

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação Fisiologia-Farmacologia

Departamento de Fisiologia Biofísica

Mariana de Oliveira Silva

**EFEITOS ANTICÂNCER E ANTIMETASTÁTICOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS
DO LyeTxI-b: interação com membranas, modulação da adesão, migração e
invasão de células de câncer de mama**

Belo Horizonte

2025

Mariana de Oliveira Silva

**EFEITOS ANTICÂNCER E ANTIMETASTÁTICOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS
DO LyeTxI-b: interação com membranas, modulação da adesão, migração e
invasão de células de câncer de mama**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Profa Dra Elaine Maria de Souza Fagundes

Belo Horizonte

2025

043

Silva, Mariana de Oliveira.

Efeitos anticâncer e antimetastáticos de peptídeos derivados do LyeTxI-b: interação com membranas, modulação da adesão, migração e invasão de células de câncer de mama [manuscrito] / Mariana de Oliveira Silva. – 2025. 133 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Profa Dra Elaine Maria de Souza Fagundes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Peptídeos Antimicrobianos. 3. Neoplasias de Mama Triplo Negativas. 4. Metástase Neoplásica. 5. Adesão Celular. 6. Adesões Focais. I. Fagundes, Elaine Maria de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 403 DE MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

Às 13:00 horas do dia 10 do mês de outubro de 2025, Transmitida através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Mariana de Oliveira Silva**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai**, FMUSP, **Profa. Dra. Elaine Amaral Leite**, FaFar/Universidade Federal de Minas Gerais, **Dra. Betânia Barros Cota**, CPqRR/Fiocruz e o **Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino**, FaFar/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"EFEITOS ANTICÂNCER E ANTIMETASTÁTICOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DO LYETXI-B: INTERAÇÃO COM MEMBRANAS, MODULAÇÃO DA ADESÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de outubro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 21/10/2025, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Betania Barros Cota, Usuário Externo**, em 22/10/2025, às 07:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Maria de Souza Fagundes, Professora do Magistério Superior**, em 22/10/2025, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2025, às 22:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Nagai, Usuária Externa**, em 06/11/2025, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4652849** e o código CRC **E29E1954**.

COLABORAÇÃO

Prof. Dr. Johannes A. Eble - Universidade de Münster - Münster, Alemanha

Profa. Dra. Maria Elena de Lima, Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte

FINANCIAMENTO:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Programa Cátedra Brasil da Universidade de Münster 2022 - Código de Financiamento 88881.833929/2023-01

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Processo: 406048/2018-5

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Processo: APQ-004

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela fidelidade e por me sustentar, principalmente, nos meus momentos de incertezas que são muitos e recorrentes.

Agradeço à Profa Elaine por toda paciência e compreensão, pela orientação, pelas oportunidades e todo aprendizado durante esses quase cinco anos; à Profa Elisabeth Neumann por tudo que fez por mim desde o início dessa caminhada. Agradeço ao Prof Johannes e a todos do laboratório na universidade de Münster por ter nos recebido tão bem, por toda ajuda e aprendizado nesse um ano de doutorado sanduíche. Também agradeço à Flávia, pós doc que esteve comigo durante o sanduíche por aliviar o peso das responsabilidades e das tarefas, pela companhia sempre agradável e todo acolhimento.

Agradeço a UFMG, ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro, com o qual foi possível desenvolver este projeto.

Agradeço aos meus amigos e familiares por todo apoio, incentivo e por acreditarem na minha capacidade, em especial à Denise, por acreditar e investir em mim, por sempre me apoiar e me encorajar. E a todos os outros que direta ou indiretamente tornaram essa jornada mais fácil e agradável, meus companheiros de laboratório Daniel, Lara, Tayrine, Rebeca, Renata, Victória, Juan, Gustavo e Joaquim, também à Sandhra e Profa Fátima por todo suporte e por permitir o uso da infraestrutura do laboratório nos momentos de necessidade. Agradeço à Ximena, Giorgia, Lydia, Sophie e Talita por tornarem meus dias em Münster mais alegres e também ao Danielle por todos ensinamentos e ajuda nos experimentos, além da excelente companhia.

Obrigada ao 1002B por ter sido meu lar nesses quatro anos cheio de amor, companheirismo e muitas risadas. Millena, Camila, Giovana, Marcela, Raquel, obrigada meninas, por me receberem tão bem, por todo cuidado e carinho, pela amizade e pelas longas sessões de cinema, pipoca e fofocas.

E por aguentarem minhas reclamações e dúvidas constantes, por toda ajuda e apoio emocional, pela companhia que alegrava os dias, por dividir o fardo da pós agradeço especialmente à Gabizinha, Karen e César, não tenho palavras para descrever a importância de vocês na minha vida, com certeza não chegaria aqui sem

vocês que estiveram ao meu lado desde o início. À Karen, em especial, por ter sido a minha melhor companhia e por ter me acolhido nas crises de ansiedade e cuidado tão bem de mim, mesmo que de longe no período do meu doutorado sanduíche, minha eterna gratidão.

E por fim, mesmo elas não estando mais presentes, preciso deixar registrada minha eterna gratidão à minha guardiã e à minha mãezinha. Minha guardiã, Said, foi o meu exemplo de caráter, honestidade, independência feminina, bondade, amor a Deus e ao próximo; a minha mãe, Maria Aparecida, mulher guerreira (Maria, né meus queridos!), meu exemplo de força, de bom humor, positividade e otimismo frente a qualquer dificuldade que a vida possa trazer. Minha guardiã me ensinou o caminho e minha mãe fez incontáveis sacrifícios para que eu o seguisse, sem elas eu não seria quem sou e, definitivamente, não estaria onde estou. Sinto a falta de vocês todos os dias, com todo meu amor, muito obrigada!

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

— *Guimarães Rosa*

RESUMO

O câncer de mama, especialmente o tipo triplo-negativo (TNBC), é uma das principais causas de mortalidade em mulheres no mundo, sendo caracterizado por alta agressividade, prognóstico desfavorável e resistência aos tratamentos convencionais, devido à ausência de alvos moleculares específicos. Nesse contexto, a metástase representa o principal fator de mortalidade. Peptídeos derivados de venenos têm emergido como potenciais terapias anticâncer, podendo modular a adesão das células à matriz extracelular (MEC), reduzindo migração, invasão e, conseqüentemente, a metástase. O presente estudo investigou o potencial anticâncer e antimetastático de peptídeos derivados do peptídeo isolado da peçonha da aranha *Lycosa erithrognatha* LyeTxI e sua forma acetilada (LyeTxI-Ac), seu derivado sintético LyeTxI-b e três derivados minimizados (LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK e LyeTxImn-Ac) em duas linhagens de câncer de mama: MDA-MB-231 (TNBC, alto potencial metastático) e MCF-7 (baixo potencial metastático). A análise de citotoxicidade revelou que a média de CI50 para os peptídeos minimizados foi de 91,03 μM e 16,47 μM , e para os peptídeos maiores de 11,51 μM e 3,53 μM , para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. Ensaio de QCM-D, que avaliam interação dos peptídeos com membrana, demonstraram que dois peptídeos minimizados causaram perturbação em membranas lipídicas modelo de células tumorais em concentrações não citotóxicas. Ensaio de adesão realizados com componentes da matriz extra-celular (MEC) como colágeno tipo I e fibronectina mostraram que os peptídeos minimizados LyeTxImnK e LyeTxImnK-Ac aumentaram significativamente a adesão celular ao colágeno tipo I e à fibronectina, em concentrações não citotóxicas. O LyeTxImn-Ac também aumentou a adesão à fibronectina em MDA-MB-231, enquanto LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac exibiram efeitos discretos ou isolados. Na avaliação da formação de complexos de adesão-focal (FAs) em MDA-MB-231, o tratamento com LyeTxI-b e LyeTxImnK resultou em aumento significativo do número de FAs, evidenciado por imunofluorescência. Estudos de migração celular em 2D, mostraram que o peptídeo LyeTxI-b reduziu de forma significativa a migração de células MDA-MB-231, enquanto as células MCF-7, de fenótipo pouco invasivo, não foi observado diferente com o controle. Os peptídeos minimizados não interferiram com a migração celular. Já nos ensaios de invasão 3D com esferoides em gel de colágeno tipo I, os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK e LyeTxImnK-Ac reduziram significativamente a invasão das duas

linhagens. Avaliação de metaloproteinases, endopeptidases responsáveis pela degradação da MEC e pela promoção da migração celular, em gel de zimografia mostraram que os mesmos peptídeos suprimiram a produção MMP-2 e MMP-9 na sua forma ativa, nas duas linhagens. Os resultados indicam que os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK e LyeTxImnK-Ac possuem atividade anticâncer e antimetastática in vitro, caracterizada pela maior afinidade à membranas modelo de células tumorais, aumento da adesão celular a substratos da MEC, formação de FAs, redução da migração 2D e invasão 3D, e supressão de MMPs, sugerindo seu potencial inovador no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para redução de metástases em câncer de mama.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos; Câncer de mama triplo-negativo; Metástase; Adesão celular; Complexo de adesão-focal.

ABSTRACT

Breast cancer, particularly the triple-negative subtype (TNBC), is one of the leading causes of mortality among women worldwide and is characterized by high aggressiveness, poor prognosis, and resistance to conventional therapies due to the absence of specific molecular targets. In this context, metastasis represents the primary cause of cancer-related death. Venom-derived peptides have emerged as promising anticancer therapies, as they can modulate cell adhesion to the extracellular matrix (ECM), thereby reducing migration, invasion, and consequently metastasis. The present study investigated the anticancer and antimetastatic potential of peptides derived from LyeTxI, a peptide isolated from the venom of the spider *Lycosa erithrognatha*, including its acetylated form (LyeTxI-Ac), its synthetic derivative (LyeTxI-b), and three minimized derivatives (LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK, and LyeTxImn-Ac), in two breast cancer cell lines: MDA-MB-231 (TNBC, high metastatic potential) and MCF-7 (low metastatic potential). Cytotoxicity analysis revealed that the mean IC_{50} values for the minimized peptides were 91.03 μ M and 16.47 μ M, whereas for the larger peptides they were 11.51 μ M and 3.53 μ M, for the MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, respectively. QCM-D assays, which evaluate peptide–membrane interactions, demonstrated that two minimized peptides induced disruption of model lipid membranes mimicking tumor cells at non-cytotoxic concentrations. Cell adhesion assays performed using extracellular matrix (ECM) components, such as type I collagen and fibronectin, showed that the minimized peptides LyeTxImnK and LyeTxImnK-Ac significantly increased cell adhesion to type I collagen and fibronectin at non-cytotoxic concentrations. LyeTxImn-Ac also enhanced adhesion to fibronectin in MDA-MB-231 cells, whereas LyeTxI, LyeTxI-b, and LyeTxI-Ac exhibited discrete or isolated effects. In the evaluation of focal adhesion (FA) complex formation in MDA-MB-231 cells, treatment with LyeTxI-b and LyeTxImnK resulted in a significant increase in the number of FAs, as evidenced by immunofluorescence analysis. Two-dimensional (2D) cell migration assays showed that LyeTxI-b significantly reduced the migration of MDA-MB-231 cells, whereas no differences compared to the control were observed in MCF-7 cells, which display a less invasive phenotype. The minimized peptides did not interfere with cell migration. In three-dimensional (3D) invasion assays using spheroids embedded in type I collagen gels, the peptides LyeTxI-b, LyeTxImnK, and LyeTxImnK-Ac significantly reduced the invasion of both cell lines. Matrix metalloproteinase (MMP)

activity, evaluated by gel zymography, demonstrated that these same peptides suppressed the production of active MMP-2 and MMP-9 in both cell lines. Collectively, these results indicate that LyeTxI-b, LyeTxImnK, and LyeTxImnK-Ac exhibit in vitro anticancer and antimetastatic activity, characterized by enhanced affinity for tumor cell model membranes, increased cell adhesion to ECM substrates, FA formation, reduced 2D migration and 3D invasion, and suppression of MMP activity, suggesting their innovative potential in the development of new therapeutic strategies aimed at reducing metastasis in breast cancer.

Keywords: Antimicrobial peptides; Triple-negative breast cancer; Metastasis; Cell adhesion; Focal adhesion complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítios metastáticos preferenciais do Câncer de mama. (Modificado de Xu <i>et al.</i> , 2024).	22
Figura 2 – Esquema simplificado do mecanismo de adesão focal. As proteínas de ligação à MEC (receptores da MEC) são castanhas, as proteínas de estrutura (Modificado de Calkins e Youssef, 2016).	25
Figura 3 – Representação esquemática da interação do AMP com a bacteriana. (Modificado de Manniello <i>et al.</i> , 2021).	30
Figura 4 – Estruturas dos peptídeos LyeTxI e LyeTxI-b.	33
Figura 5 – Esquema básico do sensor QCM composto por um cristal e eletrodo. (Modificado de Migoñ; Wasilewski; Suchy, 2020).	42
Figura 6 – Esquema ilustrativo do ensaio de wound healing com Culture-Inserts de dois poços (Ibidi)	45
Figura 7 – Esquema ilustrativo do ensaio de invasão em gel de colágeno tipo I de esferoides de células de câncer de mama	46
Figura 8.1 – Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxI-b (0,5 µM) com bicamada suportada de (A) DOPC, (B) DOPC+20% POPS, (C) DOPC+10% Colesterol e (D) DOPC+20% POPS +10% Colesterol.	52
Figura 8.2 – Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxI-b (4 µM) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol.....	53
Figura 8.3 – Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxImnK-Ac (12,5 µM) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol.....	54
Figura 8.4 – Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxImnK (12,5 µM) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol	55
Figura 9 – Figura representativa da morfologia de células MDA-MB-231 em placas não tratadas para adesão por microscopia óptica	58
Figura 9.1 Efeito dos peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac sobre a adesão de células MDA-MB-231 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F).	60
Figura 9.2 – Efeito dos peptídeos LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK e LyeTxImn-Ac sobre a adesão de células MDA-MB-231 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F).....	62
Figura 9.3 – Efeito dos peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac sobre a adesão de células MCF-7 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F).	65
Figura 9.4 – Efeito dos peptídeos LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK sobre a adesão de células MCF-7 a colágeno tipo I (A e C) ou fibronectina (B e D).	67

