponteiros P200 (StageTips - stop-and-go-extraction tips), de acordo com a metodologia proposta por Rappsilber et al., (2007). As microcolunas foram equilibradas com uma solução TFA 0,1%, então foram carregadas com os peptídeos seguido de 3 ciclos de lavagens com solução de TFA 0,1%. Após a lavagem, os peptídeos foram eluídos pela adição de 60 µL de solução 0,1% de TFA contendo concentrações crescentes de ACN (20%, 30, 40%, 50 e 90%). Finalizada a eluição, as amostras foram concentradas em um concentrador a vácuo. Os peptídeos foram posteriormente quantificados o usando o Qubit® protein assay.

#### *5.2.5.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)*

O fracionamento e fragmentação dos peptídeos trípticos foram realizadas de acordo com metodologia usada por Souza (2017), usando um sistema cromatográfico com colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimante 3000) acoplado on-line ao espectrômetro de massas híbrido ion trap-orbitrap, Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific,

Bremen, Alemanha). Os solventes utilizados nas corridas foram: solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). O sistema cromatográfico consistiu de dois tipos de colunas capilares, sendo uma pré-coluna (diâmetro interno de 100  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm de comprimento), empacotada no laboratório com partículas esféricas de sílica revestidas por C18 ReprosilPur de 5  $\mu\text{m}$  com poros de 120 Å (Dr. Maisch Ammerbuch-Entringen, Alemanha). As amostras foram injetadas por injeção parcial e o carregamento nessa pré-coluna foi realizado a um fluxo de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  de solução, sendo 98% de solvente A e 2% de solvente B. Essa pré-coluna tem função de reter os peptídeos e é utilizada como um filtro para remover resíduos de sais. A segunda coluna é uma coluna analítica (diâmetro interno de 75  $\mu\text{m}$   $\times$  35 cm de comprimento), também empacotada com partículas C18 Reprosil de 3  $\mu\text{m}$  com poros de 120 Å (Dr. Maisch Ammerbuch-Entringen, Alemanha). Os peptídeos foram separados nesta coluna analítica e eluídos utilizando gradientes de 2 a 40% de solvente B em 170 min, de 40 % - 85% até 185 min, seguido por uma etapa isocrática de 85% até 190 min, retornando para 2 % de solvente B até 210 min para reequilibrar a coluna. A interface entre nanoLC e o espectrômetro de massa híbrido LTQ Velos Pro Orbitrap Elite (Thermo Scientific) foi feita por meio do controle automático do equipamento, utilizando o software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Scientific). A fonte de ionização utilizada foi Nanospray flex ion source (Thermo Scientific,), com a voltagem do spray ajustada para 2,5 kV e a temperatura do capilar de transferência de 275 °C. Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo, sendo a aquisição dependente de dados [DDA - Data Dependent Acquisition). O ciclo de DDA consistiu em um survey scan compreendendo a faixa de m/z 300-1800 sob a resolução de 120.000 FWHM (Full Width at Half-Maximum) para m/z 400 e com valor-alvo de controle de ganho automático de  $1 \times 10^6$  íons para todos scans no FTMS e tempo

máximo de preenchimento de 200 ms. O survey scan foi seguido pela fragmentação MS/MS por dissociação de alta energia induzida por colisão (HCD- Higher-energy Collisional Dissociation) dos quinze íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo. Íons com carga +1 foram excluídos da fragmentação, independentemente de sua intensidade. A janela de isolamento para a seleção do íon precursor monoisotópico foi de 2 Th. A opção de lock mass não foi habilitada. Os espectros de MS/MS, provenientes da fragmentação, foram adquiridos no ion trap linear Velos Pro na taxa de scan, de rapid scan, sob energia de colisão de 35% e valor-alvo de íons igual a  $1 \times 10^4$  no ion trap linear (limiar de seleção de íons de 1000 contagens). Foram aplicados parâmetro de ativação  $q = 0,25$  e tempo de ativação de 30 ms. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90 s.

#### *5.2.5.5. Quantificação, identificação das proteínas e análise de dados*

Os arquivos .raw das corridas obtidas do LC-MS/MS foram usados para a quantificação label-free por meio software Progenesis Q1 for proteomics (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Reino Unido). Os espectros foram alinhados e os eventos MS1 foram quantificados em relação as áreas dos picos dos cromatogramas de íons. A identificação/sequenciamento dos espectros que apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ) usando análise de variância (ANOVA) foram exportados no formato .mgf (mascot generic files) e analisados no software Peaks Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions, Ontário, Canadá) usando o proteoma referência de *Mus musculus* disponível no Uniprot (ID do proteoma: UP000000589; data de download: 25/08/2021).

Os parâmetros usados no Peaks foram: Instrumento Orbitrap; tripsina como enzima; tipo de fragmentação HCD; correção do precursor apenas para massa;

qualidade dos filtros de scan maior que 0,65; tolerância para o erro de massa do precursor monoisotópico de 10 ppm; erro de massa para os fragmentos de 0,05 Da; máximo de duas clivagens perdidas por peptídeo; uma clivagem não específica em um terminal do peptídeo; carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificação fixa; oxidação da metionina como modificação variável; máximo de cinco modificações pós-traducionais por peptídeo. Após a análise inicial, foi realizado a filtragem dos dados aplicado uma taxa de descoberta de falsos positivos (FDR – false discovery rate) para os peptídeos menor que 1% e ao menos um único peptídeo por proteína. Em seguida, estes dados foram exportados para o software Progenesis.

Peptídeos e proteínas que apresentaram conflitos foram validados manualmente em razão do score e do perfil de abundância. Finalizada a validação manual, a lista contendo a quantificação relativa das proteínas foi exportada e foi aplicado um teste de ANOVA no software R Studio.

#### *5.2.5.6. Análise de enriquecimento de vias e termos GO*

As proteínas que apresentaram diferença de abundância entre os grupos foram submetidas à análise de enriquecimento no software online ShinyGO v0.741 (Ge et al., 2020). Primeiramente, os códigos Uniprot das proteínas foram convertidos para Gene ID usando a ferramenta db2db (Mudunuri et al., 2009), em seguida, foram submetidos ao ShinyGO configurado para um P-value cutoff (FDR) de 0,05.

Para avaliar a anotação funcional da proteínas foi usado o KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) (Kanehisa et al., 2007) que está incluído no ShinyGO ou via BlastKOALA. A interação proteína-proteína foi avaliada usando o STRING v.11. (Szklarczyk et al., 2021).

### **5.3. Resultados e discussão**

#### **5.3.1. Características físico-químicas da pentadactilina e seus análogos**

O peptídeo molde para a elaboração dos análogos propostos no presente trabalho foi a pentadactilina, um peptídeo de 25 aminoácidos com massa molecular de 2541.46 Da que foi purificado inicialmente por King *et al.* (2005) da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus pentadactylus* e posteriormente Libério (2008) encontrou esse mesmo peptídeo na secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus*. Esse peptídeo apresenta atividade contra micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos, contra células cancerosas (Libério *et al.*, 2011) e não apresenta atividade hemolítica relevante. A pentadactilina também mostrou-se tóxica sobre fibroblastos humanos da linhagem FHN, embora não tenha exibido citotoxicidade relevante sobre eritrócitos humanos. De modo a eliminar os efeitos deletérios sobre células não tumorais, associado à manutenção das atividades tóxicas sobre micro-organismos e sobre células tumorais, análogos da pentadactilina foram propostos e suas propriedades avaliadas no presente estudo.

Os dez análogos foram idealizados levando em consideração três parâmetros principais: a extensão da cadeia peptídica, a carga líquida e a anfipaticidade. A extensão da cadeia peptídica dos análogos variou entre 19 e 25 aminoácidos, a carga variou entre +2 e +6 e o percentual de aminoácidos hidrofóbicos de 42 a 60%. Além disso, outra estimativa de hidrofobicidade foi adotada: o GRAVY (Grand Average Hydropathy) que é obtido somando o índice hidropático de cada aminoácido e depois dividido pelo número total de aminoácidos do peptídeo, onde um valor positivo indica uma característica mais hidrofóbica enquanto um valor negativo indica uma característica mais hidrofílica da molécula (Kyte e Doolittle, 1982). Esse parâmetro é interessante, pois, mesmo que várias moléculas apresentem um mesmo percentual

de aminoácidos hidrofóbicos, como no caso dos análogos 2, 4, 9 e 10, o GRAVY será diferente, pois os índices hidropáticos dos aminoácidos apolares variam entre si (por exemplo: Isoleucina = 4,5, Valina = 4,2, Leucina 3,8). Os parâmetros físico-químicos dos análogos estão descritos na Tabela 1. O alinhamento da pentadactilina e seus análogos estão representados na Figura 3.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos da pentadactilina e de seus análogos.

Peptídeo	Sequência	Massa Molecular (M+H <sup>+</sup> )	Carga	Hidrofobicidade (%)	GRAVY
Pentadactilina	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKLa	2541.46	+3	48	0,372
AN1	GLLD <b>SL</b> KG <b>V</b> AKNVVGLASKVMEKLa	2555.47	+3	48	0,464
AN2	GLLD <b>SL</b> KG <b>V</b> AKNVVGL <b>SLIK</b> QIa	2151.30	+4	47	0,647
AN3	<b>KLLNS</b> LKG <b>V</b> AKNV <b>V</b> KSLASKVMEKLa	2696.63	+6	48	0,184
AN4	<b>KLLNS</b> LKG <b>V</b> AKNV <b>V</b> SL <b>IK</b> QIa	2292.46	+6	47	0,314
AN5	<b>KLDS</b> LKG <b>V</b> AKNV <b>G</b> SL <b>IK</b> QIa	2010.22	+4	42	0,11
AN6	<b>GT</b> L <b>AT</b> LL <b>G</b> AAL <b>N</b> SVGLAK <b>K</b> V <b>M</b> K <b>K</b> La	2483.49	+5	52	0,68
AN7	GLL <b>AT</b> LKGAAKNVVGLASKV <b>MA</b> KLa	2439.46	+5	56	0,796
AN8	<b>KLLA</b> TLLGAAKNV <b>V</b> KSLAS <b>G</b> V <b>M</b> AGLa	2424.45	+4	60	1,104
AN9	GLLDTLKGAAKNVVGLASa	1813.03	+2	47	0,563
AN10	GLL <b>ST</b> LKGAAKNVVGLASa	1785.04	+3	47	0,705

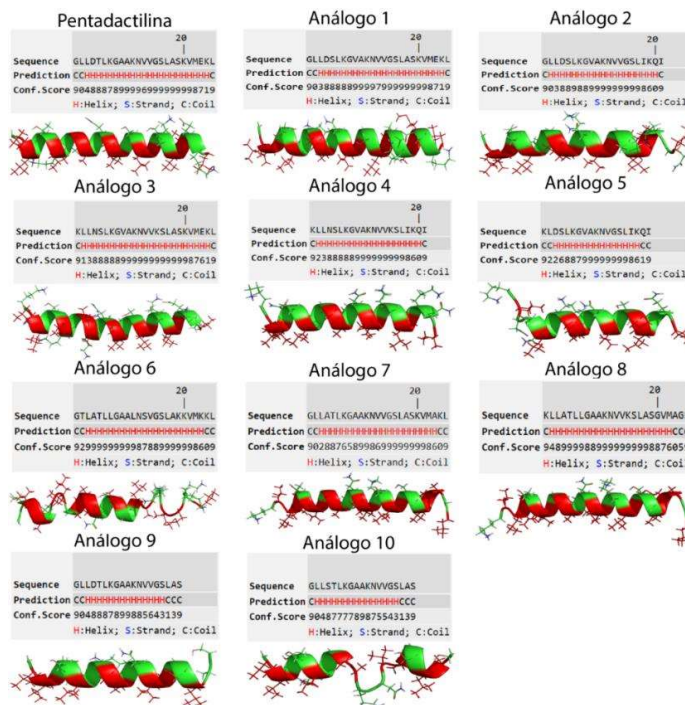
a: amidação. As modificações propostas estão assinaladas em vermelho nas estruturas primárias dos análogos.

AN5	- <b>KLDS</b> L <b>G</b> VAK <b>N</b> V <b>G</b> SL <b>IK</b> Q <b>I</b> ----	19
AN2	<b>GLLDS</b> L <b>G</b> VAK <b>N</b> V <b>G</b> SL <b>IK</b> Q <b>I</b> ----	21
AN4	<b>KLLNS</b> L <b>G</b> VAK <b>N</b> V <b>V</b> SL <b>IK</b> Q <b>I</b> ----	21
AN6	<b>GT</b> L <b>AT</b> LL <b>G</b> AAL <b>N</b> SVGLAK <b>K</b> V <b>M</b> K <b>K</b> L	25
AN8	<b>KLLA</b> TLL <b>G</b> AAL <b>N</b> V <b>V</b> SLAS <b>G</b> V <b>M</b> AGL	25
AN3	<b>KLLNS</b> L <b>G</b> VAK <b>N</b> V <b>V</b> SLAS <b>K</b> V <b>M</b> E <b>K</b> L	25
AN1	<b>GLLDS</b> L <b>G</b> VAK <b>N</b> V <b>V</b> GLASK <b>V</b> M <b>E</b> K <b>L</b>	25
AN7	GLL <b>AT</b> L <b>K</b> GAA <b>N</b> V <b>V</b> GLASK <b>V</b> M <b>A</b> K <b>L</b>	25
Pentadactilina	<b>GLLDT</b> L <b>K</b> GAA <b>N</b> V <b>V</b> GLASK <b>V</b> M <b>E</b> K <b>L</b>	25
AN9	<b>GLLDT</b> L <b>K</b> GAA <b>N</b> V <b>V</b> GLAS-----	19
AN10	<b>GLLST</b> L <b>K</b> GAA <b>N</b> V <b>V</b> GLAS-----	19

\* : \* \* \* \* \*\* .

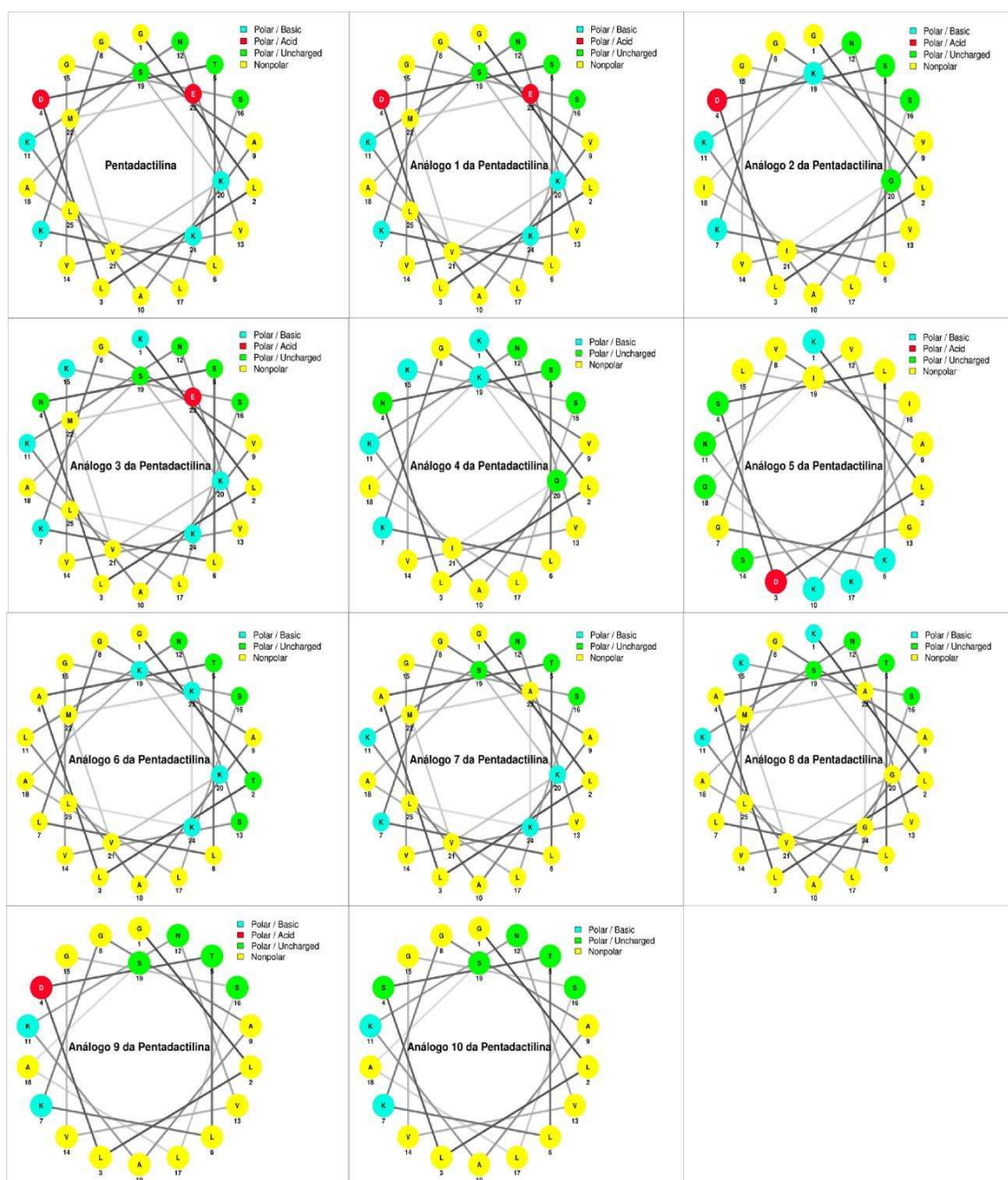
**Figura 3.** Multi-alinhamento da pentadactilina e seus análogos. Os aminoácidos apolares estão representados na cor vermelha, os polares e glicina estão em verde, os aminoácidos básicos estão na cor magenta e os ácidos em azul.

Uma das principais características dos peptídeos com atividade antimicrobiana e antitumoral é a capacidade dessas moléculas em adotar conformação em  $\alpha$ -hélice (Huang et al., 2015). Compreender como as moléculas estão estruturadas é um parâmetro importante para entendermos os seus efeitos biológicos, além disso, peptídeos que apresentam uma estrutura anfipática são mais propensos a apresentarem uma atividade lítica sobre membranas biológicas (Hansen et al., 2008). Assim sendo, foram realizadas predições de estrutura secundária da pentadactilina e seus dez análogos usando as ferramentas <http://lbqp.unb.br/NetWheels> e o servidor I-TASSER. Foi possível observar que todos os peptídeos formam  $\alpha$ -hélice e apresentam uma estrutura anfipática bem destacada e sendo a face hidrofóbica formada principalmente pelos aminoácidos Leucina, Valina, Alanina e Isoleucina (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Predição de estrutura secundária da pentadactilina e seus análogos. Os aminoácidos apolares estão indicados em vermelho e os polares estão em verde.





**Figura 5.** Projeções de Schiffer-Edmunson da pentadactilina e seus análogos.

### 5.3.2. Atividade biológica dos análogos

Quando analisamos a relação entre estrutura e atividade biológica dos análogos, observa-se que a atividade antimicrobiana e antitumoral se deu em função de vários fatores. O análogo 1 (AN1) foi resultado das substituições Thr<sup>5</sup> por Ser<sup>5</sup> e

Ala<sup>9</sup> por Val<sup>9</sup>, a carga foi mantida (+3) e a Val<sup>9</sup> promoveu um leve aumento na hidrofobicidade. Esse peptídeo apresentou efeito melhorado contra a bactéria *E. coli* (MIC = 8 µM) quando comparado ao peptídeo nativo (MIC = 25 µM), e não apresentou atividade contra *S. aureus* (Tabela 2), já contra células de câncer (B16F10) apresentou um efeito idêntico ao do peptídeo natural (IC<sub>50</sub> = 25 µM) e MCF-7 (IC<sub>50</sub> = 19,77 µM), porém apresentou uma toxicidade maior sobre células não cancerosas (NIH-3T3, IC<sub>50</sub> = 9,7 µM) (Figura 6).

**Tabela 2.** Atividade antiproliferativa dos análogos da pentadactilina sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Peptídeos	MIC em µM	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Pentadactilina <sup>1</sup>	n.a	25
AN1	n.a	8
AN2	n.a	8
AN3	8	64
AN4	8	32
AN5	n.a	n.a
AN6	64	16
AN7	4	n.a
AN8	4	16
AN9	n.a	n.a
AN10	n.a	n.a

<sup>1</sup>Resultado obtido por King (2005)

n.a – Não ativo na concentração máxima testada de 128 µM

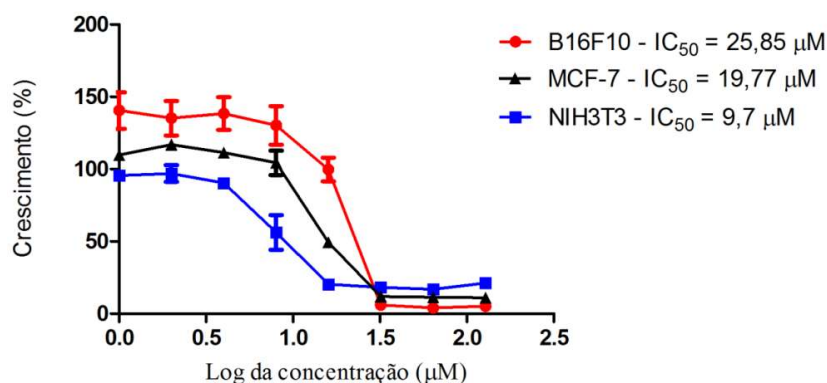


Figura 6. Atividade antiproliferativa do peptídeo AN1 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

O análogo 2 (AN2), além das substituições citadas anteriormente, foi adicionado a sequência “18IKQI21” à extremidade C-terminal resultando em um aumento de carga (+4) devido à remoção do aminoácido negativamente carregado Ácido Glutâmico e aumento da hidrofobicidade pela adição de dois resíduos de Isoleucina, além disso, o aminoácido polar básico positivo Lisina na posição 20 (K<sup>20</sup>) foi substituído pelo resíduo polar não carregado Glutamina.

Essas mudanças promoveram uma alteração na face hidrofóbica da molécula (Figura 5), entretanto, não resultaram em ganho de atividade antimicrobiana (sem atividade contra *S. aureus* e MIC = 8 µM contra *E. coli*), já contra células eucarióticas houve uma redução do IC<sub>50</sub> tanto para células tumorais (B16F10 = 10,84 µM; MCF-7 = 14,55 µM) quanto para a linhagem não tumoral (NIH3T3 = 11,60 µM) (Figura 7).

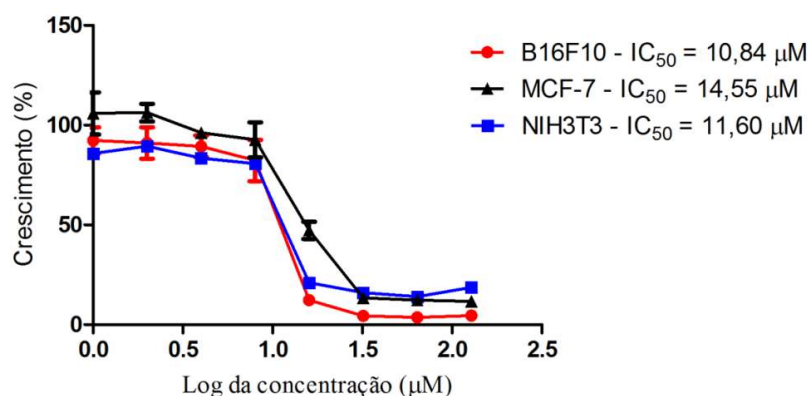
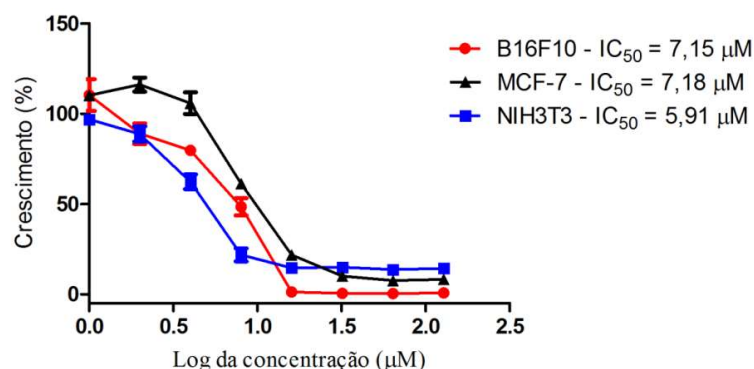


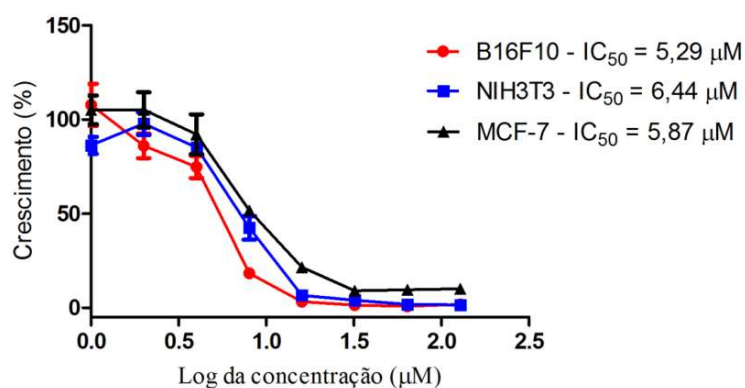
Figura 7. Atividade antiproliferativa do peptídeo AN2 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

O análogo 3 (AN3) teve suas alterações concentradas principalmente na porção N-terminal do peptídeo, onde os aminoácidos G<sup>1</sup> foi substituído por K<sup>1</sup>, D<sup>4</sup> por N<sup>4</sup>, as substituições S<sup>5</sup> e V<sup>9</sup>, foram mantidas como nos análogos anteriores, além de G<sup>15</sup> por K<sup>15</sup>. Essas alterações resultaram em um aumento de carga total (+6) pela adição de dois resíduos de Lisina e pela remoção do Ácido aspártico, o percentual hidrofóbico foi mantido em relação à pentadactilina (48%) e o GRAVY foi menor (0,184). Como pode ser observado na Figura 5, todas as alterações foram feitas na face polar do peptídeo, sendo que a face apolar foi mantida idêntica ao peptídeo modelo. Essas alterações apresentaram um efeito interessante sobre as bactérias, resultando em um efeito oposto aos demais até aqui mencionados, onde o AN3 foi bastante ativo contra *S. aureus* com um MIC = 8 µM e pouco ativo contra *E. coli* (MIC = 64 µM). Desta forma podemos inferir que, para esse peptídeo (AN3), o aumento da cationicidade aliado a um baixo GRAVY faz com que a molécula seja ativa preferencialmente contra *S.aureus* (Tabela 2). O AN3 mostrou-se três vezes mais ativo contra células B16F10 e MCF-7 (IC<sub>50</sub> em torno de 7 µM) do que a pentadactilina, entretanto também mostrou-se ativo também sobre células não tumorais com um IC<sub>50</sub> de 5,91 µM (Figura 8).



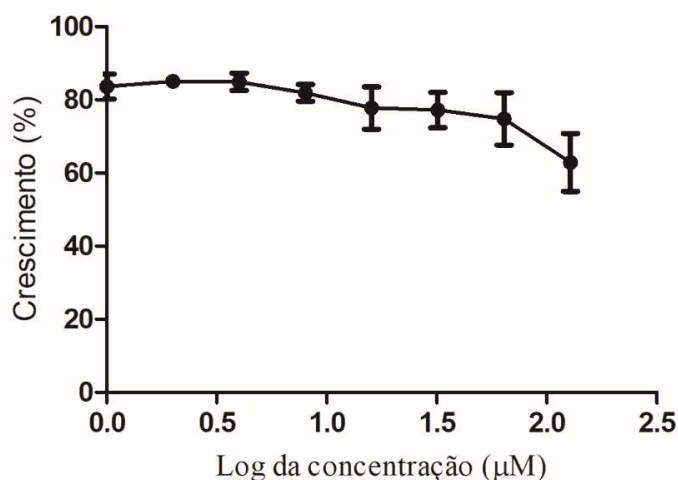
**Figura 8.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN3 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

O análogo 4 (AN4) foi resultado da modificações do aminoácidos G<sup>1</sup> por K<sup>1</sup>, D<sup>4</sup> por N<sup>4</sup>, as substituições S<sup>5</sup> e V<sup>9</sup> também foram mantidas, além da sequência C-terminal <sup>18</sup>IKQI<sup>21</sup>, o que torna esse peptídeo semelhante ao análogo 2. Essas alterações resultaram em um peptídeo mais catiônico do que a molécula modelo (carga +6), com GRAVY de 0,314, (semelhante à pentadactilina). Da mesma forma que o AN3, esse peptídeo foi mais ativo contra *S. aureus* (MIC = 8 µM), contra 32 µM para *E. coli* (Tabela 2), já contra células tumorais apresentou um IC<sub>50</sub> de 5,29 µM para a linhagem B16F10 e 5,87 µM para MCF-7, já contra células não tumorais o AN4 foi um levemente menos tóxico, apresentando um IC<sub>50</sub> de 6,44 µM em fibroblastos NIH3T3 (Figura 9).



**Figura 9.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN4 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

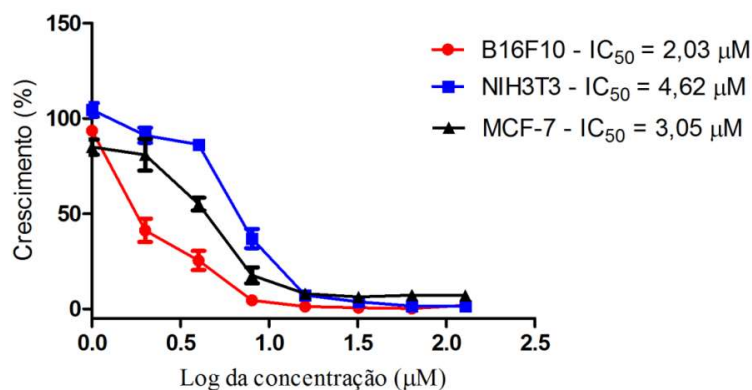
O análogo 5 (AN5) é resultado das modificações G<sup>1</sup> por K<sup>1</sup> (Leu 2 foi removido), as substituições de Serina e Valina foram mantidas (S<sup>4</sup> e V<sup>8</sup>), no meio da molécula foi removida a Val<sup>13</sup> e adicionada a sequência <sup>13</sup>GSLIKQI<sup>19</sup> na extremidade C-terminal. Com essas modificações, esse peptídeo é o menos hidrofóbico (42%) dos análogos testados nesse trabalho, também apresenta o menor GRAVY (0,11) e uma carga total de +4 (Tabela 1). Como pode ser observado na Figura 5, devido às alterações realizadas, esse análogo possui a menor face hidrofóbica entre os dez peptídeos testados e, curiosamente, não apresentou efeito sobre nenhuma das bactérias testadas, além de baixa toxicidade contra a linhagem de células tumorais B16F10, como pode ser observado na Figura 10.



**Figura 10.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN5 sobre células de melanoma murino (B16F10).

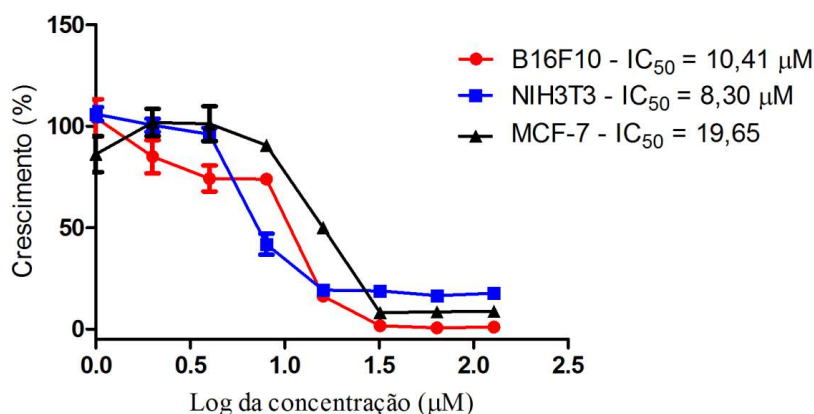
O análogo 6 (AN6) possui modificações distribuídas ao longo de toda a sequência da molécula. O aminoácido L<sup>2</sup> foi substituído por T<sup>2</sup>, D<sup>4</sup> por A<sup>4</sup>, K<sup>7</sup> por L<sup>7</sup>, K<sup>11</sup> por L<sup>11</sup>, V<sup>13</sup> por S<sup>13</sup>, S<sup>19</sup> por K<sup>19</sup> e E<sup>23</sup> por K<sup>23</sup>. As alterações resultaram em um peptídeo mais catiônico (+5) e mais hidrofóbico (percentual hidrofóbico de 52% e GRAVY de 0,68). Esse peptídeo apresentou um MIC de 64 µM contra *S.aureus* e de

16  $\mu\text{M}$  contra *E. coli*, já contra células eucarióticas o AN6 foi muito efetivo, sendo mais efetivo contra as células de câncer B16F10 e MCF-7 com valores de  $\text{IC}_{50}$  de 2,03 e 3,05  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Contra células não tumorais, o AN6 foi menos tóxico, porém ainda assim apresentou um  $\text{IC}_{50}$  muito baixo de 4,62  $\mu\text{M}$  (Figura 11).



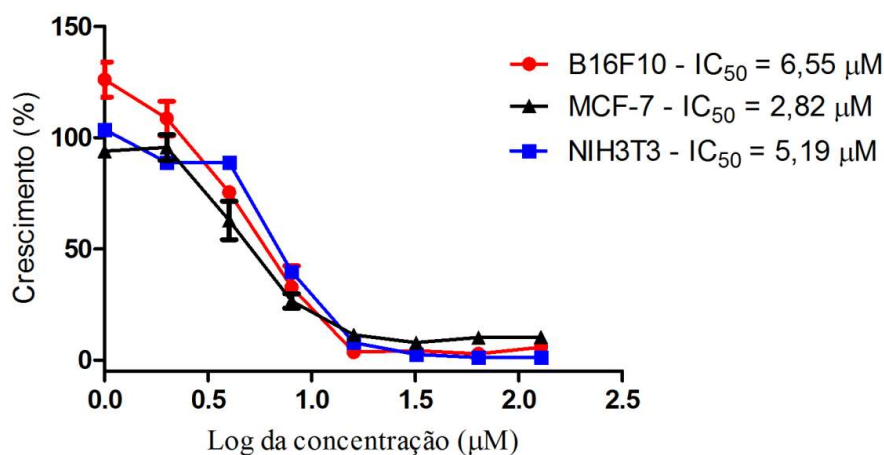
**Figura 11.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN6 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

O análogo 7 (AN7) possui apenas duas substituições, o  $\text{D}^4$  por  $\text{A}^4$  e  $\text{E}^{23}$  por  $\text{A}^{23}$ . Essas duas substituições resultaram em um peptídeo mais catiônico (+5) devido à substituição do aminoácido carregado negativamente Glu por Ala e também mais hidrofóbico, com 56% de aminoácidos hidrofóbicos e GRAVY de 0,796. O efeito dessas modificações refletiu em uma potente atividade contra a bactéria *S.aureus* ( $\text{MIC} = 4 \mu\text{M}$ ) e não apresentou atividade contra *E. coli*. A atividade contra células de câncer foi menos potente do que a atividade contra células não tumorais (Figura 12).



**Figura 12.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN7 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).

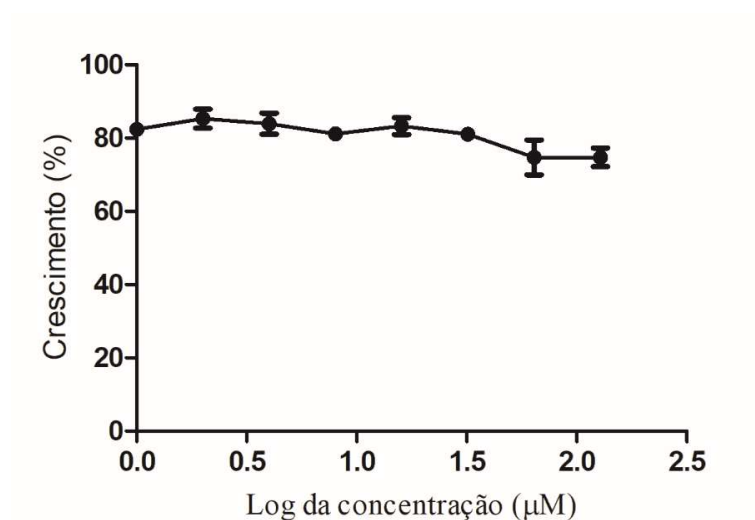
O análogo 8 (AN8) possui as modificações G<sup>1</sup> por K<sup>1</sup>, D<sup>4</sup> por A<sup>4</sup>, K<sup>7</sup> por L<sup>7</sup>, G<sup>15</sup> por K<sup>15</sup>, K<sup>20</sup> por G<sup>20</sup> e <sup>23</sup>EK<sup>24</sup> por <sup>23</sup>AG<sup>24</sup>. As substituições resultaram no peptídeo mais hidrofóbico dos dez estudados nesse trabalho, com uma razão hidrofóbica de 60% e GRAVY de 1,104 (Tabela 2) e também com a maior face hidrofóbica (Figura 5). O AN8 foi muito ativo contra *S. aureus* com valor de MIC de 4 µM, contra *E. coli* o valor do MIC foi 16 µM. Contra células de câncer, o IC<sub>50</sub> variou entre 2,82 µM contra MCF-7 e 6,55 µM contra B16F10, já contra células não tumorais NIH3T3 foi menos ativo do que contra MCF-7 com um IC<sub>50</sub> de 5,19 µM (Figura 13).



**Figura 13.** Atividade antiproliferativa do peptídeo AN8 sobre células de melanoma murino (B16F10), carcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto não tumoral (NIH3T3).



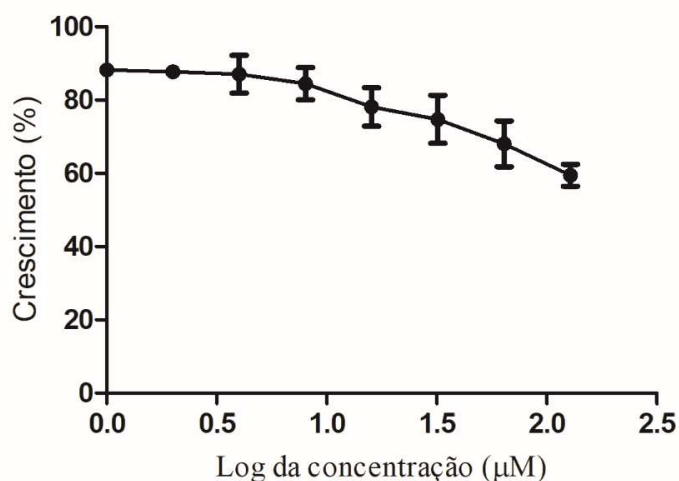
O análogo 9 (AN9) foi resultado da exclusão da extremidade C-terminal na Serina<sup>19</sup> e não teve substituições de aminoácidos. Esse peptídeo apresenta 47% de razão hidrofóbica, GRAVY de 0,563 e uma carga de +2. Esse peptídeo não apresentou atividade contra as bactérias testadas, além de baixa atividade contra células da linhagem B16F10, onde na concentração de 128  $\mu\text{M}$ , mais de 70% das células ainda mostraram-se viáveis (Figura 14).



**Figura 14.** Atividade antiproliferativa do análogo AN9 sobre células de melanoma murino (B16F10).

O análogo 10 (AN10) é quase idêntico ao AN9, também excluído a extremidade C-terminal na Serina<sup>19</sup> com exceção da substituição de D<sup>4</sup> por S<sup>4</sup>. Devido a substituição do Ácido Aspártico (carregado negativamente) pela Serina (não carregado), esse peptídeo apresentou uma carga +3, a razão hidrofóbica foi mantida em 47% e GRAVY teve um aumento considerável (0,705) pelo fato do índice hidropático da Serina ser maior (-0,8) do que o Ácido Aspártico (-3,5). Apesar dessas modificações, o peptídeo também não apresentou atividade contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, além de uma fraca atividade contra as células de câncer B16F10,

onde na concentração máxima testada de 128  $\mu\text{M}$  cerca de 60% das células ainda mostraram-se viáveis (Figura 15).



**Figura 15.** Atividade antiproliferativa do análogo AN10 sobre células de melanoma murino (B16F10).

A relação entre estrutura e atividade biológica têm sido bastante estudadas e é um ponto chave na compreensão dos efeitos biológicos dos peptídeos (Dennison *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013). Para se obter peptídeos com uma atividade citotóxica ideal, ou seja, com uma potente atividade contra células tumorais ao mesmo tempo que não apresente toxicidade sobre as células não tumorais requer otimizações na estrutura primária, na carga líquida, estrutura secundária, anfipaticidade e hidrofobicidade, entre outras (Gaspar *et al.*, 2013).

O peptídeo pentadactilina, usado como modelo neste trabalho, possui várias atividades biológicas como antimicrobiana (King *et al.*, 2005; Libério, 2008) e citotóxica (Libério *et al.*, 2011) caracterizadas, o que facilita avaliar as atividades dos análogos propostos. Foram produzidos dez análogos com modificações na extensão da cadeia peptídica (de modo que a sua redução com manutenção da atividade

antiproliferativa/citotóxica é interessante, pois reduz os custos de produção da molécula), na cationicidade e na hidrofobicidade, visto que esta última característica está relacionada também com a helicidade dos peptídeos (Huang *et al.*, 2011). A cationicidade é uma característica importante para a atividade e seletividade de peptídeos antimicrobianos, onde uma baixa cationicidade pode resultar em inatividade da molécula e, de modo inverso, um grande aumento da carga líquida pode resultar em ganho de atividade e também de efeitos indesejados como hemólise (Jiang *et al.*, 2008). Além dessas características, a amidação C-terminal pode ser um fator importante para o aumento da atividade tanto antimicrobiana quanto antitumoral, entretanto, o efeito é variável dependendo das demais características estruturais (Dennison *et al.*, 2009). Como a pentadactilina apresenta C-terminal amidado, em todos os análogos essa modificação foi mantida.

As mudanças feitas no AN1 substituindo aminoácidos que apresentam as mesmas propriedades resultou em ganho de atividade contra *E. coli* e não apresentou atividade contra *S. aureus*. A atividade citotóxica sobre células B16F10 foi muito semelhante a da pentadactilina ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ), enquanto que o  $IC_{50}$  sobre células MCF-7 foi consideravelmente menor do que o observado por Libério *et al.* (2011), infelizmente o leve aumento da hidrofobicidade neste peptídeo também ocasionou uma atividade maior sobre as células não cancerosas NIH3T3.

No AN2 as mudanças propostas foram mais extensas, com o objetivo de tornar o peptídeo mais catiônico e hidrofóbico pela adição da sequência  $^{18}IKQI^{21}$  na extremidade C-terminal que, de fato, propiciou um ganho de atividade tanto contra a linhagem B16F10 quanto para MCF-7, mas não houve uma diferença significativa quando comparando com a atividade sobre células não tumorais (Figura 7).

A modulação da hidrofobicidade é um fator crucial na atividade anticâncer (Huang *et al.*, 2011), e acreditamos que a remoção do C-terminal que era formado, entre outros, pela Lisina nas posições 20 e 24 presente na face hidrofóbica da pentadactilina tenha um papel crucial na potencialização da atividade desse análogo, visto que, sem esses dois resíduos com característica polar, a anfipacidade desse análogo é aumentada. Quanto a atividade antimicrobiana, as modificações não alteraram a atividade desse peptídeo, mantendo-se idêntica ao AN1.

O AN3 e AN4 são os peptídeos mais catiônicos dentre os estudados nesse trabalho (carga líquida +6) e também os menos hidrofóbicos (com exceção do AN5). Curiosamente as alterações nesses peptídeos resultaram em uma inversão da atividade antimicrobiana (diferentemente dos análogos anteriores), estes foram mais ativos contra a bactéria *S. aureus*, mas também manteve a atividade contra *E. coli* porém com um valor de MIC mais alto (Tabela 2). A cationicidade na face polar é uma característica importante na atividade antimicrobiana (Ziqing *et al.*, 2008) e, de fato, a maioria dos resíduos de Lisina estão localizadas na face polar de uma forma alternada com outros aminoácidos nesses dois análogos (Figura 5). Além disso, esse resultado nos permite inferir que esses dois peptídeos podem ter uma preferência em interagir com os fosfolipídios fosfatidilglicerol e lisofosfatidilglicerol que são os principais componentes da membrana plasmática da bactéria *S. aureus* (Malanovic e Lohner, 2016).

A atividade citotóxica dos peptídeos AN3 e AN4 também foram potencializadas quando comparado com a pentadactilina. A atividade do AN3 em comparação com o observado para a pentadactilina foi 3,6 vezes superior para a linhagem B16F10 (Libério *et al.*, 2011) e 7,5 vezes para células MCF-7 (Libério, 2008), entretanto esse

peptídeo não apresentou seletividade entre células cancerosas e células não cancerosas. O AN4 foi ainda mais potente contra as células de câncer (ver Figura 9), sendo um pouco menos tóxico para as células não cancerosas, indicando uma possível seletividade principalmente quando comparado com a linhagem B16F10. A alta cationicidade dos análogos AN3 e AN4 foi uma característica importante para o ganho de atividade contra as células de câncer (assim como nas bactérias) e que, nestes dois peptídeos em particular, a hidrofobicidade não foi crucial para a atividade citotóxica. Um resultado semelhante foi observado por Liu *et al.* (2016), onde uma alta cationicidade de um peptídeo associado a uma baixo GRAVY e uma estrutura anfipática bem definida apresentou um valor de IC<sub>50</sub> muito baixo (3 µM) contra células HeLa. No AN5, a carga líquida um pouco menor que a presente nos peptídeos AN3 e AN4 (+4) associado a um baixo índice hidropático (GRAVY = 0,11), tornou-o inativo tanto contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, quanto para a linhagem tumoral B16F10 (Figura 10). Essa associação mostra que para se ter um peptídeo ativo é necessário um equilíbrio entre a anfipacidade da molécula e sua carga líquida. Quando se observa a projeção helicoidal do AN5 na Figura 5 é possível observar que os aminoácidos com característica polar básica e polar não carregado estão agrupados separadamente (ao contrário do AN3 e AN4), o que poderia explicar a inatividade deste peptídeo além, claro, da baixa hidrofobicidade. Em um estudo realizado utilizando análogos do peptídeo V13K foi possível observar claramente que os peptídeos menos hidrofóbicos mesmo que com uma carga líquida alta são menos ativos sobre células tumorais do que aqueles peptídeos com uma hidrofobicidade mais elevada (Huang *et al.*, 2011).

O AN6 apresenta uma razão hidrofóbica mais elevada (52%) e GRAVY de 0,68 decorrente principalmente da substituição de dois resíduos de Lisina por Leucina, para

compensar a perda de carga, na região C-terminal uma Serina e um Ácido Aspártico foram substituídos por Lisina, desta forma o AN6 ficou com uma carga líquida +5. Com essas modificações, houve diferenças na atividade antibacteriana, com um valor de MIC menor para *E. coli* do que para *S.aureus*, nos fazendo acreditar estar essa atividade deste peptídeo relacionada tanto à carga líquida quanto à hidrofobicidade. Esse resultado vai de acordo com o obtido por Conlon, Ahmed, *et al.* (2009) onde o aumento da anfipaticidade juntamente com hidrofobicidade, não gerou um ganho de atividade antimicrobiana, porém aumentou os efeitos indesejados como hemólise. Quando observado o efeito desse peptídeo sobre as células eucarióticas verificou-se que o valor do IC<sub>50</sub> foi muito baixo, principalmente para as células tumorais, sendo duas vezes mais ativo contra as células B16F10 do que para células não cancerosas NIH3T3 (IC<sub>50</sub> de 2 µM e 4,6 µM, respectivamente), já contra MCF-7 o valor do IC<sub>50</sub> foi de 3 µM.

Os análogos 7 e 8 são os mais hidrofóbicos avaliados neste trabalho e apresentaram uma atividade muito baixa contra a bactéria *S. aureus* (MIC = 4 µM), sendo que o AN7 apresenta apenas duas modificações, os aminoácidos ácidos foram substituídos por Alanina (D<sup>4</sup> por A<sup>4</sup> e E<sup>23</sup> por A<sup>23</sup>). Curiosamente esse peptídeo não apresentou atividade sobre a bactéria Gram-negativa *E. coli* mesmo mantendo a mesma carga que o AN6. O AN8 é o mais hidrofóbico com 60% de razão hidrofóbica e GRAVY de 1,104 e com essas modificações, a sua carga líquida foi reduzida para +4 e, ainda assim, este peptídeo foi ativo tanto para *E. coli* quanto para *S.aureus*. Este comportamento nos leva a acreditar que a atividade antibacteriana neste caso seja modulada basicamente pela alta hidrofobicidade, visto que nos análogos 1 e 2, por exemplo, mesmo com carga líquida +4 mostraram-se inativos contra *S. aureus*.

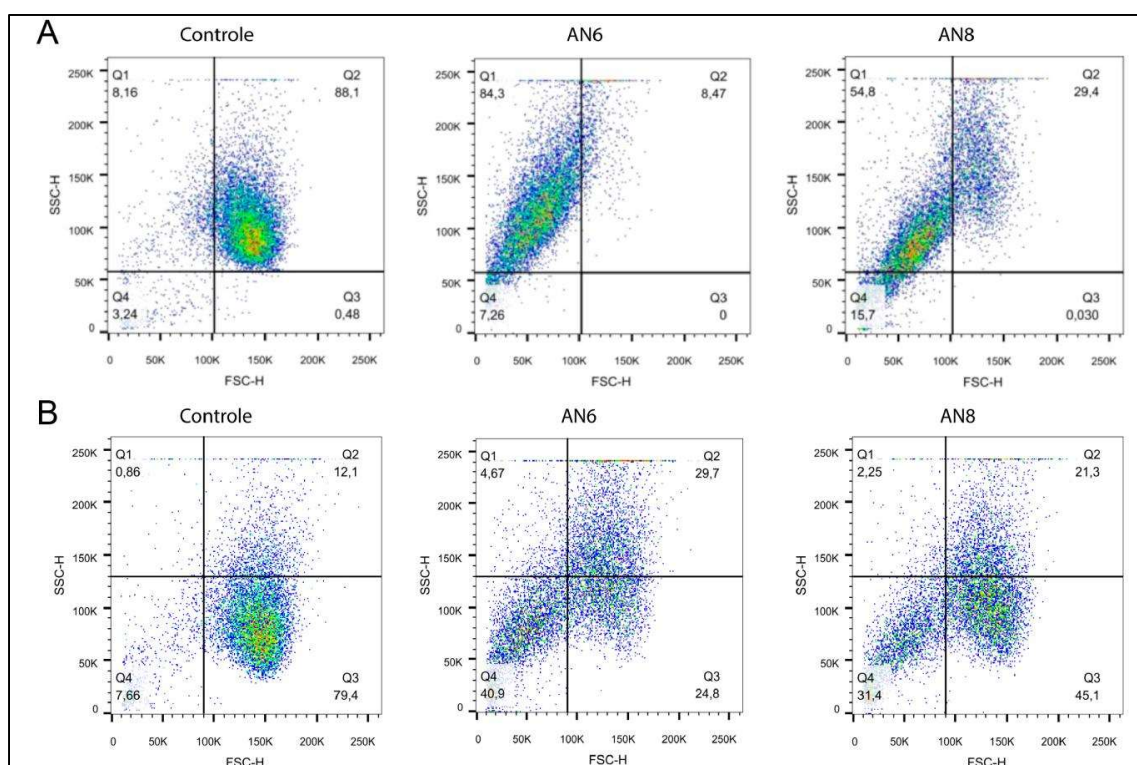
A atividade anticâncer do peptídeo AN7 não apresentou seletividade para as linhagens não tumorais, sendo que o valor do IC<sub>50</sub> para as células não tumorais foi menor do que para as células B16F10 e MCF-7. Tem sido postulado que a modificação de aminoácidos nas faces polar ou apolar da molécula resulta em efeitos biológicos diferentes, onde os aminoácidos da face polar são mais sensíveis a citotoxicidade em células não cancerosas, enquanto que os aminoácidos da face apolar são necessários para a atividade sobre células tumorais e a modulação dessas atividades por meio de D-aminoácidos têm mostrado bons resultados na busca por peptídeos mais seletivos contra células de câncer (Huang *et al.*, 2012). O AN8 diferentemente do AN4 e AN6, mostrou uma maior atividade contra células MCF-7 do que para as demais células.

O análogo 9 foi resultado da exclusão da extremidade C-terminal na Ser<sup>19</sup> e não teve substituições de aminoácidos, já para o análogo 10, o aminoácido D<sup>4</sup> foi substituído por S<sup>4</sup> e ambos não apresentaram atividade bacteriana ou atividade citotóxica relevante. Esse resultado é interessante pois nos faz acreditar que a região C-terminal deve ser crucial para a atividade biológica da pentadactilina. Em um estudo semelhante, as deleções no C-terminal de análogos do peptídeo nomeado P-18 (este é resultado da fusão de segmentos dos peptídeos crecopina A e magainina 2), resultou na inativação de vários análogos testados contra linhagens de bactérias e eritrócitos (Shin *et al.*, 2001).

### 5.3.3. Avaliação dos mecanismos de ação por citometria de fluxo

#### 5.3.3.1. Morfologia celular

Para avaliar os mecanismos de ação dos peptídeos sobre as linhagens de células tumorais B16F10 (melanoma murino) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), foi usada a técnica de citometria de fluxo. Quando as células foram tratadas com a concentração máxima estimada que causa 75% de morte celular (IC75), observou-se que houve redução da granulosidade (SSC) e também do tamanho (FSC), quando comparados aos controles em ambas linhagens (Figura 16).

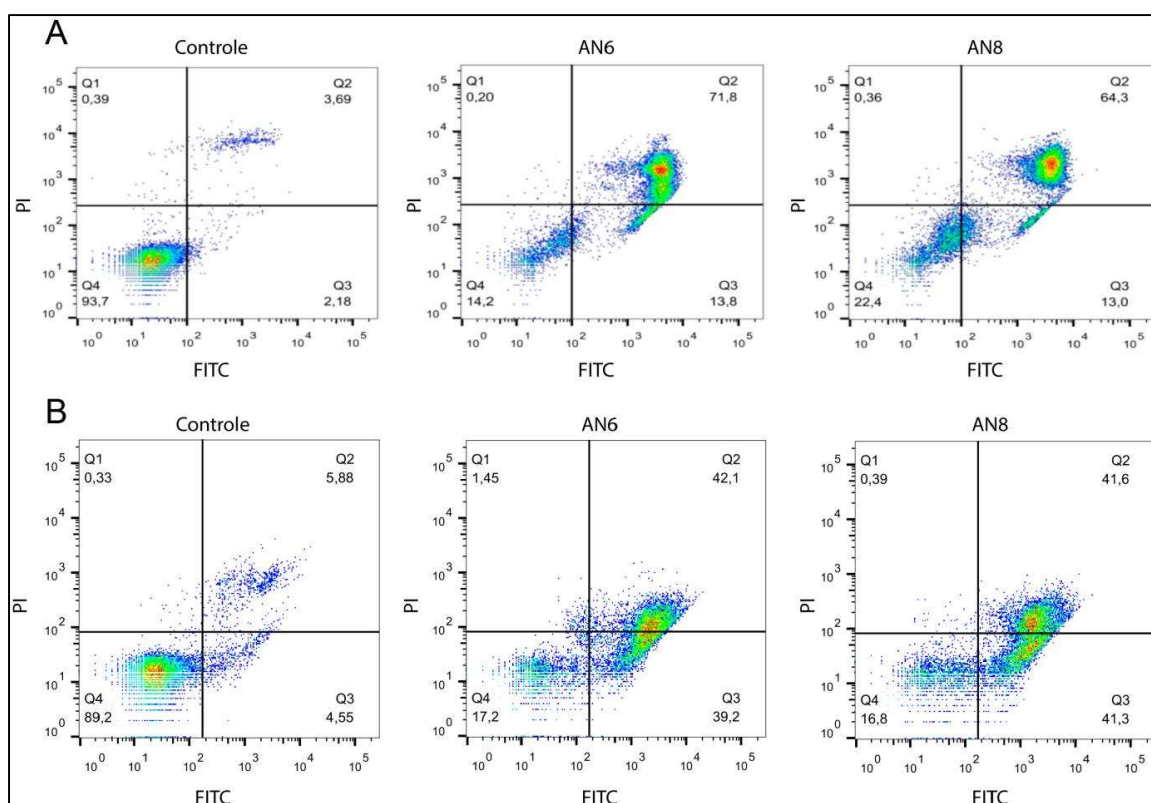


**Figura 16.** Avaliação da morfologia celular quanto à granulosidade (SSC-H) e ao tamanho (FSC-H) da linhagem B16F10 (A) e MCF-7 (B) tratados com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas nas concentrações referentes ao IC75 de cada peptídeo.



### 5.3.3.2. Exposição de fosfatidilserina

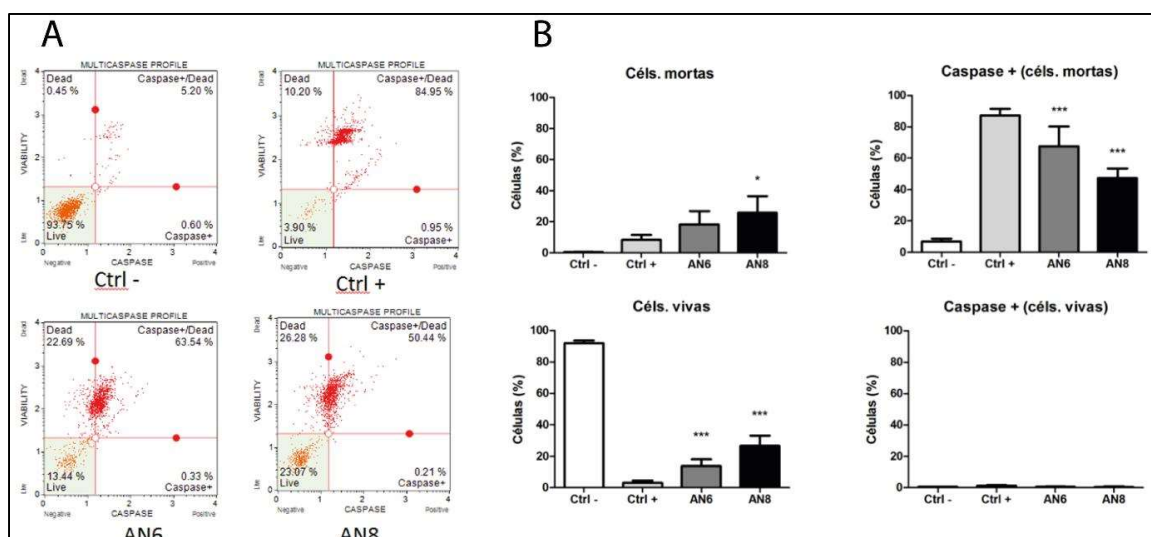
A avaliação de morte celular foi realizada usando Anexina-V para marcação de exposição de fosfatidilserina como indicativo de morte celular por apoptose e Iodeto de Propídio que marca DNA como indicativo de necrose. Quando tratadas com o IC<sub>75</sub>, as células da linhagem B16F10 foram majoritariamente duplamente marcadas (quadrante 2) de forma similar para os peptídeos AN6 e AN8. Quando avaliamos a linhagem MCF-7 o percentual de células duplamente marcadas ou marcadas somente com Anexina-V foram similares para ambos os peptídeos (Figura 17).



**Figura 17.** Efeito dos peptídeos AN6 e AN8 sobre as células tumorais da linhagem B16F10 (A) e MCF-7 (B) utilizando os marcadores anexina V/FITC (apoptose) e iodeto de propídio (necrose).

### 5.3.3.3. Avaliação de multicaspases

A marcação de caspases também foi avaliada sobre a linhagem B16F10 usando um kit de Multicaspases em um equipamento Muse Cell Analyzer. Foi observado que, após 6 horas de tratamento com a dose referente ao IC<sub>75</sub>, a maioria das células apresentaram uma marcação positiva significativa para caspases usando análise de variância (Anova fator único) tanto para o peptídeo AN6 quanto para o AN8 (Figura 18).



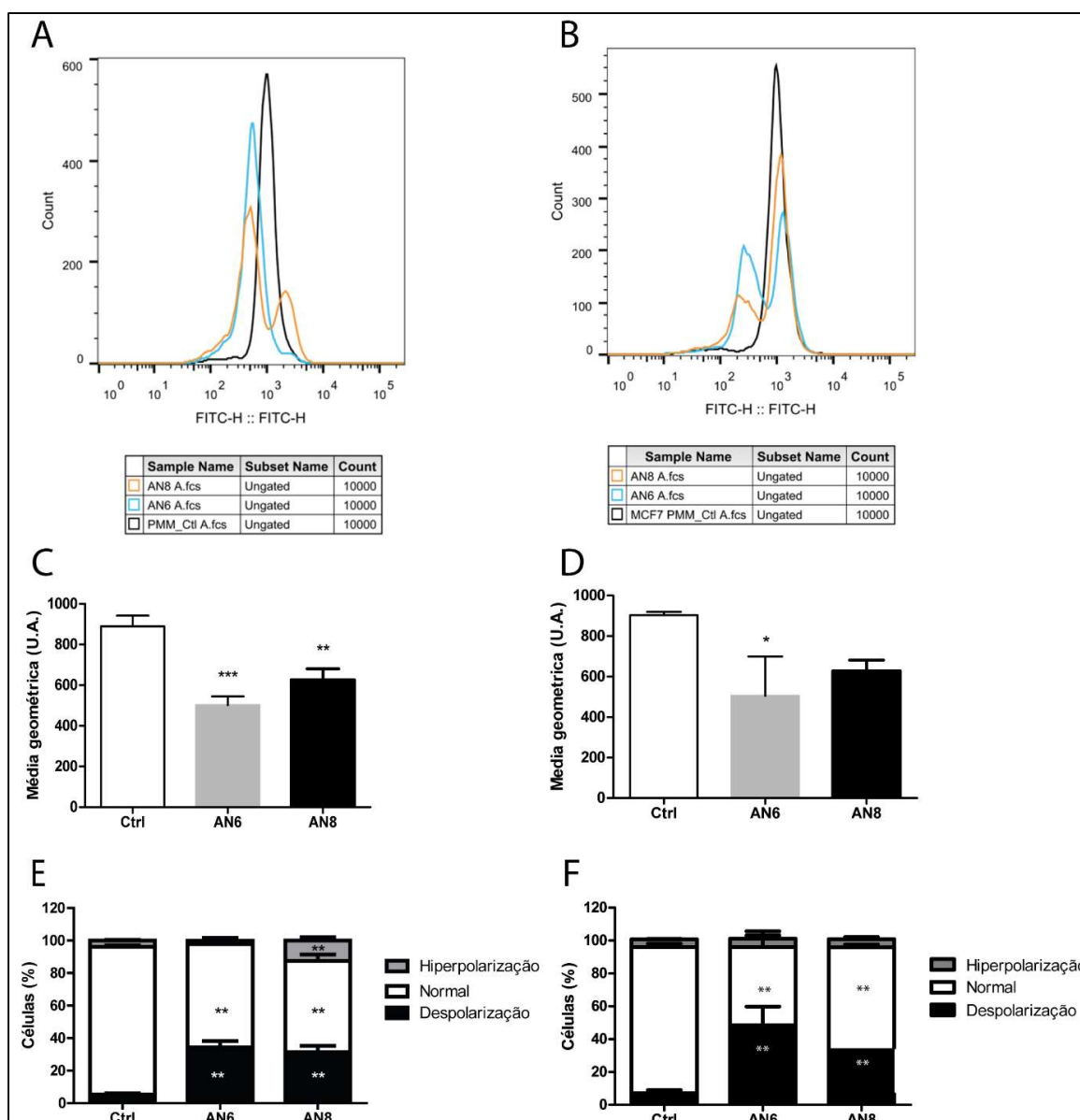
**Figura 18.** Avaliação da marcação de multicaspases em células da linhagem B16F10 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 6 horas de tratamento com a dose referente ao IC<sub>75</sub> (A). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  usando análise de variância (Anova) fator único (B).

### 5.3.3.4. Potencial de membrana mitocondrial

As células B16F10 e MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 por 24 horas na concentração referente ao IC<sub>75</sub> foram marcadas com rodamina 123 e avaliadas por citometria de fluxo para verificar o potencial de membrana mitocondrial (PMM). Foi possível observar que ambos os peptídeos provocaram alterações sobre o PMM das duas linhagens celulares (Figura 19). Na linhagem B16F10, as células tratadas com o peptídeo AN6 apresentaram alteração do PMM (Figura 19A, linha azul), um resultado similar foi observado quando as células foram tratadas com peptídeo AN8

(Figura 19A, linha amarela). Este resultado fica mais evidente para a linhagem B16F10 quando analisamos a média geométrica (Figura 19C), onde é possível observar que há uma diminuição significativa do PMM em ambos os peptídeos testados. Quando avaliamos especificamente o percentual de como as células foram marcadas, é possível observar que há um número significativo de células identificadas como despolarizada tanto para o AN6 quanto para o AN8 (Figura 19E), por outro lado, só o peptídeo AN8 um número significativo de células marcadas como hiperpolarizadas.

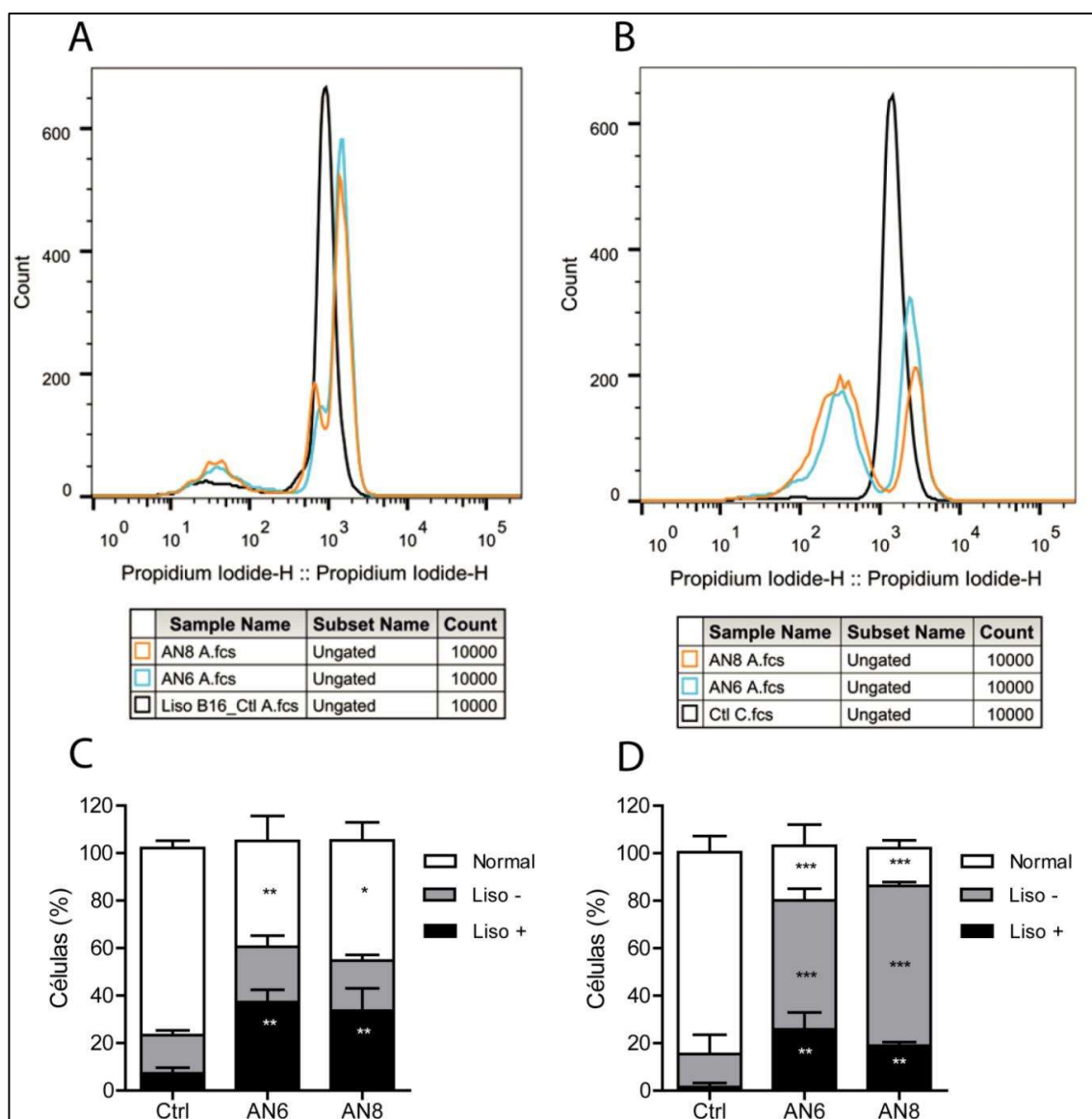
Quando avaliamos o PMM em células da linhagem MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 (Figura 19B), apenas o AN6 induziu uma diminuição significativa da média geométrica quando comparado ao controle (Figura 19D), por outro lado, ambos os peptídeos promoveram uma despolarização significativa, representando 48 e 34%, respectivamente (Figura 19F).



**Figura 19.** Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) usando rodamina 123 em células B16F10 (A) e MCF-7 (B) após 24 horas de tratamento tratadas com a dose referente ao IC<sub>75</sub>. Representação do PMM das células B16F10 (C) e MCF-7 (D) usando a média geométrica. Representação do PMM das células B16F10 (E) e MCF-7 (F) quanto ao estado de hiperpolarização, normal ou de despolarização. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , anova fator único seguido do teste de Tukey.