Figura 10 – Aumento na formação de complexos de adesão focal em células MDA-MB-231 após tratamento com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxI-mnK.	70
Figura 11 – Alterações morfológicas em células MDA-MB-231 após tratamento com peptídeos.....	73
Figura 12.1 – Ensaio de migração celular 2D (wound healing) em células MDA-MB-231 após 24 h de tratamento com os LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK.	76
Figura 12.2 – Ensaio de migração celular 2D (wound healing) em células MCF-7 após 24 h de tratamento com os LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK.	77
Figura 13.1 – Os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK reduzem a invasão de esferoides de células MDA-MB-231 em gel de colágeno tipo I.	79
Figura 13.2 – Os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK reduziram a invasão de esferoides de células MCF-7 em gel de colágeno tipo I.	80
Figura 14.1 – Os peptídeos LyeTxI-b (0,5 µM), LyeTxImnK-AC (12,5 µM) e LyeTxImnK (12,5 µM) suprimiram a secreção de metaloproteinases de matriz em células MDA-MB-231.	82
Figura 14.2 – Os peptídeos LyeTxI-b (0,4 µM), LyeTxImnK-AC (2 µM) e LyeTxImnK (2 µM) suprimiram a secreção de metaloproteinases de matriz em células MCF-7.	83
Figura 15 – Ativação da integrina pela ligação da talina à subunidade β e separação das subunidades α e β (Modificado de Wegener & Campbell, 2008).	84
Figura 16 – Padrão de aminoácidos da subunidade α (A-x3-G-x3-L) e da subunidade β (V-x3-I-x3-G) e a interação entre os domínios transmembranara α e β da integrina (Modificado de Berger <i>et al.</i> , 2009).....	85
Figura 17.1 – Representação estrutural da interação entre o peptídeo sintético LyeTxI-b (sequência: <i>IWLTALKFLGKNLGKLAKQQLAKL</i> , em rosa) e o domínio transmembrana da integrina β1 (sequência: <i>IPIVAGVVAGIVLIGLALLLIW</i> , em roxo).	86
Figura 17.2 – Representação estrutural da interação entre o peptídeo sintético LyeTxImnK (sequência: <i>IWLTKALKFLGKNLGK</i> , em rosa) e o domínio transmembrana da integrina β1 (sequência: <i>IPIVAGVVAGIVLIGLALLLIW</i> , em roxo).	87
Figura 18 – Resumo dos resultados.	89
Figura 19 – Possível mecanismo de ação dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK em células de câncer de mama.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos peptídeos derivados do LyeTxI.	38
Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória 50% (CI ₅₀) da toxina nativa e peptídeos sintéticos na viabilidade de células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.....	49
Tabela 3 – Comparação entre o padrão de aminoácidos da subunidade α da integrina com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxmnK.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Peptídeos Antimicrobianos

Bax – Proteína X associada a Bcl-2 (proteína pró-apoptótica)

Bcl-2 – Linfoma de células B 2 (proteína antiapoptótica)

Ctn – Crotalicidina

CXCL9, CCL22 – Quimiocinas

Da – Dalton (massa molecular)

ER / RE – Receptor de Estrogênio

ERK – Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares

FA / FAs – Complexo(s) de Adesão Focal

FAK – Quinase de Adesão Focal

HER-2 – Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HS27 – Fibroblastos dérmicos humanos

IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 – Interleucinas

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinases (de matriz ou de membrana)

MT1-MMP - Metaloproteinase de Matriz tipo 1 da Membrana (MMP14)

MTT – (ensaio de viabilidade celular com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

PC – Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

PIs – Fosfatidilinositóis

PR / RP – Receptor de Progesterona

PS – Fosfatidilserina

QCM-D – *do inglês* Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring

SFB – Soro Fetal Bovino

SM – Esfingomielina

Src – Tirosina Quinase da Família Src (proto-oncogene)

TAM / TAMs – Macrófagos Associados ao Tumor

TEM – Transição Epitélio-Mesenquimal

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador β

TIMP – Inibidores Teciduais das Metaloproteinases

TNBC – Câncer de mama Triplo-Negativo

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Câncer de Mama	20
1.2 Membrana Celular do Câncer de Mama e Moléculas Envolvidas na Motilidade, Migração, Invasão e Metástase.....	23
1.3 Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Toxinas Naturais como Modelos para Descoberta de Fármacos contra o Câncer de Mama	28
1.4 LyeTxI-b, um AMP derivado de uma toxina de aranha <i>Lycosa erythrognatha</i> , como modelo para a descoberta de medicamentos para o câncer de mama	32
1.5 Justificativa	35
2. OBJETIVOS.....	37
Objetivo Geral.....	37
Objetivos específicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Peptídeos.....	38
3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo	39
3.3 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (CI ₅₀) e avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT	39
3.4 Análise de Interação Peptídeo-Membrana por Microbalança de Cristal de Quartzo com monitoramento de Dissipação (QCM-D).....	40
3.5 Adesão celular a componentes da matriz extracelular: colágeno tipo I, fibronectina	42
3.6 Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK.....	43
3.7 Análise morfológica de células MDA-MB-231 tratadas pelos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK.....	44
3.8 Ensaio de migração celular em modelo 2D (<i>wound healing</i>)	44
3.9 Invasão celular em modelo 3D com esferoides em géis de colágeno tipo I45	
3.10 Secreção de MMPs gelatinolíticas	46
3.11 Análise <i>in silico</i> da interação de LyeTxI-b e LyeTxImnK com a subunidade β da integrina β 1	47
3.12 Análise estatística	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 Citotoxicidade dos peptídeos para duas linhas celulares de câncer de mama	49
4.2 Efeitos dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK sobre a estabilidade e as propriedades viscoelásticas de bicamadas lipídicas com diferentes composições avaliados por QCM-D	50
4.3 Efeito dos peptídeos na adesão de células MDA-MB-231 e MCF-7 a dois componentes da matriz extracelular (colágeno I, fibronectina)	56

4.4	Análise do efeito dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK na formação de complexos de adesão focal (FA) em células MDA-MB-231 por microscopia confocal	68
4.5	Efeito dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK na morfologia de células MDA-MB-231	72
4.6	Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na migração celular em modelos 2D (<i>wound healing</i>)	75
4.7	Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na invasão de esferoides de MDA-MB-231 e MCF-7 em géis de colágeno tipo I (3D)	78
4.8	Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs)	81
4.9	Análise <i>in silico</i> da interação dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxmnK com subunidade β da integrina $\beta 1$	84
	Resumo Dos Resultados	88
5.	DISCUSSÃO	90
5.1	Proposta de mecanismo do potencial antimetastático dos peptídeos derivados e sintéticos da peçonha de <i>Lycosa erythrognatha</i>	104
6.	CONCLUSÃO	106
	Referências Bibliográficas	107
	APÊNDICE A - Interação de LyeTxI-b com a subunidade β da integrina $\beta 1123$	
	APÊNDICE B - Interação de LyeTxImnK com a subunidade β da integrina $\beta 1128$	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

Câncer é um termo abrangente usado para definir mais de cem diferentes tipos de doenças malignas caracterizadas pelo crescimento desordenado de células com potencial migratório que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes (INCA, 2022). O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, reduzindo a expectativa de vida globalmente no século XXI. Em 2022, o número de casos de câncer foi de 2,3 milhões resultando em 670 mil mortes por câncer em todo o mundo (Freihat; Sipos; Kovacs; 2025).

O câncer de mama é o tipo de neoplasia maligna mais prevalente entre as mulheres no Brasil e no mundo, sendo responsável por elevados índices de morbimortalidade. Para cada ano do triênio de 2023 a 2025, foram estimados 73.610 novos casos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos por 100 mil mulheres (Instituto Nacional de Câncer, 2022). No ano 2023, o Brasil teve mais de 20 mil óbitos por câncer de mama em mulheres (Instituto Nacional de Câncer, 2025).

A heterogeneidade do câncer de mama levou a diferentes classificações baseadas em características morfológicas e moleculares, sendo a classificação mais comumente utilizada na clínica aquela que classifica os diferentes subtipos baseando-se nos receptores hormonais. Os subtipos Luminal A e Luminal B expressam receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), porém, Luminal A apresenta baixo nível de Ki-67 (indicador de proliferação celular) e, portanto, um melhor prognóstico. O subtipo HER-2 + expressa o Receptor 2 de Fator de Crescimento Humano em excesso, e o subtipo triplo-negativo (TNBC) não expressa nenhum desses receptores hormonais, sendo, portanto, o mais agressivo, associado a um prognóstico desfavorável e resistência aos tratamentos existentes, devido à falta de alvos moleculares para a terapia (Harbeck *et al.*, 2019; Nolan, Lindeman, Visvader, 2021).

O câncer de mama triplo-negativo representa 15-20% de todos os casos de câncer de mama, e sua taxa de sobrevivência é a mais baixa. Esse tipo de câncer é altamente invasivo, causando metástases distantes, principalmente no cérebro e nas vísceras (Costa *et al.*, 2021). As estratégias de tratamento incluem cirurgia e radioterapia, realizadas na mama, linfonodos e áreas adjacentes. No entanto, a

remoção do tumor primário da maioria dos cânceres sólidos não elimina as metástases, que representam um dos maiores obstáculos para alcançar a cura (Janssen *et al.*, 2017).

Nesse contexto, são comumente utilizadas nos ensaios pré-clínicos de câncer de mama, as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, que representam dois subtipos diferentes de câncer de mama que mais acometem a população. A linhagem MCF-7 é luminal, de baixa invasividade e expressa os receptores hormonais (RE, RP e HER-2), o que torna essas células sensíveis às terapias hormonais, à indução de morte por apoptose e paradas no ciclo celular. Já a linhagem MDA-MB-231 é triplo-negativa, apresenta um perfil invasivo e metastático e é mais propensa a sofrer autofagia em resposta ao estresse ou tratamento. Essa resposta diferencial é essencial para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes (Moon *et al.*, 2020; Sherbakov *et al.*, 2023).

O microambiente tumoral contém células tumorais não metastáticas e metastáticas, células estromais, incluindo fibroblastos, células imunes, células neuronais e células endoteliais vasculares. Todas essas células estão imersas na matriz extracelular (MEC) e são alimentadas por vasos sanguíneos provenientes da angiogênese (Malandrino *et al.*, 2018). No câncer, os fibroblastos frequentemente induzem a progressão tumoral ao estimular a proliferação e o fenótipo invasivo das células cancerígenas, o que aumenta seu potencial metastático (Janssen *et al.*, 2017).

As células metastáticas podem escapar do tumor primário, entrar nos sistemas vasculares, invadir e colonizar órgãos secundários, espalhando-se por todo o corpo (Wang e Huang, 2017). No processo de invasão, as células cancerígenas movem-se através da MEC, interagindo com diversas proteínas e arranjos supramoleculares, penetrando camadas de células epiteliais e endoteliais, e invadindo várias estruturas da MEC (Eble e Niland, 2019). A capacidade das células de se desagregar umas das outras e da MEC, assim como sua capacidade de migrar para outras partes do corpo, está associada à regulação negativa de moléculas da membrana celular, como as caderinas, que promovem a interação célula-célula, e as integrinas que promovem a adesão célula-MEC a partir da formação de complexos de adesão focal (Abduljawwad; Ahmed, 2019). **(Figura 1)** O câncer de mama apresenta uma certa predileção para

metástase em órgãos específicos, como cérebro, pulmão, fígado e ossos (Xu *et al.*, 2024).

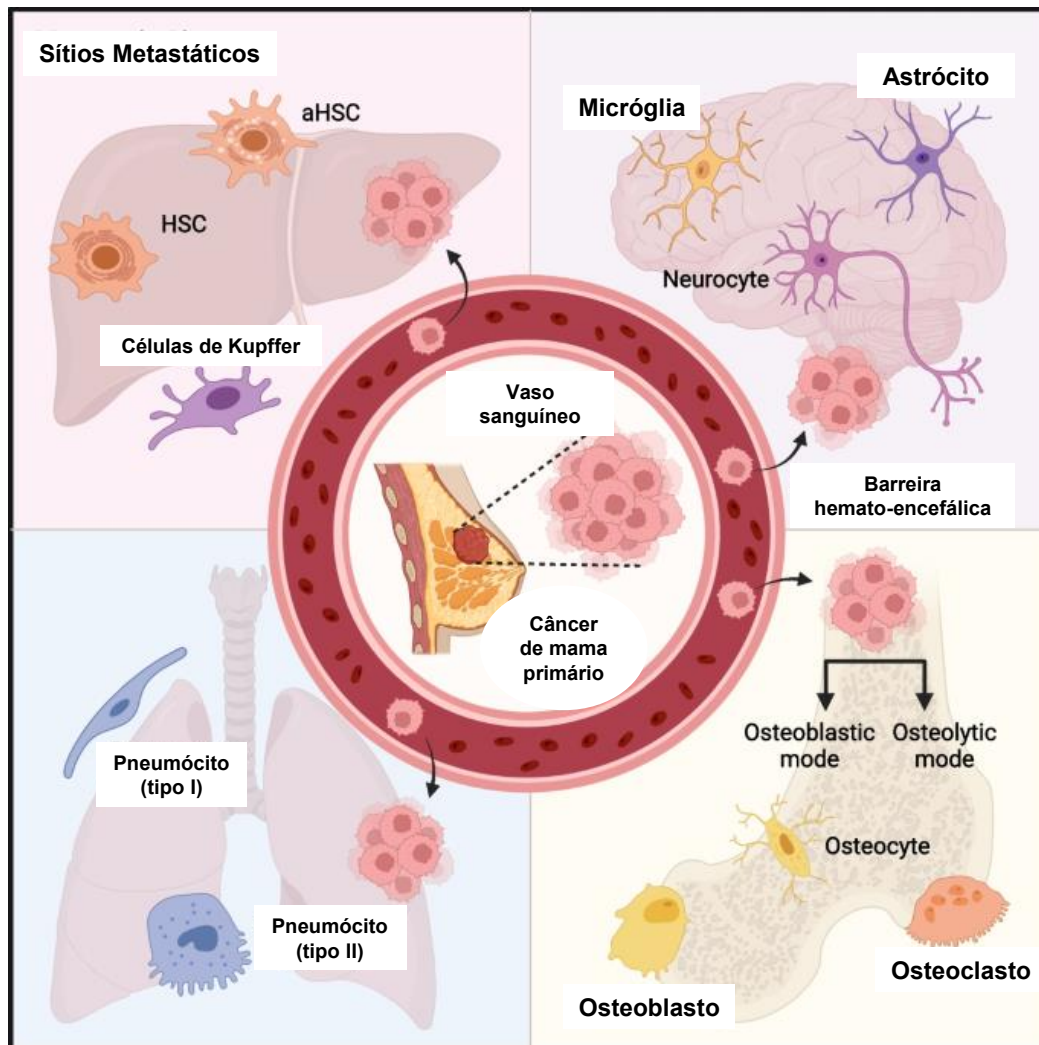


Figura 1. Sítios metastáticos preferenciais do Câncer de mama. (Modificado de Xu *et al.*, 2024).

As células cancerígenas possuem diversos mecanismos para escapar da destruição pelo sistema imunológico, incluindo a resposta antitumoral e a indução de imunossupressão, permitindo que elas avancem pela cascata metastática. No estroma tumoral, o sistema imunológico pode ser responsável não apenas por inibir, mas também por promover a metástase. As células tumorais também produzem citocinas e quimiocinas que recrutam células imunes, que por sua vez secretam outros mediadores inflamatórios no microambiente tumoral, recrutando mais células imunossupressoras e favorecendo a metástase. A citocina IL-1 β é sugerida como

indutora da malignidade do câncer de mama, mediando a transição epitelial-mesenquimal (TEM) e aumentando a metástase do câncer de mama. Isso leva a níveis elevados e desbalanceados da citocina fator transformador de crescimento β (TGF- β), que também promove a malignidade do câncer e medeia a quimiorresistência (Neophytou *et al.*, 2021; Mousset *et al.*, 2023).

Entre as células imunes que se correlacionam positivamente com a angiogênese e o prognóstico ruim, destacam-se os macrófagos associados ao tumor (TAMs). Eles são as células imunes mais abundantes no estroma tumoral (Boutillier e Elswa, 2021). Duas subpopulações de TAMs são polarizadas com atividades supressoras ou promotoras do tumor, denominadas TAM1 e TAM2, respectivamente. O TAM1 antitumoral secreta IL-12, IL-6 e CXCL9 para estimular o sistema imunológico. Eles também produzem óxido nítrico para matar células tumorais. O TAM2 produz IL-10 e CCL22, induzindo angiogênese (Wang *et al.*, 2023).

Portanto, a terapia de tumores sólidos deve ser complementada com medicamentos que inibam a capacidade das células cancerígenas de invadir a MEC e desenvolver tumores secundários, além de visar as células não tumorais no microambiente tumoral que sustentam a progressão das células cancerígenas. A remodelação do microambiente imunossupressor nos tumores é outra estratégia importante para inibir a tumorigênese e a progressão tumoral (Wang *et al.*, 2023). Nesse contexto, os esforços no campo da descoberta de medicamentos anticâncer envolvem estratégias para inibir a progressão tumoral e os mecanismos relacionados à motilidade, migração e/ou invasão e metástase.

1.2 Membrana Celular do Câncer de Mama e Moléculas Envolvidas na Motilidade, Migração, Invasão e Metástase

As células interagem com a matriz extracelular (MEC) por meio de seus receptores de adesão na membrana celular, como as integrinas e proteoglicanas transmembranosas. As integrinas são compostas por duas subunidades, α e β , e os domínios N-terminais de ambas as subunidades formam, em conjunto, o sítio de ligação à MEC (Millard *et al.*, 2011). Até agora, 18 subunidades α e 8 subunidades β , com 24 combinações heterodiméricas, foram descritas e classificadas em 3 grupos distintos: integrinas que se ligam à laminina ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$), integrinas que se ligam ao colágeno ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ e $\alpha 11\beta 1$), integrinas

leucocitárias (α L β 2, α M β 2, α X β 2 e α D β 2), e integrinas que se ligam à fibronectina (α 5 β 1, α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6, α v β 8, e α IIb β 3) (Takada *et al.*, 2007).

As integrinas desempenham papel crucial nas etapas de desenvolvimento do câncer, incluindo crescimento tumoral, invasão, metástase e resistência a terapia. Seu papel no crescimento tumoral e metástase envolve a proliferação e sobrevivência celular, inclusive de células-tronco cancerígenas, a adesão à MEC e ativação de vias pró-sobrevivência e anti-apoptóticas, resultando em resistência terapêutica mediada por adesão. Na invasão celular, as integrinas medeiam a remodelação da MEC por meio dos fibroblastos associados ao tumor tornando o microambiente favorável à metástase tumoral, além de promoverem a sobrevivência de células cancerígenas circulantes, que também favorece a metástase tumoral. Outro processo importante desempenhado pelas integrinas que resulta na migração, invasão e metástase é o aumento da produção de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular (Hamidi; Ivaska, 2018; Kariya; Su *et al.*, 2020; Nishita, 2025).

No câncer de mama, as integrinas são usadas como indicadores prognósticos e sua interação com proteínas da matriz extracelular desencadeia a formação, desmontagem e reorganização dos filamentos de actina, fibras de estresse e complexos de adesão focal, regulando a forma celular e processos que requerem remodelação celular, como adesão, migração e divisão celular. Linhagens de câncer de mama metastáticas incluindo MDA-MB-435 e MDA-MB-231, bem como outras linhagens não metastáticas como MCF-7 e as células não cancerígenas Hek-293 expressam integrinas α v, enquanto a expressão elevada de β 5 e α v β 5 é restrita às células cancerígenas da mama, e a expressão elevada de β 3 e α v β 3 é restrita às células MDA-MB-435 (Taherian *et al.*, 2011).

A interação das integrinas das membranas celulares com os componentes da MEC e seu agrupamento recruta moléculas adaptadoras e moléculas de transdução de sinal, como a quinase de adesão focal (FAK) e membros da família Src, que servem como sítios intracelulares para o citoesqueleto e transmitem sinais entre a MEC e o interior da célula (Eble e Niland, 2019; Bergerhausen *et al.*, 2020) (**Figura 2**).

A modificação da funcionalidade das integrinas pode alterar as propriedades de adesão celular, afetando o contato celular com componentes da matriz extracelular ou com células endoteliais, ou ainda, comprometendo as cascatas de transdução de sinal

que apoiam a migração, ou ambos. Por exemplo, a inibição de $\alpha 5\beta 1$ pode suprimir a migração das células MDA-MB-231, afetando a transdução de sinais. A supressão da integrina $\alpha\beta 3$ reduz a mobilidade celular, invasão, transmigração e re-adesão. A integrina $\alpha\beta 3$ é responsável pela motilidade celular e migração trans-endotelial, além de ativar a metaloproteínase de matriz MMP-2 (Gurgul *et al.*, 2022).

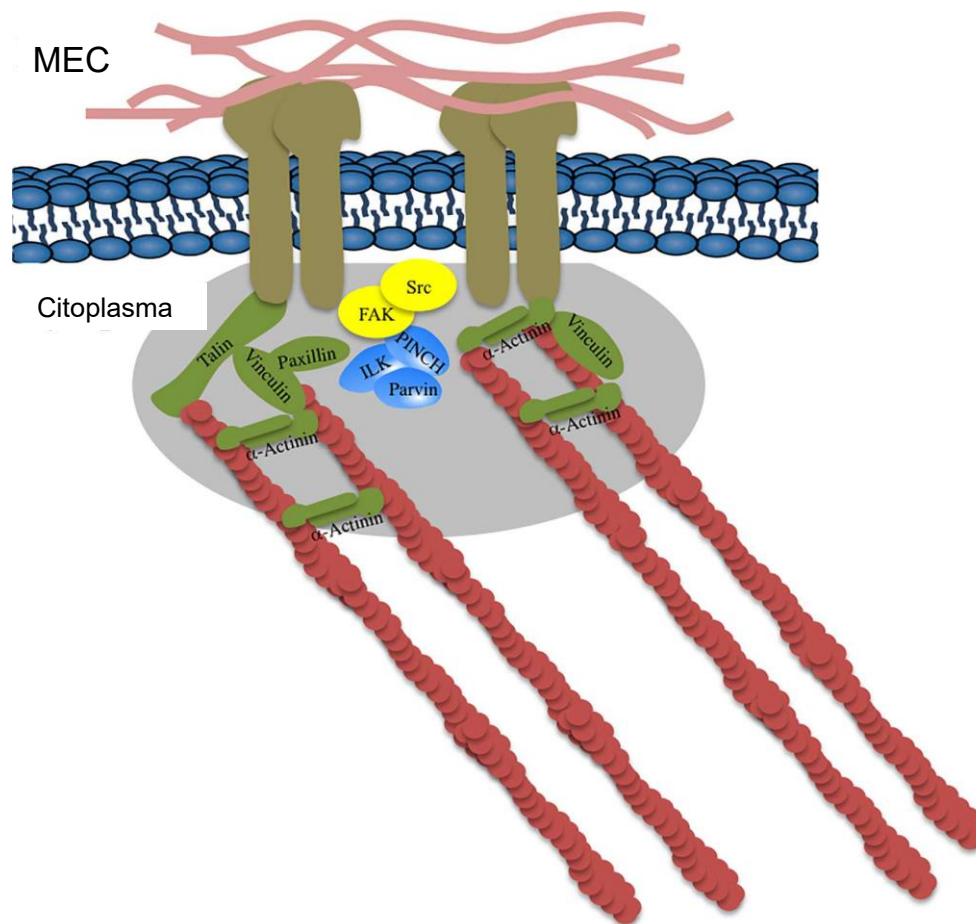


Figura 2. Esquema simplificado do mecanismo de adesão focal. As proteínas de adesão focal são codificadas por cores da seguinte forma: as integrinas (receptores da MEC) são castanhas, as proteínas de estrutura são verdes, as proteínas do complexo IPP são azuis e as quinases de sinalização são amarelas. Os polímeros de F-actina são apresentados a vermelho e as proteínas da matriz extracelular são apresentadas a rosa (Modificado de Calkins e Youssef, 2016).

As metaloproteínases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de cálcio e zinco capazes de clivar componentes da MEC. Algumas

MMPs são secretadas e outras são MMPs ligadas à membrana. Elas são principalmente reguladas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), que podem ser secretados ou localizados na superfície celular e são responsáveis pelo controle da degradação de proteínas da MEC pelas MMPs. A desregulação do equilíbrio entre MMPs e TIMPs leva à progressão do câncer, entre outras condições patológicas. Existem quatro TIMPs humanos capazes de inibir a maioria das MMPs. Por exemplo, MMP-9, MMP-14 e MMP-15 são inibidas pela TIMP-1, enquanto a MMP-2 é inibida pela TIMP-2. As TIMPs interagem com o domínio catalítico das MMPs, bem como com o domínio PEX (hemopexina) (Rempe; Hartz; Bauer, 2016; Radisky *et al.*, 2017).

Existem 23 tipos diferentes de MMPs humanas, classificadas em seis grupos diferentes: (1) colagenases: MMP-1, MMP-8 e MMP-13; (2) gelatinasas: MMP-2 e MMP-9; (3) estromelinas: MMP-3 e MMP-10; (4) matrilisinas: MMP-7 e MMP-26; (5) metaloproteinases de matriz do tipo membrana (MT-MMP): MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, que podem digerir uma série de proteínas da MEC, como colágeno, fibronectina e laminina, além de ativar a pro-MMP-2; e o último grupo (6), de especificidade heterogênea de substrato e estrutura: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 (Rempe; Hartz; Bauer, 2016; Radisky *et al.*, 2017).

A estrutura das MMPs é composta por domínios modulares, e três domínios estão presentes em todas as MMPs: (1) um peptídeo sinal para localização extracelular; (2) um domínio pró, que é removido por uma protease ativadora; e (3) um domínio catalítico conservado. Muitas MMPs também contêm: (4) domínios semelhantes à hemopexina (PEX), responsáveis pelas interações com a membrana celular via moléculas de superfície celular, além de interações com outras proteínas solúveis, controlando a localização e especificidade de substrato. MMP-2 e MMP-9 possuem três repetições do tipo II de fibronectina, responsáveis pelo reconhecimento de substratos específicos da matriz extracelular, como elastina e colágeno desnaturado (Radisky *et al.*, 2017).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) podem degradar e remodelar a MEC e têm sido associadas à progressão e metástase do câncer de mama. A inibição de algumas MMPs, como MMP-9 ou MMP-14, utilizando anticorpos monoclonais

inibidores, demonstrou efeitos anti-tumorais promissores em modelos pré-clínicos de câncer de mama (Kwon, 2023). Além de degradar a MEC, as MMPs podem induzir diretamente a transição epitelial-mesenquimal (TEM) nas células epiteliais-alvo, levando à resistência à apoptose e ao aumento da invasividade das células cancerígenas (Radisky *et al.*, 2017; Niland; Riscanevo; Eble, 2021).

A MMP-9 tem sido associada à patologia dos cânceres, principalmente ao permitir a invasão celular, metástase e angiogênese. Portanto, a MMP-9 tem sido avaliada como biomarcador para câncer (Huang *et al.*, 2018). A MMP-9 é expressa como pró-MMP-9 e é ativada por uma cascata de ativação de zimogênios iniciada pela MMP-14 na membrana celular, que ativa a MMP-2 e MMP-13, que então transforma a pró-MMP-9 em MMP-9 ativa (Fridman *et al.*, 2003). Vale ressaltar que IL-1 β ativa a quinase de adesão focal (FAK) e Src para induzir a produção de MMP-9, responsável pela invasão das células de câncer de mama (Mon *et al.*, 2017), enquanto IL-10 inibe a tumorigenese por meio da regulação negativa de VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MMP-9 (Sheikhpour *et al.*, 2018). TGF- β e TNF- α também estimulam a produção de MMP-9 (Yousef *et al.*, 2014).

Além da atividade das MMPs, que digerem os componentes da MEC e permitem a invasão e metástase, e das integrinas, outras proteínas participam do processo de motilidade celular e adesão, como as E-caderinas (caderinas epiteliais), que são proteínas transmembranas responsáveis pela adesão célula-célula na superfície celular (Yadav *et al.*, 2015). A ligação da E-caderina entre as células é responsável pela inibição da proliferação quando as células atingem a confluência. Após a ligação célula-célula através das E-caderinas, a cauda citoplasmática dessa proteína transmembrana, que está associada ao citoesqueleto por meio das cateninas (α , β , p120), media efeitos de sinalização a jusante que envolvem vias de sinalização de fatores de crescimento como Hippo, Wnt, TGF β , NF- κ B, entre outros. A perda da expressão de E-caderina está associada à progressão e metástase tumoral devido à perda da inibição de contato, aumentando a proliferação celular, motilidade e migração (Mendonça *et al.*, 2018).

Além da expressão diferencial de proteínas na superfície celular, como integrinas, E-caderinas e MMPs, as membranas das células cancerígenas também exibem uma distribuição de fosfolípidos alterada, que leva a uma carga líquida

negativa na superfície celular, diferente das células não tumorais. Enquanto as membranas das células não tumorais são assimétricas, contendo predominantemente os fosfolipídeos carregados positivamente fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline (SM) na camada externa, enquanto o fosfolipídeo neutro fosfatidiletanolamina (PE), e os fosfolipídeos carregados negativamente fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI) são constituintes da camada interna. Porém, as membranas celulares tumorais não apresentam essa distribuição lipídica assimétrica devido à translocação de fosfatidilserina (PS) aniônica da camada citoplasmática para a camada externa, o que faz com que a carga líquida na superfície celular fique negativa. Além disso, a superfície externa das membranas celulares tumorais tem uma maior densidade de glicosaminoglicanos, que são polissacarídeos negativamente carregados. Portanto, as membranas celulares do câncer exibem uma carga líquida negativa, diferentemente das membranas celulares não tumorais (Aghamiri *et al.*, 2021; Klaiss-Luna *et al.*, 2023).