#### 5.3.3.5. Permeabilização de membrana lisossômica

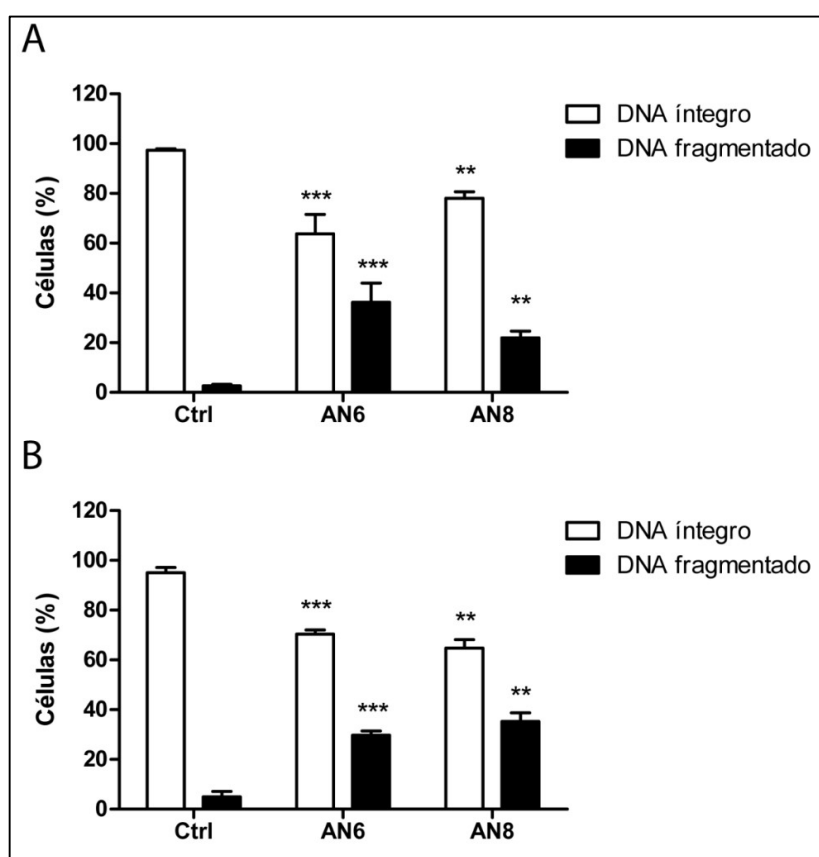
Também foi avaliado a permeabilização de membrana lisossômica (PML) usando citometria de fluxo nas linhagens de células B16F10 e MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 durante 24 horas nas concentrações referentes ao IC<sub>75</sub>. Quando ocorre a PML há diminuição do pH em razão da perda de prótons, resultando na redução da marcação por corantes lisossomotrópicos, como laranja de acridina (Repnik *et al.*, 2016). A atividade dos peptídeos AN6 e AN8 sobre a funcionalidade de membranas lisossômicas pode ser observado na Figura 20. Não houve redução significativa da marcação de PML na linhagem B16F10 para ambos os peptídeos testados (Figura 20A e 20C), por outro lado, na linhagem MCF-7 houve uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) para células classificadas como “Liso –”, indicando perda de fluorescência do corante laranja de acridina tanto para AN6 quanto para AN8 (Figura 20B e 20D). Em contrapartida, houve uma marcação positiva (Liso +) em ambas as linhagens testadas com os dois peptídeos.



**Figura 20.** Permeabilização de lisossomos marcados com laranja de acridina em células B16F10 (A e C) e MCF-7 (B e D) tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas com doses referentes ao IC<sub>75</sub>. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001, anova fator único seguido do teste de Tukey.

### 5.3.3.6. Fragmentação de DNA e ciclo celular

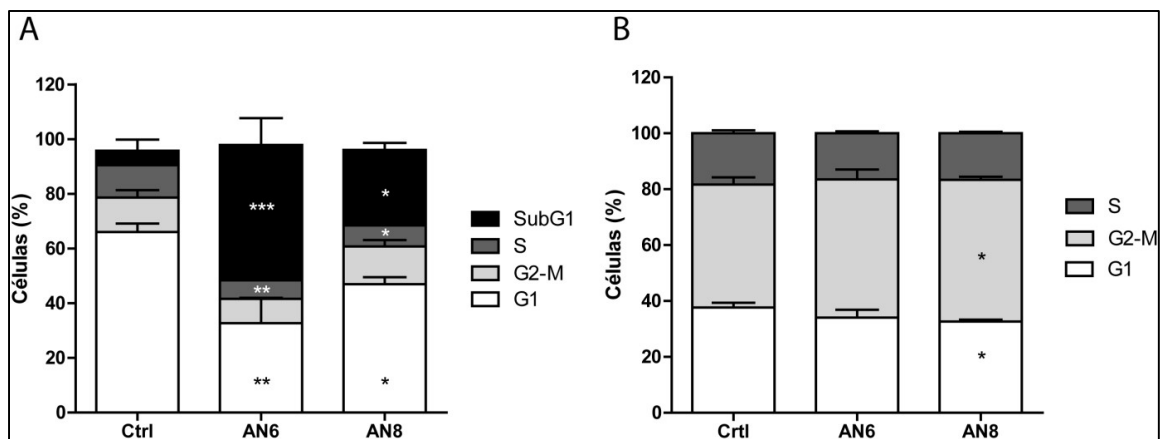
A fragmentação de DNA de células das linhagens B16F10 e MCF-7 foram avaliadas após 24 horas de tratamento com os peptídeos AN6 e AN8. Foi possível observar que ambos os peptídeos induziram uma fragmentação de DNA significativa tanto para a linhagem B16F10 (Figura 21A), quanto para a MCF-7 (Figura 21B).



**Figura 21.** Avaliação integridade do DNA de células B16F10 (A) e MCF-7 (B) tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas de tratamento. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , anova fator único seguido do teste de Tukey.

A avaliação do perfil de ciclo celular das linhagens B16F10 e MCF-7 também foi avaliado após 24 horas de tratamento com os peptídeos AN4 e AN8. Na linhagem B16F10 observou-se que houve um aumento significativo de células na fase sub G1, representado 49% das células tratadas com o peptídeo AN6 e 27% das células tratadas com o AN8. Além disso, houve uma diminuição significativa de células nas

fases S e G1 tratadas com os dois peptídeos (Figura 22A). Por outro lado, na linhagem MCF-7, houve aumento significativo somente nas células que estavam em G2/M tratadas com o peptídeo AN8 (Figura 22B).



**Figura 22.** Avaliação do ciclo celular de células B16F10 (A) e MCF-7 (B) tratadas com os peptídeos AN6 e AN8 após 24 horas de tratamento. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , anova fator único seguido do teste de Tukey.

Nos ensaios de citometria de fluxo foi possível observar que ambos os peptídeos provocam alterações na morfologia celular tanto na linhagem B16F10 quando na MCF-7. A diminuição do tamanho celular pode ser um indicativo dos estágios iniciais do processo apoptótico, geralmente essa diminuição é resultado da desidratação e pode ser analisado pelo parâmetro de dispersão de luz frontal (FSC). Além disso, o parâmetro de dispersão lateral (SSC, medido a  $90^\circ$ ) inalterado ou comumente aumentado também está relacionado à diminuição do tamanho celular. O encolhimento celular promovido pela desidratação promove uma condensação do citoplasma e núcleo das células, bem como sua granulosidade, resultando em um aumento de reflexão e refração da luz (Wlodkowic *et al.*, 2011), algo que pode ser observado no eixo SSC-H das células tratadas com os peptídeos na Figura 16.



Entretanto, cabe pontuar que com o avanço do processo apoptótico há uma diminuição do tamanho celular e conseqüentemente uma redução de sinal de dispersão frontal e lateral. Da mesma forma, também não é possível distinguir células apoptóticas ou células necróticas por meio deste ensaio de dispersão de luz em razão do comportamento celular ser parecido (Wlodkowic *et al.*, 2011).

A marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio foi usada para a marcação de apoptose e necrose, respectivamente. Uma das características dos peptídeos com atividade sobre células tumorais tem sido a interação direta com a membrana plasmática, induzindo a formação de poros e conseqüentemente a morte celular. A maioria dos peptídeos com atividade sobre células tumorais são catiônicos. De um total de 253 peptídeos disponíveis no banco de dados APD, há 215 peptídeos com tal característica. A interação de peptídeos positivamente carregados é favorecida em razão das células cancerosas superexpressar fosfolipídeos negativamente carregados como fosfatidilserina e mucinas O-glicosiladas, algo que não ocorre em células não cancerosas. Desta forma, estes peptídeos podem provocar a lise da membrana celular resultando em necrose ou interagir com alvos na membrana e ativar vias de morte celular, ou ainda, adentrar nas células e ativar vias intracelulares (Bhutia e Maiti, 2008).

A apoptose caracteriza-se por um processo de morte celular altamente organizado e que é essencial para remodelação tecidual, resposta imune e supressão tumoral. O fato de que a apoptose geralmente não provoca resposta inflamatória ou imune é considerado uma das formas ideais de para o tratamento do câncer (Qiao *et al.*, 2009). Por outro lado, a necrose pode ser considerada como um processo de morte celular não controlado principalmente no caso de fatores externos, podendo

resultar em inflamação, provavelmente por meio da liberação de fatores das células mortas, atuando como meio de alerta para o sistema imunológico inato (Golstein e Kroemer, 2006).

Os experimentos realizados neste estudo usando anexina e iodeto de propídio como marcadores mostrou que a maioria das células foram duplamente marcadas tanto nas células tratadas com o peptídeo AN6 quanto com o AN8 (Figura 17). Este resultado mostra que estes peptídeos desestabilizam a membrana plasmática das células, possivelmente indicando necrose. Entretanto, também é possível notar que há um significativo número de células marcadas somente com anexina, principalmente na linhagem MCF-7.

A ação de peptídeos com propriedades anticâncer podem ativar distintos mecanismos de morte celular. Foi observado que um peptídeo nomeado FK-16, derivado de um conhecido peptídeo do tipo catelecidina LL-37, induz apoptose e morte celular autofágica, mas não induz necrose (Ren *et al.*, 2013). Por outro lado, foi observado que o peptídeo dermaseptina B2 (também identificado como adenoregulina), obtido inicialmente da secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa bicolor*, atua sobre a membrana plasmática de células PC3, apresentando um significativo número de células duplamente marcadas, além da liberação de LDH (van Zoggel *et al.*, 2012).

Caspases constituem um grupo de proteases baseadas em cisteína (cysteine-aspartic proteases). Estas enzimas são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas em resposta a estímulos, como diferenciação celular e apoptose (Vaculova e Zhivotovsky, 2008; Julien e Wells, 2017).

A ativação de caspases constituem uma importante etapa na via de morte celular que culmina no processo apoptótico (Hoskin e Ramamoorthy, 2008). O processo de ativação de caspases se dá de forma rápida e a partir de quatro horas já foi observado que há um ápice da atividade da caspase 3 (Tyas *et al.*, 2000). Assim sendo, optamos por avaliar a marcação de multicaspases em um intervalo de 6 horas após o tratamento das células com os peptídeos. O kit multicaspase usado neste experimento pode detectar as caspase-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, além do fluoróforo 7-AAD que é incluído no teste para avaliar a permeabilidade da membrana plasmática e consequentemente células mortas.

Foi observado que a maioria da células da linhagem B16F10 foram marcadas positivamente para caspases nos dois peptídeos testados, bem como estas células positivas para caspases também foram marcadas com 7-AAD, indicando que estas células estavam mortas e com a permeabilidade da membrana plasmática alterada (Figura 18). A ativação e marcação de caspases sugere fortemente que as células morreram decorrente de processo de apoptose, e que a marcação por 7-AAD pode ter acontecido em razão do avanço do processo apoptótico (apoptose tardia), mas a ocorrência de necrose também deve ser considerada, principalmente se considerarmos que não há marcação significativa para caspases em células vivas.

A estabilidade do potencial de membrana mitocondrial é um fator chave no funcionamento celular e a perturbação prolongada pode resultar em perda da viabilidade das células (Zorova *et al.*, 2018).

Para investigar o potencial de membrana mitocondrial das células B16F10 e MCF-7 tratadas com os peptídeos AN6 e AN8, as células foram marcadas com rodamina 123 e avaliadas no citômetro de fluxo. Esta abordagem mostrou que a

maioria das células foram marcadas como despolarizadas (Figura 19). A despolarização da membrana mitocondrial é relatado como um evento importante na cascata de eventos que resultam na morte celular por apoptose (Safiulina et al., 2006; Ganta et al., 2017).

Estudos prévios já relataram que a ação de peptídeos obtidos a partir da secreção da pele de anfíbios têm mostrado que estes também podem provocar alterações no potencial de membrana mitocondrial, seja por ação direta ou ação secundária (Libério et al., 2011; Wang et al., 2013).

Como sugerido por Li et al, (2003), um possível mecanismo de ativação mitocondrial pode ocorrer via ativação de caspases envolvidas na sinalização apoptótica através das proteínas Bax, Bak e Bid ou ainda via regulação de cálcio. Além disso, estas proteínas induzem a sinalização de caspase que envolve a liberação mitocondrial de várias proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c e Smac / Diablo. Ren et al., (2013), mostraram que o peptídeo FK-16, derivado da catelecidina humana LL-37 promove apoptose via AIF/EndoG-dependente e morte celular autofágica via cascata p53-Bax/Bcl-2 em células de câncer de colon de forma independente de caspases.

Os lisossomos são organelas intracelulares com um interior ácido que atuam na degradação e reciclagem de macromoléculas distribuídas por endocitose, fagocitose e autofagia. Além disso, são considerados reguladores cruciais da homeostase celular. Uma característica muito interessante dos lisossomos é que em razão da elevada quantidade de hidrolases em seu interior, a permeabilização parcial de sua membrana induz a apoptose, enquanto que uma ruptura lisossomal induz a necrose (Appelqvist *et al.*, 2013). Observamos neste estudo que a permeabilidade

lisossômica não foi alterada de forma significativa nas células B16F10 tratadas com ambos os peptídeos. Por outro lado, houve aumento da permeabilidade lisossômica nas células MCF-7 tratadas tanto com AN6 quanto com o AN8 (Figura 20).

Ceron *et al.*, (2010) mostrou que o peptídeo antimicrobiano cecropina A é capaz de promover uma diminuição da integridade lisossômica. Este peptídeo também induziu um aumento de espécies reativas de oxigênio, fragmentação de DNA, entre outros efeitos, e que culminou com a apoptose de células HL-60 independente da ativação de caspases. Em um outro estudo usando peptídeo célula-penetrante (*cell penetrating peptide* - CPP) conjugado a um peptídeo amiloide foi capaz de penetrar e romper a membrana lisossomal e induzir a morte celular (Veloria *et al.*, 2018).

A fragmentação de DNA é uma importante característica do processo de morte celular por apoptose que ocorre nas fase tardia desse processo (Zang e Ming, 2000). Os ensaios realizados neste projeto mostram que o tratamento das células B16F10 e MCF-7 com os peptídeos AN6 e AN8 provocaram um aumento significativo na marcação de DNA fragmentado (Figura 21). Este resultado corrobora com os demais mostrados anteriormente que, embora ocorra alterações na membrana celular induzida pelos peptídeos sugerindo a ação por necrose, a indicação de que há um processo apoptótico também deve ser considerado.

A ação de peptídeos sobre células tumorais que induzem, além de outros efeitos, a fragmentação de DNA têm sido relatado como uma das etapas do processo apoptótico em diferentes linhagens celulares (Kim *et al.*, 2003; Cerón *et al.*, 2011; Libério *et al.*, 2011).

O ciclo celular consiste em um processo altamente ordenado e regulado que resulta em um processo de duplicação celular com o objetivo de transmitir informações

genéticas de uma geração para a outra (Israels e Israels, 2000). Desta forma, eventuais perturbações nas células podem interromper o ciclo celular ou, em caso de dano irreparável, induzir a célula a um processo apoptótico. Quando avaliamos o efeito dos peptídeos AN6 e AN8 sobre o ciclo celular das células B16F10 e MCF-7, foi possível observar que, para B16F10, houve uma expressiva marcação de células marcadas como subG1. Em razão disso, houve uma redução significativa de células nas fase S e G1 (Figura 22). Vários trabalhos têm demonstrado que a marcação de um pico em subG1 está relacionado com células apoptóticas (Maroufi et al., 2020; Das et al., 2001; Yoshida et al., 2008; Kuo et al., 2005).

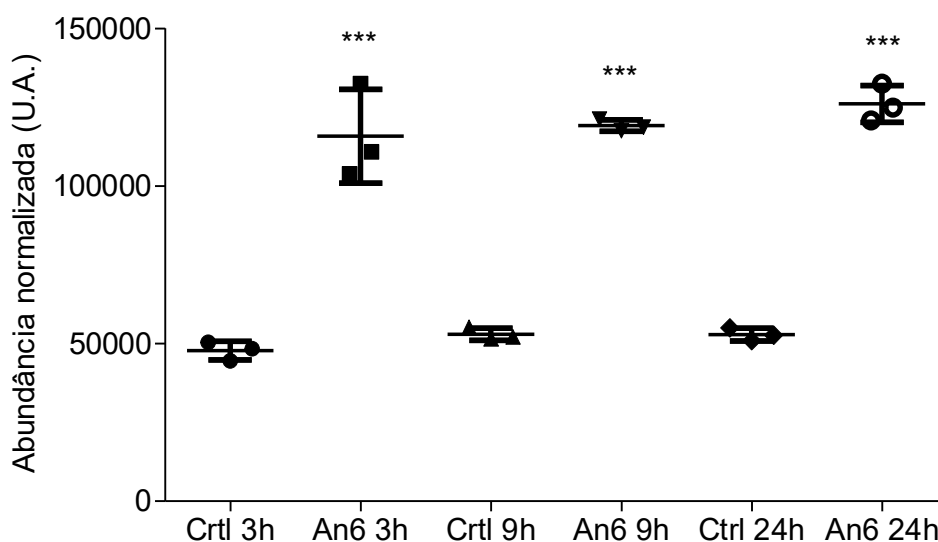
Outrossim, para a linhagem de células MCF-7 houve um aumento significativo apenas nas células marcadas na fase G2/M. Este aumento pode indicar que estas células possam estar com algum dano no DNA, visto durante a esta fase há um importante ponto de checagem e reparo de DNA que atua para evitar que células com material genético danificado entrem na mitose (DiPaola, 2002).

#### **5.3.4. Análise proteômica**

Os experimentos de análise proteômica foram realizados apenas com o análogo AN6, pois esse exibiu um perfil de citotoxicidade mais intenso sobre as células de melanoma murino B16F10.

Para avaliar o efeito do peptídeo AN6 sobre o proteoma, células da linhagem B16F10 foram tratadas com a dose referente ao IC<sub>75</sub>, calculada anteriormente no ensaio de MTT. As amostras foram resultantes de tratamentos nos tempos de 3, 9 e 24 horas foram digeridas por tripsina e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) do modelo Orbitrap.

A análise proteômica quantitativa livre de marcação (*label-free*) foi realizada usando o software *Progenesis* e apenas as proteínas que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) por meio do teste de ANOVA foram exportadas. A lista final de proteínas resultou em 1150 entradas que então foram submetidas a outra análise estatística usando ANOVA, desta vez usando o R Studio, para avaliar as diferenças na expressão de proteínas entre os grupos. Após esta análise, 242 proteínas foram identificadas como reguladas ( $p < 0,05$ ) quando avaliamos a variante tratamento. Um exemplo representativo da diferença no padrão de abundância das proteínas identificada pode ser observada na Figura 23.



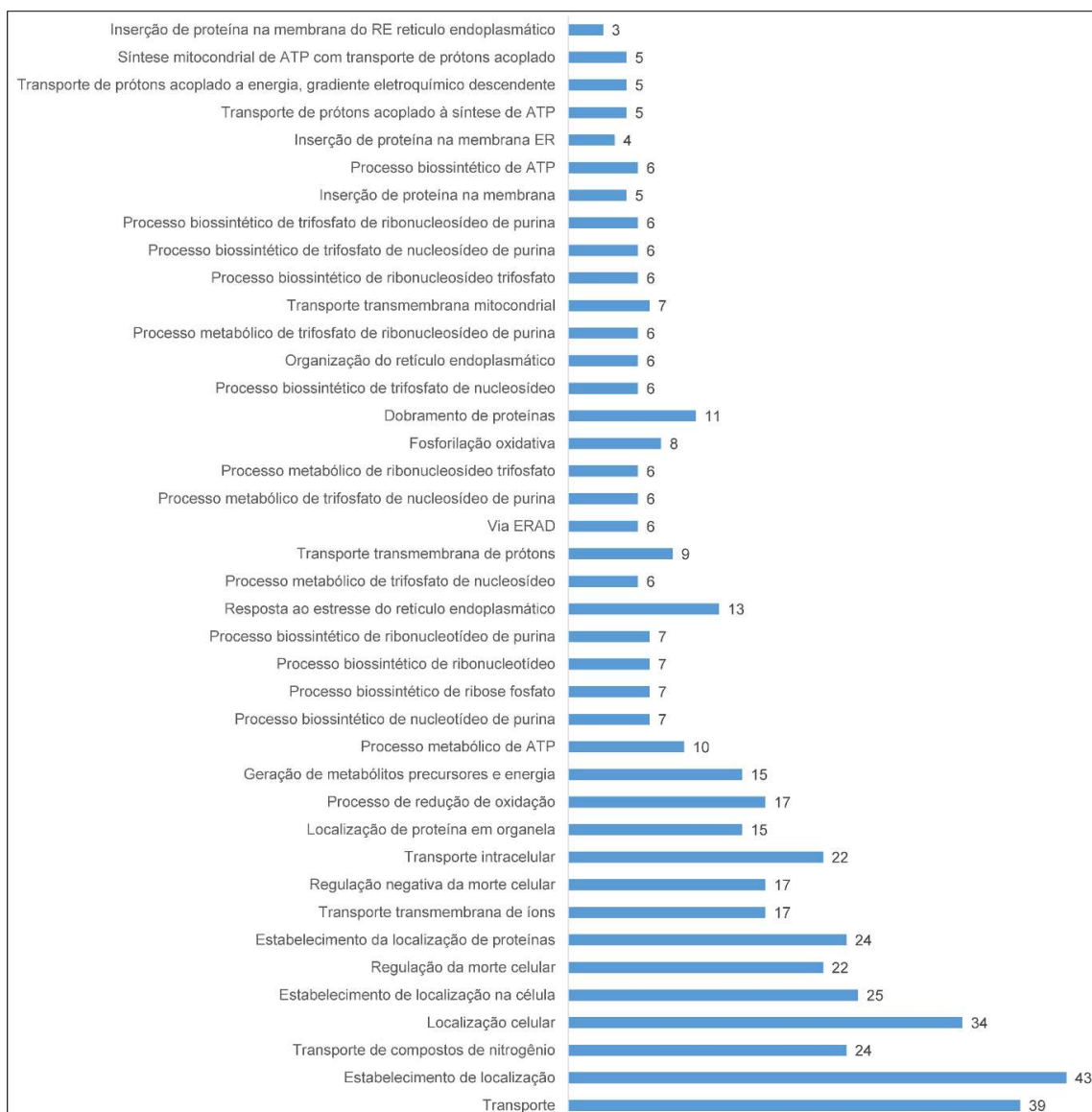
**Figura 23.** Imagem representativa do padrão de expressão da proteína *Prohibitin* (ID Uniprot P67778) em células B16F10 quando tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle (DMEM) em diferentes tempos. \*\*\*  $p < 0,0001$  usando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

Dessas 242 proteínas, 103 apresentaram um padrão de abundância aumentada em relação ao controle (ANEXOS - Tabela 5) e 139 proteínas com o padrão de abundância diminuída nas células tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle (ANEXOS - Tabela 6).

A análise funcional das proteínas reguladas foi realizada usando a ferramenta online ShinyGO considerando as três principais classificações ontológicas mais comumente usadas: processos biológicos, componentes celulares e função molecular. As vias foram categorizadas em função do enriquecimento (que consiste no número de proteínas/genes identificadas em determinada via em razão do número total de proteínas/genes que compõem determinada via).

Em função da quantidade de vias que resultaram desta análise, foram destacadas as quarenta principais vias mais enriquecidas para as proteínas que apresentaram abundância aumentada em relação ao controle quando categorizadas quanto aos **processos biológicos** (Figura 24). Nesta categoria, as vias metabólicas que apresentaram um maior enriquecimento estão relacionadas com o retículo endoplasmático e processos mitocondriais como síntese mitocondrial de ATP e transporte de prótons. Já as vias que apresentaram um maior quantitativo de proteínas, embora o enriquecimento seja menor, foram proteínas relacionadas ao transporte celular, localização celular e regulação da morte celular.

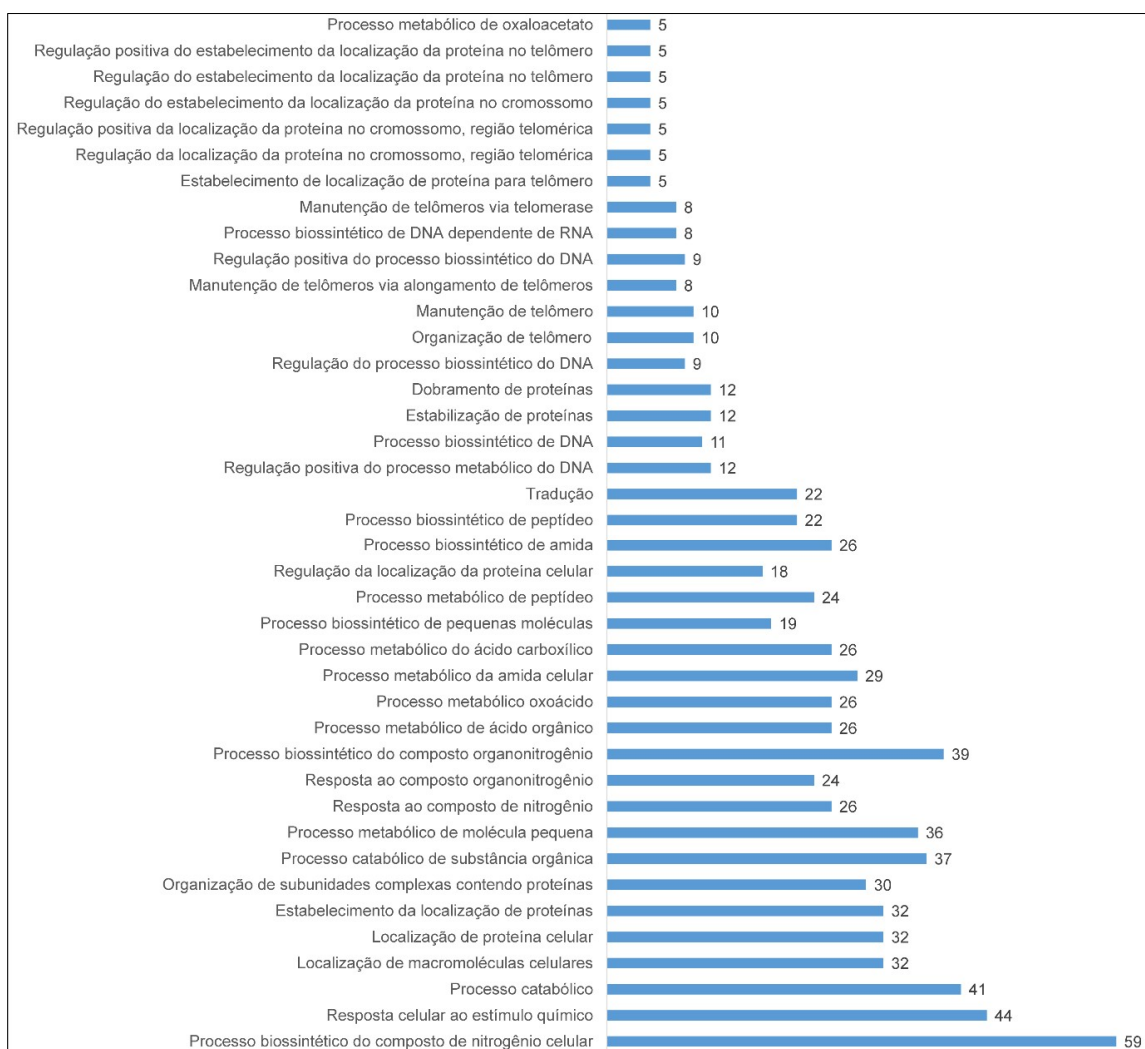




**Figura 24.** Proteínas categorizadas de acordo com processos biológicos com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

As proteínas enquadradas como processos biológicos que estavam com a expressão diminuída em relação ao controle estão apresentadas na Figura 25. As vias mais diminuídas compreendem os processos de metabolismo do oxaloacetato, regulações relacionadas ao telômero e processos e regulação do DNA. Já as maiores quantidades de proteínas foram observadas nas vias de processos metabólicos de

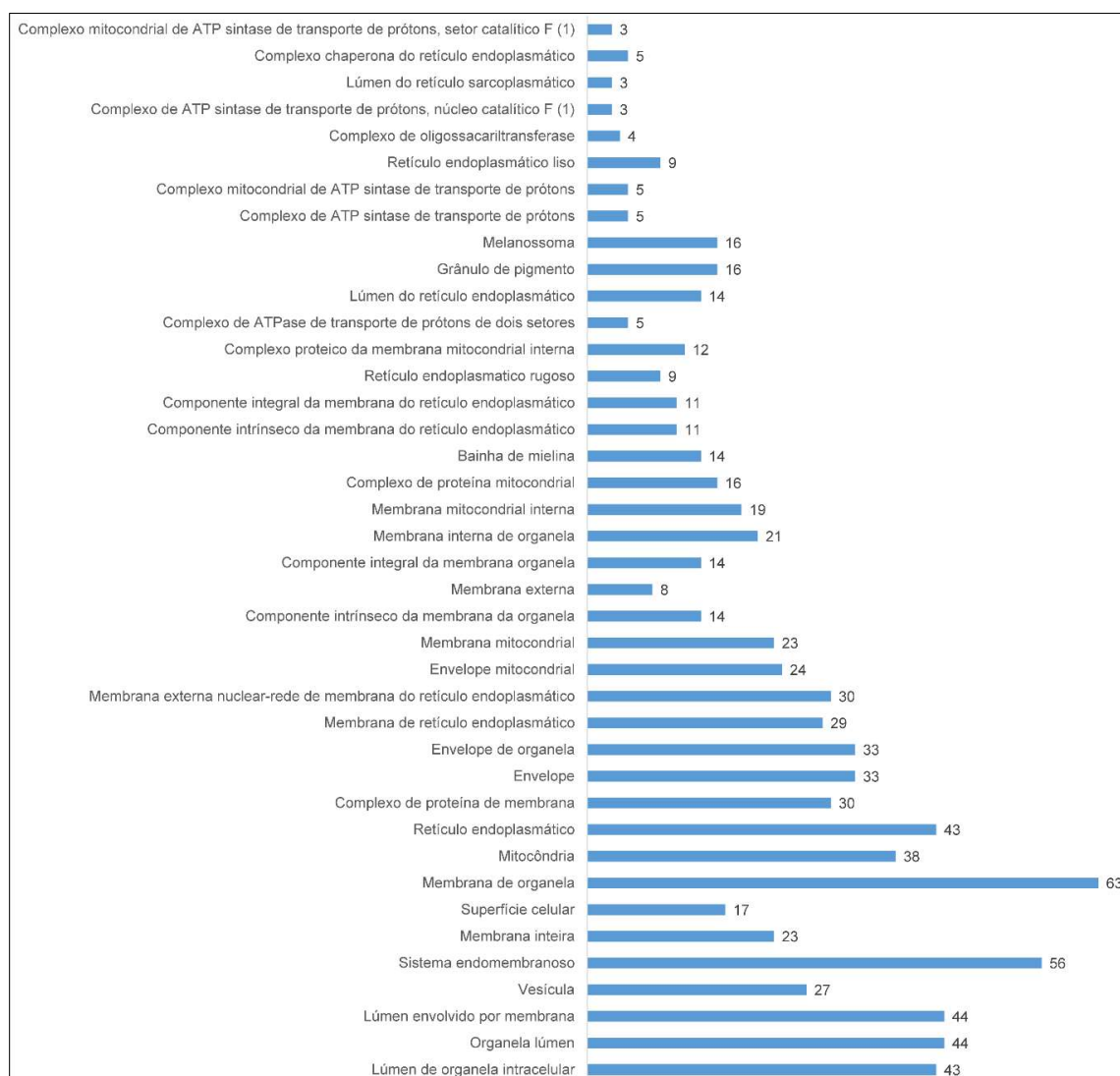
moléculas pequenas incluindo amida, nitrogênio e organonitrogênio; além de processo catabólico e resposta celular ao estímulo químico.



**Figura 25.** Proteínas categorizadas de acordo com os processos biológicos com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Os locais na célula onde as proteínas se encontram foram agrupados por meio do termo GO de **componente celular**. Observou-se que a maioria das proteínas com abundância aumentada também compõem o retículo endoplasmático e a mitocôndria, destacando, por exemplo, complexo mitocondrial de ATP sintase, complexo chaperona do retículo endoplasmático, além de melanossoma e grânulo de pigmento (Figura 26), uma característica da linhagem B16F10, objeto desse capítulo.

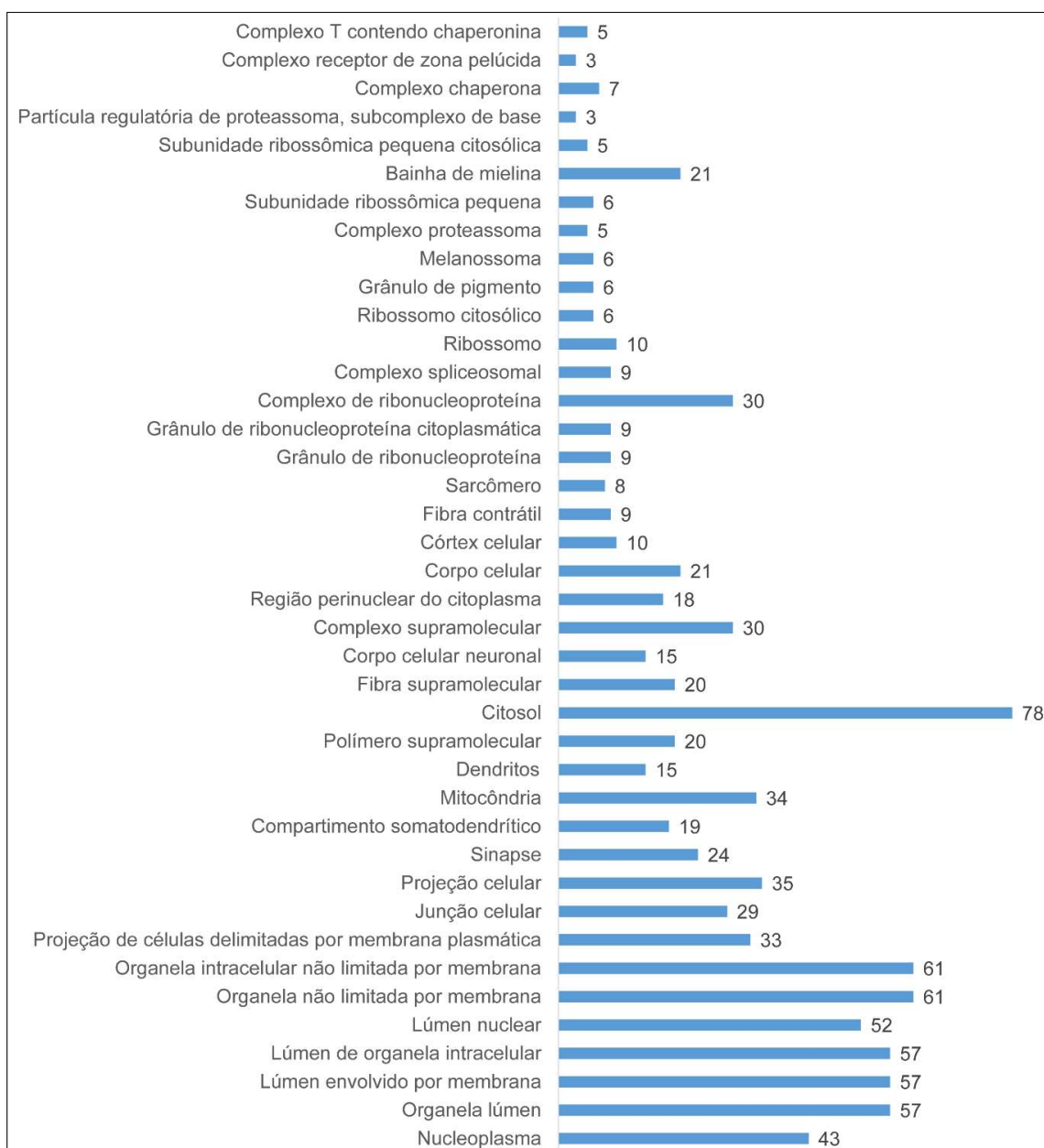
Como era esperado, as vias com mais proteínas expressas também compõem estruturas relacionadas ao retículo endoplasmático e mitocôndria.