1.3 Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Toxinas Naturais como Modelos para Descoberta de Fármacos contra o Câncer de Mama

Nas últimas décadas, o campo da descoberta de fármacos anticâncer introduziu muitos agentes antitumorais de diferentes fontes naturais, como microrganismos, plantas, animais e, especialmente, venenos de animais. O tratamento de câncer baseado em peptídeos tem ganhado muita atenção devido às suas vantagens, como afinidade para se ligar a receptores, seletividade e especificidade para células tumorais, além de ter baixa toxicidade nos tecidos normais (Lau; Dunn, 2018).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm sido recentemente estudados como agentes antitumorais, e seu mecanismo de ação é principalmente baseado na desestabilização da membrana e morte celular (Klaiss-Luna *et al.*, 2023), devido às suas características estruturais: apresentam carga líquida positiva (Manrique-Moreno *et al.*, 2021) em pHs variando de +1 a +11, são formados por 5 a 50 resíduos de aminoácidos (10 kDa ou menos) com um alto percentual de resíduos hidrofóbicos em uma estrutura anfipática (Aghamiri *et al.*, 2021). Os aminoácidos carregados positivamente dos AMPs interagem eletrostaticamente com os lipídios carregados negativamente das membranas bacterianas (fosfatidilglicerol, cardiolipina, ácidos lipoteicoicos e lipopolissacarídeos), assim como com moléculas carregadas

negativamente das membranas das células tumorais (fosfatidilserina, gangliosídeos sialilados, mucinas O-glicosiladas e sulfatos de heparina) (Klaiss-Luna *et al*, 2023).

Os mecanismos pelos quais os AMPs levam à perturbação e ruptura da membrana podem ser classificados em três modelos diferentes: modelo de detergente tipo carpete, modelo de barril-estaca, modelo toroidal. No modelo de carpete, os AMPs se acumulam na superfície da membrana, formando uma camada paralela na citomembrana e, posteriormente, interagem com a membrana, causando permeabilização e ruptura. Quando os AMPs interagem entre si, formam uma estrutura tipo poro de barril-estaca que interage com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática, formando um poro transmembrana. O modelo toroidal combina esses dois modelos, formando um poro transmembrana e também interagindo com a superfície da membrana (**Figura 3**). Os efeitos formadores de poro são mais prováveis de ocorrer para peptídeos com mais de 21 resíduos de aminoácidos, o que pode estar relacionado com a espessura da bicamada lipídica das membranas, que corresponde ao comprimento dos peptídeos com estrutura secundária de alfa-hélice dos AMPs (Sani; Separovic, 2016; Manrique-Moreno *et al*, 2021; Aghamiri *et al*, 2021).

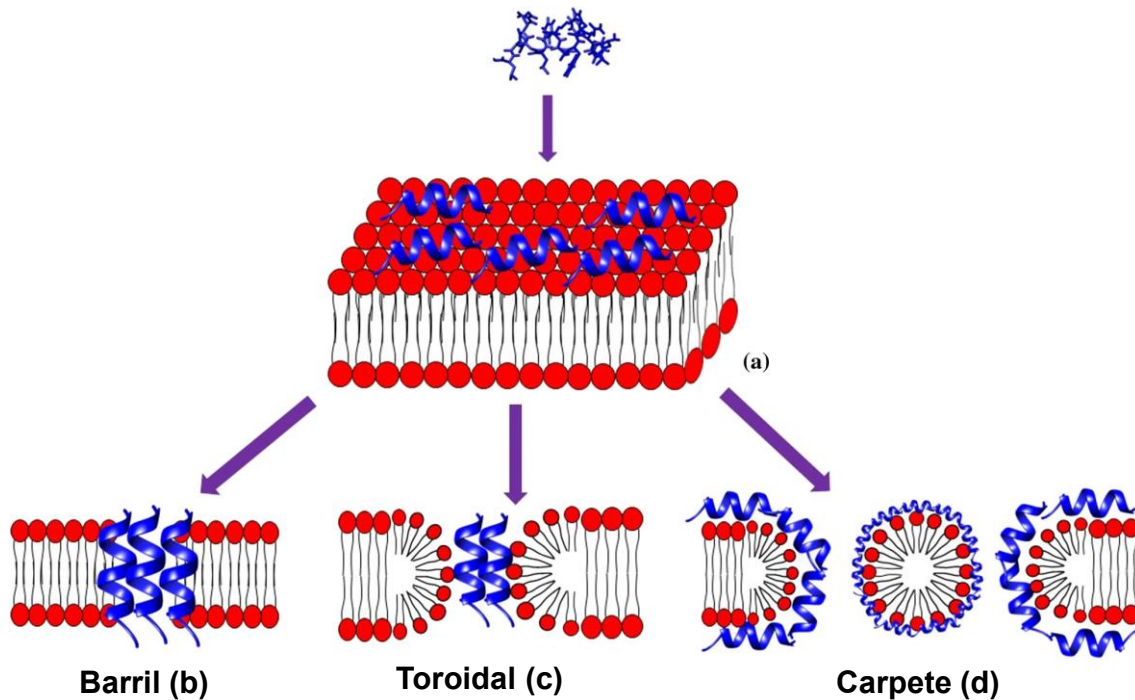


Figura 3. Representação esquemática da interação do AMP com a membrana bacteriana. Os mecanismos membranolíticos começam com a adsorção do AMP na membrana celular alvo (a). No modelo de barril, os peptídeos permeiam a bicamada (b); no mecanismo de poro toroidal, os peptídeos interagem com os grupos de cabeça dos lipídios, induzem a curvatura da bicamada e se inserem perpendicularmente na bicamada da membrana (c); no modelo de tapete, os peptídeos cobrem toda a membrana, as cadeias laterais não polares do peptídeo ligam-se ao núcleo hidrofóbico da membrana, enquanto os resíduos polares se ligam aos fosfatos lipídicos, formando micelas com a membrana fragmentada (d). (Modificado de Manniello, M. D. *et al.*, 2021).

Alguns AMPs mostram atividade na membrana celular sem danificar sua estrutura, especialmente peptídeos com menos de 20 resíduos de aminoácidos. Por exemplo, Zhang *et al* (2001) mostraram a capacidade de polyphemusin I, um peptídeo de 17 aminoácidos, em interagir com a membrana lipídica sem causar grande ruptura ou permeabilização da bicamada lipídica. Esse peptídeo foi capaz de promover flip-flop lipídico e nenhum modelo toroidal de poro ou mecanismo de tapete foi associado à sua atividade (Zhang *et al*, 2001; Powers *et al*, 2005).

Um grande número de AMPs só forma sua estrutura secundária ativa após interação com a membrana da célula alvo (Aghamiri *et al*, 2021; Sani e Separovic, 2016). Por exemplo, Klais-Luna *et al* (2023) estudaram as propriedades biofísicas da Crotalicidina (Ctn), um AMP catiônico do veneno da cascavel *Crotalus durissus*

terrificus da América do Sul, em modelos de membrana de células de câncer de mama e mostraram uma atividade antitumoral e seletividade da Ctn para as linhas celulares de câncer de mama, sugerindo um mecanismo iniciado pela interação eletrostática do peptídeo com a superfície da bicamada lipídica, levando à desestabilização da membrana. A Ctn é um peptídeo de 34 aminoácidos, com carga líquida de +15 de resíduos básicos, e sofre mudança conformacional quando interage com sistemas lipídicos carregados negativamente, mostrando o maior conteúdo helicoidal ao interagir com membranas modelo MDA-MB-231, que são mais negativamente carregadas em comparação com as membranas modelo MCF-7.

Alguns AMPs têm sido reportados por atuar através de mecanismos não membranólíticos, como dano mitocondrial, bloqueio do ciclo celular e inibição de metástase (Aghamiri *et al*, 2021). Por exemplo, Law *et al*. (2023) avaliaram AMPs (ATMP1 e derivados) de peixe *Anabas testudineus* (24 resíduos de aminoácidos) que causaram bloqueio do ciclo celular na fase G1, induziram apoptose e superexpressão de p53 nas células MDA-MB-231, enquanto foram não-tóxicos para células humanas normais (fibroblastos dérmicos humanos HS27). O derivado com maior carga líquida catiônica apresentou as atividades mais fortes contra MDA-MB-231 e foi o menos tóxico para HS27, quando comparado aos outros peptídeos com carga líquida positiva.

Como outro exemplo, a Moricina, um AMP catiônico de 42 aminoácidos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, inibe a viabilidade das células MDA-MB-231 com um CI_{50} de 2,75 μ M e aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (Ahmad *et al*, 2023). Além disso, regula negativamente a expressão da proteína NF- κ B relacionada à via de sinalização downstream e a proteína antiapoptótica Bcl2 e regula positivamente a proteína supressora de tumor p53, a proteína pró-apoptótica Bax, caspase 3 e caspase 9, levando à morte celular dependente de caspase nas células MDA-MB-231. A Moricina também causou uma queda significativa na taxa de migração das células MDA-MB-231 após 12 e 24 horas de exposição, e diminuiu a formação de colônias e a taxa de proliferação celular. Esse peptídeo foi capaz de penetrar nas células e causar estresse oxidativo intracelular e formação de ânion superóxido nas mitocôndrias, resultando em alterações morfológicas nas mitocôndrias, lisossomos e núcleo.

Os mecanismos de morte induzidos por AMPs de diversas fontes, descritos na literatura, incluem parada no ciclo celular, indução de apoptose mediante aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como bax, caspase 7 e caspase 9, e diminuição da expressão de bcl-2, além da redução da migração celular e interferência no funcionamento mitocondrial (Li *et al.*, 2018; Najm *et al.*, 2021; Selvarathinam *et al.*, 2023; Teleb *et al.*, 2023).

1.4 LyeTxI-b, um AMP derivado de uma toxina de aranha *Lycosa erythrognatha*, como modelo para a descoberta de medicamentos para o câncer de mama

O peptídeo sintético de 24 resíduos de aminoácidos LyeTxI-b (peso molecular 2737,3 Da) é um derivado da toxina nativa LyeTxI, isolada do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha* (Santos *et al.*, 2010), e se difere dessa toxina por ter um N-terminal acetilado e uma exclusão de um resíduo de His, na posição 16. A estrutura secundária do LyeTxI-b possui um segmento helicoidal bem definido, desde o segundo aminoácido até o C-terminal amidado, sem uma clara separação entre faces hidrofóbicas e hidrofílicas. O AMP LyeTxI-b apresentou atividade *in vivo* contra artrite séptica e, além de reduzir a carga bacteriana, também reduziu a migração de células imunes e os níveis da citocina IL-1 β e da quimiocina CXCL1 (Reis *et al.*, 2018). LyeTxI-b também mostrou atividade anticâncer contra linhagens derivadas de tumores sólidos (HCT-116, MDA-MB-231 e MCF-7) e leucêmicas (HL60, THP-1) (Garcia *et al.*, 2015). **(Figura 4).**

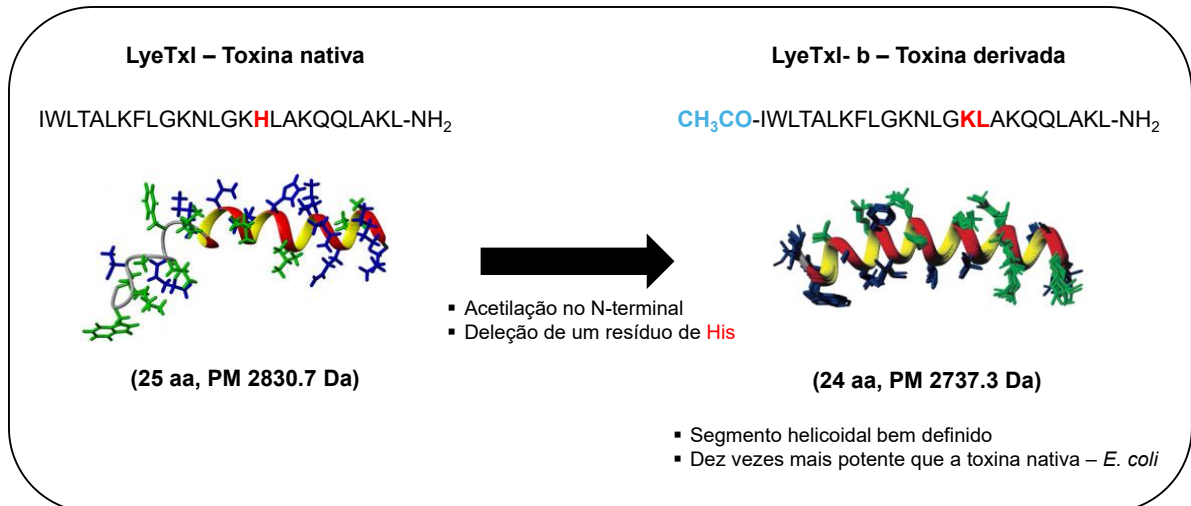


Figura 4. Estruturas dos peptídeos LyeTxI e LyeTxI-b. LyeTxI é uma toxina de 25 resíduos, 2830,7 Da, isolada do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, cuja estrutura secundária é majoritariamente α -helicoidal. O derivado sintético LyeTxI-b (24 resíduos, 2737,3 Da) difere pela acetilação da extremidade N-terminal e pela exclusão de um resíduo de histidina na posição 16, alterações que conferiram uma conformação helicoidal bem definida e uma potência cerca de dez vezes superior em relação ao peptídeo nativo contra *E. coli* (Modificado de Santos *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2018).

Para a linhagem celular de glioblastoma U87-MG, a propriedade anticâncer do LyeTxI-b foi associada a um mecanismo membranolítico (Abdel-Salam *et al.*, 2019). Estudos morfológicos utilizando microscopia eletrônica de varredura demonstraram a formação de poros na membrana plasmática em altas concentrações de LyeTxI-b (30 μ M). Análises de microscopia eletrônica de transmissão mostraram núcleos inchados com leve condensação do DNA, aumento do volume celular com citoplasma eletrolúcido e vacuolização de organelas, mas sem ruptura das membranas nuclear ou plasmática. Análises morfométricas revelaram uma alta porcentagem de células em estágios de necroptose, seguidas de necrose e apoptose em níveis mais baixos. A necrostatina-1, um inibidor conhecido da necroptose, protegeu parcialmente as células da toxicidade do peptídeo de forma dependente da concentração. A citometria de fluxo por imagem confirmou que 59% das células passaram por necroptose após 3 horas de incubação com o peptídeo (30 μ M). Vale ressaltar que o LyeTxI-b mostrou apenas uma leve citotoxicidade contra fibroblastos normais de linhagens celulares humanas e de macacos, e baixa atividade hemolítica em eritrócitos humanos.

LyeTxI-b mostrou citotoxicidade contra linhagens celulares triplo-negativas MDA-MB-231, com um índice de seletividade 70 vezes superior ao da cisplatina. Além disso, apresentou um efeito sinérgico com a cisplatina, aumentando seu valor de índice seletivo em 16 vezes. O LyeTxI-b levou à redução da fosforilação de AKT1, o que indica autofagia relacionada à morte celular, e à diminuição da expressão de p21, o que explica o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (Avelar Junior *et al.*, 2022).

LyeTxI-b apresentou valores de CI_{50} de 5 a 7 μ M contra células de câncer de mama humanas (MCF-7, MDA-MB-231) e de camundongo (4T1) (Abdel-Salam *et al.*, 2021). O peptídeo induziu a exposição da fosfatidilserina na membrana celular e aumentou o conteúdo de DNA sub-diploide (sub-G1) nas células 4T1, sugerindo indução de apoptose ou necrose. LyeTxI-b também reduziu a taxa de sobrevivência das células clonogênicas. A toxicidade subaguda do peptídeo LyeTxI-b *in vivo* foi avaliada, e camundongos BALB/c tratados com o peptídeo LyeTxI-b (5 mg/kg) não apresentaram lesões ou alterações significativas no pulmão, rim, baço, coração, cérebro e fígado, conforme exame e análise histopatológica.

Estudos *in vivo* utilizando o modelo isogênico de câncer de mama metastático murino 4T1 demonstraram que a administração intratumoral do peptídeo (5 mg/kg) reduziu significativamente o número de metástases pulmonares em relação ao grupo controle. A administração subcutânea (5 mg/kg) reduziu significativamente o tamanho e o volume do tumor. A quantificação de citocinas e fatores de crescimento tumoral por ELISA revelou que LyeTxI-b e carboplatina (5 mg/kg) apresentaram uma redução significativa na expressão de TGF- β no tumor e no baço, redução de TNF- α no cérebro e no baço, e supressão de IL-1 β no pulmão e no tumor. Além disso, o LyeTxI-b induziu um aumento na citocina anti-inflamatória IL-10 no tumor e sua redução no baço. Quanto à IL-6, o peptídeo aumentou seus níveis no tumor, baço e cérebro (Abdel-Salam *et al.*, 2021).

1.5 Justificativa

As atividades *in vitro* e *in vivo* sugerem que o efeito do peptídeo LyeTxI-b sobre o crescimento tumoral em modelo de câncer de mama triplo-negativo em camundongos, bem como em citocinas e fatores de crescimento tumoral, parece estar relacionado a um perfil menos invasivo das células de câncer de mama e, portanto, a redução do número de metástases observada no pulmão de animais tratados com ele (Abdel-Salam *et al.*, 2021). Em estudos anteriores, o LyeTxI-b é citotóxico contra as linhagens celulares de câncer de mama humano MCF-7 e a linhagem triplo-negativa MDA-MB-231. Esses resultados estão protegidos pela patente concedida BR1020150318600, que reivindica o uso de LyeTxI-b em composições farmacêuticas anticâncer (Data de prioridade 18/12/2015 – PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USOS - Maria Elena de Lima Perez Garcia, Elaine Maria de Souza -Fagundes, Pablo Víctor Mendes dos Reis, Daniel Moreira dos Santos, Jarbas Magalhães Resende, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Gabriele de Matos Cardoso Perdigão).

Peptídeos sintéticos análogos ao LyeTxI-b, incluindo a toxina original derivada do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, LyeTxI, com 25 resíduos de aminoácidos, ainda não foram investigados em modelos de câncer de mama. Peptídeos minimizados de 15-16 resíduos de aminoácidos - LyeTxImn; LyeTxImnK; LyeTxImnK-Ac - foram mais ativos contra microrganismos, menos hemolíticos e mostraram menos neurotoxicidade, quando comparados à toxina nativa LyeTxI. O peptídeo minimizado de 15 resíduos de aminoácidos (LyeTxImn) foi planejado com base em estudos que sugeriram que o lado amino-terminal de LyeTxI é indispensável para a conformação da estrutura secundária do peptídeo, e a região carboxi-terminal pode não ser essencial para sua atividade, pois, nem a modificação do lado carboxi-terminal de LyeTxI (LyeTxI-K-HYNIC), nem a supressão de um resíduo de histidina na mesma porção (LyeTxI-b), comprometeram sua atividade antimicrobiana. A introdução de uma lisina extra na posição 5 do peptídeo minimizado levou a uma estrutura teórica anfipática por análise *in silico* (LyeTxImnK e LyeTxImnK-Ac) e essa modificação aumentou a atividade antimicrobiana do derivado encurtado de LyeTxI, sendo LyeTxImnK o candidato mais promissor para o desenvolvimento de uma composição farmacêutica antimicrobiana (Fuscaldi *et al.*, 2020).

Nesse cenário, a hipótese deste trabalho é que os mecanismos associados ao efeito antimetastático de LyeTxI-b e, provavelmente, da toxina nativa e dos peptídeos derivados minimizados, envolvem a redução da atividade migratória e invasiva, causada pela interferência com os componentes do citoesqueleto ou redução na atividade das moléculas de adesão da membrana das células tumorais (Monteiro *et al.*, 2011). Dessa forma, os dados obtidos neste estudo podem contribuir para o avanço no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na atividade antimetastática de peptídeos derivados de toxinas naturais. Além disso, os resultados poderão apoiar o desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico seletivo contra o câncer de mama, especialmente o subtipo triplo-negativo, para o qual ainda são escassas as opções terapêuticas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade anticâncer e antimetastática de derivados sintéticos da toxina LyeTxI da peçonha de aranha *Lycosa erithrognatha* em modelo de câncer de mama *in vitro*, visando a identificação de protótipos úteis para o desenvolvimento de novas terapias para tratamento do câncer de mama.

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito dos peptídeos na viabilidade celular em duas linhagens de câncer de mama humano, MCF-7 e MDA-MB-231 (triplo-negativa) em modelo 2D e determinar sua concentração inibitória;
2. Avaliar a interação dos peptídeos com membranas lipídicas que mimetizam membranas celulares tumorais e não tumorais;
3. Analisar o efeito dos peptídeos sobre a adesão das células MDA-MB-231 e MCF-7 em componentes da matriz extracelular, colágeno do tipo I e fibronectina;
4. Avaliar o efeito dos peptídeos na formação de complexo de adesão-focal (FA) em MDA-MB-231, especificamente pela marcação da integrina $\beta 1$ e paxilina, bem como proteína do citoesqueleto (actina);
5. Analisar o efeito dos peptídeos na morfologia celular através da quantificação de parâmetros como área, perímetro, circularidade, arredondamento, razão de alongamento e solidez;
6. Investigar o efeito dos peptídeos sobre a migração de células MDA-MB-231 e MCF-7;
7. Analisar o efeito dos peptídeos na invasão de células MDA-MB-231 e MCF-7 em modelo 3D;
8. Investigar o efeito dos peptídeos na secreção de metaloproteinases MMP2 e MMP9;
9. Avaliar a interação *in silico* dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK com a subunidade β da integrina $\beta 1$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo são derivados do LyeTxI, originalmente isolado do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. Os peptídeos sintéticos foram adquiridos da empresa ProteoGenix SAS (Schiltigheim, França). Foram testados o LyeTxI (sequência nativa), LyeTxI-b (acetilado no N-terminal), LyeTxImnK e LyeTxImn (formas minimizadas), além de suas variantes acetiladas (LyeTxImn Δ K-Ac, LyeTxImn-Ac e LyeTxI-Ac). Todos os peptídeos foram ressuspensos em PBS, para produção de soluções estoque na concentração de 1 mM e armazenados em pequenas alíquotas a -20 °C, a fim de preservar a estabilidade e evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

Tabela 1. Características físico-químicas dos peptídeos derivados do LyeTxI.

Peptídeo	Sequência	Peso Molecular (g/mol)	pl Teórico	Código
LyeTxI	H-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH ₂	2830.73	10.60	1
LyeTxI-b	Ac-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH ₂	2737.42	10.60	2
LyeTxImnK-Ac	Ac-IWLTALKFLGKNLGK-NH ₂	1871.13	10.48	3
LyeTxImnK	H-IWLTALKFLGKNLGK-NH ₂	1828.13	10.48	4
LyeTxI-Ac	Ac-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH ₂	2875.54	10.60	5
LyeTxImn-Ac	Ac-IWLTALKFLGKNLGK-NH ₂	1700.03	10.30	6

Sequências, pesos moleculares teóricos e pontos isoelétricos (pl) dos peptídeos utilizados no estudo. O LyeTxI corresponde à sequência nativa isolada do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, enquanto as demais variantes apresentam modificações estruturais, incluindo acetilação no N-terminal e/ou minimização da sequência.

3.2 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

As linhagens celulares de câncer de mama humano MDA-MB-231 (triplo-negativo) e MCF-7 (subtipo luminal) foram utilizadas neste estudo. As células MDA-MB-231 foram obtidas da DSMZ (Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Alemanha) e mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). As células MCF-7 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. M. Götte, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade de Münster, Alemanha, sendo cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino (SFB) e antibióticos, e as células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂.

3.3 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (CI₅₀) e avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT

Com o objetivo de avaliar a concentração em que cada um dos seis peptídeos inibe o crescimento celular, medimos o valor de CI₅₀, que é a concentração do composto que causa uma redução de 50% na viabilidade ou crescimento celular. O ensaio de viabilidade e proliferação celular baseia-se na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a formazan. A metodologia foi descrita por Monks *et al.* (1991).

Células (10.000/poço) foram semeadas em placas de 96 poços (90 µL/poço), incubadas overnight e tratadas por 48 h a 37 °C com 5% de CO₂ com diluições seriadas dos peptídeos (100 a 0,39 µM; 10 µL/poço). Após o tratamento, adicionou-se MTT (2,5 mg/mL; 10 µL/poço). Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi removido, e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de HCl 0,04 M em isopropanol.

A absorbância foi lida a 560 nm em leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da viabilidade celular em relação ao controle (PBS), segundo a equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - [(DO \text{ tratada} \times 100) / DO \text{ controle}]$$

As interações entre as amostras e o meio foram estimadas por comparação com poços contendo apenas meio. Os experimentos foram realizados em triplicata, em ao menos três ensaios independentes.

3.4 Análise de Interação Peptídeo-Membrana por Microbalança de Cristal de Quartzo com monitoramento de Dissipação (QCM-D)

A interação dos peptídeos com bicamadas lipídicas miméticas foi avaliada utilizando a técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo com monitoramento de Dissipação (QCM-D), conforme descrito por Di Iorio *et al.* (2020). Esta metodologia permite a detecção de variações de massa por unidade de área, com base na mudança de frequência de um cristal de quartzo oscilante, e fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas da camada formada sobre o sensor (Di Iorio *et al.*, 2020) (**Figura 5**).

Vesículas lipídicas

Foram utilizadas vesículas lipídicas unilamelares com composição variada, preparadas com lipídeos dissolvidos em clorofórmio. As formulações utilizadas foram:

- **Carga neutra (DOPC 100%):** 100 µL de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina) [10 mg/mL].
- **Carga negativa (80% DOPC + 20% POPS):** 80 µL de DOPC [10 mg/mL] + 20 µL de POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina) [10 mg/mL].
- **Carga negativa + colesterol (10%):** 73 µL DOPC + 21,5 µL POPS + 5,5 µL colesterol [10 mg/mL].
- **Carga neutra + colesterol (10%):** 94,7 µL DOPC + 5,3 µL colesterol [10 mg/mL].

As misturas lipídicas foram secas sob fluxo de gás nitrogênio até completa evaporação do clorofórmio, formando um filme lipídico fino nas paredes dos frascos de vidro âmbar. Os frascos foram colocados sob vácuo por, no mínimo, 1 hora para remoção completa do solvente. Em seguida, os lipídeos foram hidratados com 1 mL de água ultrapura (miliQ), resultando em uma concentração final de 1 mg/mL. A solução opaca obtida foi homogeneizada e submetida à sonicação por 10 minutos,

obtendo-se vesículas com diâmetro estimado entre 50–100 nm em uma solução translúcida. Antes da utilização, as vesículas foram diluídas (1:10) em tampão contendo CaCl_2 10 mM, o qual promove instabilidade e facilita a fusão das vesículas na superfície do sensor de quartzo.

Ativação dos sensores de quartzo

Os sensores de quartzo (Q-sensors) foram limpos por sonicação em SDS 2% por 10 minutos, seguidos de cinco lavagens com água miliQ e nova sonicação por 5 minutos. Após secagem com gás nitrogênio, os sensores foram ativados por exposição à radiação UV por 10 minutos, para promover a formação de bicamada lipídica estável sobre a superfície.

Execução do experimento de QCM-D

Os sensores foram inseridos nas câmaras da máquina QCM-D (Q-Sense, Biolin Scientific), com o eletrodo voltado para cima. As conexões com os tubos de entrada (esquerda) e saída (direita) foram ajustadas, e o fluxo de injeção foi programado para 75 $\mu\text{L}/\text{min}$, à temperatura constante de 23 °C. A estabilidade da linha de base foi verificada antes do início das injeções.