**Figura 26.** Proteínas categorizadas de acordo com componente celular com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Quando avaliamos as proteínas com expressão diminuída de acordo com componente celular, é possível observar que os componentes mais enriquecidos estão relacionadas com complexos chaperona, ribossomos, bainha de mielina e proteassoma. Já os componentes com maior número de proteínas identificadas estão

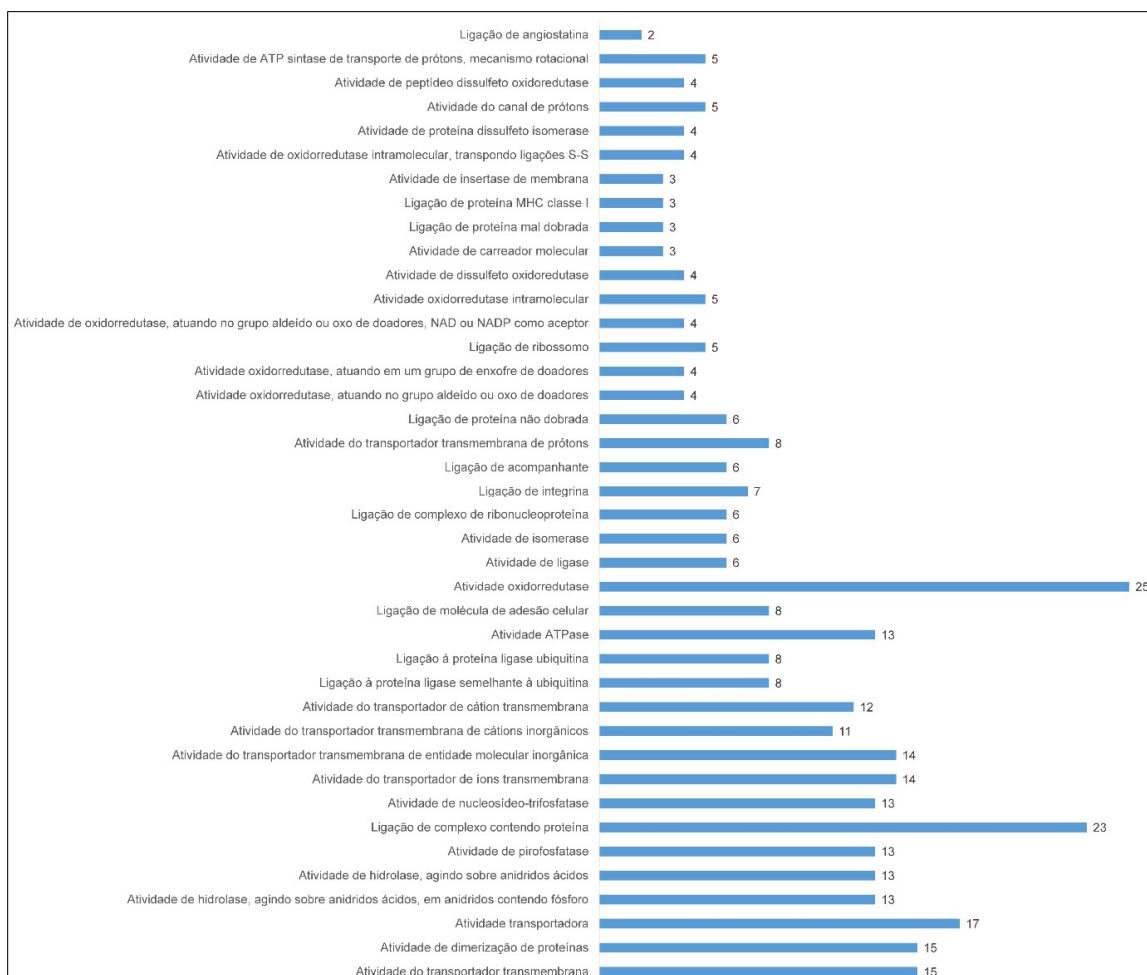
no citosol, organelas não limitadas por membrana (ex. ribossomo), lúmen de organela, além de lúmen nuclear e nucleoplasma (Figura 27).



**Figura 27.** Proteínas categorizadas de acordo com componente celular com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Com o intuito de avaliar que tipo de função as proteínas que foram identificadas desempenham, estas foram categorizadas de acordo com a **função molecular**. As proteínas que apresentaram um maior enriquecimento estão associadas com a

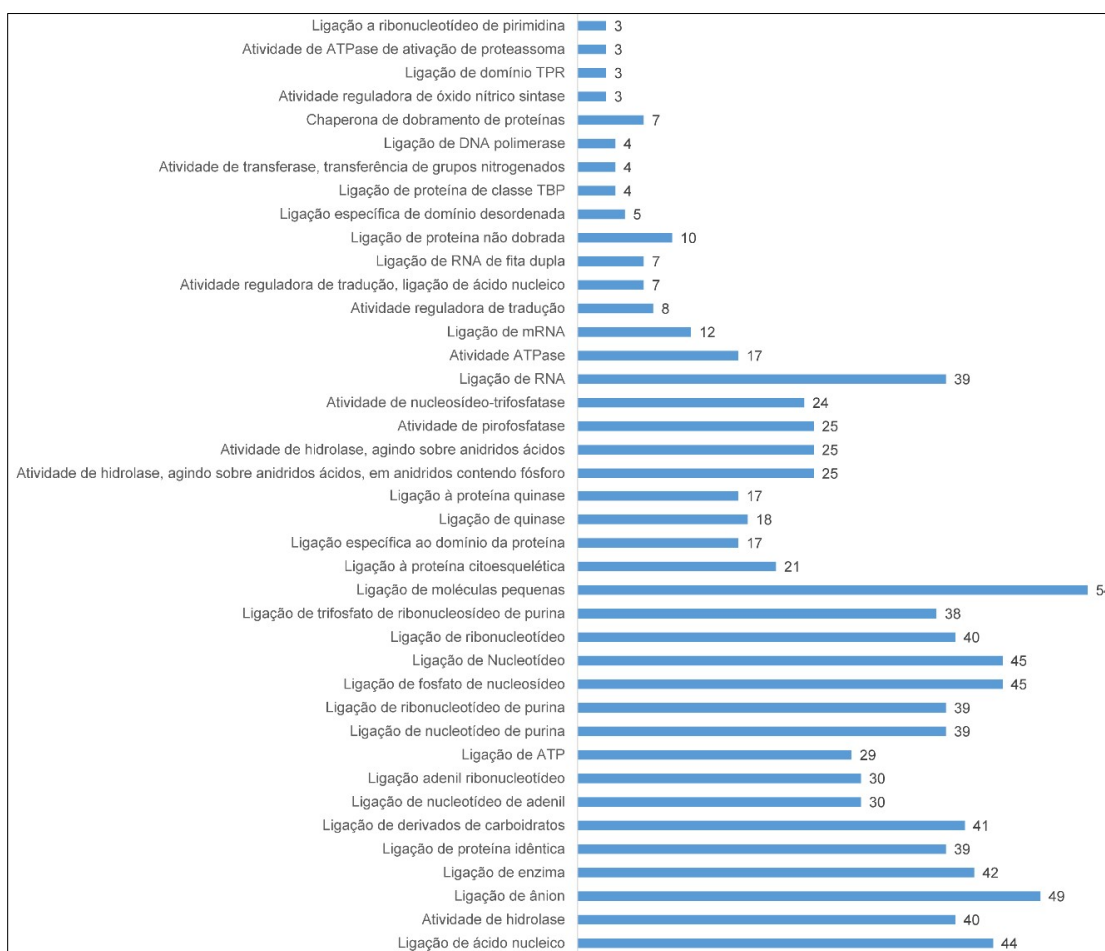
ligação de angiotatina, ATP sintase, oxirredutase e atividade do canal de prótons. Quanto ao número de proteínas identificadas, as funções que mais se destacam foram a oxirredutase e ligação de complexo contendo proteína (Figura 28).



**Figura 28.** Proteínas categorizadas de acordo com função molecular com abundância aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Quando foram avaliados os termos GO para as proteínas que estavam com a abundância diminuída para a categoria de função molecular, foi observado que os grupos mais enriquecidos foram proteínas relacionadas à ligação a ribonucleotídeo de pirimidina, atividade ATPase de ativação do proteassoma, ligação de domínio TPR (*tetratricopeptide repeat*), além da ligação de ácidos nucleicos (RNA e DNA). As proteínas presentes em maiores quantidades foram classificadas em relação à

ligação de RNA, ligação de moléculas pequenas, ligação de nucleotídeo e ribonucleotídeo (Figura 29).

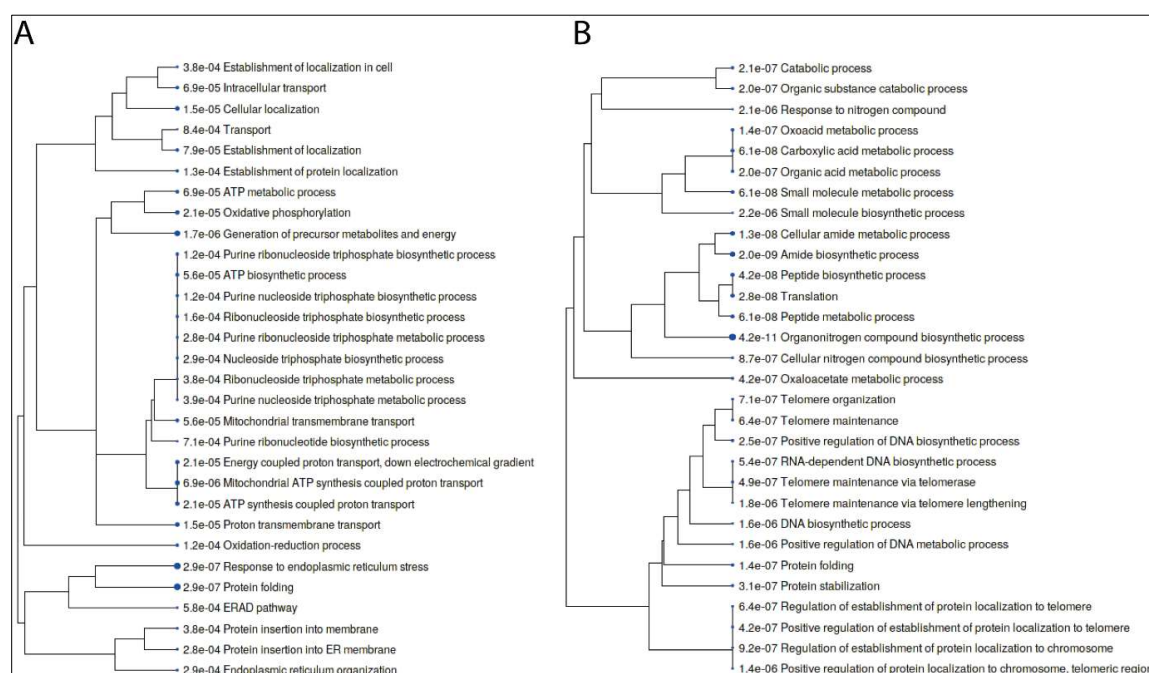


**Figura 29.** Proteínas categorizadas de acordo com a função molecular com abundância diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Para sintetizar os dados de ontologia do gene (GO) expostos nas Figuras 24 a 29, essas vias também foram projetadas em formato de dendrograma com o intuito de mostrar a relação de proximidade das proteínas que estão com o padrão de abundância diferencialmente expressos em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. Desta forma, foi possível observar que as proteínas que estão com um padrão de expressão aumentado nas células B16F10, considerando o termo GO de **processos biológicos**, estão relacionadas com transporte e localização celular,

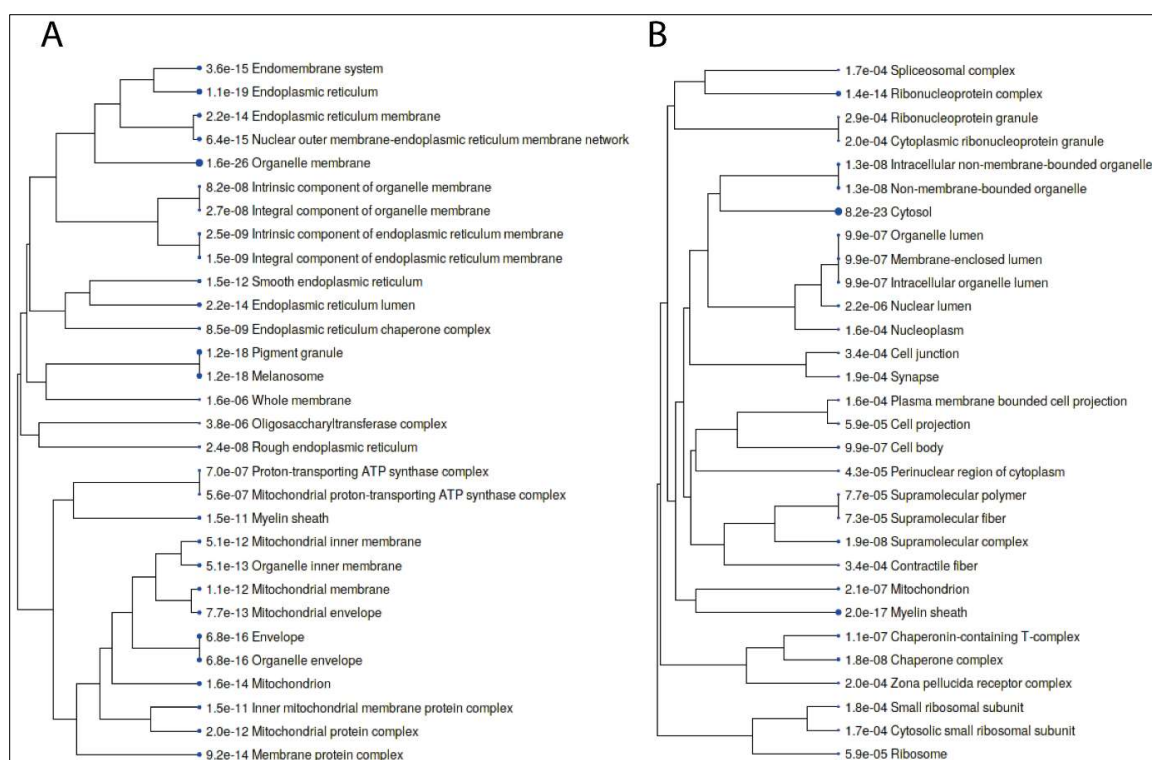


síntese de compostos relacionados ao DNA e RNA, além de processos envolvendo a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Figura 30A). Já as proteínas que estão com a abundância diminuída estão majoritariamente agrupadas nas vias relacionadas ao telômero e regulação de DNA; processamento, síntese e metabolismo de pequenas moléculas como ácido carboxílico, amida e nitrogênio (Figura 30B).



**Figura 30.** Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de processos biológicos que estão com a abundância aumentada (**A**) e diminuída (**B**) em células B16F10.

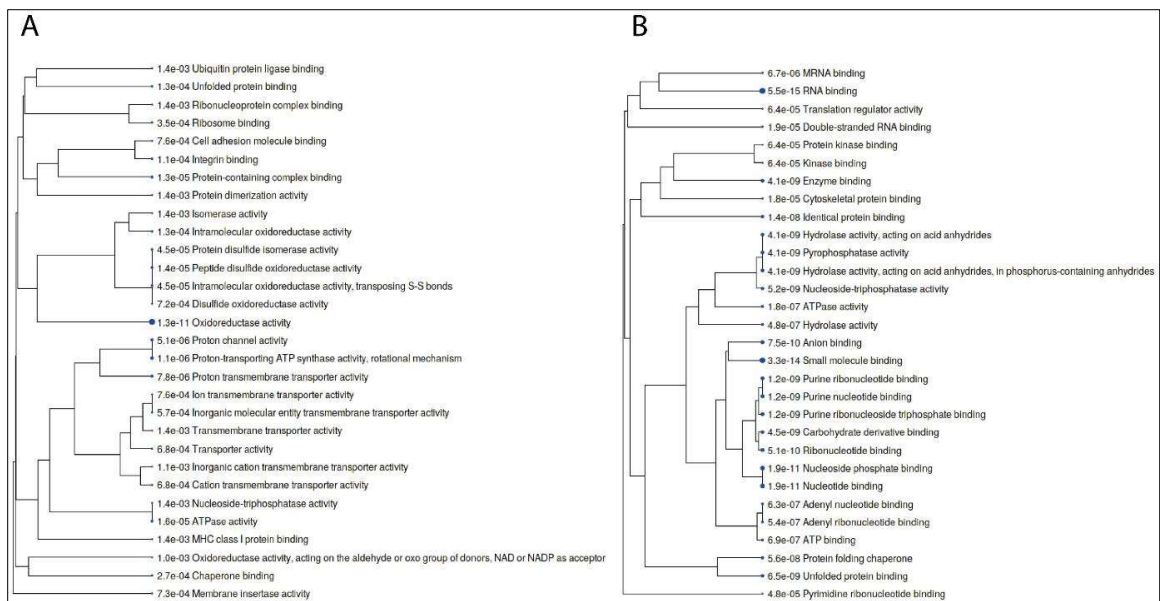
Quanto aos termos enriquecidos em função dos **componentes celulares**, a maioria das entradas das proteínas com abundância aumentada estão relacionadas com o retículo endoplasmático e mitocôndria (Figura 31A). Já as proteínas identificadas com abundância diminuída estão mais diversamente distribuídas nas células, como complexos de spliceossoma e ribonucleoproteínas, ribossomo e citosol (Figura 31B).



**Figura 31.** Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de componente celular que estão com a abundância aumentada (**A**) e diminuída (**B**) em células B16F10.

Para as proteínas agrupadas em razão da **função molecular** que elas desempenham, mais uma vez a predominância das entradas das proteínas com abundância aumentada estão relacionadas ao retículo endoplasmático e a mitocôndria foram majoritárias, destacando as enzimas do tipo oxirredutase (Figura 32A). Já as proteínas com a abundância diminuída, apresentaram uma maior diversidade funcional, destacando as atividades do tipo quinase, ligantes de nucleotídeos, ácidos nucleicos e pequenas moléculas (Figura 32B).





**Figura 32.** Dendrograma das vias metabólicas que compreendem os termos de ontologia do gene (GO) de função molecular que estão com a abundância aumentada (A) e diminuída (B) em células B16F10.

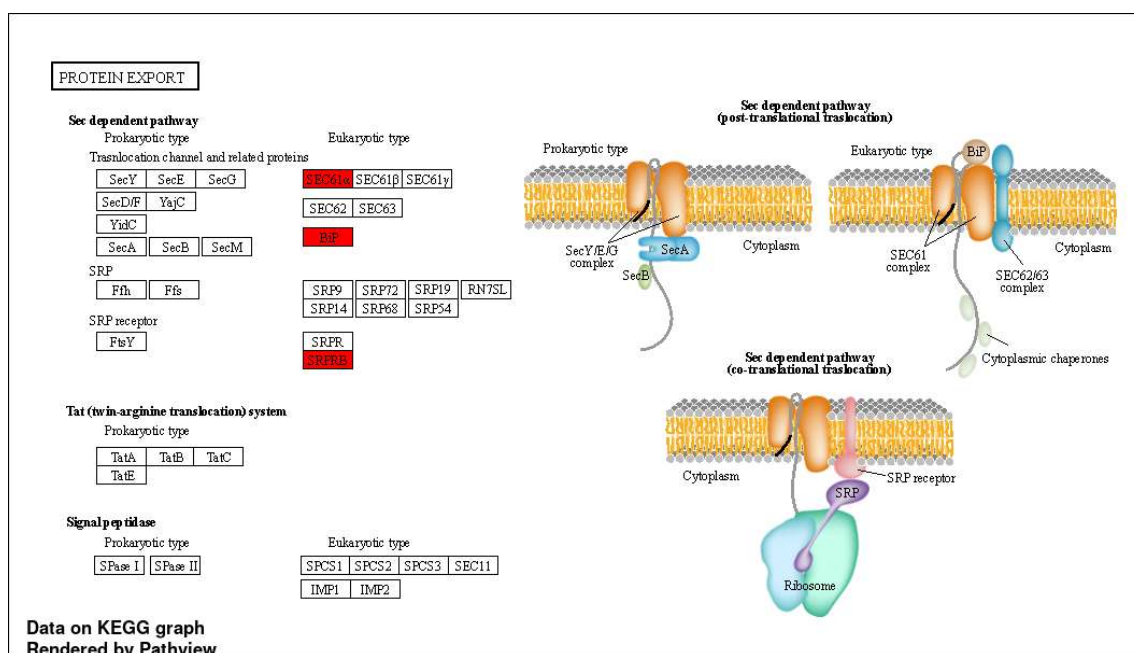
Para avaliar mais especificamente quais vias estavam alteradas e quais proteínas estavam envolvidas nas respostas às condições experimentais às quais as células foram submetidas, foi feita uma análise usando a ferramenta KEGG. As vias com um maior enriquecimento para proteínas com abundância aumentada foram: exportação de proteínas, processamento de proteínas no retículo endoplasmático, síntese de N-glicanos de vários tipos e ferroptose. As principais vias identificadas para este grupo de proteínas usando o KEGG encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Enriquecimento de vias metabólicas usando a ferramenta KEGG contendo proteínas com a expressão aumentada em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Via metabólica	Nº de proteínas identificadas	Nº de proteínas da via	Razão de enriquecimento	Enriquecimento (FDR)
Protein export	3	27	24.1	1.8E-03
Protein processing in endoplasmic reticulum	18	170	22.9	1.2E-17
Various types of N-glycan biosynthesis	4	40	21.7	3.0E-04
Ferroptosis	4	40	21.7	3.0E-04
N-Glycan biosynthesis	4	50	17.3	6.3E-04
Histidine metabolism	2	26	16.7	3.4E-02
Tyrosine metabolism	3	39	16.7	4.9E-03
Oxidative phosphorylation	10	133	16.3	1.5E-08
Thyroid hormone synthesis	5	74	14.6	2.5E-04
Diabetic cardiomyopathy	13	204	13.8	7.0E-10
Antigen processing and presentation	5	80	13.5	3.0E-04
Citrate cycle (TCA cycle)	2	32	13.5	4.5E-02
Beta-Alanine metabolism	2	32	13.5	4.5E-02
Tryptophan metabolism	3	51	12.7	9.4E-03
Cardiac muscle contraction	5	87	12.5	4.1E-04
Parkinson disease	13	245	11.5	4.0E-09
Prion disease	12	266	9.8	7.9E-08
Thermogenesis	10	228	9.5	1.3E-06
Amyotrophic lateral sclerosis	15	364	8.9	4.0E-09
Huntington disease	11	300	7.9	1.7E-06
Alzheimer disease	13	366	7.7	2.6E-07
ECM-receptor interaction	3	88	7.4	4.0E-02
Non-alcoholic fatty liver disease	5	154	7	4.9E-03
Pathways of neurodegeneration	14	469	6.5	4.7E-07
Phagosome	5	169	6.4	6.9E-03
RNA transport	5	172	6.3	7.1E-03

\*ECM: extracelular matrix

A via enriquecida com a maior razão de enriquecimento foi a de exportação de proteínas com três proteínas identificadas de um total de 27 proteínas que compõem essa via e estão representadas na Figura 33. A proteína **Sec61 $\alpha$**  faz parte de um complexo formador do canal denominado Sec61, que, resumidamente, está associado ao transporte de proteínas que precisam ser translocadas ou inseridas na membrana do retículo endoplasmático durante a síntese proteica (Pfeffer *et al.*, 2015). No câncer, foi observado que esta proteína está associada com a progressão da proliferação celular, migração e transição epitélio-mesênquima, além de conferir resistência à droga cisplatina em células de carcinoma nasofaríngeo (Cao *et al.*, 2020). A proteína **BiP**, também identificada como Hspa5, é uma chaperona que atua no dobramento correto de proteínas e também auxilia a degradação de proteínas mal dobradas por meio da interação com outras proteínas como DNAJC10 / ERdj5. Foi observada que a Hpa5 atua regulando negativamente a ferroptose, um tipo de morte celular regulada que é impulsionada por lesão oxidativa que promove peroxidação lipídica, ligando-se à glutatona peroxidase 4 (GPX4) protegendo contra a degradação da proteína GPX4 e subsequente peroxidação lipídica. Além disso, a via Hpa5 – GPX4 está associada com a resistência à ferroptose, limitando a atividade da droga gencitabina em células de adenocarcinoma ductal pancreático humano (Zhu *et al.*, 2017). A proteína **Srprb** (*signal recognition particle receptor subunit beta*) está presente no retículo endoplasmático e atua na segmentação de proteínas nesta organela. Foi observado que a superexpressão de *Srprb* em adenocarcinoma pancreático ductal, associada à regulação negativa da proteína SERP1, induziu apoptose via NF- $\kappa$ B (Ma *et al.*, 2017).



**Figura 33.** Via de exportação de proteínas. As proteínas em vermelho encontram-se com expressão aumentada em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.

A via de **processamento de proteínas no retículo endoplasmático** apresentou um total de 18 proteínas com abundância aumentada de um total de 170 (Figura 34). Dentre as proteínas que estão com a abundância aumentada no retículo endoplasmático (RE), estão incluídas as lectinas chaperonas calnexina (**CNX**) e calreticulina (**CRT**) e sua co-chaperona **ERp57** associada, uma glicoproteína específica do tipo tioldissulfeto oxidorreductase que são responsáveis pela maturação de glicoproteínas no RE (Ellgaard *et al.*, 2003).

O padrão de abundância dessas proteínas são diferentes dependendo do tipo de câncer em que se encontram. Foi observado que a expressão elevada de calnexina está associado a um resultado clínico ruim em pacientes com câncer colorretal (Ryan *et al.*, 2016). Por outro lado, a superexpressão de calreticulina foi associado à sensibilização para a apoptose, enquanto que a diminuição dessa proteína tem efeito contrário (Arnaudeau *et al.*, 2002). Quanto à proteína ERp57, foi observado que esta

apresenta um importante papel na regulação da morte celular imunogênica. *ERp57* atua positivamente para a exposição da proteína CRT na superfície celular, desencadeando a resposta imune e facilitando a remoção de células apoptóticas, por outro lado, na ausência desta proteína, há inibição da translocação de CRT e a restauração da imunogenicidade é comprometida (Song *et al.*, 2021; Panaretakis *et al.*, 2008).

Outra importante função da ERp57 consiste na regulação da resposta à proteína não dobrada (*unfolded protein response* – UPR). Quando o RE está sob estresse em resposta a fatores intrínsecos como a ativação de oncogene ou a fatores extrínsecos (como hipóxia, produtos químicos ou nutrientes), proteínas mal dobradas podem se acumular no lúmen do RE e, na ausência de ERp57, a oxidação da proteína dissulfeto isomerase (PDI) é facilitada; esta oxidação ativa a cascata PERK/CHOP, resultando na apoptose dependente da via p-53 (Kranz *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2021). Um resumo desse processo pode ser observado na Figura 34.

Outro complexo que apresenta abundância aumentada associado ao RE é o OST (oligosacariltransferase). Este complexo está associado ao complexo translocon Sec61 mencionado anteriormente. Enquanto o Sec61 contribui, de uma forma resumida, na translocação de proteínas recém-traduzidas através de seu poro, as OTSs atuam na glicosilação ligada a asparagina (*N-linked glycosylation*), facilitando a interação com as chaperonas como calnexina e calreticulina, para garantir que seu dobramento esteja correto (Shibatani *et al.*, 2005; Braunger *et al.*, 2018).

Observou-se que quatro proteínas do complexo OST estavam com abundância aumentada em relação ao controle: a riboforina 1 (**Rpn1**), também identificada com OST1; a riboforina 2 (**Rpn2**), identificada com SWP1; dolichil-difosfooligosacarídeo

glicosiltransferase subunidade **DAD1** (*defender against cell death 1*), identificada também como OST2; dolichil-difosfoligossacarídeo glicosiltransferase subunidade 48 kDa **Ddost**, também identificada como WBP1.

A proteína Rpn1 compreende a maior parte do complexo OST e sua expressão elevada está associada a um prognóstico ruim para o câncer de mama. Por outro lado, foi observado que a supressão gênica (*knockdown*) dessa proteína resultou na inibição da proliferação e invasão de células de câncer de mama *in vitro*, além de induzir a apoptose celular por estresse no RE (Ding *et al.*, 2021). Ma e colaboradores (2020) demonstraram que a superexpressão de Rpn1 em camundongos aumenta os níveis da proteína COPS5 que consequentemente subregula os níveis da proteína p53. Entretanto, nos nossos resultados não foi observado aumento nos níveis de COPS5.

Quanto à proteína Rpn2, observou-se que sua expressão está elevada em vários tipos de cânceres como câncer de mama, câncer gástrico, cólon, entre outros. Além disso, em células de câncer de esôfago, a elevada expressão de Rpn2 induz a proliferação celular, migração e invasão de tecidos adjacentes ao tumor. Por outro lado, quando o gene Rpn é silenciado, há uma redução significativa da proliferação e migração celular, além da redução tumoral em modelo xenotransplantado (Li *et al.*, 2019). Em osteosarcoma, foi observado que a expressão elevada de Rpn2 está associada a um prognóstico ruim. Já o silenciamento do gene Rpn2 em células de osteosarcoma resultou também na diminuição da proliferação celular e do potencial invasivo, além de sensibilizar as células para o tratamento com quimioterápicos convencionais (Fujiwara *et al.*, 2014).

A proteína DAD1 foi identificada inicialmente como um gene supressor de morte celular (Nakashima *et al.*, 1993). A inibição desta enzima em células promelocíticas HL-60 pelo antibiótico e indutor de estresse do RE tunicamicina resulta em morte celular por apoptose, por outro lado, a sua expressão elevada está associada com bloqueio da apoptose e aumento da sobrevida tumoral. DAD1 também é regulado positivamente em várias outras linhagens de câncer como carcinoma hepocelular e colorretal, câncer de próstata, entre outros. Entretanto não é uma regra, visto que em câncer de pâncreas e de bexiga esta enzima se apresenta subregulada (Pérez-Sala e Mollinedo, 1995; Luo *et al.*, 2021). Indo além, observou-se que o uso do quimioterápico cisplatina regulou positivamente a expressão de DAD1 em células de câncer de ovário OVCAR-3, possivelmente contribuindo para resistência a cisplatina por parte dessa linhagem celular (Yoon *et al.*, 2010).

Ddost e ANXA5 (Anexina A5) quando superexpressas em carcinoma de células escamosas também foram associadas a uma redução no tempo para formação de metástases, além da diminuição da sobrevida em câncer cervical e da orofaringe (Shapanis *et al.*, 2021). Entretanto, no nosso trabalho, a ANXA5 (que não está representada nem compõe esta via) se encontra com a abundância diminuída quando as células foram tratadas com o peptídeo AN6, o que resulta em benefícios para a célula tumoral, visto que a expressão elevada de ANXA5 pode inibir a proliferação celular e desencadear apoptose (Li *et al.*, 2018).

Algumas proteínas que compõem o complexo NEF (nucleotide exchange factor) também presentes no RE apresentaram um padrão de abundância aumentada, a citar: **Hyou1** (*hypoxia up-regulated protein 1*), uma proteína que pertence ao grupo das proteínas de choque térmico (Hsp – heat shock protein) e atua como uma

chaperona, tendo um importante papel durante o estresse celular, em especial na privação de oxigênio. Em condição de hipóxia, ocorre a superexpressão de Hyou1 resultando na supressão da apoptose em razão da privação de oxigênio, além de favorecer a expressão e transporte do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para o RE, contribuindo para a angiogênese e, conseqüentemente, para a reoxigenação celular (Ozawa *et al.*, 2001; Stojadinovic *et al.*, 2007).

No câncer, em razão das suas propriedades já mencionadas, Hyou1 é abundantemente expressa em várias linhagens tumorais como câncer e ovário, carcinoma nasofaríngeo, câncer de mama, câncer de pulmão e vários outros, atuando na proliferação e metástase, reduzindo a apoptose e promovendo angiogênese tumoral (Rao *et al.*, 2021). Recentemente também observou-se que a superexpressão de You1 está associada à quimiorresistência em células de câncer de pulmão (Li *et al.*, 2021).

**BiP** (*binding immunoglobulin protein*), também identificada como Hspa5 (nome do gene) ou GRP78 (*78 kDa glucose-regulated protein*) é uma chaperona que, assim como algumas já citadas, atua no processamento de proteínas recém-sintetizadas com o intuito de garantir que estejam dobradas corretamente ou, em caso de problemas no processo de enovelamento das proteínas, que elas sejam descartadas para o proteassoma e que não acumulem no lúmen do RE (Enogieru *et al.*, 2019).

Avaliando o perfil quantitativo dessa proteína pelos dados de proteômica que obtivemos, foi possível observar que nas células tratadas a abundância de BiP foi aproximadamente duas vezes superior ao controle.

BiP é considerado o regulador principal da resposta à proteína não dobrada (UPR). Em razão do rápido crescimento e expansão das células tumorais, é comum a



ocorrência de hipóxia e privação de nutrientes como glicose. Da mesma forma que a expressão Hyou1 é estimulada por hipóxia, a expressão de BiP é estimulada pela privação de glicose (Li e Lee, 2006). Além disso, foi observado a presença elevada de BiP em tumores, estando esta proteína associada à sobrevivência das células tumorais, facilitando o enovelamento de proteínas, impedido o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE e atuando na manutenção da atividade lisossomal (Cerezo e Rocchi, 2017; Kim *et al.*, 2018).