A ordem de injeção das soluções em cada câmara foi a seguinte (com fluxo contínuo por 3 a 7 minutos por etapa):

1. Tampão (baseline)
2. Vesículas lipídicas
3. Lavagem com tampão
4. Solução de peptídeo
5. Lavagem final com tampão

Durante o experimento, foram monitoradas em tempo real as mudanças de frequência (Δf) e dissipação (ΔD), parâmetros relacionados à adsorção e às propriedades viscoelásticas da camada formada sobre o sensor. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

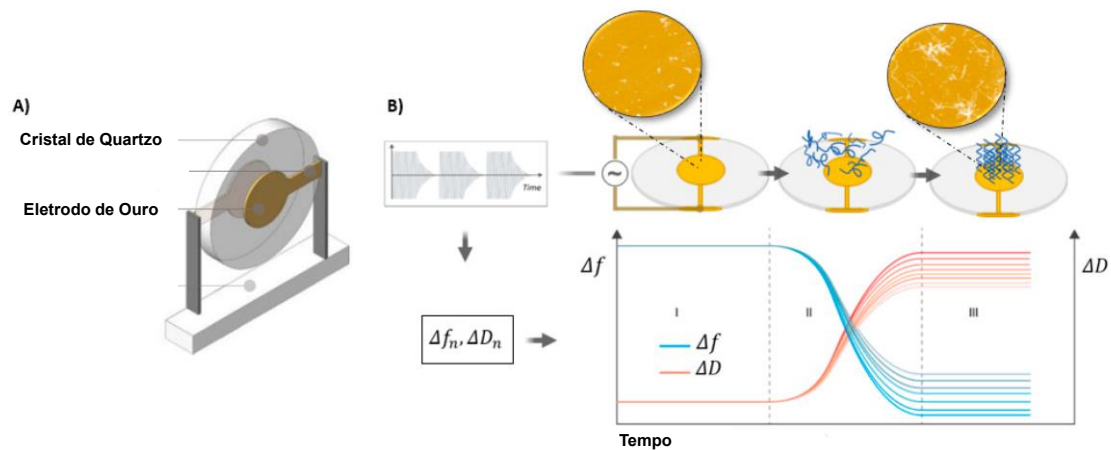


Figura 5. (A) Esquema básico do sensor QCM composto por um cristal de quartzo revestido com dois eletrodos de ouro. (B) O princípio de funcionamento esquemático fornece informações sobre as variações em Δf e ΔD plotadas à medida que as moléculas são adsorvidas na superfície do sensor de ouro. No mecanismo de adsorção esquemático, a seção I mostra uma superfície nua e linhas de base estáveis; durante a adsorção, são observadas mudanças moleculares em Δf e ΔD (seção II). Após a adsorção completa na superfície, as linhas de base são estabilizadas (seção III). Os dados coletados pela microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação (QCM-D) podem ser usados para modelagem viscoelástica e quantificação de massa, bem como para calcular a viscoelasticidade e a espessura da camada adsorvida. (Modificado de Migoñ; Wasilewski; Suchy, 2020).

3.5 Adesão celular a componentes da matriz extracelular: colágeno tipo I, fibronectina

Com o objetivo de entender se os peptídeos afetam a capacidade das células de câncer de mama de se aderirem à matriz extracelular (MEC), realizamos ensaios de adesão celular 2D, utilizando os componentes mais prevalentes da MEC: colágeno e fibronectina.

O primeiro passo foi determinar a densidade celular ideal com base no protocolo descrito por Eble *et al.* (2022), com modificações. As células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram semeadas, respectivamente, a partir de 100×10^3 e 500×10^3 células por poço, em placas de 96 poços previamente revestidas com colágeno tipo I e fibronectina. Para cada linhagem, foi realizada uma diluição seriada de duas vezes (1:2) ao longo de dez poços, a fim de se estabelecer a densidade celular mais adequada para os ensaios subsequentes (Eble *et al.* 2002).

Após a definição da densidade celular ideal a ser utilizada em placas revestidas com colágeno tipo I e fibronectina, avaliamos a interferência dos peptídeos na adesão celular.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, os poços foram revestidos com colágeno tipo I (0,2 µg/mL em ácido acético 0,1 M), fibronectina (2 µg/mL em PBS) e incubados a 4 °C overnight. Após duas lavagens com PBS, os poços foram bloqueados com BSA 0,1% (100 µL/poço, 30 min, RT).

As células foram suspensas sem SFB na densidade ideal (50.000 células para MDA-MB-231 e 100.000 para MCF-7) e adicionadas imediatamente com as diluições dos peptídeos (baseadas na CI_{50}). EDTA 10 mM foi usado como controle positivo. A incubação foi de 2–3 h para MDA-MB-231 e 5–6 h para MCF-7.

Após adesão, as células foram fixadas com etanol 70% (10 min, TA), coradas com cristal violeta 0,2% (30 min) e lavadas com água corrente. O corante foi extraído com Triton X-100 0,2% overnight. A leitura da absorbância foi realizada a 560 nm. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes em quadruplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.6 Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 tratadas com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK

Com o objetivo de avaliar o efeito de dois peptídeos selecionados (LyeTxI-b e LyeTxImnK) na formação de complexos de adesão-focal realizamos o ensaio de imunofluorescência, adaptado com base em Ali *et al.* (2023) (Ali *et al.*, 2023).

As células (3000 células/poço) foram semeadas em lâminas cobertas com fibronectina (0,2 µg/mL) na presença ou ausência dos peptídeos. Após 3 horas, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% e sacarose 5% em PBS. A superfície foi bloqueada com 2% de BSA por 1 hora, seguido de incubação com anticorpo contra a integrina $\beta 1$ (marcação extracelular) por 24 horas. Após lavagem com PBS (3x), a marcação intracelular foi realizada mediante permeabilização com solução contendo 0,2% de BSA e 0,1% de Triton X-100 por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas novamente (3x com PBS) e incubadas com anticorpo contra paxilina overnight.

A seguir, as células foram lavadas e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários fluorescentes correspondentes, além de faloidina para marcação da actina. Após nova lavagem (3x com PBS), os núcleos foram corados com solução de Hoechst 3342 (5 µg/mL) por 5 minutos, seguidos de lavagem final com PBS. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Zeiss com objetivas de 10x e 40x. A análise dos complexos de adesão focal foi realizada com o software Fiji/ImageJ. Foram realizados experimentos em triplicata, cerca de sessenta imagens de células únicas por condição foram analisadas e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.7 Análise morfométrica de células MDA-MB-231 tratadas pelos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK

As imagens feitas no ensaio de imunofluorescência foram utilizadas para quantificar as alterações na morfologia das células MDA-MB-231 utilizando o menu *Analyze*. As imagens foram inicialmente convertidas para escala de cinza (8-bits), seguidas de aplicação de limiar (threshold) e binarização, a fim de segmentar os contornos celulares e permitir a análise morfométrica (IMAGEJ, 2025).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: área (µm²), definida como a superfície projetada da célula; perímetro (µm), correspondente ao comprimento da borda celular; circularidade ($4\pi \times \text{área} / \text{perímetro}^2$), que assume valor igual a 1 para um círculo perfeito e tende a 0 em formas alongadas ou irregulares; índice de alongamento (eixo maior / eixo menor), que expressa a relação de alongamento celular; arredondamento, calculado como a razão entre a área e o quadrado do eixo maior, refletindo o grau de proximidade da célula a uma forma circular e solidez (área / área do invólucro convexo), parâmetro que indica o grau de convexidade, sendo valores próximos a 1 característicos de células compactas e valores menores associados à presença de protrusões ou irregularidades. As medidas foram obtidas por meio da ferramenta “Analyze Particles” do ImageJ. Os dados resultantes foram exportados e analisados no GraphPad Prims 8.0.2.

3.8 Ensaio de migração celular em modelo 2D (*wound healing*)

Com o objetivo de investigar o efeito dos peptídeos na migração celular, foi realizado o ensaio de *wound healing* utilizando *Culture-Inserts* de dois poços (Ibidi), posicionados em placas de 24 poços.

As células foram semeadas a uma densidade de 50.000 células por câmara, em 70 μL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas durante a noite para permitir a formação de uma monocamada confluenta. Após a remoção dos *inserts* e lavagem com PBS, adicionou-se 400 μL de DMEM sem SFB contendo os peptídeos na concentração de $1/8 \text{ CI}_{50}$.

A análise da migração celular foi realizada por meio de imagens em lapso temporal (*time-lapse*), capturadas a cada 3 horas durante um período inicial de 9 horas e, posteriormente, após 24 horas. A área livre de células foi quantificada utilizando o software ImageJ/Fiji (**Figura 6**). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Este protocolo foi adaptado com base nas diretrizes fornecidas pela Ibidi para ensaios de *wound healing* com *Culture-Inserts* (IBIDI, 2021).

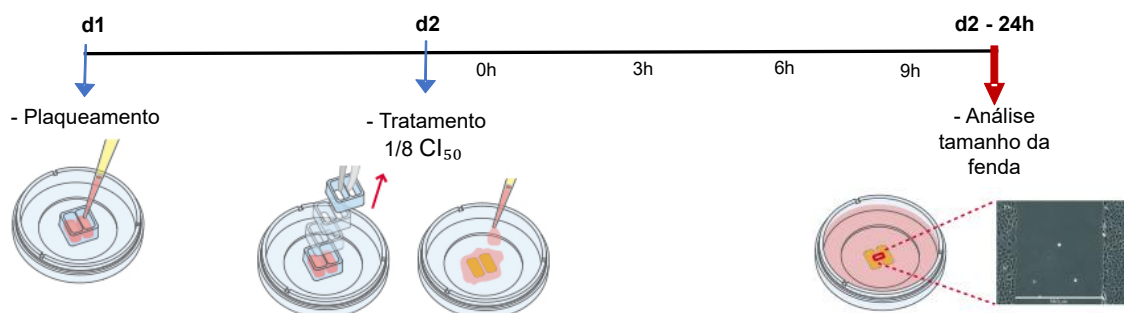


Figura 6. Esquema ilustrativo do ensaio de *wound healing* com Culture-Inserts de dois poços (Ibidi). Células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços contendo os inserts, na densidade de 50.000 células por câmara, em 70 μL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas overnight para formação da monocamada. Após a remoção dos inserts e lavagem com PBS, adicionou-se 400 μL de DMEM sem SFB contendo os peptídeos na concentração de $1/8$ da CI_{50} . A migração celular foi monitorada por imagens em lapso temporal (*time-lapse*) a cada 3 horas até 9 h, e novamente após 24 h. A área livre de células foi quantificada com o software ImageJ/Fiji.

3.9 Invasão celular em modelo 3D com esferoides em géis de colágeno tipo I

A invasividade local das células tumorais é considerada uma etapa inicial do complexo processo de metástase. Um modelo de cultura de esferoides tridimensional (3D) foi usado para determinar o efeito dos peptídeos na invasão do tumor em gel de colágeno. Adaptado de Kaufman *et al.*, 2021 (Kaufman *et al.*, 2021)

As células MDA-MB-231 contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno do tipo I (5.000 células/poço) e MCF-7 (2.000 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços de baixa adesão, centrifugadas a 300 g por 3 min a 4 °C e incubadas por 4 a 7 dias para formação de esferoides. Após esse período, foi adicionado colágeno tipo I (1 mg/mL; 100 $\mu\text{L/poço}$) e as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C para polimerização do gel.

Os esferoides foram então tratados com os peptídeos na concentração de 1/8 da CI_{50} e incubados por 72 h. As imagens foram adquiridas ao final do experimento com microscópio invertido AxioVert (Zeiss), e a área de invasão foi quantificada com o ImageJ/Fiji. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (**Figura 7**).

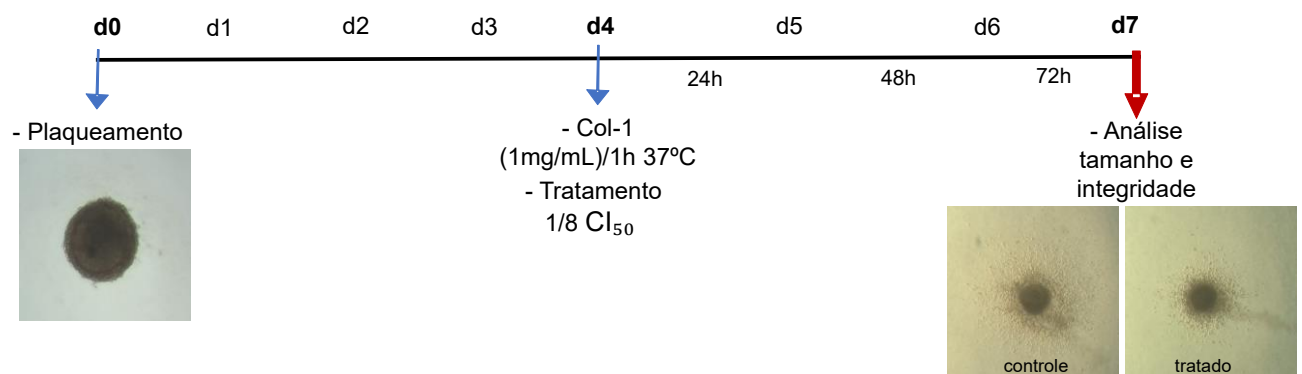


Figura 7. Esquema ilustrativo do ensaio de invasão em gel de colágeno tipo I de esferoides de células de câncer de mama. Células MDA-MB-231 (5.000 células/poço, com 10 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno tipo I) e MCF-7 (2.000 células/poço) foram cultivadas em placas de baixa adesão, centrifugadas a 300 g por 3 min a 4 °C e incubadas por 4 a 7 dias para formação dos esferoides. Após esse período, os esferoides foram incorporados em matriz de colágeno tipo I (1 mg/mL; 100 $\mu\text{L/poço}$), polimerizada por 1 h a 37 °C, e posteriormente tratados com os peptídeos por 72 h. A análise da invasão foi realizada por aquisição de imagens em microscópio invertido AxioVert (Zeiss) e quantificação da área de invasão com o software ImageJ/Fiji.

3.10 Secreção de MMPs gelatinolíticas

A zimografia com gelatina identifica a atividade gelatinolítica em amostras biológicas utilizando géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), impregnados (copolimerizados) com gelatina. Ensaio adaptado de Toth and Fridman, 2001 (Toth e Fridman, 2001).

As células foram cultivadas até aproximadamente 80% de confluência em meio de crescimento completo em frascos T25. A monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS (5 mL) para remover o SFB e, em seguida, incubada com meio livre de SFB (2,0 mL) a 37 °C por 16 a 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os peptídeos e incubadas por mais 24 horas. O meio condicionado foi coletado e mantido a 4 °C, seguido de centrifugação (400 × g, 5 min) para remoção de células e detritos. O sobrenadante clarificado foi misturado com tampão de amostra 4X, e de 20 a 30 µL da mistura foram aplicados nas canaletas de gel SDS-PAGE.

O meio com 10% de soro foi utilizado como controle positivo para detecção das gelatinases MMP-9 (92 kDa e 84 kDa, proforma e forma ativa, respectivamente) e MMP-2 (72 kDa e 64 kDa, proforma e forma ativa, respectivamente). Foi utilizado também um marcador de peso molecular (200 a 50 kDa). O gel SDS-PAGE a 10% copolimerizado com gelatina foi submetido à eletroforese sob voltagem constante (130 V, até 40 mA) por 90 a 100 minutos. Após a corrida, o gel foi submetido à etapa de renaturação, com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação suave, seguido de lavagem com 300 mL de água destilada e incubação por mais 30 minutos em tampão de desenvolvimento.

O gel foi então incubado a 37 °C por pelo menos 16 horas em bandeja fechada. A coloração foi feita com azul de Coomassie por pelo menos 1 hora, e o gel foi descolorido até o aparecimento de bandas claras indicativas da atividade gelatinolítica. As imagens foram obtidas com o sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.

3.11 Análise *in silico* da interação de LyeTxI-b e LyeTxImnK com a subunidade β da integrina β 1

As análises estruturais foram realizadas utilizando ChimeraX (versão 1.10) em combinação com AlphaFold2 e Alphafold2-multimer (ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 utilizando <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). A sequência do domínio transmembranar da subunidade alfa 2 da integrina humana foi obtida da sequência de referência do NCBI: NM_002203.4 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_002203.4/). A estrutura da subunidade alfa

2 da integrina P17301 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P17301/entry#structure>) serviu como referência. Para todos os resíduos de aminoácidos, as pontuações de confiança pLDDT (e respectivos mapas/gráficos), assim como as pontuações ipTM que avaliam a confiabilidade das diferentes interações são fornecidas como material suplementar para a interação entre LyeTxI-b (Apêndice A) e LyeTxImnK (Apêndice B) com a subunidade β da integrina β 1.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi usada para comparar vários grupos. Um teste t não pareado foi realizado para comparar apenas dois grupos. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade dos peptídeos para duas linhas celulares de câncer de mama

A Tabela 2 apresenta os valores de CI_{50} calculados para cada peptídeo após quantificação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT que consiste na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan e permite avaliar a viabilidade celular por espectrofotometria.

Como mostrado, os peptídeos minimizados foram menos citotóxicos (peptídeos 3, 4 e 6) quando comparados à toxina nativa LyeTxI (peptídeos 1 e 5) e ao derivado sintético LyeTxI-b (peptídeo 2). Os peptídeos 3, 4 e 6 foram mais potentes contra MCF-7 (CI_{50} de 16 a 17 μ M) e menos potentes contra MDA-MB-231 (CI_{50} de 86 a 98 μ M). Isso também foi observado para os peptídeos 1 e 5, com CI_{50} de 3 a 4 μ M para MCF-7 e 13 a 17 μ M para MDA-MB-231. De forma geral, os peptídeos minimizados (3, 4 e 6) apresentaram menor citotoxicidade para as duas linhagens celulares quando comparados à toxina nativa (1 e 5) e ao peptídeo LyeTxI-b (2), e a linhagem MCF-7 foi mais sensível à ação citotóxica dos peptídeos em relação à linhagem MDA-MB-231.

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória 50% (CI_{50}) da toxina nativa e peptídeos sintéticos na viabilidade de células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

#	Peptídeo	CI_{50}	
		MDA-MB-231 (μ M)	MCF-7 (μ M)
1	LyeTxI	13,58 (11,11 a 16,61)*	4,12 (3,08 a 3,52)
2	LyeTxI-b	4,53 (3,45 a 5,96)	3,02 (2,58 a 3,54)
3	LyeTxImnK-Ac	88,82 (72,21 a 104,90)	16,89 (13,96 a 20,44)
4	LyeTxImnK	97,07 (88,63 a 106,3)	16,05 (12,6 a 20,46)
5	LyeTxI-Ac	17,02 (13,64 a 21,23)	2,92 (2,26 a 3,77)
6	LyeTxImn-Ac	88,02 (44,64 a 173,5)	Nd

Os valores de CI_{50} foram calculados com base na regressão linear das curvas dose-resposta logarítmica após 48 horas de exposição aos peptídeos, determinados pelos ensaios de MTT. Os valores representam a média de pelo menos 3 experimentos independentes. *Valores em parênteses indicam o Intervalo de Confiança. Nd: não foi possível realizar o experimento para este peptídeo em MCF-7.

4.2 Efeitos dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK sobre a estabilidade e as propriedades viscoelásticas de bicamadas lipídicas com diferentes composições avaliados por QCM-D

Com base nos ensaios de citotoxicidade, que evidenciaram diferenças expressivas nos valores de CI_{50} entre os peptídeos nativos/derivados e seus derivados minimizados, buscou-se investigar se tais variações estariam associadas às propriedades estruturais e, conseqüentemente, ao modo de interação com membranas. Para isso, foi selecionado o peptídeo sintético LyeTxI-b, representando a toxina nativa, e os análogos minimizados LyeTxImnK e LyeTxImnK-Ac, que apresentam uma estrutura teórica anfipática e maior atividade antimicrobiana (Fuscaldi *et al*, 2020), para os experimentos de QCM-D. O objetivo foi caracterizar a dinâmica de interação desses peptídeos com diferentes composições de membranas lipídicas que mimetizam membranas celulares eucarióticas, permitindo correlacionar suas propriedades biofísicas com a seletividade e a atividade citotóxica observada em células tumorais.

Neste experimento, foram utilizadas bicamadas lipídicas neutras (DOPC) e negativamente carregadas, acrescidas de fosfatidilserina (20% POPS), com e sem colesterol (10%), para modelos mais compatíveis com membranas eucarióticas. De forma geral, a injeção dos lipossomos (faixa amarela) causou uma queda acentuada de frequência (Δf , azul) e aumento moderado de dissipação (ΔD , vermelho), indicativo de formação da bicamada suportada. As bicamadas contendo carga aniônica conferida pela fosfatidilserina tiveram uma variação ligeiramente maior na ΔD em relação às zwitteriônicas, indicativo da formação de uma bicamada menos rígida e mais hidratada. As membranas com colesterol (10% Col) sofreram variações menos intensas de Δf e ΔD .

A **Figura 8.1** mostra que o peptídeo LyeTxI-b, na concentração de 0,5 μM , não causou nenhuma alteração nos sinais de Δf e ΔD , tanto na fase de adsorção como após a lavagem, para todos os modelos de membrana, indicativo de que não houve

inserção/ligação na membrana nessa concentração. Em contrapartida, quando utilizada a concentração de CI_{50} , 4 μ M, o peptídeo LyeTxI-b (**Figura 8.2**) mostrou uma interação forte e estável com todas as membranas, ocorreu inserção/ligação durante a fase de adsorção demonstrada pela queda acentuada na Δf e aumento da ΔD , que também indica que a bicamada se tornou mais macia e hidratada, além disso o sinal da ΔD foi maior nas membranas aniônicas em comparação com as zwitteriônicas, indicando maior interação com o peptídeo e reorganização dessas membranas.

Após a etapa de lavagem, os sinais de Δf permaneceram parcialmente inalterados, indicando que o peptídeo se manteve inserido na membrana e formou poros estáveis sem uma perda de massa lipídica considerável para as duas membranas. Enquanto a ΔD teve menor aumento e se manteve mais baixa nas membranas zwitteriônicas, quando comparadas com as aniônicas, característica de uma membrana mais rígida e organizada que sofreu menos perturbação pelo peptídeo LyeTxI-b.

Já na **Figura 8.3** e **8.4** podemos observar que os peptídeos minimizados, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK, também causaram um decréscimo adicional de Δf com elevação de ΔD após sua injeção, padrão consistente com ligação/inserção na bicamada e leve abrandamento viscoelástico. No entanto, após a lavagem, os sinais de Δf aumentaram positivamente quase ao mesmo nível pré-peptídeos, indicando remoção e perda de massa lipídica. A ΔD foi diferente entre as membranas neutras e negativas, apresentando maior magnitude e variação nas negativas, caracterizando uma maior desorganização e aumento da maciez dessas membranas após a inserção dos peptídeos e lavagem com a solução tampão.

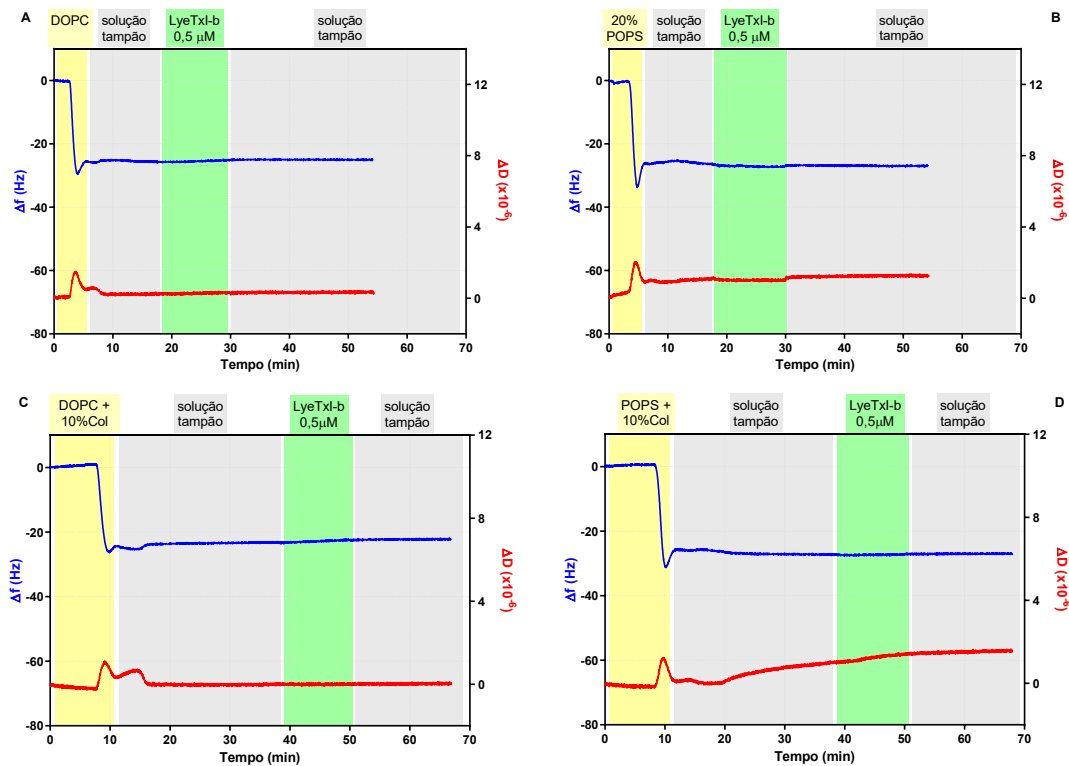


Figura 8.1. Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxI-b (0,5 μM) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol. As curvas representam a variação de frequência (Δf , azul) e de dissipação (ΔD , vermelho) ao longo do tempo. A formação da bicamada (faixa amarela) resultou em queda pronunciada de Δf e aumento discreto de ΔD , compatíveis com uma camada rígida e pouco hidratada. A adição do peptídeo (faixa verde) não promoveu alteração na Δf e ΔD , sugerindo que não ocorreu ligação e reorganização da bicamada. Lavagem subsequente (faixa cinza final) também não causou nenhuma alteração significativa, indicando que não houve alteração na viscoelasticidade e rearranjo estrutural. Dados representativos de três experimentos independentes.

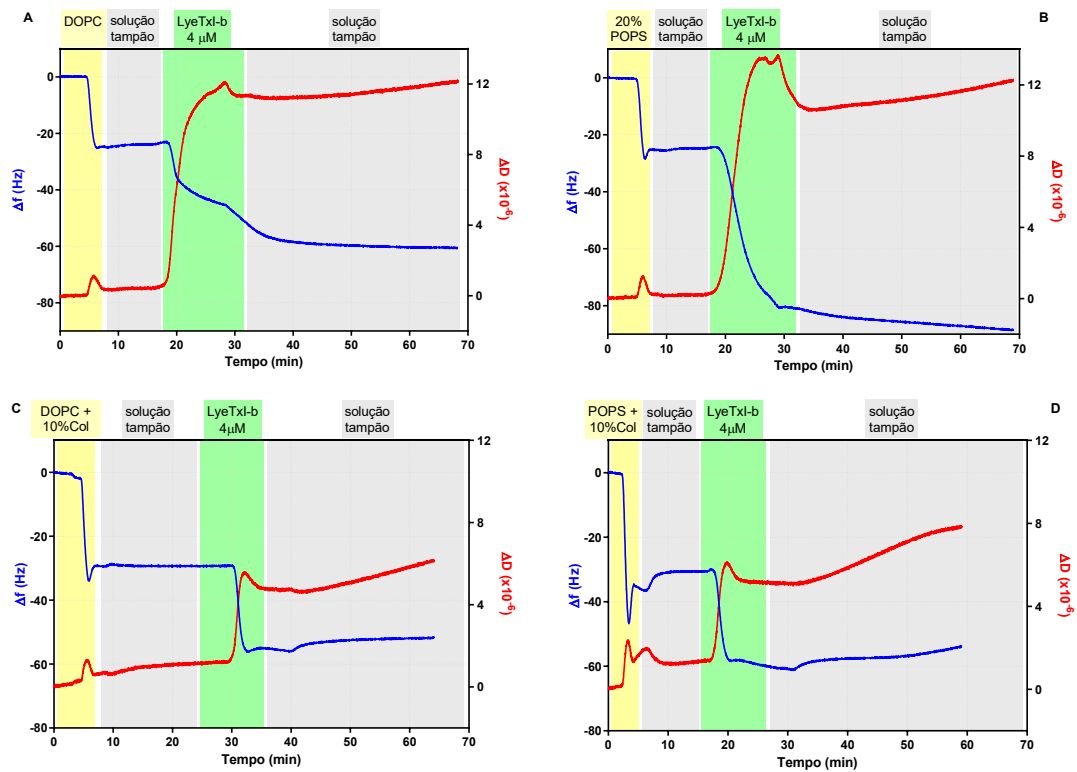


Figura 8.2. Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxI-b (4 μ M) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol. As curvas representam a variação de frequência (Δf , azul) e de dissipação (ΔD , vermelho) ao longo do tempo. A formação da bicamada (faixa amarela) resultou em queda pronunciada de Δf e aumento discreto de ΔD , compatíveis com uma camada rígida e pouco hidratada. A adição do peptídeo (faixa verde) promoveu decréscimo adicional de Δf e aumento de ΔD , indicando ligação e reorganização da bicamada. Lavagem subsequente (faixa cinza final) induziu ligeira elevação de ΔD , indicando aumento da viscoelasticidade e rearranjo estrutural, seguido de estabilização em níveis diferentes dos iniciais, a Δf não foi alterada, ou seja, o peptídeo se inseriu de forma estável e não causou perda de massa lipídica de forma significativa. As alterações nos sistemas contendo POPS tiveram maior magnitude, indicando uma seletividade do peptídeo por membrans aniônicas (B e D). Dados representativos de três experimentos independentes.