Outra proteína que está intimamente relacionada com a Hyou1 e BiP é a **HSP90B1**, também identificada como endoplasmina e GRP94. Esta proteína quando tratada com o AN6 apresentou uma abundância aproximadamente 2,5 vezes superior ao controle.

Como as outras já mencionadas, HSP90B1 trata-se de uma chaperona que igualmente apresenta um importante papel na resposta UPR, contribuindo para homeostase proteica no RE. Entretanto, foi observado que essa proteína interage com receptores do tipo Toll (TLR) em linfócitos B (Liu e Li, 2008). Estudos mostram que HSP90B1 apresenta expressão elevada em vários tipos de tumores como câncer hepático, câncer de mama e de pulmão, além da indicação de prognóstico ruim (Cawthorn *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019).

As proteínas **PDIA1** (*protein disulfide isomerase family A*, também identificada como P4hb - *prolyl 4-hydroxylase,  $\beta$  polypeptide*), **PDIA4**, **PDIA6** e **Erp29** (*endoplasmic reticulum resident protein 29*) apresentaram abundância aumentada nas células tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle. Estas proteínas fazem parte do complexo proteínas dissulfeto isomerase (PDIs), atuam como oxirredutase e como chaperona. Suas funcionalidades conferem proteostase e

equilíbrio redox ao RE, além de vários outros efeitos biológicos como migração celular vascular, agregação plaquetária, remodelagem vascular e remodelagem do citoesqueleto das células do músculo liso (Kajihara *et al.*, 2020).

No que se refere ao câncer, foi observado que a expressão elevada de PDIA1 em glioma está associada a uma maior gravidade da doença, bem como um desfecho desfavorável (Zou *et al.*, 2017). Sun e colaboradores (2013) mostraram que PDIA1 quando superexpresso induz resistência ao glioblastoma multiforme tratado com o quimioterápico temozolomida e que o silenciamento gênico da PDIA1 restaura o efeito da droga, induzindo as células tumorais a apoptose. Dados disponíveis na literatura mostram resultados semelhantes com a proteína PDIA4, que atua protegendo células tumorais regulando negativamente a apoptose ao inibir a ativação das procaspases 3 e 7 (Kuo *et al.*, 2017). PDIA6 quando superregulado promove a proliferação de células e progressão do ciclo celular em células HeLa (Gao *et al.*, 2016). Também foi verificado que esta proteína induz resistência a cisplatina em células de adenocarcinoma de pulmão (Tufo *et al.*, 2014), já Erp29 quando superexpressa diminui os efeitos apoptóticos da doxorubicina em câncer de mama (Zang e Putti, 2010), por outro lado, atua como supressor de tumor suprimindo a transição epitélio-mesênquima e diminuindo a proliferação celular em câncer gástrico (Wu *et al.*, 2017).

TRAP (*Translocon-associated protein subunit alpha*) compreendem um complexo de proteínas que desempenham um importante papel na translocação de proteínas, visto que está localizado próximo à proteína translocon Sec61 mencionado anteriormente. Observamos que a proteína **Ssr1**, também identificada como TRAP-alfa ou ainda SSR-alfa, apresenta abundância aumentada nas células tratadas em

relação ao controle. No que se refere ao câncer, não foi encontrado dados na literatura referente a esta proteína em particular, entretanto, observou-se que a superexpressão da proteína Ssr3 em carcinoma hepatocelular está associado a um quadro agressivo e desfavorável (Huang *et al.*, 2018).

Outra proteína que apresenta abundância aumentada é a **Ubxn4** (*UBX domain-containing protein*), também identificada como Ubx2. Esta proteína faz parte do complexo Ubx, que por sua vez está envolvida no processo denominado de degradação de proteínas associadas ao RE denominado ERAD (*endoplasmic reticulum-associated protein degradation*). Resumidamente, esse processo consiste na ubiquitinação de proteínas mal enoveladas que posteriormente são levadas para o proteossoma para degradação (Stolz e Wolf, 2010). Embora não se tenha dados aprofundados sobre a sua função no câncer, a elevada expressão de Ubx4 não está associado com uma maior agressividade no carcinoma de pulmão de células não pequenas (Zeng *et al.*, 2020).

Além das proteínas com abundância aumentada relacionadas ao RE, também foram observadas quatro proteínas (p97/VCP, Lman1, Hasp90a e Capn2) com abundância diminuída associadas ao RE após o tratamento das células B16F10 com o peptídeo AN6, estas estão assinaladas em verde na Figura 34.

A proteína *transitional endoplasmic reticulum ATPase*, também identificada como TER-ATPase, *15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit* e *valosin-containing protein* é codificada a partir do gene VCP. Está relacionada com um grande número de atividades celulares como a regulação do ciclo celular, formação do envelope nuclear, reparo de DNA, expressão gênica, proteólise mediada por ubiquitina, entre outras (Vandermoere *et al.*, 2006; Ju *et al.*, 2009). A expressão elevada de p97 tem sido

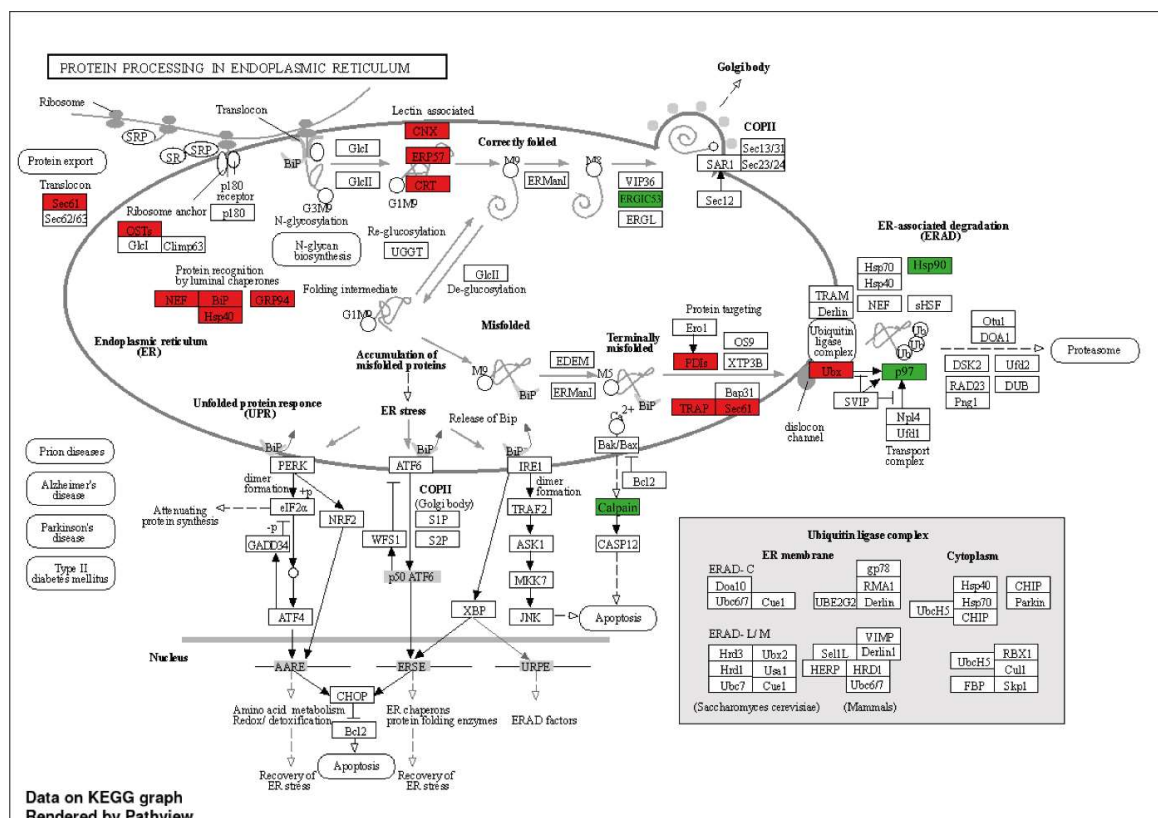
associada com vários tipos de cânceres, incluindo os prevalentes e com prognóstico ruim (Yamamoto et al., 2003; Tsujimoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). Por outro lado, foi observado que há uma variação da expressão de p97 em linhagens celulares de melanoma, e nem todas as linhagens ocorrem com expressão dessa proteína elevada (Smith *et al.*, 2006).

Outra proteína cuja abundância estava diminuída nas células tratadas foi a Hsp90ab1 (*heat shock protein HSP 90-beta*). Uma chaperona molecular que está relacionada a mais de vinte processos biológicos como regulação negativa do processo apoptótico, regulação positiva da ligação de proteínas, regulação positiva da telomerase, regulação negativa do processo metabólico de proteínas, entre outros. A expressão elevada de Hsp90ab1 juntamente com outras proteínas está correlacionada com um prognóstico ruim para carcinoma hepatocelular (Wang *et al.*, 2021). Embora sem a identificação da proteína específica, foi observado que Hsp90 é altamente expressa em melanoma humano, além de associado com a progressão da doença (McCarthy *et al.*, 2008).

**ERGIC-53** (*the ER-Golgi intermediate compartment protein-53*), também identificada com Lman1, é uma proteína que circula entre RE o complexo de Golgi, sendo conhecido como um receptor de carga de glicoproteínas, reconhecido por vários tipos de proteínas solúveis, incluindo fator de coagulação do sangue V e fator VIII, catepsina C, catepsina Z,  $\alpha$ 1-antitripsina e metaloproteinase-9 de matriz (MMP9) (Fu *et al.*, 2019). Roeckel e colaboradores (2009) mostraram que a supressão de Lman1 afetou a secreção da proteína A1AT (*antiangiogenic and growth-inhibiting protein a-1-antitrypsin*) e indicaram que este evento contribui para a tumorigênese do

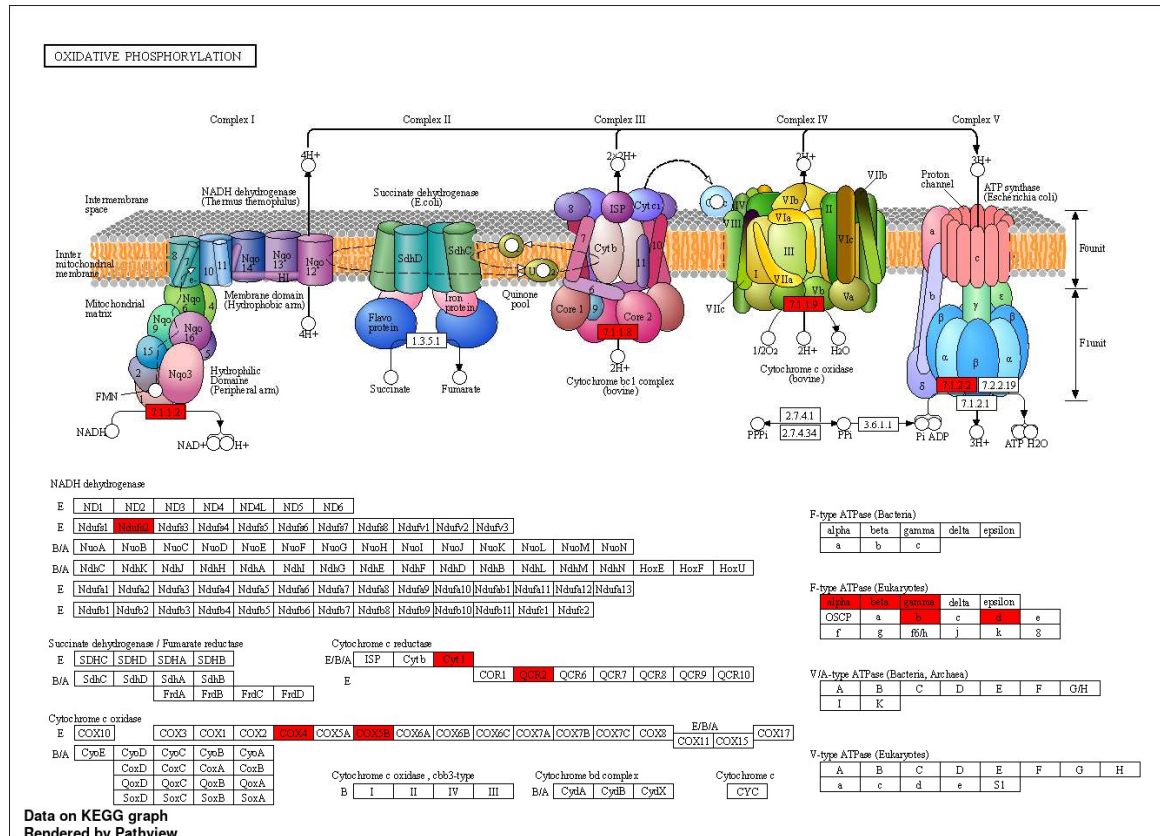
câncer de colón MSI-H. Algo similar pode ter ocorrido na células B16F10 tratadas com o AN6 em razão da abundância reduzida de Lman1.

A proteína **calpain** (*calcium-activated neutral proteinase 2*), identificada também por *capn2*, faz parte de um grupo de proteases que atuam em vários processos fisiológicos como remodelagem do citoesqueleto, sinalização celular e apoptose. Como mostrado na Figura 34, em condições de estresse, calpains atuam clivando alguns substratos que podem resultar em processos apópticos como a ativação da caspase-12. Calpains também podem clivar outras caspases, como mostrado por Storr e colaboradores (2011) e outros membros da família Bcl-2 como BAX.



**Figura 34.** Via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6. As proteínas / complexos que estão com a abundância aumentada estão destacadas em vermelho e as que estão com abundância diminuídas estão destacadas em verde.

A via da fosforilação oxidativa também estava enriquecida nas células tratadas com o peptídeo AN6 com dez proteínas anotadas com a abundância aumentada em relação ao controle (Figura 35).



**Figura 35.** Via da fosforilação oxidativa. As proteínas / complexos que estão com a abundância aumentada estão destacadas em vermelho em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.

Esta via é essencial para a vida de todos os animais pois é dela de onde é obtido a maior parte do ATP usado para manter o equilíbrio metabólico. As proteínas identificadas são: **Cyc1** (cytochrome c1, heme protein, mitochondrial), **Uqcrc2** (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein 2, mitochondrial), **Cox4i1** (cytochrome c oxidase subunit 4), **Cox5b** (cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial), **Atp5f1a** (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial), **Atp5f1b** (ATP synthase subunit beta, mitochondrial), **Atp5c1** (ATP synthase subunit gamma)

**Atp5pb** (*ATP synthase subunit b*), **Atp5pd** (*ATP synthase subunit d, mitochondrial*) e **Ndufs2** (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S2*).

A proteína Cyc1 é uma importante subunidade do complexo mitocondrial III. Quando analisamos sua função sobre o câncer, os dados da literatura são escassos quanto ao seu mecanismo de ação, mas é encontrado com expressão elevada em vários tipos de cânceres. Em câncer de mama, a expressão elevada de Cyc1 é correlacionado com taxa de sobrevida mais baixa, ao mesmo tempo o silenciamento do gene Cyc1 *in vitro* resulta em redução na migração celular (Han *et al.*, 2016). Em osteosarcoma o resultado foi semelhante, sendo observado ainda que o silenciamento de Cyc1 potencializou a liberação de citocromo c induzido por TRAIL, induzindo a ativação de caspase-9 e resultando em apoptose (Li *et al.*, 2014).

Uqcrc2 além de sua função também como subunidade do complexo mitocondrial III, sugere-se também que possa atuar como um oncogene ou gene supressor de tumor, visto que sua expressão elevada está associado com a invasão e metástase de vários tipos de cânceres como colorretal, câncer de mama e câncer testicular (Wang *et al.*, 2020).

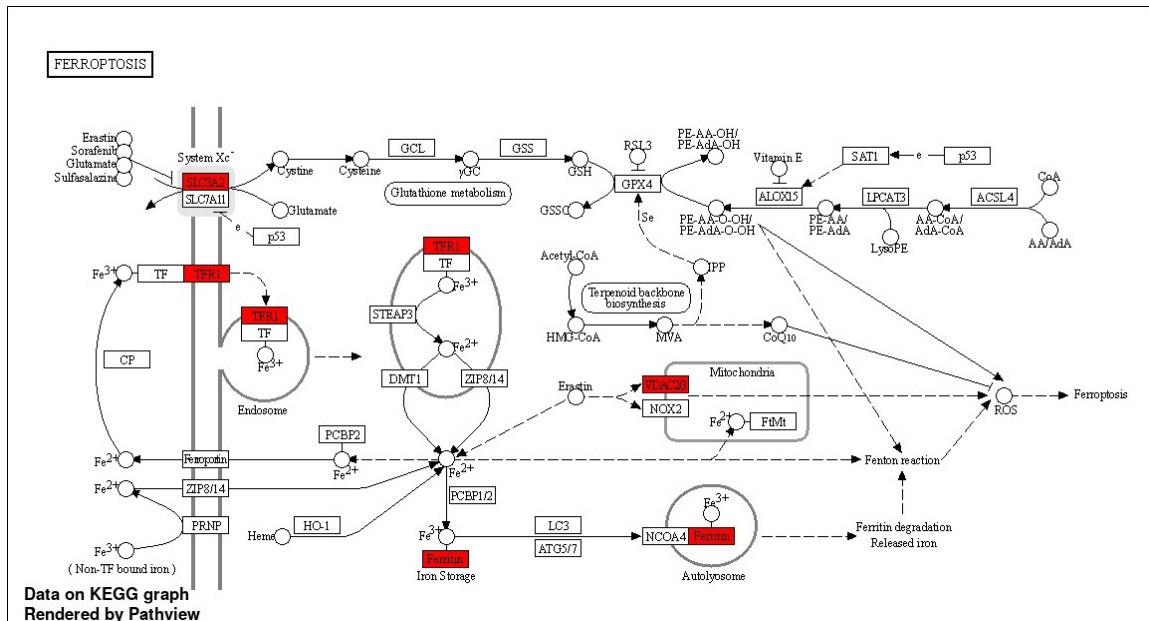
Cox4i1 e Cox5b fazem parte um complexo que, dentre outras funções, atuam como regulador de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria. Embora o excesso de ROS seja danoso à célula, o aumento de ROS associado a mudanças no estado redox celular alteram a atividade dos fatores de transcrição que estimulam a proliferação das células cancerígenas (Ishikawa *et al.*, 2008). Estas proteínas quando superexpressas estão associadas a vários tipos de cânceres como câncer medular de tireoide e câncer de mama. Já o silenciamento dos genes que codificam essas proteínas induzem as células a apoptose (Gao *et al.*, 2015; Bikas *et al.*, 2020).

Já a expressão de proteínas pertencentes ao complexo ATP sintase não é uniforme e a depender do tipo de câncer sua expressão aumentada pode influenciar positivamente ou negativamente o desenvolvimento e progressão do câncer, refletindo no tratamento e prognóstico (Repetto *et al.*, 2020; Atltinoz *et al.*, 2020). A proteína Ndufs2 quando regulada positivamente também está associada a progressão de vários tipos de cânceres, embora o mecanismo de ação relacionado a isso ainda seja desconhecido (Liu *et al.*, 2019).

Outra via onde foi observada o enriquecimento usando a ferramenta KEGG foi a ferroptose. A ferroptose é tipo de morte celular dependente de ferro, não apoptótica, que pode ser ativada em células cancerosas a partir de estímulos naturais ou agentes sintéticos como drogas/medicamentos (Dixon e Stockwell, 2019). Dentre as proteínas que compõem essa via, observamos que **TRFC** (*transferrin receptor protein 1*), também identificado como TFR1, **Slc3a2** (*solute carrier family 3 member 2*), **VDAC3** (*voltage-dependent anion-selective channel protein 3*) e a **Fth1** (*ferritin heavy chain*) estavam com a abundância aumentada em células B16F10 quando foram tratadas com o peptídeo AN6 (Figura 36).

A proteína TFRC atua na internalização de ferro na célula. Foi observado que o TFR1 está associadas a várias doenças como anemia e doenças degenerativas. Além disso, essa proteína também tem sido encontrada com a expressão elevada em vários tipos de tumores (Shen *et al.*, 2018). Já a proteína Slc3a2 atua no transporte de aminoácidos essenciais e, embora correlacionada com a ferroptose, a sua expressão elevada também está associada ao desenvolvimento e progressão de vários tipos de cânceres (Digomann *et al.*, 2019).





**Figura 36.** Via da ferroptose. As proteínas / complexos que estão com a abundância aumentada estão destacadas em vermelho em células da linhagem B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.

A proteína VDAC3 é encontrada na membrana externa da mitocôndria em forma de canal o qual permite a difusão de metabólitos entre a mitocôndria e o citoplasma e vice-versa. Em relação ao câncer, essa proteína é alvo da molécula erastina que causa sua inibição induzindo a morte celular por ferroptose, mas a correlação entre sua expressão estar aumentada ou não dependendo do tipo de câncer e/ou em tecidos normais ainda precisa ser elucidado. Ao menos em câncer de próstata, não houve variação significativa na expressão de VDAC3 em relação ao tecido não tumoral (Asmarinah *et al.*, 2014). Já a VDAC2 está associada a progressão tumoral, atuando com um regulador negativo da apoptose por meio da interação e inibição da proteína pro-apoptótica Bax (Reina *et al.*, 2016).

A ferritina é uma proteína responsável pelo armazenamento e regulação de ferro na célula e está envolvida em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos. Observou-se que a ferritina está com a expressão aumentada em

melanoma humano, além disso, em metástases a expressão de ferritina foi ainda maior do que em melanoma primário. Por outro lado, com a supressão gênica da ferritina em ensaios *in vitro*, as células foram mais suscetíveis ao estresse oxidativo e à apoptose (Baldi *et al.*, 2005).

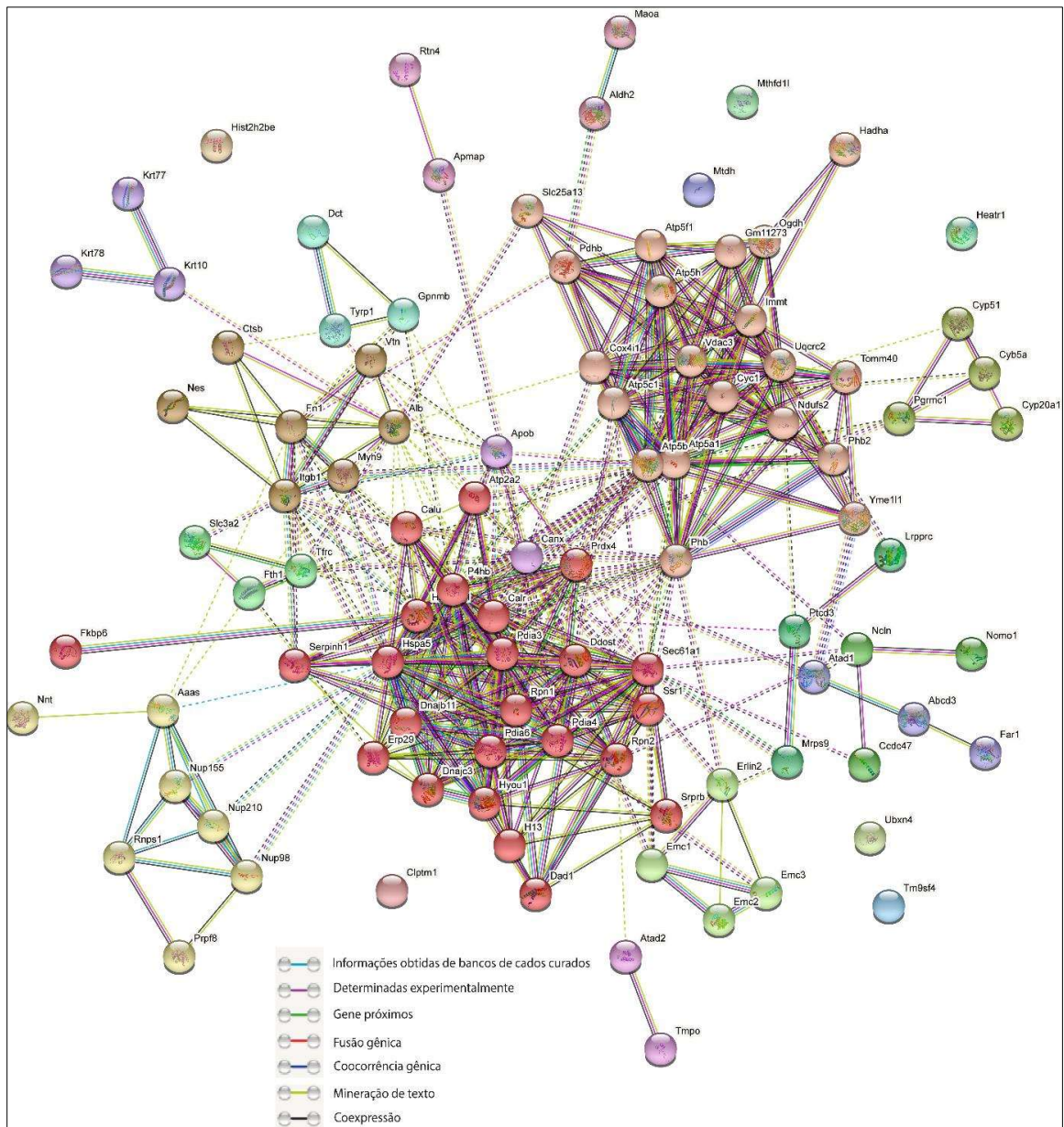
Uma proteína que está com uma abundância elevada nas células que foram tratadas com o peptídeo AN6, embora não classificada em nenhuma das vias KEGG, é a proibitina (PHB) (pode ser identificada na mapa de interação proteína-proteína obtido do STRING na Figura 37). Essa proteína está presente em vários locais da célula, incluindo núcleo, mitocôndria e membrana plasmática. Embora associada como um regulador do ciclo celular e supressor de tumor, sua expressão é geralmente muito elevada em vários tipos de tumores (Zhou e Qin, 2013).

Das 103 proteínas com abundância aumentada submetidas ao KEGG, seis não foram identificadas por falta de anotação de funcionalidade no banco de dados. As informações sobre essas proteínas são descritas a seguir utilizando dados disponíveis na literatura:

- Entrada A0A1D5RLM8 (nome do gene: **Gm11639**) – Trata-se de uma proteína do tipo *EF-hand* (que apresenta um domínio hélice-loop-hélice), uma característica comum das proteínas de ligação ao cálcio (informação obtida a partir de proteínas semelhantes no Uniprot);
- Entrada Q8VBZ3 (nome do gene: **Clptm1**) – Proteína transmembranar da fenda labial e palatina homóloga 1 é uma proteína transmembrana que, quando superexpressa em células A549 (adenocarcinoma pulmonar), atua inibindo a morte celular por apoptose induzida por estresse genotóxico provocado por drogas (James *et al.*, 2012);

- Entrada Q61213 (nome do gene: **Gag**) – Trata-se de uma proteína identificada como Gag, oriunda de retrovírus endógeno incorporado ao genoma de camundongos, sendo mais expressa em linhagens tumorais. A proteína *Gag* é associada à resposta imune (Dai *et al.*, 2020);
- Entrada D3YU17 (nome do gene: **Ncln**) – É uma proteína de um complexo translocon associado ao ribossomo envolvido no transporte de proteínas de membrana de múltiplas passagens para a membrana do retículo endoplasmático; interage com a proteína Nomo1;
- Entrada Q80WJ7 (nome do gene: **Mtdh**) – É uma proteína localizada na membrana do retículo endoplasmático e membrana nuclear que, quando sua expressão está aumentada, contribui para aumentar a agressividade e redução do prognóstico de vida no câncer de mama (Tokunaga *et al.*, 2014). Além disso, a superexpressão dessa proteína também está associada à resistência ao trastuzumabe, um anticorpo monoclonal usado no tratamento de câncer de mama (Du *et al.*, 2014). A expressão aumentada dessa proteína já foi observada para outros tipos de câncer como melanoma, hepatoma e glioma (Kang *et al.*, 2004);
- Entrada Q6GQT9 (nome do gene: **Nomo1**) – Nomeada de modulador nodal 1, esta proteína atua como componente complexo translocon associado ao ribossomo envolvido no transporte de proteínas de membrana de múltiplas passagens para a membrana do retículo endoplasmático; interage com a proteína *Ncln*, citada anteriormente. Recentemente observou-se que a proteína *Nomo1* apresenta um papel

crítico para sustentar a morfologia do retículo endoplasmático (Amaya *et al.*, 2021).



**Figura 37.** Análise de interação proteína-proteína usando o STRING DB de proteínas com a abundância aumentada em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.

Quanto às proteínas com expressão diminuída, um total de 139 entradas foram identificadas em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle. A lista de todas essas proteínas estão identificadas na Tabela 5 (Anexos)

A lista de 139 proteínas subreguladas foram submetidas no servidor KEGG para análise de enriquecimento. As vias que foram identificadas como enriquecidas usando a ferramenta KEGG estão listadas na Tabela 4. Como já citando anteriormente, para as proteínas com abundância reduzida, as principais vias reguladas estão relacionadas com a biossíntese / metabolismo de moléculas pequenas como aminoácidos.

**Tabela 4.** Enriquecimento de vias usando a ferramenta KEGG contendo proteínas com a expressão diminuída em células B16F10 após o tratamento com o peptídeo AN6.

Vias metabólicas	Nº de proteínas identificadas	Nº de proteínas da via	Razão de enriquecimento	Enriquecimento (FDR)
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	2	8	40.2	8.6E-03
Cysteine and methionine metabolism	8	52	24.8	8.1E-08
2-Oxocarboxylic acid metabolism	3	20	24.1	3.2E-03
Galactose metabolism	4	32	20.1	7.3E-04
Biosynthesis of amino acids	9	78	18.6	8.1E-08
One carbon pool by folate	2	19	16.9	3.3E-02
Arginine biosynthesis	2	20	16.1	3.5E-02
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3	31	15.6	8.4E-03
Citrate cycle (TCA cycle)	3	32	15.1	8.6E-03
Carbon metabolism	11	120	14.8	4.2E-08
Pyruvate metabolism	4	44	14.6	2.4E-03
Pentose phosphate pathway	3	33	14.6	8.7E-03
Phenylalanine metabolism	2	22	14.6	3.9E-02
Pentose and glucuronate interconversions	3	35	13.8	1.0E-02
Proteasome	4	47	13.7	2.9E-03
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3	38	12.7	1.2E-02
Folate biosynthesis	2	26	12.4	4.7E-02
Arginine and proline metabolism	4	54	11.9	4.3E-03
Spliceosome	8	129	10	4.4E-05
Glycolysis / Gluconeogenesis	4	66	9.8	7.2E-03
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	3	50	9.7	2.3E-02
Ribosome	7	130	8.7	3.4E-04

RNA transport	8	172	7.5	2.8E-04
Glutathione metabolism	3	71	6.8	4.3E-02
MRNA surveillance pathway	4	97	6.6	2.0E-02
Ribosome biogenesis in eukaryotes	3	78	6.2	5.0E-02
Tight junction	6	163	5.9	5.8E-03
AMPK signaling pathway	4	124	5.2	3.8E-02
Protein processing in endoplasmic reticulum	4	170	4.7	2.5E-02
Necroptosis	5	174	4.6	2.6E-02
Focal adhesion	5	200	4	3.9E-02
Proteoglycans in cancer	5	201	4	3.9E-02
Regulation of actin cytoskeleton	5	219	3.7	4.8E-02

Das 139 proteínas com abundância diminuída submetidas ao KEGG, 6 não tinham informações depositadas neste banco de dados e foram inseridas algumas informações manualmente a partir de dados da literatura. São elas:

- Entrada O35841 (nome do gene: **API-5**) - Trata-se do inibidor de apoptose 5 (*apoptosis inhibitor 5*). É uma proteína nuclear que possui uma potente atividade antiapoptótica e é comumente encontrada com a expressão elevada em vários tipos de tumores (Coci *et al.*, 2012);
- Entrada A0A7G9TMG4 (nome do gene: **Gag**) – Como mencionado anteriormente, trata-se de uma proteína identificada como Gag, oriunda de retrovírus endógeno incorporado ao genoma de camundongos, sendo mais expressa em linhagens tumorais. A proteína Gag é associada com a resposta imune (Dai *et al.*, 2020). Foi feito um alinhamento desta proteína com a outra de mesmo nome encontrada com expressão aumentada para verificar que se tratava de duas proteínas distintas;
- Entrada Q9CQC6 (nome da gene: **Bzw1**) – *Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1* é uma proteína membro de uma família de fatores

de transcrição. Em humano pode ativar a transcrição do gene da histona H4 e atua com outros fatores de transcrição auxiliando no controle do ciclo celular (Li *et al.*, 2009);

- Entrada Q3U4S7 (nome do gene: **Csde1**) - Na espécie *Mus musculus* esta proteína está como não caracterizada. Em humanos, a proteína é nomeada *cold shock domain containing E1*. Trata-se de uma proteína ligante de RNA que atua em uma ampla variedade de efeitos biológicos como ciclo celular, apoptose, diferenciação (Guo *et al.*, 2020);
- Entrada Q3TGU7 (nome do gene: **Pa2g4**) – Nomeada de proteína 2GA4 associada à proliferação (*proliferation-associated protein 2G4*) e seus níveis de expressão estão correlacionados com alguns tipos de cânceres como neuroblastoma, cervical, cérebro, mama, próstata, pancreático, hepatocelular. Esta proteína possui duas isoformas e ambas regulam o crescimento celular, entretanto, dependendo do tecido, esta proteína pode funcionar como um supressor de tumor ou como um oncogene (Stevenson *et al.*, 2020).
- Entrada Q8BK64 (nome do gene: **Ahsa1**) - Nomeada de *activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1*. É encontrada no citosol e retículo endoplasmático e sua função, como o nome sugere, estimula a atividade ATPase de HSP90. Foi observado que sua função foi ativada durante a apoptose induzida por cisplatina em carcinomas de pulmão, ovário e esôfago. Por outro lado, observou-se que esta proteína é encontrada com expressão elevada em linhagens células de osteosarcoma e o silenciamento do gene que codifica essa proteína resulta em inibição do crescimento, migração e invasão celular, além de induzir a apoptose (Lessa *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2016)

É sabido que a progressão do câncer depende do metabolismo do carbono, incluindo a glicólise e o ciclo do ácido cítrico (ou tricarboxílico). Além disso, o metabolismo do carbono abrange os ciclos do folato (precursor do ácido fólico / vitamina A) e da metionina, permitindo que as células gerem unidades de carbono (ou grupos metil), que apresenta uma grande importância no metabolismo celular, como por exemplo na biosíntese de nucleotídeos de purina e pirimidina, ambos essenciais para a síntese de ácidos nucléicos (Newmann e Maddocks, 2017).

A metilação, por sua vez, é importante no processo tumoral visto que a expressão de muitos genes são controladas dessa maneira. Por exemplo, o processo de regulação gênica de promotores de genes supressores de tumor pode ser regulada pela hipermetilação do DNA, reduzindo assim sua expressão e facilitando a progressão tumoral (Kullis e Esteller, 2010).

Diante do exposto, observamos resultados antagonistas quando avaliamos estes resultados (referentes as vias metabólicas de compostos pequenos mostrados na Tabela 4), em relação aos mostrados anteriormente sobre as vias reguladas positivamente nas condições de tratamento.

Muitas proteínas que atuam nessas vias que observamos como subreguladas geralmente são encontradas com a expressão elevada em alguns tipos de canceres e estão associadas com a progressão tumoral. Por exemplo, a enzima malato desidrogenase (**Mdh1**), que catalisa a interconversão de oxaloacetato e malato (na via do metabolismo do carbono), é encontrada com expressão elevada em câncer de pulmão de células não pequenas quando comparada ao tecido normal e está associada com um prognóstico desfavorável. Já o *knockdown* dessa proteína resultou na morte das células cancerosas sem causar danos nas células normais (Zhang *et al.*,



2017). Também foi observado que Mdh1 está com expressão elevada em várias linhagens celulares de melanoma (Lee *et al.*, 2019), embora a linhagem usada no nosso trabalho não estava inclusa. Cholewa e colaboradores (2014), usando uma abordagem proteômica, observou que células de melanoma humano A375 tratadas com a molécula Volasertib, um inibidor da enzima PLK1 (*polo-like kinase 1*), apresentou uma diminuição de diversas proteínas metabólicas, inclusive Mdh1.

Dentre as outras proteínas da via do metabolismo do carbono com a expressão diminuída, temos: **Mdh2** (maleato desidrogenase 2), **Phgdh** (d-3-fosfoglicerato desidrogenase), **Gapdh** (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) **Tkt** (transcetolase), **Psat1** (fosfoserina aminotransferase), **Pgk1** (fosfoglicerato quinase 1), **Pgls** (6-fosfogluconolactonase), **Got1** e **Got2** (aspartate aminotransferase), **Aco2** (aconitase).

Dentre as vias destacadas na Tabela 4, as vias AMPK e da Necroptose, embora sinalizadas com o FDR superior a 0,05 (0,07 e 0,1, respectivamente), merecem destaque em razão do que sua regulação pode influenciar na compreensão dos resultados apresentados nesta tese.

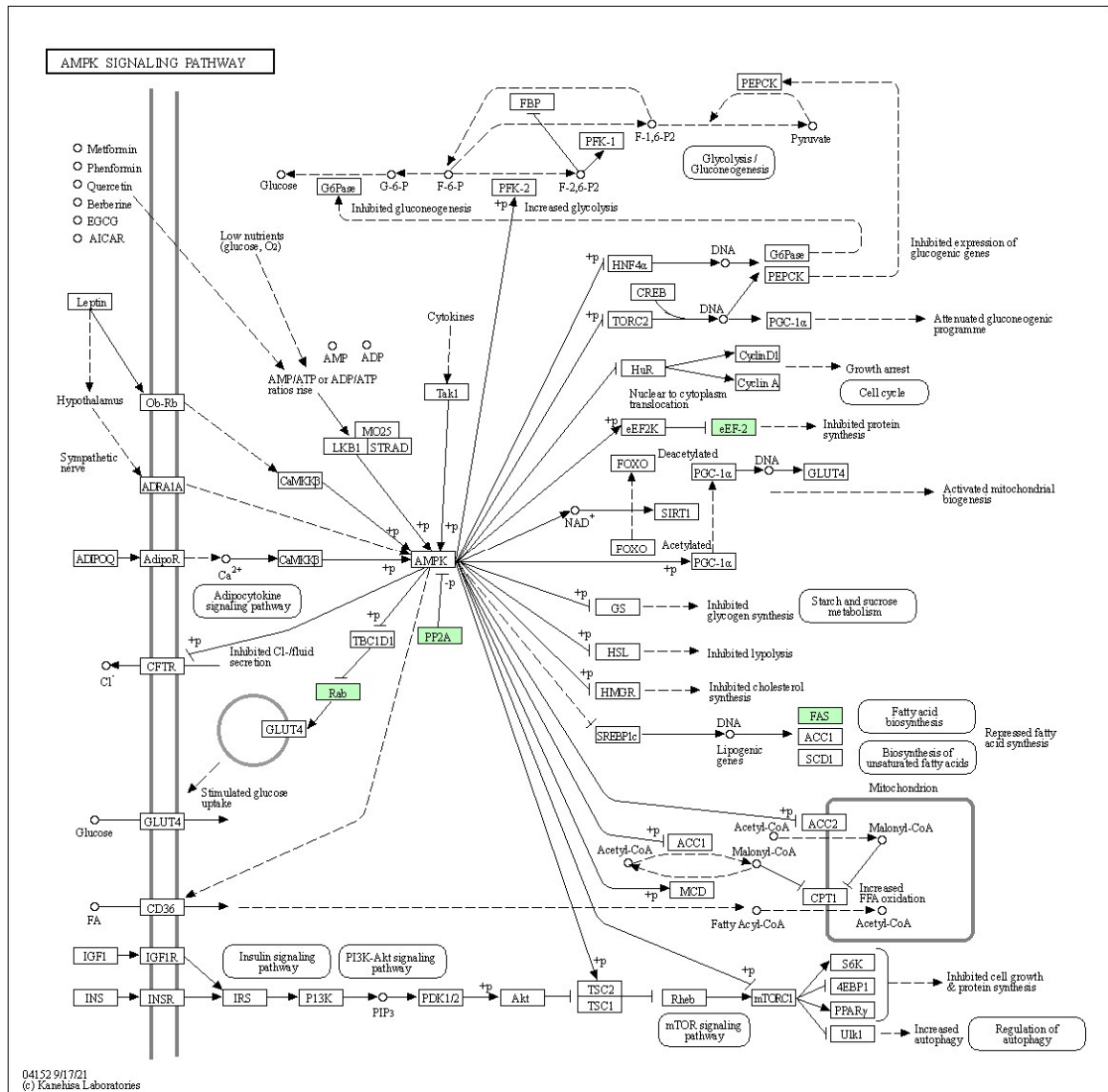
A via AMPK (proteína quinase ativada por AMP) é um dos reguladores centrais do metabolismo celular dos eucariotos e sua regulação determina etapas críticas em vários processos como a regulação do crescimento, reprogramação do metabolismo e até mesmo a autofagia (Mihaylova e Shaw, 2011).

Neste trabalho, observamos que quatro proteínas que estão envolvidas na via AMPK foram identificadas com a abundância diminuída nas células tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle, são elas: **Fasn** (ácido graxo sintase), **Eef2** (*Tr-type G domain-containing protein*) também identificado como fator de

alongamento eucariótico 2, **Ppp2cb** (*serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit*), também identificada como PP2A e **Rab14** (*ras-related protein Rab-14*). Estas proteínas estão representadas em verde na Figura 38.

A proteína Fasn atua, como o próprio nome sugere, na síntese de ácidos graxos e tem um papel importante na lipidogênese. Sua expressão geralmente é elevada em vários tipos de tumores, inclusive em melanoma humano e melanoma murino B16F10, a mesma usada nesse trabalho. Por outro lado, a inibição de Fasn reduz a proliferação e induz as células a apoptose (Carvalho *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2011, Bian *et al.*, 2015).

O fator de alongamento eucariótico Eef2 é uma proteína envolvida na etapa de alongamento da cadeia peptídica. Dada esta característica, as células controlam a tradução regulando a atividade de Eef2 em várias condições biológicas como a progressão do ciclo celular e estresse genotóxico, por exemplo. Essa proteína também foi identificada com a expressão aumentada em vários tipos de tumores câncer de pulmão, esôfago, mama, entre outros (Oji *et al.*, 2014). Quando foi feito silenciamento do gene Eef2 em células de câncer gástrico *in vitro* resultou na parada do ciclo celular em G2/M e inativação dos reguladores de Eef2 (Akt e cdc2) (Nakamura *et al.*, 2009).



**Figura 38.** Via de sinalização AMPK. As proteínas destacadas em verde estão com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle.

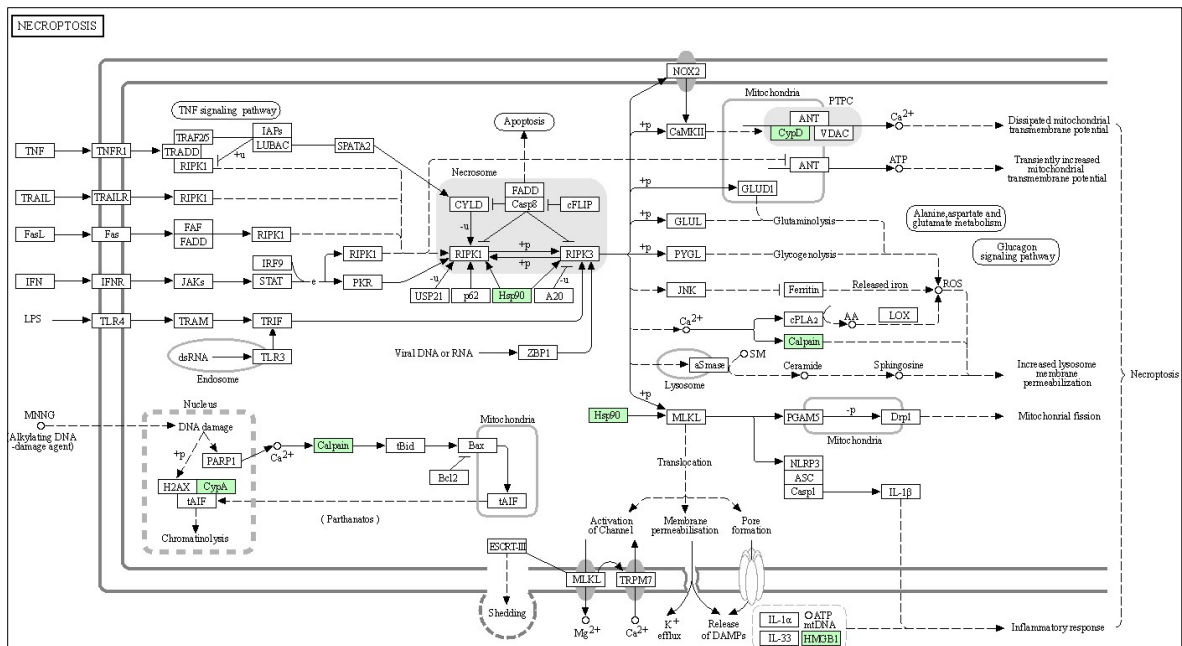
A proteína PP2A é uma fosfatase e desempenha um papel importante em vários processos celulares, como proliferação celular, transdução de sinal e apoptose. A expressão elevada desta proteína foi observada em vários tipos de tumores como câncer de mama, pulmão (Seshacharyulu *et al.*, 2001). Entretanto não está muito claro os efeitos da diminuição de sua expressão.

Já a proteína Rab14 faz parte de uma família de proteínas que se associam a ras, uma importante família de proteínas frequentemente muito expressas em vários

tipos de cânceres. Foi observado que Rab14 é encontrada com expressão aumentada em câncer de mama comparado aos tecidos normais. Já o seu silenciamento resulta na inibição da proliferação, migração e invasão celular usando modelos *in vitro* de câncer de mama (Yu *et al.*, 2016).

A necrose costuma ser visto como um processo acidental e desregulado de morte celular. Entretanto, descobriu-se que a via da necrose programada, posteriormente nomeada de necroptose, envolve um sofisticado sistema de ativação gênica que culmina na morte celular. Além disso, descobriu-se que a morte celular com aparência necrótica contribui para o desenvolvimento embrionário e homeostase do tecido adulto, pode ser induzida por receptores específicos da membrana plasmática e a necrose pode ser regulada por fatores genéticos, epigenéticos e farmacológicos (Galluzzi e Kroemer, 2008). Dentre as algumas das proteínas envolvidas na necroptose estão RIP1, ciclofilina D (cypD), PARP1, e fator indutor de apoptose (AIF).

Neste trabalho, observamos que algumas proteínas que compõem a via da necroptose foram identificadas com a expressão diminuída (Figura 39). As proteínas identificadas são: **CypD** (*peptidyl-prolyl isomerase D*), também identificada como PPID, **CypA** (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A*), também identificada como PPIA, **CAPN2** (calpaina 2), **Hsp90ab1** (*heat shock protein HSP 90-beta*) e **Hmgb1** (*high mobility group protein B1*).



**Figura 39.** Via de sinalização da necroptose. As proteínas destacadas em verde estão com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 em relação ao controle.

A CypD é uma proteína mitocondrial conhecida por regular o poro de transição da permeabilidade mitocondrial, um poro de grande condutância inespecífico cuja abertura leva à dissipação do potencial da membrana mitocondrial interna, perda de produção de ATP e, eventualmente, morte celular (Amanakis e Murphy, 2020).

A proteína CypA está presente em vários locais na célula. Foi observado que esta proteína é capaz de promover angiogênese e proliferação de células endoteliais e que sua expressão está aumentada em vários tipos de tecidos tumorais (Li *et al.*, 2006). Foi observado que CypA está superexpressa em melanoma metastático (linhagem SK-MEL-2) em detrimento ao tumor primário (Al-Ghoul *et al.*, 2008). Entretanto neste trabalho, essa proteína está subregulada em células tratadas com o peptídeo AN6.

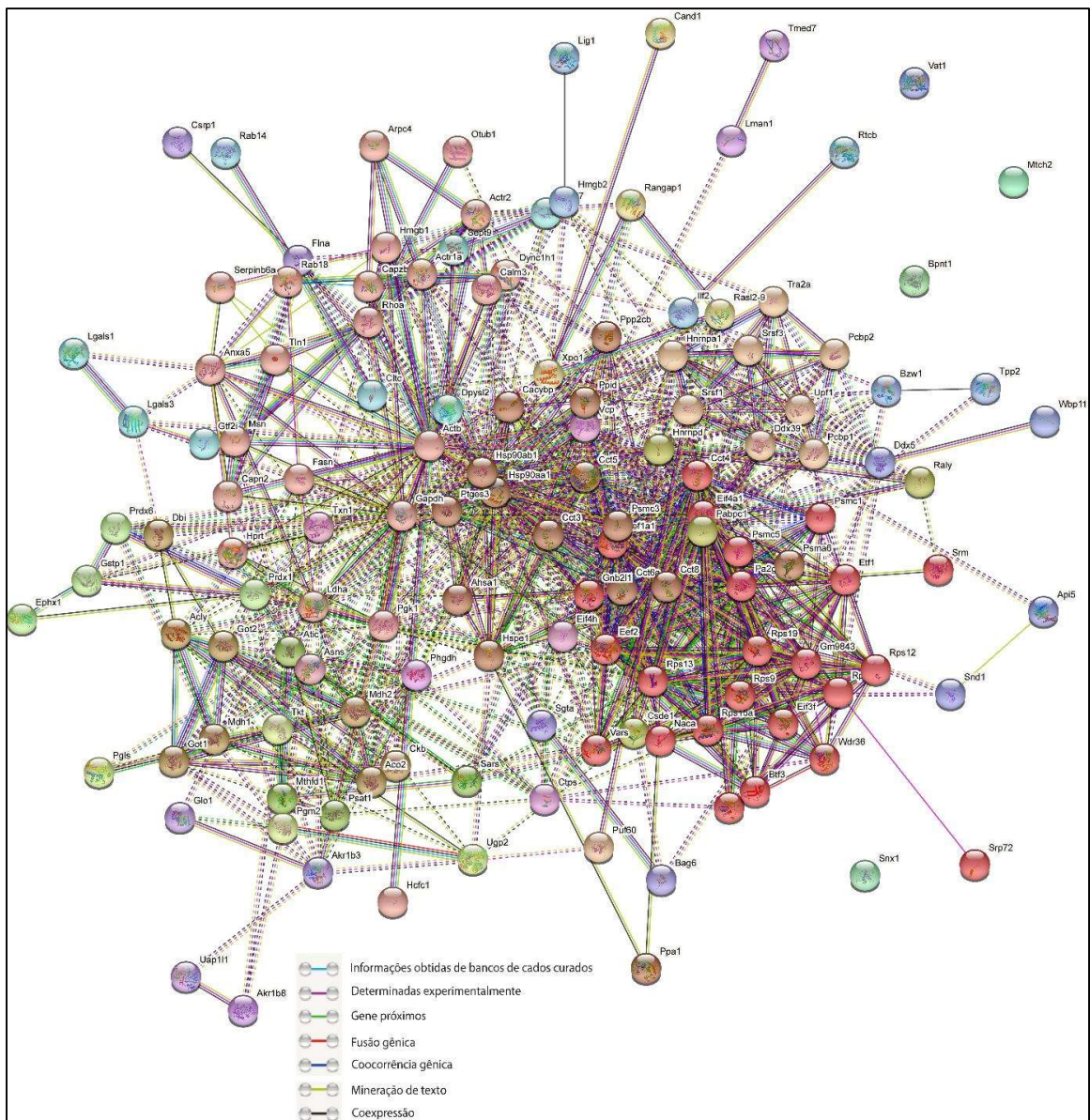
A proteína calpaina, como mencionada anteriormente, possui uma série de atividades biológicas nas células. Inclusive, foi observado que essa proteína é capaz de mediar a permeabilização da membrana lisossomal, resultando no lançamento de hidrolases no citosol e, desta forma, contribuindo para a morte celular necrótica (Vandenabeele, 2010). Todavia, não está claro se a sua abundância é um fator determinante para esse processo acontecer.

A proteína Hsp90ab1 que está presente nessa via também já foi mencionada anteriormente por estar relacionada em vias proteicas associadas ao RE. Além disso, a sua inibição está relacionada com a apoptose, como já comentado. Entretanto, no contexto da necroptose, observou-se que a inibição da Hsp90 pode atuar inibindo este “mecanismo” pelo fato de que a RIPK1 (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), um importante regulador da morte celular, é dependente de Hsp90 (Jakobsen e Silke, 2016). Desta forma, contextualizando com o nosso trabalho, a expressão reduzida desta proteína (ou grupo de proteínas) nas células tratadas com o peptídeo AN6 pode também estar relacionado com algum mecanismo de inibição da necroptose.

Outra proteína identificada com abundância diminuída nas células tratadas com o peptídeo AN6 foi a Hmgb1. Localizada majoritariamente no núcleo celular, esta proteína está relacionada com uma enorme quantidade de funções moleculares e processos biológicos. No núcleo, Hmgb1 atua como uma chaperona de DNA e participa no reparo de DNA e manutenção do telômero, na mitocôndria atua aumentando a autofagia e inibindo a apoptose. No fluido extracelular regula a inflamação, migração, proliferação, autofagia e apoptose (Kang *et al.*, 2013).

Esta proteína costuma ser liberada principalmente quando ocorre morte celular não programada.

O mapa de interação proteína-proteína obtido com o uso da ferramenta String usando as proteínas com a abundância diminuída está representado na Figura 40. Como mostrado anteriormente, a maioria das proteínas com regulação negativa estão relacionadas ao citosol, diferentemente do grupo de proteínas com abundância aumentada, onde a maioria das proteínas identificadas se concentraram em dois *clusters* principais de proteínas presentes no retículo endoplasmático e mitocôndria.



**Figura 40.** Análise de interação proteína-proteína usando o STRING DB de proteínas com a abundância diminuída em células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6.

O *cluster* em vermelho é composto por 24 proteínas que estão relacionadas em sua maioria com o processo de biosíntese de proteínas, como o fator de alongamento 1 alfa 1 (Eef1a1), proteína ribossomal 40S (Rps19) e fatores relacionados à tradução de proteínas em eucariotos como Eif4a1 e Eif3f. O *cluster* marrom contém 22 proteínas e está relacionado à actina (Actb) e seus constituintes compreendem proteínas estruturais presentes em estruturas ligadas a membrana e citoplasma. Já o



*cluster* marrom escuro (contendo 15 proteínas) mostra as moléculas com função chaperona, podendo ser encontradas no citosol como Cct3 e Cct8 e chaperonas mitocondriais como Hspe1 e Hsp9a.

#### **5.4. Considerações sobre os resultados de citometria de fluxo e proteômica**

Como mostrado nos experimentos usando a citometria de fluxo, os resultados indicaram que os peptídeos promoveram vários efeitos nas células. Era esperado que algumas hipóteses levantadas nos ensaios de citometria fossem verificadas com os experimentos de análise proteômica. Por exemplo, os ensaios com anexina e potencial de membrana mitocondrial nos sugeriram que mecanismos de morte celular envolvendo apoptose poderiam estar ocorrendo e o objetivo da proteômica era avaliar se o que estávamos vendo nos ensaios de citometria iriam se confirmar. Entretanto, nenhuma proteína relacionada diretamente com processos apoptóticos (caspases, Bim, Bax, Bcl-2, citocromo C, fasL, entre outras) foram observadas com a abundância aumentada nas células tratadas, mesmo sendo visível a presença de células mortas e conseqüente redução no número de células em relação ao grupo controle.

A abordagem que adotamos, de avaliar os efeitos de peptídeos com atividade deletéria sobre células de câncer usando a proteômica, é escassa na literatura. Apenas um artigo publicado seguindo essa linha foi encontrado até o presente momento: trata-se de uma análise proteômica comparativa do efeito de dois peptídeos nomeados de caerin 1.1 e caerin 1.2 (isolados inicialmente da secreção do anfíbio *Ranoidea splendida*) sobre células TC-1 (câncer de pulmão murino) transformadas com HPV16 E6 e E7 (Ni et al., 2018). Embora os autores também observaram com o emprego da citometria de fluxo a marcação positiva com anexina, a análise

proteômica não corroborou a presença de proteínas reguladas que pudessem estar envolvidas em processos relacionados com a apoptose, assim como também observamos neste trabalho.

Diante do exposto, há de se considerar a hipótese de que a ação dos peptídeos sobre células tumorais avaliados neste trabalho, em especial o AN6, ocorra por mecanismos diferentes dos convencionais sobre o qual ainda não temos conhecimento. Ou ainda, a que considero mais plausível, de que a ação se dê por rompimento da membrana plasmática, de forma rápida e sem que haja a regulação do metabolismo celular para ocasionar a morte celular.

Acredito que o acoplamento de algum fluoróforo ao peptídeo e sua avaliação em tempo real usando, por exemplo, microscopia confocal poderá trazer repostas para estas questões.

Quando olhamos para os resultados da análise proteômica, é possível notar que a expressão aumentada de proteínas relacionadas principalmente ao RE e mitocôndria faz parecer que as células estão tentando progredir, digamos, de uma maneira mais agressiva, pelo fato de que algumas proteínas relacionadas até mesmo a mecanismos de resistência a drogas foram identificadas.

Por outro lado, algumas vias metabólicas importantes para o desenvolvimento celular como a síntese de moléculas pequenas a base de carbono e a síntese de aminoácidos, por exemplo, estavam com a abundância diminuída, o que acaba pesando contra o que foi mencionado anteriormente.

Dito isto, mais estudos são necessários para melhor compreender os resultados aqui apresentados, bem como a incorporação de outras metodologias que também possam auxiliar na verificação de proteínas específicas como análises por

qPCR e Western blot, por exemplo, podem nos fornecer pistas importantes sobre o entendimento do mecanismo de ação de peptídeos sobre células tumorais.

## 5.5. Conclusões

A relação entre estrutura e atividade biológica dos peptídeos foi perceptível pela modificação de vários parâmetros como carga líquida, anfipacidade, hidrofobicidade e extensão da cadeia peptídica, embora tenhamos observado que a modulação tanto da atividade antibacteriana quanto da atividade citotóxica é multifatorial.

Quanto a essa parte do trabalho, podemos concluir que:

Os análogos propostos que apresentam um sutil aumento de carga líquida e/ou hidrofobicidade resultaram em ganho de atividade e manutenção da seletividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*;

Quando a carga líquida é aumentada e, conseqüentemente, a hidrofobicidade é reduzida, os peptídeos são substancialmente mais ativos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e também contra células eucarióticas;

A porção C-terminal da pentadactilina é essencial na atividade biológica contra bactérias e contra células eucarióticas;

Os análogos 4, 6 e 8 apresentaram uma tendência de seletividade para as células cancerosas.

Na avaliação dos efeitos biológicos do peptídeos sobre células tumorais, usamos duas abordagens distintas: na primeira, foi usada a citometria de fluxo para avaliar os efeitos dos análogos AN6 e AN8 sobre linhagens celulares B16F10 e MCF-7. Com os resultados obtidos nesta etapa é possível concluir que:

Os peptídeos AN6 e AN8 foram capazes de alterar significativamente o tamanho das células B16F10 e MCF-7;

Houve uma marcação significativa em ambas as células com os fluoróforos Anexina V-FITC, que sugere a ocorrência de apoptose, e Iodeto de propídio, que se liga ao DNA em caso de rompimento da membrana plasmática, indicando necrose. A maioria das células tiveram uma marcação dupla, reforçando a possibilidade de necrose com ambos os peptídeos testados;

A avaliação de multicaspases, realizada somente com a linhagem B16F10, mostrou um percentual extremamente elevado de células positivas para tais enzimas, além de marcação com 7-AAD, indicando dano na membrana plasmática;

Ambos os peptídeos induziram significativamente a despolarização do potencial de membrana mitocondrial tanto nas células B16F10 quanto na linhagem MCF-7;

Quanto à permeabilidade da membrana lisossômica, observamos alteração significativa somente na linhagem MCF-7 tratada com ambos os peptídeos;

O tratamento de ambas as linhagens de células com os peptídeos AN6 e AN8 resultaram em fragmentação de DNA. Já as alterações no ciclo celular foram observadas majoritariamente na linhagem B16F10;

Em relação à análise proteômica, podemos concluir que:

Uma grande parte das proteínas identificadas com a abundância aumentada nas células B16F10 tratadas com o peptídeo AN6 estão relacionadas com o retículo endoplasmático e mitocôndria;

Algumas das proteínas identificadas estão associadas com a regulação negativa da apoptose e progressão tumoral;

Não foram identificadas proteínas relacionadas com a morte celular com abundância aumentada;

Em relação às proteínas com abundância diminuída, uma parte significativa são relacionadas com o citosol;

A maioria das vias enriquecidas com proteínas com a abundância diminuída estão relacionadas com o metabolismo de pequenas moléculas como aminoácidos e compostos a base de nitrogênio e carbono;

## 6. Referências bibliográficas

ALTINOZ, M. A.; UCAL, Y.; YILMAZ, M. C.; KIRIS, İ. et al. Progesterone at high doses reduces the growth of U87 and A172 glioblastoma cells: Proteomic changes regarding metabolism and immunity. **Cancer Medicine**, 9, n. 16, p. 5767-5780, 2020.

AMANAKIS, Georgios; MURPHY, Elizabeth. Cyclophilin D: an integrator of mitochondrial function. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 595, 2020.

AMAYA, C.; CAMERON, C. J.; DEVARKAR, S. C.; SEAGER, S. J. et al. Nodal modulator (NOMO) is required to sustain endoplasmic reticulum morphology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 2, 2021.

APPELQVIST, H.; WÄSTER, P.; KÅGEDAL, K.; ÖLLINGER, K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target . **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 214-226, 2013.

ARNAUDEAU, S.; FRIEDEN, M.; NAKAMURA, K.; CASTELBOU, C. et al. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46696-46705, 2002.

ASMARINAH, A.; PARADOWSKA-DOGAN, A.; KODARIAH, R.; TANUHARDJA, B. et al. Expression of the Bcl-2 family genes and complexes involved in the mitochondrial transport in prostate cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 4, p. 1489-1496, 2014.

BALDI, A.; LOMBARDI, D.; RUSSO, P.; PALESCANDOLO, E. et al. Ferritin Contributes to Melanoma Progression by Modulating Cell Growth and Sensitivity to Oxidative Stress. **Clinical Cancer Research**, 11, n. 9, p. 3175-3183, 2005.

BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends in Biotechnology**. v. 26, n. 4, p. 210-217. 2008.

BIAN, Y.; YU, Y.; WANG, S.; LI, L. Up-regulation of fatty acid synthase induced by EGFR/ERK activation promotes tumor growth in pancreatic cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 612-617, 2015.

BIKAS, A.; JENSEN, K.; PATEL, A.; COSTELLO, J. et al. Cytochrome C oxidase subunit 4 (COX4): A potential therapeutic target for the treatment of medullary thyroid cancer. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2548, 2020.

BJELLQVIST, B.; HUGHES, G. J.; PASQUALI, C.; PAQUET, N.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J. C.; FRUTIGER, S.; HOCHSTRASSER, D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis**. v. 14, n. 10, p. 1023-31. 1993.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434-6451, 2008.

BRAUNGER, K.; PFEFFER, S.; SHRIMAL, S.; GILMORE, R. et al. Structural basis for coupling protein transport and N-glycosylation at the mammalian endoplasmic reticulum. **Science**, v. 360, n. 6385, p. 215-219, 2018.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 9, p. 3233, 2020.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, n. 3, p. 238. 2005.

CAO, C.; ZHOU, S.; HU, J. Long noncoding RNA MAGI2-AS3/miR-218-5p/GDPD5/SEC61A1 axis drives cellular proliferation and migration and confers cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma. **International Forum of Allergy & Rhinology**, 10, n. 8, p. 1012-1023, 2020.

CARVALHO, M. A.; ZECCHIN, K. G.; SEGUIN, F.; BASTOS, D. C. et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 11, p. 2557-2565, 2008.

CAWTHORN, T. R.; MORENO, J. C.; DHARSEE, M.; TRAN-THANH, D. et al. Proteomic Analyses Reveal High Expression of Decorin and Endoplasmic Reticulum (HSP90B1) Are Associated with Breast Cancer Metastasis and Decreased Survival. **PLOS ONE**, 7, n. 2, p. e30992, 2012.

CEREZO, M.; ROCCHI, S. New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. **Autophagy**, v. 13, n. 1, p. 216-217, 2017.

CERÓN, J. M.; CONTRERAS-MORENO, J.; PUERTOLLANO, E.; DE CIENFUEGOS, G. A. et al. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1494-1503, 2010.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **BBA-Biomembranes**. v. 1758, n. 9, p. 1184-1202. 2006.

CHEN, F.-Y.; LEE, M.-T.; HUANG, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. **Biophysical Journal**. v. 84, n. 6, p. 3751-3758. 2003.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 13, p. 12316-12329. 2005.

CHOLEWA, B. D.; PELLITTERI-HAHN, M. C.; SCARLETT, C. O.; AHMAD, N. Large-scale label-free comparative proteomics analysis of polo-like kinase 1 inhibition via the small-molecule inhibitor BI 6727 (Volasertib) in BRAFV600E mutant melanoma cells. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 11, p. 5041-5050, 2014.

COATES, A. R.; HALLS, G.; HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 1, p. 184-194, 2011.

CONLON, J. M. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. **Cell and Tissue Research**. v. 343, n. 1, p. 201-212. 2011.

CONLON, J. M.; AHMED, E.; CONDAMINE, E. Antimicrobial Properties of Brevinin-2-Related Peptide and its Analogs: Efficacy Against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 74, n. 5, p. 488-493. 2009.

CONLON, J. M.; IWAMURO, S.; KING, J. D. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1163, n. 1, p. 75-82. 2009.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; LUKIC, M. L.; FLATT, P. R. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**. v. 57, p. 67-77. 2014.

CSORDAS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of an hemolytic polypeptide from defensive secretion of European bombina species. **Monatshefte für Chemie**. v. 101,

DAI, Y. D.; DIAS, P.; MARGOSIAK, A.; MARQUARDT, K. et al. Endogenous retrovirus gag antigen and its gene variants are unique autoantigens expressed in the pancreatic islets of non-obese diabetic mice. **Immunology Letters**, v. 223, p. 62-70, 2020.

DAS, G. C.; HOLIDAY, D.; GALLARDO, R.; HAAS, C. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose–response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. **Cancer Letters**, v. 165, n. 2, p. 147-153, 2001.

DE ANDRADE, B.; LEÓN, J.; CARLOS, R.; DELGADO-AZAÑERO, W. et al. Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. **Oral Diseases**, v. 17, n. 8, p. 808-812, 2011.

DE OLIVEIRA, D. M.; FORDE, B. M.; KIDD, T. J.; HARRIS, P. N. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020.

DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; BHATT, T.; SINGH, J.; PHOENIX, D. A. The effect of C-terminal amidation on the efficacy and selectivity of antimicrobial and anticancer peptides. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 332, n. 1, p. 43. 2009.



DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Investigations into the potential anticancer activity of Maximin H5. **Biochimie**. v. 137, p. 29-34. 2017.

DENNISON, S. R.; WHITTAKER, M.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Anticancer  $\alpha$ -helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 487-499. 2006.

DESLOUCHES, B.; DI, Y. P. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. **Oncotarget**. v. 8, n. 28, p. 46635-46651. 2017.

DIGOMANN, D.; LINGE, A.; DUBROVSKA, A. SLC3A2/CD98hc, autophagy and tumor radioresistance: a link confirmed. **Autophagy**, 15, n. 10, p. 1850-1851, 2019/10/03 2019.

DING, J.; XU, J.; DENG, Q.; MA, W. et al. Knockdown of Oligosaccharyltransferase Subunit Ribophorin 1 Induces Endoplasmic-Reticulum-Stress-Dependent Cell Apoptosis in Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, 11, n. 4434. 2021.

DIPAOLA, Robert S. To arrest or not to G2-M Cell-cycle arrest: commentary re: AK Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. Clin. Cancer Res., 8: 3512–3519, 2002. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 11, p. 3311-3314, 2002.

DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The Hallmarks of Ferroptosis. **Annual Review of Cancer Biology**, 3, n. 1, p. 35-54, 2019.

DOBRZYŃSKA, I.; SZACHOWICZ-PETELSKA, B.; SULKOWSKI, S.; FIGASZEWSKI, Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 276, n. 1-2, p. 113-119. 2005.

DU, C.; YI, X.; LIU, W.; HAN, T. et al. MTDH mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by decreasing PTEN expression through an NF $\kappa$ B-dependent pathway. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2014.

ELLGAARD, Lars; FRICKEL, Eva-Maria. Calnexin, calreticulin, and ERp57. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n. 3, p. 223-247, 2003.

ENOGIERU, A. B.; OMORUYI, S. I.; HISS, D. C.; EKPO, O. E. GRP78/BIP/HSPA5 as a Therapeutic Target in Models of Parkinson's Disease: A Mini Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2019, p. 2706783, 2019/03/05 2019.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **Journal of Peptide Science**. v. 17, n. 5, p. 298-305. 2011.

- FEICHTINGER, R. G.; NEUREITER, D.; KEMMERLING, R.; MAYR, J. A. et al. Low VDAC1 expression is associated with an aggressive phenotype and reduced overall patient survival in cholangiocellular carcinoma. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 539, 2019.
- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, 149, n. 4, p. 778-789, 2021.
- FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 11, n. 1, p. 37. 2012.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**. v. 20, n. 1, p. 122-128. 2015.
- FU, Y.-L.; ZHANG, B.; MU, T.-W. LMAN1 (ERGIC-53) promotes trafficking of neuroreceptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 511, n. 2, p. 356-362, 2019.
- FUJIWARA, T.; TAKAHASHI, R.-u.; KOSAKA, N.; NEZU, Y. et al. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, 3, p. e189, 2014.
- GALLUZZI, Lorenzo; KROEMER, Guido. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, 2008.
- GANTA, K. K.; MANDAL, A.; CHAUBEY, B. Depolarization of mitochondrial membrane potential is the initial event in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz induced cytotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 69-82, 2017.
- GAO, H.; SUN, B.; FU, H.; CHI, X. et al. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Oncotarget**, 7, n. 33, p. 53289-53298, 2016.
- GAO, S.-P.; SUN, H.-F.; JIANG, H.-L.; LI, L.-D. et al. Loss of COX5B inhibits proliferation and promotes senescence via mitochondrial dysfunction in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43363, 2015.
- GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, p. 294. 2013.
- GE, S. X.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, v. 36, n. 8, p. 2628-2629, 2020.
- GIFFORD, J. L.; HUNTER, H. N.; VOGEL, H. Lactoferricin. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, n. 22, p. 2588. 2005.

GUIMARÃES, A. B.; COSTA, F. J. Q.; PIRES JUNIOR, O. R.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. The amazing world of peptide engineering: The example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. **Protein & Peptide Letters**. v. 23, n. 8, p. 722-737. 2016.

GUO, A.-X.; CUI, J.-J.; WANG, L.-Y.; YIN, J.-Y. The role of CSDE1 in translational reprogramming and human diseases. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020.

YINGYAN, H.; SHUJUAN, S.; MEISONG, Z.; ZEYU, Z. et al. CYC1 predicts poor prognosis in patients with breast cancer. **Disease Markers**, v. 2016, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, n. 5, p. 646-674. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 57-70. 2000.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 12, p. 1551. 2006.

HANEY, E. F.; NATHOO, S.; VOGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 163, n. 1, p. 82-93. 2010.

HANSEN, M.; KILK, K.; LANGEL, Ü. Predicting cell-penetrating peptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, n. 4, p. 572-579. 2008.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein Peptide Science**. v. 10, n. 6, p. 585-606. 2009.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; SINGH, J.; PHOENIX, D. A. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. **Medicinal Research Reviews**. v. 33, n. 1, p. 190-234. 2013.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **BBA-Biomembranes**. v. 1778, n. 2, p. 357-375. 2008.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K. et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.

HUANG, S.; ZHONG, W.; SHI, Z.; WANG, K. et al. Overexpression of signal sequence receptor  $\gamma$  predicts poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. **Human Pathology**, 81, p. 47-54, 2018.

HUANG, Y.; FENG, Q.; YAN, Q.; HAO, X.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic anticancer peptides: a promising candidate for novel anticancer drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 15, n. 1, p. 73-81. 2015.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & Cell**. v. 1, n. 2, p. 143-152. 2010.

HUANG, Y.-B.; HE, L.-Y.; JIANG, H.-Y.; CHEN, Y.-X. Role of helicity on the anticancer mechanism of action of cationic-helical peptides. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, n. 6, p. 6849-6862. 2012.

HUANG, Y.-B.; WANG, X.-F.; WANG, H.-Y.; LIU, Y.; CHEN, Y. Studies on Mechanism of Action of Anticancer Peptides by Modulation of Hydrophobicity Within a Defined Structural Framework. **Molecular Cancer Therapeutics**. 2011.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. O que é câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 01 de Novembro de 2021.

ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, M.; KOSHIKAWA, N. et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661-664, 2008.

ISRAELS, E. D.; ISRAELS, L. G. The cell cycle. **The oncologist**, v. 5, n. 6, p. 510-513, 2000.

JACOBSEN, A. V.; SILKE, J. The importance of being chaperoned: HSP90 and necroptosis. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 2, p. 205-207, 2016.

JAMES, M. A.; WEN, W.; WANG, Y.; BYERS, L. A. et al. Functional characterization of CLPTM1L as a lung cancer risk candidate gene in the 5p15. 33 locus. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e36116, 2012.

JIANG, Z.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; HANCOCK, R. E.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**. v. 90, n. 3, p. 369-383. 2008.

JU, J.-S.; FUENTEALBA, R. A.; MILLER, S. E.; JACKSON, E. et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. **Journal of Cell Biology**, 187, n. 6, p. 875-888, 2009.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1380-1389, 2017.

KAJIHARA, D.; HON, C.-C.; ABDULLAH, A. N.; WOSNIAK, J. et al. Analysis of splice variants of the human protein disulfide isomerase (P4HB) gene. **BMC Genomics**, 21, n. 1, p. 766, 2020/11/04 2020.

KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; WANG, S. et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234, n. 1, p. 119-124, 2002.

KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M. et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl\_1, p. D480-D484, 2007.

KANG, D.-c.; SU, Z.-z.; SARKAR, D.; EMDAD, L. et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. **Gene**, v. 353, n. 1, p. 8-15, 2005.

KANG, R.; ZHANG, Q.; ZEH, H. J., III; LOTZE, M. T. et al. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 15, p. 4046-4057, 2013.

KIM, S.-Y.; KIM, H. J.; KIM, H.-J.; KIM, D. H. et al. HSPA5 negatively regulates lysosomal activity through ubiquitination of MUL1 in head and neck cancer. **Autophagy**, 14, n. 3, p. 385-403, 2018/03/04 2018.

KIM, S.; KIM, S. S.; BANG, Y.-J.; KIM, S.-J. et al. In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. **Peptides**, v. 24, n. 7, p. 945-953, 2003.

KING, J. D.; AL-GHAFFERI, N.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; LEPRINCE, J.; NIELSEN, P. F.; CONLON, J. M. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry & Physiology C**, v. 141, n. 4, p. 393-397. 2005.

KOCI, L.; CHLEBOVA, K.; HYZDALOVA, M.; HOFMANOVA, J. et al. Apoptosis inhibitor 5 (API-5; AAC-11; FIF) is upregulated in human carcinomas in vivo. **Oncology Letters**, v. 3, n. 4, p. 913-916, 2012.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423. 2010.

KRANZ, P.; NEUMANN, F.; WOLF, A.; CLASSEN, F. et al. PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR). **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 8, p. e2986-e2986, 2017.

KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. **Advances in Genetics**, 70, p. 27-56, 2010.

KUO, T. F.; CHEN, T. Y.; JIANG, S. T.; CHEN, K. W. et al. Protein disulfide isomerase a4 acts as a novel regulator of cancer growth through the procaspase pathway. **Oncogene**, 36, n. 39, p. 5484-5496, 2017/09/01 2017.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105-132. 1982.

LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141. 2009.

LEE, J.-S.; LEE, H.; LEE, S.; KANG, J. H. et al. Loss of SLC25A11 causes suppression of NSCLC and melanoma tumor formation. **EBioMedicine**, v. 40, p. 184-197, 2019.

LEE, M.; SONG, Y.; CHOI, I.; LEE, S.-Y. et al. Expression of HYOU1 via Reciprocal Crosstalk between NSCLC Cells and HUVECs Control Cancer Progression and Chemoresistance in Tumor Spheroids. **Molecules and Cells**, 44, n. 1, p. 50-62, 2021.

LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Antimicrobial peptides in action. **Journal of the American Chemical Society**. v. 128, n. 37, p. 12156-61. 2006.

LESSA, R. C.; CAMPOS, A. H. J.; DE FREITAS, C. E.; DA SILVA, F. R. et al. Identification of upregulated genes in oral squamous cell carcinomas. **Head & Neck**, v. 35, n. 10, p. 1475-1481, 2013.

LI, G.; FU, D.; LIANG, W.; FAN, L. et al. CYC1 silencing sensitizes osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 2070-2080, 2014.

LI, Jianze; LEE, Amy S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 45-54, 2006.

LI, M.; ZHAI, Q.; BHARADWAJ, U.; WANG, H. et al. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. **Cancer**, v. 106, n. 10, p. 2284-2294, 2006.

LI, S.; CHAI, Z.; LI, Y.; LIU, D. et al. BZW1, a novel proliferation regulator that promotes growth of salivary mucoepidermoid carcinoma. **Cancer letters**, v. 284, n. 1, p. 86-94, 2009.

LI, X.; MA, W.; WANG, X.; CI, Y. et al. Annexin A5 overexpression might suppress proliferation and metastasis of human uterine cervical carcinoma cells. **Cancer Biomarkers**, 23, p. 23-32, 2018.

LI, Y. C.; PARK, M. J.; YE, S.-K.; KIM, C.-W.; KIM, Y.-N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. **The American Journal of Pathology**. v. 168, n. 4, p. 1107-1118. 2006.

LI, Y.; HUANG, C.; BAI, Q.; YU, J. Ribophorin II promotes cell proliferation, migration, and invasion in esophageal cancer cells in vitro and in vivo. **Bioscience Reports**, 39, n. 5, 2019.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**. v. 37, n. 2, p. 207-15. 2012.

LIBÉRIO, M. D. S. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e**

**anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases**. 2008. (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília.

LIBÉRIO, M. S.; JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; CILLI, E. M.; ZANOTTA, L. C.; NASCIMENTO, A. C.; SOUSA, M. V.; JÚNIOR, O. R. P.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids**. v. 40, p. 51-59. 2011.

LIU, B.; LI, Z. Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin. **Blood**, 112, n. 4, p. 1223-1230, 2008.

LIU, L.; QI, L.; KNIFLEY, T.; PIECORO, D. W. et al. S100A4 alters metabolism and promotes invasion of lung cancer cells by up-regulating mitochondrial complex I protein NDUFS2. **Journal of Biological Chemistry**, 294, n. 18, p. 7516-7527, 2019.

LIU, X.; CAO, R.; WANG, S.; JIA, J.; FEI, H. Amphipathicity determines different cytotoxic mechanisms of lysine-or arginine-rich cationic hydrophobic peptides in cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 59, n. 11, p. 5238-5247. 2016.

LOHNER, K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. **General Physiology and Biophysics**. v. 28, n. 2, p. 105-116. 2009.

LUO, Y.; WU, Y.; HUANG, H.; YI, N. et al. Emerging role of BAD and DAD1 as potential targets and biomarkers in cancer (Review). **Oncology Letters**, 22, n. 6, p. 811, 2021.

MA, Q.; WU, X.; WU, J.; LIANG, Z. et al. SERP1 is a novel marker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients via anti-apoptosis and regulating SRPRB/NF- $\kappa$ B axis. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 4, p. 1104-1114, 2017.

MA, Y.-S.; WANG, X.-F.; YU, F.; WU, T.-M. et al. Inhibition of USP14 and UCH37 deubiquitinating activity by b-AP15 as a potential therapy for tumors with p53 deficiency. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2020.

MAGANA, M.; PUSHPANATHAN, M.; SANTOS, A. L.; LEANSE, L. et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, 20, n. 9, p. e216-e230, 2020/09/01/ 2020.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **BBA-Biomembranes**. v. 1858, n. 5, p. 936-946. 2016.

MANSOUR, S. C.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Peptide Science**. v. 21, n. 5, p. 323-329. 2015.

MANSOUR, S. C.; PENA, O. M.; HANCOCK, R. E. Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends in Immunology**. v. 35, n. 9, p. 443-450. 2014.

MAROUFI, N. F.; VAHEDIAN, V.; MAZRAKHONDI, S. A. M.; KOOTI, W. et al. Sensitization of MDA-MBA231 breast cancer cell to docetaxel by myricetin loaded into biocompatible lipid nanoparticles via sub-G1 cell cycle arrest mechanism. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 393, n. 1, p. 1-11, 2020.

MARSTON, H. D.; DIXON, D. M.; KNISELY, J. M.; PALMORE, T. N. et al. Antimicrobial resistance. **Jama**, v. 316, n. 11, p. 1193-1204, 2016.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **BBA-Biomembranes**. v. 1788, n. 8, p. 1687-1692. 2009.

MATTILA, J.-P.; SABATINI, K.; KINNUNEN, P. K. Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides. **BBA-Biomembranes**. v. 1778, n. 10, p. 2041-2050. 2008.

MCCARTHY, M. M.; PICK, E.; KLUGER, Y.; GOULD-ROTHBERG, B. et al. HSP90 as a marker of progression in melanoma. **Annals of Oncology**, 19, n. 3, p. 590-594, 2008.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 1016-1023, 2011.

MITEVA, M.; ANDERSSON, M.; KARSHIKOFF, A.; OTTING, G. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. **FEBS Letters**. v. 462, n. 1-2, p. 155-158. 1999.

MONSUEZ, J.-J.; CHARNIOT, J.-C.; VIGNAT, N.; ARTIGOU, J.-Y. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International Journal of Cardiology**, 144, n. 1, p. 3-15, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

NAKAMURA, J.; AOYAGI, S.; NANCHI, I.; NAKATSUKA, S.-I. et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G2/M progression in the cell cycle. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 5, p. 1181-1189, 2009.

NAKASHIMA, T.; SEKIGUCHI, T.; KURAOKA, A.; FUKUSHIMA, K. et al. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes



apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 10, p. 6367-6374, 1993.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 132, n. 3, p. 887-895. 2012.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein Peptide Letters**. v. 10, n. 3, p. 227-238. 2003.

NEWMAN, A. C.; MADDOCKS, O. D. One-carbon metabolism in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 12, p. 1499-1504, 2017.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**. v. 29, n. 9, p. 464-472. 2011.

NI, G.; LIANG, D.; CUMMINS, S. F.; WALTON, S. F. et al. Comparative proteomic study of the antiproliferative activity of frog host-defence peptide caerin 1.9 and its additive effect with caerin 1.1 on TC-1 cells transformed with HPV16 E6 and E7. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRY, P.; VEUTHEY, J.-L.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**. v. 85, n. 5, p. 2265-2289. 2011.

OJI, Y.; TATSUMI, N.; FUKUDA, M.; NAKATSUKA, S.-I. et al. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 5, p. 1461-1469, 2014.

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

OZAWA, K.; KONDO, T.; HORI, O.; KITAO, Y. et al. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. **The Journal of Clinical Investigation**, 108, n. 1, p. 41-50, 2001.

PANARETAKIS, T.; JOZA, N.; MODJTAHEDI, N.; TESNIERE, A. et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 9, p. 1499-1509, 2008.

PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, n. 7, p. 784-790. 2005.

PFEFFER, S.; BURBAUM, L.; UNVERDORBEN, P.; PECH, M. et al. Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.

QIAO, L.; WONG, B. C. Y. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. **Drug resistance updates**, v. 12, n. 3, p. 55-64, 2009.

RAMOS, P.; BENTIREN-ALJ, M. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. **Oncogene**. v. 34, p. 3617. 2014.

RAO, S.; OYANG, L.; LIANG, J.; YI, P. et al. Biological function of HYOU1 in tumors and other diseases. **OncoTargets and Therapy**, v. 14, p. 1727, 2021.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896-1906, 2007.

RAVENTOS, D.; TABOUREAU, O.; MYGIND, P. H.; NIELSEN, J. D.; SONKSEN, C. P.; KRISTENSEN, H. H. Improving on Nature's Defenses: Optimization & High Throughput Screening of Antimicrobial Peptides. **Comb Chem High Throughput Screen**. v. 8, n. 3, p. 219-233. 2005.

REINA, S.; GUARINO, F.; MAGRÌ, A.; DE PINTO, V. VDAC3 As a Potential Marker of Mitochondrial Status Is Involved in Cancer and Pathology. **Frontiers in Oncology**, 6, n. 264, 2016.

REN, S. X.; SHEN, J.; CHENG, A. S.; LU, L. et al. FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63641, 2013.

REPNIK, U.; ČESEN, M. H.; TURK, B. The use of lysosomotropic dyes to exclude lysosomal membrane permeabilization. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 5, p. pdb.prot087106, 2016.

RIEDL, S.; ZWEYTICK, D.; LOHNER, K. Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. **Chemistry Physics Lipids**. v. 164, n. 8, p. 766-781. 2011.

ROECKEL, N.; WOERNER, S. M.; KLOOR, M.; YUAN, Y.-P. et al. High frequency of LMAN1 abnormalities in colorectal tumors with microsatellite instability. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 292-299, 2009.

ROKITSKAYA, T. I.; KOLODKIN, N. I.; KOTOVA, E. A.; ANTONENKO, Y. N. Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. **BBA-Biomembranes**. v. 1808, n. 1, p. 91-97. 2011.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**. v. 5, n. 4, p. 725. 2010.

RYAN, D.; CARBERRY, S.; MURPHY, Á. C.; LINDNER, A. U. et al. Calnexin, an ER-induced protein, is a prognostic marker and potential therapeutic target in colorectal cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2016.

SAFIULINA, D.; VEKSLER, V.; ZHARKOVSKY, A.; KAASIK, A. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. **Journal of Cellular Physiology**, v. 206, n. 2, p. 347-353, 2006.

SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **European Journal of Pharmacology**. v. 625, n. 1-3, p. 190-194. 2009.

SESHACHARYULU, P.; PANDEY, P.; DATTA, K.; BATRA, S. K. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. **Cancer Letters**, v. 335, n. 1, p. 9-18, 2013.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**. v. 66, n. 4, p. 236-48. 2002.

SHAO, J.; WANG, L.; ZHONG, C.; QI, R. et al. AHS1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 45-51, 2016.

SHAPANIS, A.; LAI, C.; SMITH, S.; COLTART, G. et al. Identification of proteins associated with development of metastasis from cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) via proteomic analysis of primary cSCCs\*. **British Journal of Dermatology**, 184, n. 4, p. 709-721, 2021.

SHEN, Y.; LI, X.; DONG, D.; ZHANG, B. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. **American Journal of Cancer Research**, 8, n. 6, p. 916-931, 2018.

SHEWACH, D. S.; KUCHTA, R. D. Introduction to Cancer Chemotherapeutics. **Chemical Reviews**. v. 109, n. 7, p. 2859-2861. 2009.

SHIBATANI, T.; DAVID, L. L.; MCCORMACK, A. L.; FRUEH, K. et al. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. **Biochemistry**, v. 44, n. 16, p. 5982-5992, 2005.

SHIN, S.; YANG, S. T.; PARK, E.; EOM, S.; SONG, W.; KIM, J.; LEE, S. H.; LEE, M.; LEE, D.; HAHM, K. S. Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of  $\alpha$ -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 58, n. 6, p. 504-514. 2001.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**. v. 7, p. 539-539. 2011.

SMITH, L. M.; NESTEROVA, A.; ALLEY, S. C.; TORGOV, M. Y. et al. Potent cytotoxicity of an auristatin-containing antibody-drug conjugate targeting melanoma

cells expressing melanotransferrin/p97. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 6, p. 1474-1482, 2006.

SONG, D.; LIU, H.; WU, J.; GAO, X. et al. Insights into the role of ERp57 in cancer. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 8, p. 2456, 2021.

SOUZA, J. M. F. **Neuroproteômica de abelhas e ratos para descoberta de proteínas relacionadas à aprendizagem**. 2017. xv, 149 p., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

STEVENSON, B. W.; GORMAN, M. A.; KOACH, J.; CHEUNG, B. B. et al. A structural view of PA2G4 isoforms with opposing functions in cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 47, p. 16100-16112, 2020.

STOJADINOVIC, A.; HOOKE, J. A.; SHRIVER, C. D.; NISSAN, A. et al. HYOU1/Orp150 expression in breast cancer. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 11, p. BR231-BR239, 2007.

STOLZ, A.; WOLF, D. H. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. **BBA - Molecular Cell Research**, 1803, n. 6, p. 694-705, 2010.

STORR, S. J.; CARRAGHER, N. O.; FRAME, M. C.; PARR, T. et al. The calpain system and cancer. **Nature Reviews Cancer**, 11, n. 5, p. 364-374, 2011/05/01 2011.

SUN, S.; LEE, D.; HO, A. S. W.; PU, J. K. S. et al. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. **Neuro-Oncology**, 15, n. 5, p. 562-577, 2013.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TOKUNAGA, E.; NAKASHIMA, Y.; YAMASHITA, N.; HISAMATSU, Y. et al. Overexpression of metadherin/MTDH is associated with an aggressive phenotype and a poor prognosis in invasive breast cancer. **Breast cancer**, v. 21, n. 3, p. 341-349, 2014.

TSUJIMOTO, Y.; TOMITA, Y.; HOSHIDA, Y.; KONO, T. et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3007-3012, 2004.

TUFO, G.; JONES, A. W. E.; WANG, Z.; HAMELIN, J. et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in

lung adenocarcinoma. **Cell Death & Differentiation**, 21, n. 5, p. 685-695, 2014/05/01 2014.

TYAS, L.; BROPHY, V. A.; POPE, A.; RIVETT, A. J. et al. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. **EMBO Reports**, v. 1, n. 3, p. 266-270, 2000.

VAN ZOGGEL, H.; CARPENTIER, G.; DOS SANTOS, C.; HAMMA-KOURBALI, Y. et al. Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermaseptin B2. **PLoS One**, v. 7 n. 9, p. e44351, 2012.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 700-714, 2010.

VANDERMOERE, F.; EL YAZIDI-BELKOURA, I.; SLOMIANNY, C.; DEMONT, Y. et al. The Valosin-containing Protein (VCP) Is a target of Akt signaling required for cell survival. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 20, p. 14307-14313, 2006.

VELORIA, J. R.; CHEN, L.; LI, L.; BREEN, G. A. et al. Novel cell-penetrating-amyloid peptide conjugates preferentially kill cancer cells. **Medchemcomm**, v. 9, n. 1, p. 121-130, 2018.

WANG, C.; ZHOU, Y.; LI, S.; LI, H.; TIAN, L.; WANG, H.; SHANG, D. Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells. **Life Sciences**. v. 92, n. 20-21, p. 1004-1014. 2013.

WANG, D.-w.; SU, F.; ZHANG, T.; YANG, T.-c. et al. The miR-370/UQCRC2 axis facilitates tumorigenesis by regulating epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 17, p. 5042, 2020.

WANG, G. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. Cabi, 2017. ISBN 1786390396.

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

WANG, S.; YANG, D.; KONG, W. Prediction of Overall Survival Rate in Patients With Hepatocellular Carcinoma Using an Integrated Model Based on Autophagy Gene Marker. **Frontiers in Genetics**, 12, n. 436, 2021.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. **Journal of Membrane Biology**. v. 239, n. 1-2, p. 27-34. 2011.

WIŚNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis . **Nature methods**. v. 6, n. 5, p. 359-362, 2009.

WLODKOWIC, D.; TELFORD, W.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in Cell Biology**. v. 103, p. 55-98, 2011.

WU, J.; YANG, Y.; GAO, S.; JIANG, H. et al. ERp29 inhibits tumorigenicity by suppressing epithelial mesenchymal transition in gastric cancer. **Oncotarget**. 8, n. 45, p. 78757-78766, 2017.

XU, X.; LAI, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. **Chemical Reviews**. v. 115, n. 4, p. 1760-1846. 2015.

XU, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, G.; XI, Y. et al. HSP90B1 overexpression predicts poor prognosis in NSCLC patients. **Tumor Biology**, 37, n. 10, p. 14321-14328, 2016.

YAMAMOTO, S.; TOMITA, Y.; NAKAMORI, S.; HOSHIDA, Y. et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 3, p. 447-452, 2003.

YAMAMOTO, S.; TOMITA, Y.; URUNO, T.; HOSHIDA, Y. et al. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 12, n. 11, p. 925-934, 2005.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**. v. 12, n. 1, p. 7. 2015.

YANG, Q.-Z.; WANG, C.; LANG, L.; ZHOU, Y.; WANG, H.; SHANG, D.-J. Design of potent, non-toxic anticancer peptides based on the structure of the antimicrobial peptide, temporin-1CEa. **Archives of Pharmacal Research**. v. 36, n. 11, p. 1302-1310. 2013.

YANG, Z.; ZHUANG, L.; SZATMARY, P.; WEN, L. et al. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma. **International Journal of Medical Sciences**, 12, n. 3, p. 256-263, 2015.

YOON, J.; KIM, E.-S.; LEE, S. J.; PARK, C.-W. et al. Apoptosis-related mRNA expression profiles of ovarian cancer cell lines following cisplatin treatment. **Journal of Gynecologic Oncology**, 21, n. 4, p. 255-261, 12 2010.

YOSHIDA, T.; KONISHI, M.; HORINAKA, M.; YASUDA, T. et al. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, n. 1, p. 129-133, 2008.

- YU, J.; WANG, L.; YANG, H.; DING, D. et al. Rab14 suppression mediated by MiR-320a inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 15, p. 2317, 2016.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. v. 415, n. 6870, p. 389. 2002.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987.
- ZHANG, B.; TORNMALM, J.; WIDENGREN, J.; VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H. et al. Characterization of the Role of the Malate Dehydrogenases to Lung Tumor Cell Survival. **Journal of Cancer**, 8, n. 11, p. 2088-2096, 2017.
- ZHANG, D; PUTTI, T. C. Over-expression of ERp29 attenuates doxorubicin-induced cell apoptosis through up-regulation of Hsp27 in breast cancer cells. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 20, p. 3522-3531, 2010.
- ZHANG, Jian Hua; MING, X. U. DNA fragmentation in apoptosis. **Cell research**, v. 10, n. 3, p. 205-211, 2000.
- ZHANG, L.-J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**. v. 26, n. 1, p. R14-R19. 2016.
- ZHANG, W.; LI, J.; LIU, L.-W.; WANG, K.-R.; SONG, J.-J.; YAN, J.-X.; LI, Z.-Y.; ZHANG, B.-Z.; WANG, R. A novel analog of antimicrobial peptide Polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice. **Peptides**. v. 31, n. 10, p. 1832-1838. 2010.
- ZHENG, X.; WEIGERT, A.; REU, S.; GUENTHER, S. et al. Spatial Density and Distribution of Tumor-Associated Macrophages Predict Survival in Non-Small Cell Lung Carcinoma. **Cancer Research**, 80, n. 20, p. 4414-4425, 2020.
- ZHOU, T.-B.; QIN, Y.-H. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, 33, n. 1, p. 28-36, 2013.
- ZHU, S.; ZHANG, Q.; SUN, X.; ZEH, H. J. et al. HSPA5 regulates ferroptotic cell death in cancer cells ferroptosis in pancreatic cancer . **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 2064-2077, 2017.
- JIANG, Z.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides . **Peptide Science**. v. 90, n. 3, p. 369-383. 2008.
- ZOROVA, L. D.; POPKOV, V. A.; PLOTNIKOV, E. Y.; SILACHEV, D. N. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50-59, 2018.

ZOU, H.; WEN, C.; PENG, Z.; SHAO, Y.-Y. et al. P4HB and PDIA3 are associated with tumor progression and therapeutic outcome of diffuse gliomas. **Oncology Reports**, 39, n. 2, p. 501-510, 2018.



## 7. ANEXOS

**Tabela 5.** Lista de proteínas com expressão aumentada em células B16F10 quando tratadas com o peptídeo AN6.

Entrada Uniprot	Descrição - Nome da proteína	Fold change	Confidence score	Anova (p)
P09528	Ferritin heavy chain	5,27	228,68	8,9E-13
Q922J9	Fatty acyl-CoA reductase 1	2,68	105,54	2,7E-11
P09055	Integrin beta-1	4,67	658,24	5,13E-11
P07147	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase	4,04	1611,76	7,83E-11
Q9QYA2	Mitochondrial import receptor subunit T	2,92	335,65	9,74E-11
P67778	Prohibitin	2,64	1017,94	1,52E-10
P29812	L-dopachrome tautomerase	4,54	967,07	2,75E-10
Q8BMS1	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	2,67	1218,04	2,89E-10
O35887	Calumenin	4,21	1320,67	3,3E-10
B7ZNJ1	Fibronectin	16,00	345,67	3,63E-10
Q0VBU4	Coiled-coil domain-containing protein 47	23,47	187,59	4,34E-10
Q99P72	Reticulon-4	5,27	824,23	4,87E-10
E9Q0F0	Keratin 78	3,43	125,96	5,34E-10
A2A513	Keratin, type I cytoskeletal 10	4,96	958,08	5,46E-10
A0A0R4J116	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	4,41	293,15	7,38E-10
Q3TVS6	Cathepsin B	6,61	342,22	8,03E-10
Q61833	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	2,88	641,4	8,07E-10
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1	4,19	765,58	8,44E-10
A0A1D5RLM8	Predicted gene 11639	4,76	53,78	8,74E-10
A3KGR9	Histocompatibility 13 (Fragment)	3,39	213,84	9E-10
Q3TBB0	PKD domain-containing protein	9,65	714,07	9,12E-10
P07724	Albumin	16,89	244,45	9,91E-10
Q8C1W8	Proton-translocating NAD(P)(+) transhydrogenase	3,26	648,09	1,18E-09
Q3UWP8	Uncharacterized protein (Fragment)	4,04	2764,67	1,46E-09
E9Q1Y3	Apolipoprotein B-100 (Fragment)	8,60	281,69	1,62E-09
Q3TVM2	Aldedh domain-containing protein	2,58	1391,38	1,64E-09
Q3TX38	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	3,10	667,52	1,82E-09
Q9CY27	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	12,08	233,79	1,92E-09
Q3TPD9	Amine oxidase (Fragment)	3,13	559,04	2,01E-09
Q5RKP4	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	3,30	1842,69	2,32E-09
Q08EK4	Keratin 77	5,24	414,74	3,33E-09
Q8BTJ9	Aamy domain-containing protein	1,78	275,82	3,5E-09
Q99KI3	ER membrane protein complex subunit 3	3,18	245,79	3,88E-09
P01942	Hemoglobin subunit alpha	24,59	332,67	4,11E-09
Q8K0C4	Lanosterol 14-alpha demethylase	3,40	637,02	4,93E-09
Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2,92	2060,92	5,43E-09
P61620	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	4,33	320,33	6,08E-09
G3X9B1	HEAT repeat-containing protein 1	5,42	127,86	6,22E-09
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	2,57	3286,27	6,25E-09
Q5I0W0	ATP synthase subunit b	2,82	329,73	6,42E-09
Q9DCX2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	2,48	762,69	6,46E-09

<b>Q8BKE6</b>	Cytochrome P450 20A1	3,19	306,91	6,69E-09
<b>Q91V38</b>	Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1	3,16	2172,02	6,85E-09
<b>A1L2Z3</b>	ER membrane protein complex subunit 1	4,26	511,72	7,38E-09
<b>Q8C140</b>	Uncharacterized protein	2,32	951,99	7,44E-09
<b>F7DBQ0</b>	Protein disulfide-isomerase A6	2,74	874,73	9,09E-09
<b>Q3UL43</b>	Uncharacterized protein	2,38	193,96	0,00000001
<b>Q3UDR2</b>	Protein disulfide-isomerase (Fragment)	3,49	2362,97	1,01E-08
<b>Q8VBZ3</b>	Cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog	5,25	354,35	1,06E-08
<b>Q61213</b>	Protease	3,26	2509,67	1,15E-08
<b>Q9DB77</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	3,42	924,65	1,17E-08
<b>Q14C51</b>	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	2,96	153,64	1,21E-08
<b>P29788</b>	Vitronectin	26,84	128,63	1,26E-08
<b>Q6P5H2</b>	Nestin	2,98	349,57	1,26E-08
<b>Q9D7N9</b>	Adipocyte plasma membrane-associated protein	2,59	115	1,41E-08
<b>D3YU17</b>	Nicalin	3,42	324,39	1,42E-08
<b>A0A286YDB7</b>	Signal sequence receptor subunit alpha (Fragment)	3,59	196,93	0,000000015
<b>Q80WJ7</b>	Protein LYRIC	7,04	128,94	1,54E-08
<b>Q3TQL4</b>	MIC	2,86	1727,87	1,63E-08
<b>P20029</b>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	3,33	2521,05	1,78E-08
<b>P56480</b>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2,58	3674,66	2,03E-08
<b>P08003</b>	Protein disulfide-isomerase A4	2,93	2182,48	2,09E-08
<b>Q8BH24</b>	Transmembrane 9 superfamily member 4	3,92	79,92	2,09E-08
<b>Q3ULE5</b>	UBX domain-containing protein (Fragment)	3,13	133,21	2,12E-08
<b>Q3TFP8</b>	Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	2,69	219,5	2,19E-08
<b>Q6GQT9</b>	Nodal modulator 1	3,36	395,59	0,000000022
<b>O08807</b>	Peroxiredoxin-4	2,38	390,68	2,31E-08
<b>Q5SUC3</b>	Uncharacterized protein	3,16	2077,43	2,31E-08
<b>Q8BFZ9</b>	Erlin-2	3,13	379,68	2,47E-08
<b>Q9D7N3</b>	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	2,09	229,1	0,000000025
<b>P57759</b>	Endoplasmic reticulum resident protein 29	2,41	338,8	2,65E-08
<b>Q3V235</b>	Prohibitin	2,94	1436,7	2,66E-08
<b>D3YXT0</b>	Complex I-49kD	2,55	162,28	2,71E-08
<b>Q60597</b>	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	2,20	1560,3	2,79E-08
<b>Q62351</b>	Transferrin receptor protein 1	2,43	713,79	2,81E-08
<b>Q3V3R1</b>	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	2,44	1722,89	0,000000029
<b>Q3UC51</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	3,68	657,83	3,66E-08
<b>Q61033</b>	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta	2,06	613,3	3,87E-08
<b>Q8C2Q8</b>	ATP synthase subunit gamma	2,31	650,33	4,07E-08
<b>O88967</b>	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1	2,97	292,24	4,21E-08
<b>P19324</b>	Serpin H1	2,82	1312,58	4,55E-08

<b>Q9D051</b>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	5,83	461,83	4,84E-08
<b>Q9D0M3</b>	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	3,13	407,33	4,89E-08
<b>P55096</b>	ATP-binding cassette sub-family D member 3	2,83	401,43	5,14E-08
<b>Q6PB66</b>	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	3,12	1002,25	5,21E-08
<b>P61804</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	2,68	156,09	5,28E-08
<b>Q8VDD5</b>	Myosin-9	2,24	3647,76	5,54E-08
<b>P58742</b>	Aladin	2,35	76,98	5,92E-08
<b>A0A1B0GSX7</b>	Nuclear pore complex protein Nup96	7,66	298,08	6,28E-08
<b>G5E850</b>	Cytochrome b5	5,51	487,68	6,34E-08
<b>Q91XW8</b>	Inactive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP6	2,85	144,02	6,64E-08
<b>Q99KV1</b>	DnaJ homolog subfamily B member 11	4,67	253,86	6,66E-08
<b>Q8CDM1</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 2	5,39	318,67	6,72E-08
<b>Q64524</b>	Histone H2B type 2-E	1,76	700,64	6,89E-08
<b>P19536</b>	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	4,77	121,7	7,99E-08
<b>A0A494BAB5</b>		2,71	162,49	8,28E-08
<b>P47758</b>	Signal recognition particle receptor subunit beta	3,00	266,84	8,53E-08
<b>Q99PV0</b>	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	3,16	656,08	8,75E-08
<b>Q9CRD2</b>	ER membrane protein complex subunit 2	4,07	104,41	9,55E-08
<b>Q62150</b>	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	2,15	215,73	9,84E-08
<b>O55143</b>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	3,09	1753,14	0,000000103
<b>A2RSV8</b>	Cytochrome c oxidase subunit 4	3,04	513,02	0,000000114
<b>Q91YW3</b>	DnaJ homolog subfamily C member 3	4,48	267,55	0,000000127

**Tabela 6.** Lista de proteínas com expressão diminuída em células B16F10 quando tratadas com o peptídeo AN6.

<b>Entrada Uniprot</b>	<b>Descrição - Nome da proteína</b>	<b>Fold change</b>	<b>Confidence score</b>	<b>Anova (p)</b>
<b>Q9CWJ9</b>	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	2,733439	921,58	6,59E-12
<b>P29341</b>	Polyadenylate-binding protein 1	2,51289	1821,75	8,71E-12
<b>Q58E64</b>	Elongation factor 1-alpha	2,48603	3190,41	1,03E-11
<b>P26039</b>	Talin-1	2,74586	1462,16	1,13E-11
<b>P40142</b>	Transketolase	2,294456	1350,41	1,55E-11
<b>Q9JHU4</b>	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	2,35619	1520,76	1,65E-11
<b>B7FAU9</b>	Filamin, alpha	1,873261	2525,71	2,16E-11
<b>E9Q7G1</b>	Transmembrane p24-trafficking protein 7	4,644622	170,64	2,73E-11
<b>P09411</b>	Phosphoglycerate kinase 1	2,10342	2282,61	3,63E-11
<b>Q3UF95</b>	BCL2-associated athanogene 6	2,474641	232,79	6,24E-11
<b>Q3UMI7</b>	Tr-type G domain-containing protein	2,493183	3880,08	7,68E-11
<b>Q4KL76</b>	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	3,09697	526,35	7,68E-11
<b>Q3U6F6</b>	Seryl-tRNA synthetase	2,31267	440,21	7,76E-11
<b>P0DP26</b>	Calmodulin-1	1,88351	420,56	7,88E-11
<b>Q1HFZ0</b>	RNA cytosine C(5)-methyltransferase NSUN2	2,75513	414,79	9,45E-11
<b>Q3TE63</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2,813644	1767,11	9,91E-11
<b>Q3TDF8</b>	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	2,779085	432,35	1,33E-10
<b>Q9QUM9</b>	Proteasome subunit alpha type-6	2,713986	326,88	1,71E-10
<b>Q9D0F9</b>	Phosphoglucomutase-1	2,568233	610,66	2,63E-10
<b>P26041</b>	Moesin	3,25947	712,69	2,67E-10
<b>Q61753</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,949754	650,2	2,68E-10
<b>P68040</b>	Receptor of activated protein C kinase 1	2,583888	1171,1	2,71E-10
<b>Q99KR1</b>	Psmc5 protein (Fragment)	3,195334	325,19	3,11E-10
<b>O35841</b>	Apoptosis inhibitor 5	2,243249	302,2	3,96E-10

<b>Q3T9L0</b>	RNA helicase	2,9984 24	728,93	5,43E -10
<b>O08553</b>	Dihydropyrimidinase-related protein 2	2,3232 04	843,59	5,72E -10
<b>Q7TPD9</b>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	3,6359 17	197,26	6,26E -10
<b>P08249</b>	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2,1469 22	1251,89	7,02E -10
<b>Q9D0F3</b>	Protein ERGIC-53	3,2963 52	427,17	7,79E -10
<b>Q921R2</b>	40S ribosomal protein S13	2,8490 46	437	8,22E -10
<b>Q3TI05</b>	Chaperonin containing Tcp1, subunit 6a (Zeta)	3,4735 73	665,03	8,84E -10
<b>Q3TF69</b>	Uncharacterized protein	1,8834 02	656,47	9,46E -10
<b>P16045</b>	Galectin-1	3,1132 01	1160,25	9,65E -10
<b>Q68FD5</b>	Clathrin heavy chain 1	2,1815 39	2259,81	1,05E -09
<b>E9PZF0</b>	Nucleoside diphosphate kinase	2,4609 15	1362,99	1,07E -09
<b>Q6PDM2</b>	Serine/arginine-rich splicing factor 1	2,1312 14	467,81	1,10E -09
<b>Q6IRT4</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	4,0375 77	567,73	1,26E -09
<b>Q9CQ60</b>	6-phosphogluconolactonase	2,6882 55	194,69	1,30E -09
<b>S4R257</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	2,2697 22	2732,03	1,61E -09
<b>Q3U3L3</b>	SERPIN domain-containing protein	2,3955 08	378,48	1,61E -09
<b>P06151</b>	L-lactate dehydrogenase A chain	2,9258 74	1976,08	1,61E -09
<b>A0A1W2 P6P1</b>	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha (Fragment)	2,5518 65	108,9	1,61E -09
<b>P45377</b>	Aldose reductase-related protein 2	3,2353 46	360,61	1,65E -09
<b>Q9Z0S1</b>	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	1,9994 14	633,17	1,69E -09
<b>Q3TJG6</b>	CS domain-containing protein	2,6853 25	381,31	2,21E -09
<b>Q5RKP0</b>	Vat1 protein (Fragment)	2,4619 8	687,52	2,24E -09
<b>Q6ZQ38</b>	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	2,9164 45	661,72	2,50E -09
<b>Q5SW83</b>	Uncharacterized protein	2,3291 94	522,95	2,53E -09
<b>Q3U7F3</b>	Helix-destabilizing protein	2,5007 42	943,91	2,64E -09
<b>Q8BTY3</b>	Inorganic diphosphatase	3,4727 71	313,41	2,71E -09
<b>Q99KI0</b>	Aconitate hydratase, mitochondrial	1,6619 29	761,89	2,73E -09

<b>Q3TV20</b>	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	2,0815 71	761,93	2,82E -09
<b>P11499</b>	Heat shock protein HSP 90-beta	2,8779 5	2856,3	2,96E -09
<b>P14152</b>	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2,5392 61	399,33	2,98E -09
<b>Q01853</b>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2,5088 05	1508,33	3,08E -09
<b>Q9Z1Q9</b>	Valine--tRNA ligase	2,8563 22	974,68	3,21E -09
<b>Q3UAA9</b>	Uncharacterized protein	1,7781 48	2198,96	3,29E -09
<b>Q564F4</b>	T-complex protein 1 subunit delta	2,5586 16	963,97	3,30E -09
<b>Q9CXW3</b>	Calcyclin-binding protein	2,1342 31	296,59	3,43E -09
<b>P60335</b>	Poly(rC)-binding protein 1	2,5504 87	527,29	4,25E -09
<b>O08709</b>	Peroxiredoxin-6	2,2903 62	729,84	4,49E -09
<b>Q791V5</b>	Mitochondrial carrier homolog 2	3,5871 76	268,81	4,95E -09
<b>P80316</b>	T-complex protein 1 subunit epsilon	2,5769 67	821,13	4,99E -09
<b>D3YWF6</b>	Ubiquitinyl hydrolase 1	1,9284 81	242,68	4,99E -09
<b>Q61656</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	1,9608 2	979,01	5,04E -09
<b>P35700</b>	Peroxiredoxin-1	1,9881 15	1643,65	7,50E -09
<b>Q61191</b>	Host cell factor 1	2,6194 35	211,54	8,11E -09
<b>A0A7G9 TMG4</b>	Gag	3,0370 95	756,19	8,27E -09
<b>Q3TW96</b>	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1	2,4737 16	698,96	8,79E -09
<b>Q9CQC6</b>	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	3,1482 24	265,52	9,47E -09
<b>P05202</b>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	1,9175 15	1102,17	9,80E -09
<b>P37913</b>	DNA ligase 1	5,8799 77	157,2	9,82E -09
<b>Q3ULV8</b>	ACB domain-containing protein	2,9709 81	368,82	9,86E -09
<b>Q543K5</b>	Phosphoserine aminotransferase	2,4129 18	660,99	9,92E -09
<b>Q91V92</b>	ATP-citrate synthase	2,6894 93	938,24	1,02E -08
<b>A0A494B B86</b>	Alpha-centractin	2,4207	350,93	1,10E -08
<b>Q3TA68</b>	WD repeat domain 36	3,8244 57	133,57	1,20E -08
<b>Q3UDY1</b>	Aldo_ket_red domain-containing protein	2,2165 71	624,62	1,38E -08

<b>Q3V471</b>	Galectin (Fragment)	3,4399 16	281,41	1,42E -08
<b>E9PWK1</b>	Epoxide hydrolase	2,8929 11	1495,69	1,44E -08
<b>Q922D8</b>	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	2,3947 79	635,49	1,51E -08
<b>A2A6U3</b>	Septin-9	3,1847 85	238,68	1,51E -08
<b>Q04447</b>	Creatine kinase B-type	2,0186 7	1504,73	1,53E -08
<b>Q3UEB3</b>	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	2,6947 9	355,46	1,58E -08
<b>Q3U4S7</b>	Uncharacterized protein	2,7618	449,13	1,62E -08
<b>Q3TAP5</b>	RRM domain-containing protein	3,4414 76	122,12	1,67E -08
<b>Q7TMW1</b>	Rangap1 protein	2,1561 69	465,16	1,69E -08
<b>Q3V244</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4H	2,0968 86	271,55	1,73E -08
<b>Q5M9N5</b>	60S ribosomal protein L28	2,9676 61	139,75	1,97E -08
<b>Q3TRW3</b>	Staphylococcal nuclease domain-containing protein	2,2049 97	1368,05	2,10E -08
<b>Q8BSZ8</b>	PABS domain-containing protein	3,1997 95	305,09	2,14E -08
<b>P42932</b>	T-complex protein 1 subunit theta	2,2413 2	853,99	2,18E -08
<b>Q3ULW0</b>	GTP-binding nuclear protein Ran	2,4264 63	623,08	2,19E -08
<b>Q50HX4</b>	Ras-related protein Rab-14	2,8650 89	151,82	2,30E -08
<b>Q9CR16</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	2,5598 34	126,53	2,32E -08
<b>A0A0J9Y UD8</b>	High mobility group protein B1	4,0914 94	664,48	2,39E -08
<b>Q3U781</b>	RRM domain-containing protein	3,0814 41	149,46	2,42E -08
<b>Q6P5F9</b>	Exportin-1	5,7218 47	168	2,47E -08
<b>Q9EPU0</b>	Regulator of nonsense transcripts 1	2,5269 29	524,84	2,54E -08
<b>D3Z5R8</b>	40S ribosomal protein S19 (Fragment)	2,2156 17	148,27	2,58E -08
<b>Q4FZL1</b>	RNA helicase (Fragment)	2,6085 62	1523,69	2,89E -08
<b>A2AU61</b>	RNA-binding protein Raly (Fragment)	2,4904 89	231,22	3,02E -08
<b>P10639</b>	Thioredoxin	2,2321 51	282,71	3,12E -08
<b>Q80Y52</b>	Heat shock protein 90, alpha (Cytosolic), class A member 1	3,2566 02	1643,59	3,21E -08
<b>P70698</b>	CTP synthase 1	2,0881 62	441,76	3,53E -08

<b>Q8R0M2</b>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (Fragment)	2,4666 66	593,14	3,55E -08
<b>Q6ZWN5</b>	40S ribosomal protein S9	1,8658 17	495,65	3,63E -08
<b>E9Q740</b>	Signal recognition particle subunit SRP72	3,4927 27	110,08	3,90E -08
<b>P19157</b>	Glutathione S-transferase P 1	2,1530 9	1069,14	4,54E -08
<b>Q5DTS3</b>	Septin-7 (Fragment)	2,7801 9	208,94	4,64E -08
<b>Q99KF5</b>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	2,4525 69	512,61	4,95E -08
<b>P48036</b>	Annexin A5	1,9551 03	635,83	5,22E -08
<b>Q9CPU0</b>	Lactoylglutathione lyase	2,8072 28	286,51	5,34E -08
<b>P62862</b>	40S ribosomal protein S30	4,8058 89	117,29	5,47E -08
<b>P35293</b>	Ras-related protein Rab-18	2,4844 28	233,71	5,52E -08
<b>Q3UDY9</b>	Sorting nexin-1 (Fragment)	2,4509 68	71,88	5,89E -08
<b>Q3TN61</b>	Uncharacterized protein	2,3014 03	697,67	6,04E -08
<b>Q3UJR8</b>	Transcription factor BTF3	4,0130 49	258,45	6,06E -08
<b>Q3THI5</b>	AAA domain-containing protein	2,6873 8	258,56	6,15E -08
<b>Q3TGU7</b>	Peptidase_M24 domain-containing protein	2,7554 11	1071,54	6,24E -08
<b>Q3U4U6</b>	T-complex protein 1 subunit gamma	1,9710 01	1355	6,25E -08
<b>A2AMW0</b>	F-actin-capping protein subunit beta	2,0564 62	267,52	6,28E -08
<b>Q3U4M7</b>	Tripeptidyl-peptidase 2	2,2994 63	693,29	7,03E -08
<b>F6ZV59</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	2,3063 34	219,27	7,34E -08
<b>Q3UXI9</b>	DZF domain-containing protein	4,4000 3	162,78	7,87E -08
<b>A0A0U1 RNJ1</b>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	2,0773 29	2735,91	8,01E -08
<b>Q6ZWZ6</b>	40S ribosomal protein S12	2,4100 88	404,08	8,49E -08
<b>Q99LF4</b>	RNA-splicing ligase RtcB homolog	2,4901 87	253,02	8,55E -08
<b>Q3U3A8</b>	Calcium-activated neutral proteinase 2	2,7655 91	119,97	8,56E -08
<b>P97315</b>	Cysteine and glycine-rich protein 1	2,0342 63	536,8	8,94E -08
<b>P70670</b>	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	2,2425 67	384,12	9,05E -08
<b>P05201</b>	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2,2037 19	707,93	1,01E -07



<b>Q3UAZ7</b>	Uncharacterized protein (Fragment)	3,4381 33	285,87	1,06E -07
<b>P62245</b>	40S ribosomal protein S15a	3,0528 83	448,98	1,08E -07
<b>Q8BK64</b>	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	2,0900 8	366,06	1,14E -07
<b>Q8VED4</b>	Serine/threonine-protein phosphatase	2,3540 01	301,98	1,16E -07
<b>Q542I9</b>	AAA domain-containing protein	2,0740 4	122,82	1,19E -07
<b>Q3UHU8</b>	General transcription factor II-I	2,7168 18	437,91	1,24E -07
<b>Q3UKQ3</b>	Uncharacterized protein	6,1602 36	104,89	1,26E -07

## Anexo 2 - Produção científica adicional durante o período de desenvolvimento da tese de doutorado



Review

### Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy

Rosa Amalia Dueñas-Cuellar <sup>1,2,3</sup>, Carlos José Correia Santana <sup>1,2</sup>,  
Ana Carolina Martins Magalhães <sup>1</sup>, Osmindo Rodrigues Pires, Jr. <sup>1</sup>, Wagner Fontes <sup>2</sup> and  
Mariana S. Castro <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil; raduenasc@gmail.com (R.A.D.-C.); carlosjcsantana@gmail.com (C.J.C.S.); bioana.11@gmail.com (A.C.M.M.); osmindo@gmail.com (O.R.P.J.)

<sup>2</sup> Brazilian Center for Protein Research, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil; wagnerfontes2@gmail.com

<sup>3</sup> Research Group on Immunology and Infectious Diseases, Department of Pathology, Faculty of Health Sciences, University of Cauca, 5th Street # 4-70, Popayán 190001, Colombia

\* Correspondence: mscastro@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3109

Received: 18 February 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 15 May 2020



**Abstract:** Apoptosis, a genetically directed process of cell death, has been studied for many years, and the biochemical mechanisms that surround it are well known and described. There are at least three pathways by which apoptosis occurs, and each pathway depends on extra or intracellular processes for activation. Apoptosis is a vital process, but disturbances in proliferation and cell death rates can lead to the development of diseases like cancer. Several compounds, isolated from scorpion venoms, exhibit inhibitory effects on different cancer cells. Indeed, some of these compounds can differentiate between healthy and cancer cells within the same tissue. During the carcinogenic process, morphological, biochemical, and biological changes occur that enable these compounds to modulate cancer but not healthy cells. This review highlights cancer cell features that enable modulation by scorpion neurotoxins. The properties of the isolated scorpion neurotoxins in cancer cells and the potential uses of these compounds as alternative treatments for cancer are discussed.

**Keywords:** apoptosis; cancer; cell death; ion channels; scorpion toxins

**Key Contribution:** This review highlights cancer cell features that enable identification by scorpion neurotoxins. The biological effects of the isolated scorpion neurotoxins in cancer cells and the potential

Article

# Histopathological Evaluation of the Exposure by Cyanobacteria Cultive Containing [D-Leu<sup>1</sup>]Microcystin-LR on *Lithobates catesbeianus* Tadpoles

Osmindo Rodrigues Pires Júnior <sup>1,\*</sup>, Natiela Beatriz de Oliveira <sup>1</sup>, Renan J. Bosque <sup>2</sup>, Maria Fernanda Nice Ferreira <sup>2</sup>, Veronica Moraes Aurélio da Silva <sup>1</sup>, Ana Carolina Martins Magalhães <sup>1</sup>, Carlos José Correia de Santana <sup>1</sup> and Mariana de Souza Castro <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Toxinology Laboratory, Depto. Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; natiela@gmail.com (N.B.d.O.); veronicasilva@gmail.com (V.M.A.d.S.); bioana.11@gmail.com (A.C.M.M.); carlosjcsantana@gmail.com (C.J.C.d.S.); mscastro69@gmail.com (M.d.S.C.)

<sup>2</sup> Depto. Genetics and Morphology, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; rjbosque@go.olemiss.edu (R.J.B.); mfnf@unb.br (M.F.N.F.)

\* Correspondence: osmindo@unb.br or osmindo@gmail.com; Tel.: +55-(61)-3107-3110



Received: 11 June 2018; Accepted: 24 July 2018; Published: 6 August 2018

**Abstract:** This study evaluated the effects of [D-Leu<sup>1</sup>]Microcystin-LR variant by the exposure of *Lithobates catesbeianus* tadpole to unialgal culture *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 strain. The Tadpole was placed in aquariums and exposed to *Microcystis aeruginosa* culture or disrupted cells. For 16 days, 5 individuals were removed every 2 days, and tissue samples of liver, skeletal muscle, and intestinal tract were collected for histopathology and bioaccumulation analyses. After exposure, those surviving tadpoles were placed in clean water for 15 days to evaluate their recovery. A control without algae and toxins was maintained in the same conditions and exhibited normal histology and no tissue damage. In exposed tadpoles, samples were characterized by serious damages that similarly affected the different organs, such as loss of adhesion between cells, nucleus fragmentation, necrosis, and hemorrhage. Samples showed signs of recovery but severe damages were still observed. Neither HPLC-PDA nor mass spectrometry analysis showed any evidence of free Microcystins bioaccumulation.

**Keywords:** [D-Leu<sup>1</sup>]Microcystin-LR; *Lithobates catesbeianus*; tadpoles; exposure; Histopathological evaluation

**Key Contribution:** To our knowledge, this is the first report of cytotoxic effects on amphibian tadpoles, with histopathological description of acute intoxication effects by a Microcystin variant [D-Leu<sup>1</sup>]Microcystin-LR, as well as the concomitant evaluation of bioaccumulation analysis.

## Brazilian Theraphosidae: a toxicological point of view

Keven Wender Rodrigues Macedo<sup>1</sup>, Lucas Jeferson de Lima Costa<sup>1</sup>, Jéssica Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Isadora Alves de Vasconcelos<sup>1</sup>, Jessica Schneider de Castro<sup>1</sup>, Carlos José Correia de Santana<sup>1,2</sup> , Ana Carolina Martins Magalhães<sup>1</sup>, Mariana de Souza Castro<sup>1,2</sup>, Osmino Rodrigues Pires Júnior<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil.

### Abstract

The Theraphosidae family includes the largest number of species of the Mygalomorphae infraorder, with hundreds of species currently catalogued. However, there is a huge lack on physiologic and even ecologic information available, especially in Brazil, which is the most biodiverse country in the world. Over the years, spiders have been presented as a source of multiple biologically active compounds with basic roles, such as primary defense against pathogenic microorganisms or modulation of metabolic pathways and as specialized hunters. Spider venoms also evolved in order to enable the capture of prey by interaction with a diversity of molecular targets of interest, raising their pharmaceutical potential for the development of new drugs. Among the activities found in compounds isolated from venoms and hemocytes of Brazilian Theraphosidae there are antimicrobial, antifungal, antiparasitic and antitumoral, as well as properties related to proteinase action and neuromuscular blockage modulated by ionic voltage-gated channel interaction. These characteristics are present in different species from multiple genera, which is strong evidence of the important role in spider survival. The present review aims to compile the main results of studies from the last decades on Brazilian Theraphosidae with special focus on results obtained with the crude venom or compounds isolated from both venom and hemocytes, and their physiological and chemical characterization.

### Keywords:

Brazilian Theraphosidae  
Crude venom  
Hemocytes  
Biological active  
compounds  
Spiders

\* Correspondence: osmino@gmail.com or osmino@unb.br

<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0004>








Received: 18 January 2021; Accepted: 8 April 2021; Published online: 22 November 2021



On-line ISSN 1678-9199 © The Author(s), 2021 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Salamanders and caecilians, neglected from the chemical point of view

Isadora Alves de Vasconcelos<sup>a</sup> , Jéssica Oliveira de Souza<sup>a</sup> , Jessica Schneider de Castro<sup>a</sup> , Carlos José Correia de Santana<sup>a,b</sup> , Ana Carolina Martins Magalhães<sup>a</sup> , Mariana de Souza Castro<sup>a,b</sup>  and Osmindo Rodrigues Pires Júnior<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Department of Physiological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil; <sup>b</sup>Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

### ABSTRACT

Amphibians are a rich source of biologically active molecules, but the majority of Toxinology scientific articles devoted themselves to investigating the anurans, given its worldwide distribution, abundance, and diversity. On the other hand, only 8.6% of Caudata species and 7.1% of Gymnophiona species have some study. This review brings the most fascinating biological activities from skin, skin secretions, and isolated components of Caudata and Gymnophiona species including taste aversion, adhesive secretion, toxic effect in animals, and cytotoxic activity as well as described molecules such as biogenic amines, tetrodotoxins, steroidal alkaloids, proteins, antimicrobial peptides, and pheromones.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 June 2021  
Revised 31 August 2021  
Accepted 1 September 2021

### KEYWORDS

Salamanders; caecilians; toxins; skin secretion; bioactive compounds

### Introduction

The Amphibia class has three living orders: Anura, Caudata, and Gymnophiona. Anura (frogs and toads) has worldwide distribution occurring in all continents except Antarctica, with more than 8000 species distributed and 56 families (Frost 2021). Frogs and toads live in aquatic and terrestrial habitats from lowlands to mountaintops but excluded from estuarine and marine habitats. More than a half of all described species live in the tropics, especially in New World. Anatomically, frogs and toads have tailless bodies, flat heads, big mouths; and long, muscular hindlimbs associated with jumping (Duellman *et al.* 1994).

Caudata (salamander and newts) is a tailed amphibian's group, basically occurring in Northern Hemisphere, in temperate and subtropical areas of North America, Eurasia, and North Africa. The exception is subfamily Bolitoglossinae (Plethodontidae), the only tropical salamanders with occurrence in Mexico and Central America, and the Amazon basin. Caudata presents over 760 species distributed in 9 families (Frost 2021).

Gymnophiona (caecilians) are limbless amphibians with an earthworms-like appearance, occurring worldwide in the tropics, except for Madagascar and Oceania (Duellman *et al.* 1994). More than 210 species of caecilians are known, distributed among 10 families

(Frost 2021). Most caecilians are fossorial, living in moist soils usually adjacent to streams, lakes, and swamps; although there are a few aquatic species. These animals live mostly hidden, having burrowing habits and are not commonly seen. Because of this secretive nature, their biology is poorly known, and much of the knowledge comes from observations made during capture and from captive or museum specimens (Webb *et al.* 1981; Wilkinson 2012).

In recent times, amphibians have faced a serious population decline as a result of habitat loss by the exponentially increasing human population, and a significant fungal infection called chytridiomycosis is decimating populations around the world. *Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivivans* fungus, both infect adult amphibian skin and tadpole mouthparts (Basanta *et al.* 2019).

The amphibian skin is of extreme importance. Being permeable to water, it has several key roles necessary for the survival of these animals, such as gas exchange, osmoregulation, control of temperature, and defence mechanisms against pathogens and predators (Duellman *et al.* 1994, Clarke 1997). All amphibians have mucous glands and poison glands on their skin that also help with these functions. Mucous glands are small and numerous, usually scattered throughout the body, keeping the skin moist and



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Exploring the biological activities and proteome of Brazilian scorpion *Rhopalurus agamemnon* venom

Ana Carolina Martins Magalhães<sup>a,\*</sup>, Carlos José Correia de Santana<sup>a,b</sup>, Rafael D. Melani<sup>c</sup>, Gilberto B. Domont<sup>c</sup>, Mariana S. Castro<sup>a,b</sup>, Wagner Fontes<sup>b</sup>, Peter Roepstorff<sup>d</sup>, Osmino Rodrigues Pires Júnior<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Taxinology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology/IB, University of Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup> Proteomic Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense M 5230, Denmark

### ABSTRACT

Scorpion venoms are formed by toxins harmful to various organisms, including humans. Several techniques have been developed to understand the role of proteins in animal venoms, including proteomics approach. *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) is the largest scorpion in the Buthidae family in the Brazilian Cerrado, measuring up to 110 mm in total length. The accident with *R. agamemnon* is painful and causes some systemic reactions, but the specie's venom remains uninvestigated. We explore the venom protein composition using a proteomic and a biological-directed approach identifying 230 protein compounds including enzymes like Hyaluronidase, metalloproteinase, L-amino acid oxidase and amylase, the last two are first reported for scorpion venoms. Some of those new reports are important to demonstrate how distant we are from a total comprehension of the diversity about venoms in general, due to their diversity in composition and function. **Biological significance:** In this study, we explored the composition of venom proteins from the scorpion *Rhopalurus agamemnon*. We identified 230 proteins from the venom including new enzyme reports. These data highlight the unique diversity of the venom proteins from the scorpion *R. agamemnon*, provide insights into new mechanisms of envenomation and enlarge the protein database of scorpion venoms. The discovery of new proteins provides a new scenario for the development of new drugs and suggests molecular targets to venom components.

### 1. Introduction

Scorpionic accidents are directly related to the neurotoxins present in these venoms. These components are considered the most important due to their central role in the process of intoxication after envenomation, and are the best-characterized venom components, both biochemically and functionally (Cid Uribe et al., 2017 [1]). But there are still other protein components present that have a relevant role in envenoming and also a therapeutic potential such as enzymes, host-defense peptides and protease inhibitors.

Several techniques have been developed to understand the role of proteins in animal venoms (Bringans et al., 2008 [2]). The proteome, considered as the complement of a genome for a specific condition and time, including the post-translational modifications, is a relevant target for the aforementioned techniques (Wilkins et al., 1996 [3]).

One of the major benefits of proteomics is to provide a broad description of the proteins present in a small amount of venom sample, contributing to a deeper comprehension of the nature of venom's toxic

effects. Information about the toxins can be used in several ways: for example, as molecular tools for studying physiological processes (Chaim et al., n.d. [4]), or for the development of therapeutic protocols (Utkin, 2015 [5]). Venom proteomes also represent great potential for clinical diagnosis and development of new medicines for clinical use.

*R. agamemnon* (Koch, 1839) is the largest scorpion in the Buthidae family at Brazilian Cerrado, measuring up to 110 mm in total length. It is yellowish brown in color, with yellowish paws and almost black terminal segments of the metasoma. The species occurs in Brazil's Cerrado areas at states of Goiás, Bahia, Piauí, Pernambuco, and Tocantins (Brandão and Franço, 2010 [6]).

Some cases of accidents with *R. agamemnon* have been reported: two of them in Piauí and another one in Bahia (Brazil). The reported cases refer to a 54 year old woman, an 18 year old man (Carvalho et al., 2007 [7]), and a 37 year old man (Brandão and Franço, 2010 [6]). The patients had severe local pain, agitation, hyper salivation, tachycardia, blurred vision, tearing, muscle spasms, and hypotension. The second case had severe local pain, drooling, drowsiness, and irradiated pain in

\* Corresponding author.

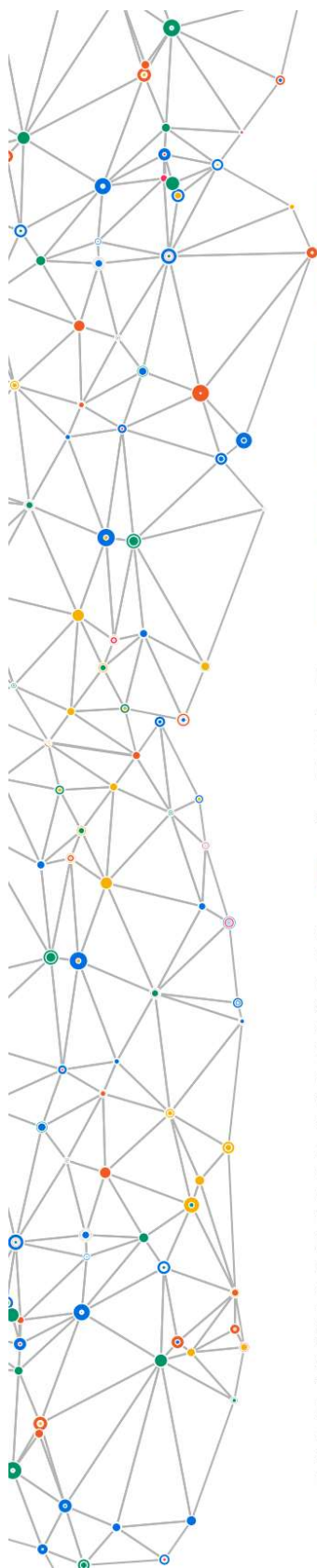
E-mail address: [aninha@aluno.unb.br](mailto:aninha@aluno.unb.br) (A.C.M. Magalhães).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104119>

Received 20 October 2020; Received in revised form 19 December 2020; Accepted 19 January 2021

Available online 1 February 2021

1874-3919/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



# PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE ORGANISMOS MARINHOS: UM ENFOQUE ANTIMICROBIANO, ANTITUMORAL E ANTIVIRAL

Osmindo Rodrigues Pires Júnior<sup>a</sup>  
Ana Carolina Martins Magalhães<sup>a</sup>  
Carlos José Correia de Santana<sup>a</sup>  
Mariana de Souza Castro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Brasília

## RESUMO

Os organismos marinhos, ao longo da evolução, desenvolveram sofisticados mecanismos químicos, utilizados na comunicação, defesa, reprodução ou regulação da homeostase. Interessantemente, muitos desses compostos apresentam atividades biológicas, como agentes antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossuppressores e neurotóxicos, ganhando especial atenção devido a sua potencial aplicação como ferramentas farmacológicas no campo do diagnóstico e da terapia de diversas doenças, como infecções, processos inflamatórios, desordens lipídicas, distúrbios imunomodulatórios, e no combate a vários tipos de câncer, atuando na divisão celular e no apoptose. De acordo com a literatura, a atividade citotóxica dos peptídeos não é mediada por interações entre receptores específicos, mas pela interação direta em sítios polares e não-polares em membranas citoplasmáticas bacterianas ou células tumorais, interferindo assim nos processos celulares, propagação e replicação. Muitos peptídeos antimicrobianos (PAMs) adotam uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice anfipática somente quando em contato com as membranas celulares, tornando-se ativos e perturbando a integridade da membrana, criando falhas ou formando poros. A carga positiva dos PAMs favorece uma maior interação com os fosfolípidios negativamente carregados (fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) das membranas bacterianas/tumorais do que com fosfolípidios "zwitteriônicos" (neutros) presentes na face extracelular da membrana de células normais de mamíferos, dessa forma criando uma seletividade e consequentemente um potencial uso terapêutico. Este capítulo consiste em uma pequena revisão sobre alguns peptídeos já isolados e caracterizados de diversos organismos marinhos, com foco nas atividades antimicrobiana, antitumoral e antiviral.

67





# Mastoparans: A Group of Multifunctional $\alpha$ -Helical Peptides With Promising Therapeutic Properties

Carlos José Correia de Santana<sup>1,2</sup>, Osmindo Rodrigues Pires Júnior<sup>1</sup>, Wagner Fontes<sup>2</sup>, Mário Sérgio Palma<sup>3</sup> and Mariana S. Castro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>3</sup>Department of Basic and Applied Biology, Institute of Biosciences of Rio Claro, São Paulo State University, UNESP, Rio Claro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Denis Servent,  
Université Paris-Saclay, France

### Reviewed by:

Christian W. Gruber,  
Medical University of Vienna, Austria  
Johannes Koehbach,  
The University of Queensland,  
Australia

### \*Correspondence:

Mariana S. Castro  
mscastro@unb.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Biochemistry,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 29 November 2021

Accepted: 15 March 2022

Published: 24 June 2022

### Citation:

de Santana CJC, Pires Júnior OR,  
Fontes W, Palma MS and Castro MS  
(2022) Mastoparans: A Group of  
Multifunctional  $\alpha$ -Helical Peptides With  
Promising Therapeutic Properties.  
Front. Mol. Biosci. 9:824989.  
doi: 10.3389/fmolb.2022.824989

Biologically active peptides have been attracting increasing attention, whether to improve the understanding of their mechanisms of action or in the search for new therapeutic drugs. Wasp venoms have been explored as a remarkable source for these molecules. In this review, the main findings on the group of wasp linear cationic  $\alpha$ -helical peptides called mastoparans were discussed. These compounds have a wide variety of biological effects, including mast cell degranulation, activation of protein G, phospholipase A<sub>2</sub>, C, and D activation, serotonin and insulin release, and antimicrobial, hemolytic, and anticancer activities, which could lead to the development of new therapeutic agents.

**Keywords:** social and solitary wasps, venom, linear cationic  $\alpha$ -helical peptide, mastoparans, mast cell degranulation, antimicrobial peptide

## INTRODUCTION

Mastoparans are small peptides (commonly tetradecapeptides with an amidated C-terminal) that were originally described for promoting degranulation and the release of histamine in mast cells. This group of peptides is found in the venom of several species of social and solitary wasps (Hirai et al., 1979b; Konno et al., 2016; Lee et al., 2016; dos Santos Cabrera et al., 2019; Abd El-Wahed et al., 2021). Several studies have demonstrated that mastoparans have a wide variety of biological effects, including activation of protein G (Higashijima et al., 1988), phospholipase A<sub>2</sub>, C, and D activation (Cho et al., 1995; Himbergen et al., 1999), serotonin and insulin release (Ozaki et al., 1990), antimicrobial, hemolytic, and anticancer activities (Park et al., 1995; Yamada et al., 2005; Rangel et al., 2011; Wang et al., 2014; de Azevedo et al., 2015), and other properties. In plants, mastoparans were used to promote the intracellular Ca<sup>+2</sup> increase to regulate cell-to-cell communication (Tucker and Boss, 1996).

The consensus sequence of mastoparans using a WebLogo generator is indicated in **Figure 1**. Most mastoparans have a length of 14 amino acid residues, (with the exceptions of mastoparan-VT7, mastoparan-like peptide-12b, and mastoparan-VT2 containing 13 amino acid residues; mastoparan-V1 and-V2 containing 15 amino acid residues; and dominulin-A, dominulin-B, and PMM with 17 amino acid residues), and a net positive charge with an amidated C-terminus. They also have a high content of hydrophobic residues (Ile, Leu, Ala, Trp, and Val), which are commonly placed at positions 1, 3, 6, 10, 13, and 14, while positions 4, 11, and 12 are usually positively charged residues (**Figure 1**).