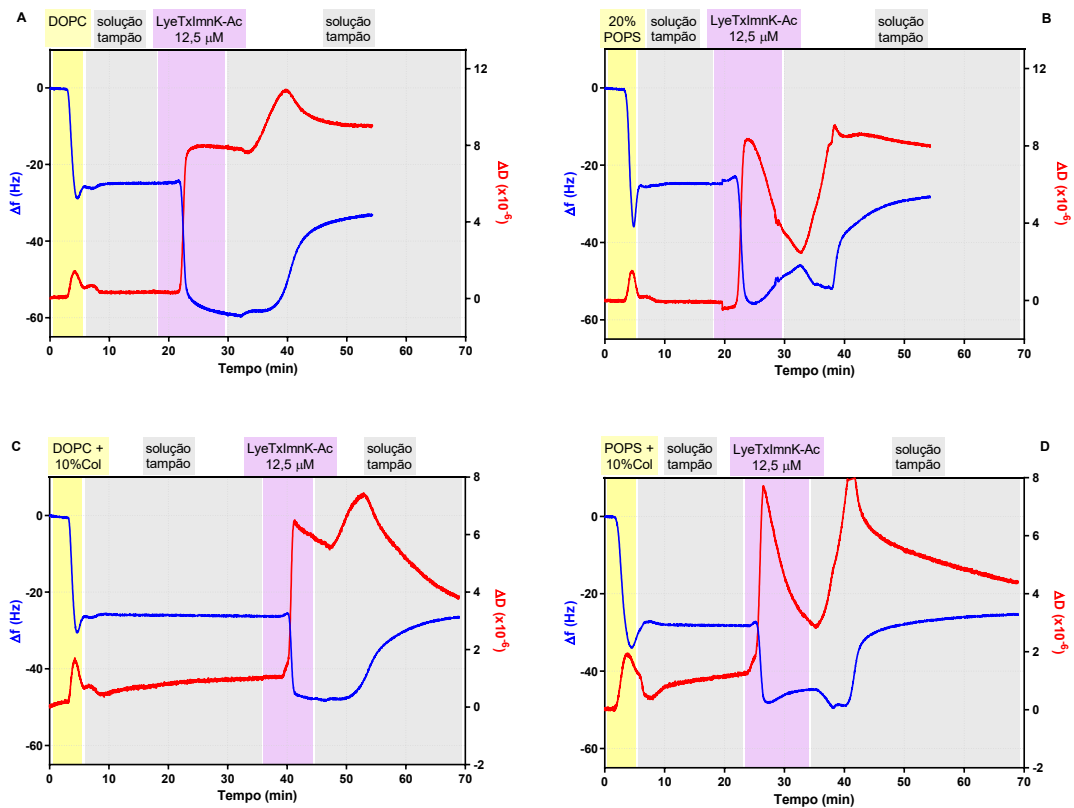


Figura 8.3. Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxImnK-Ac (12,5 μ M) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol. As curvas representam a variação de frequência (Δf , azul, harmônico $n=5$) e de dissipação (ΔD , vermelho) ao longo do tempo. A formação da bicamada (faixa amarela) resultou em queda pronunciada de Δf e aumento discreto de ΔD , compatíveis com uma camada rígida e pouco hidratada. A adição do peptídeo (faixa verde) promoveu decréscimo adicional de Δf e aumento de ΔD , sugerindo ligação e reorganização da bicamada. Lavagem final (faixa cinza final) induziu elevação transitória de ΔD , indicando aumento temporário da viscoelasticidade e rearranjo estrutural, seguido de estabilização em níveis diferentes dos iniciais, além do aumento positivo de Δf aproximando aos valores pré-peptídeo, indicando remoção e perda de massa lipídica consideráveis. As alterações nos sistemas contendo POPS tiveram maior magnitude, indicando uma seletividade do peptídeo por membranas aniônicas (B e D). Dados representativos de três experimentos independentes.

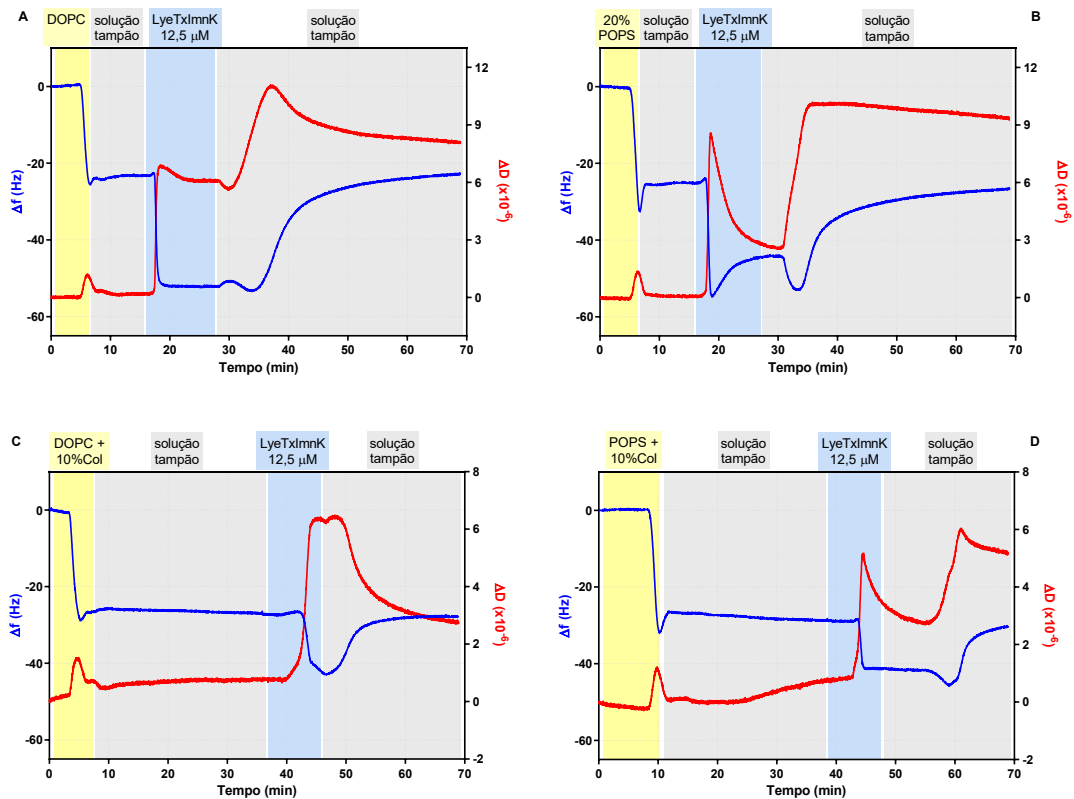


Figura 8.4. Monitoramento por QCM-D da interação do peptídeo LyeTxImnK (12,5 μM) com bicamada lipídica suportada de (A) DOPC, (B) DOPC contendo 20% POPS, (C) DOPC contendo 10% de colesterol e (D) DOPC contendo 20% POPS e 10% colesterol. As curvas representam a variação de frequência (Δf , azul, harmônico $n=5$) e de dissipação (ΔD , vermelho) ao longo do tempo. A formação da bicamada (faixa amarela) resultou em queda pronunciada de Δf e aumento discreto de ΔD , compatíveis com uma camada rígida e pouco hidratada. A adição do peptídeo (faixa verde) promoveu decréscimo adicional de Δf e aumento de ΔD , sugerindo ligação e reorganização da bicamada. Lavagem final (faixa cinza final) induziu elevação transitória de ΔD , indicando aumento temporário da viscoelasticidade e rearranjo estrutural, seguido de estabilização em níveis diferentes dos iniciais, além do aumento positivo de Δf aproximando aos valores pré-peptídeo, indicando remoção e perda de massa lipídica consideráveis. As alterações nos sistemas contendo POPS tiveram maior magnitude, indicando uma seletividade do peptídeo por membrans aniônicas (B e D). Dados representativos de três experimentos independentes.

4.3 Efeito dos peptídeos na adesão de células MDA-MB-231 e MCF-7 a dois componentes da matriz extracelular (colágeno I, fibronectina)

Baseado em resultados prévios descritos por Abdel-Salam e colaboradores (2021) foi observado uma redução significativa de metástase pulmonar após tratamento com LyeTxI-b em modelo de câncer de mama triplo-negativo 4T1 em camundongos (Abdel-Salam *et al.*, 2021). Portanto, foi investigado se os peptídeos poderiam aumentar a adesão das células MDA-MB-231 e MCF-7 a dois substratos da matriz extracelular, colágeno tipo I e fibronectina.

Os substratos fibronectina e colágeno tipo I, são componentes abundantes da matriz extracelular e relevantes no microambiente tumoral. A fibronectina é uma glicoproteína presente em membranas basais e tecidos conjuntivos, frequentemente aumentada em tumores de mama, que interage com integrinas, promovendo adesão e migração celular. Já o colágeno tipo I constitui a principal proteína estrutural da matriz estromal, conferindo rigidez ao tecido e o aumento da invasividade tumoral. Dessa forma, a utilização de ambos os substratos permite avaliar distintos mecanismos de interação célula-matriz, reproduzindo de maneira mais fiel as condições encontradas *in vivo* (Docheva *et al.*, 2010).

Para realização dos experimentos, inicialmente foi importante determinar a linearidade do método quanto à quantidade de células que permitiram observar o aumento da adesão celular através de visualização por microscópio ótico (MO), bem como sua quantificação por método colorimétrico por espectrofotometria, utilizando-se coloração com cristal de violeta. Dessa forma foi possível distinguir células aderidas, quando as células apresentavam morfologia “spread” - espalhada ao MO, fortemente aderidas ao plástico e não eram lavadas na etapa de lavagem, sendo coradas com o cristal de violeta (absorbância máxima, variando de 1,33 nm para MDA-MB-231 a 2,76 nm para MCF-7). Células não aderidas, apresentavam morfologia arredondada e eram lavadas, de forma que não eram coradas com o cristal violeta e a absorbância era mínima (absorção mínima menor que 0,16 nm). Como controle negativo de adesão foi utilizado o EDTA, um agente quelante de cálcio e magnésio que interfere na adesão celular à MEC mediada por integrina, processo que depende desses íons para manter as integrinas em sua conformação ativa. Portanto, as células tratadas com EDTA que não aderiam, eram lavadas na etapa de lavagem e, portanto, não eram coradas pelo cristal violeta, gerando uma absorbância mínima.

Assim, foram plaqueadas diferentes densidades celulares para identificar o valor de absorbância na fase linear do método. Desta forma, os ensaios de otimização indicaram que 50.000 células/poço para MDA-MB-231 e 100.000 células/poço para MCF-7 permitiram distinguir células aderidas, das não aderidas, dentro da linearidade do método avaliado a 560 nm (dados não mostrados). Dessa forma, os experimentos de adesão foram conduzidos com essas densidades celulares. A quantificação de adesão por cristal violeta foi correlacionada com os dados de viabilidade celular por quantificação por MTT, e plotados juntamente com as curvas de adesão e estão representados nos gráficos pelas curvas alaranjadas para a linhagem MDA-MB-231 e verde para MCF-7.

A visualização da microscopia ótica do efeito do peptídeo LyeTxI-b e LyeTxImnK na adesão de diferentes linhagens está representada na **Figura 9** (fotos representativas). As células foram plaqueadas em meio incompleto em placas de ultra-baixa aderência revestidas de fibronectina e colágeno tipo I; quando não tratadas, as células apresentaram morfologia predominantemente arredondada e sem espalhamento após 3 horas de incubação. Já na presença dos peptídeos foi possível observar várias células bem aderidas representadas pela morfologia mais espalhada e achatada.

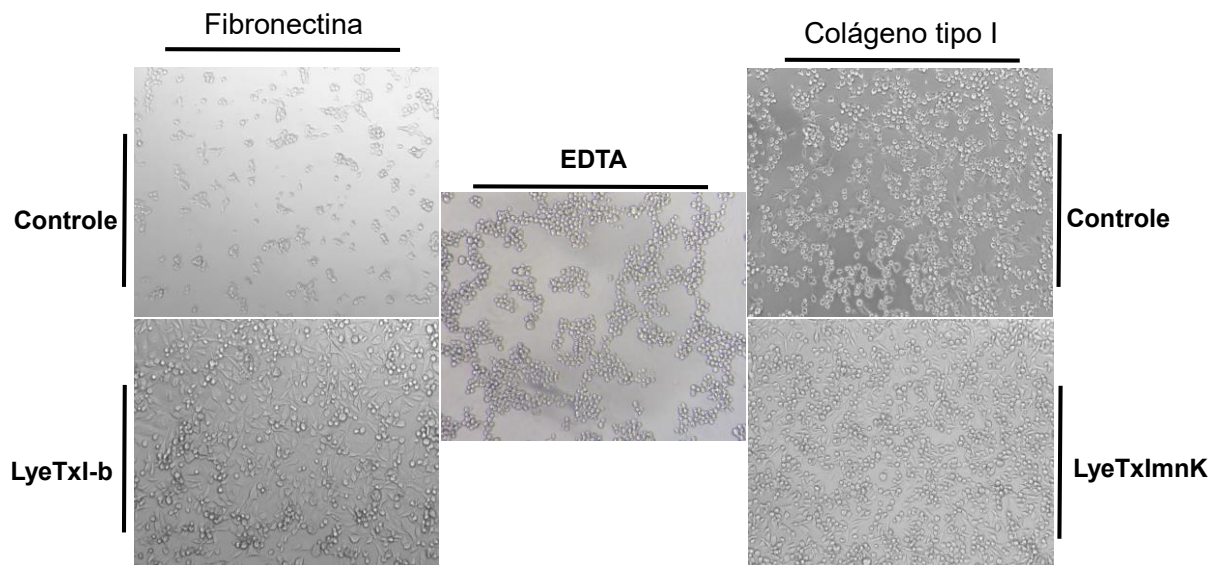


Figura 9. Figura representativa da morfologia de células MDA-MB-231 em placas não tratadas para adesão por microscopia óptica. As células foram plaqueadas em placas de ultra-baixa adesão revestidas de fibronectina ou colágeno tipo I em meio incompleto, tratadas com LyeTxI-b e LyeTxImnK e incubadas por 3 horas para adesão. EDTA 10mM foi utilizado como controle negativo de adesão. Imagens representativas.

Para as células MDA-MB-231, o tratamento com os peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac (**Figura 9.1**) não aumentaram a adesão celular. O LyeTxI promoveu aumento significativo da adesão ao colágeno tipo I e à fibronectina apenas na concentração de 0,81 μM , enquanto o LyeTxI-Ac apresentou efeito na concentração de 1,06 μM . Vale destacar que o aumento da adesão ocorreu em concentrações não citotóxicas para o peptídeo original LyeTxI e seu análogo acetilado. Para o LyeTxI-b, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma dos dois componentes de matriz testadas.

Em contrapartida, os peptídeos LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK e LyeTxImn-Ac (**Figura 9.2**) promoveram aumento significativo da adesão tanto ao colágeno tipo I quanto à fibronectina. LyeTxImnK-Ac aumentou a adesão nas concentrações de 5,5 e 11 μM , enquanto o LyeTxImnK apresentou efeito em 3,03 e 24,25 μM , em comparação ao controle celular (CC). Esse efeito ocorreu predominantemente em concentrações associadas a baixa citotoxicidade (viabilidade celular >80%). O LyeTxImn-Ac exibiu maior atividade sobre a fibronectina, promovendo aumento da adesão em concentrações não citotóxicas (1,35 a 22 μM) e em concentrações que reduziram a viabilidade celular para cerca de 60% (44 e 88 μM).

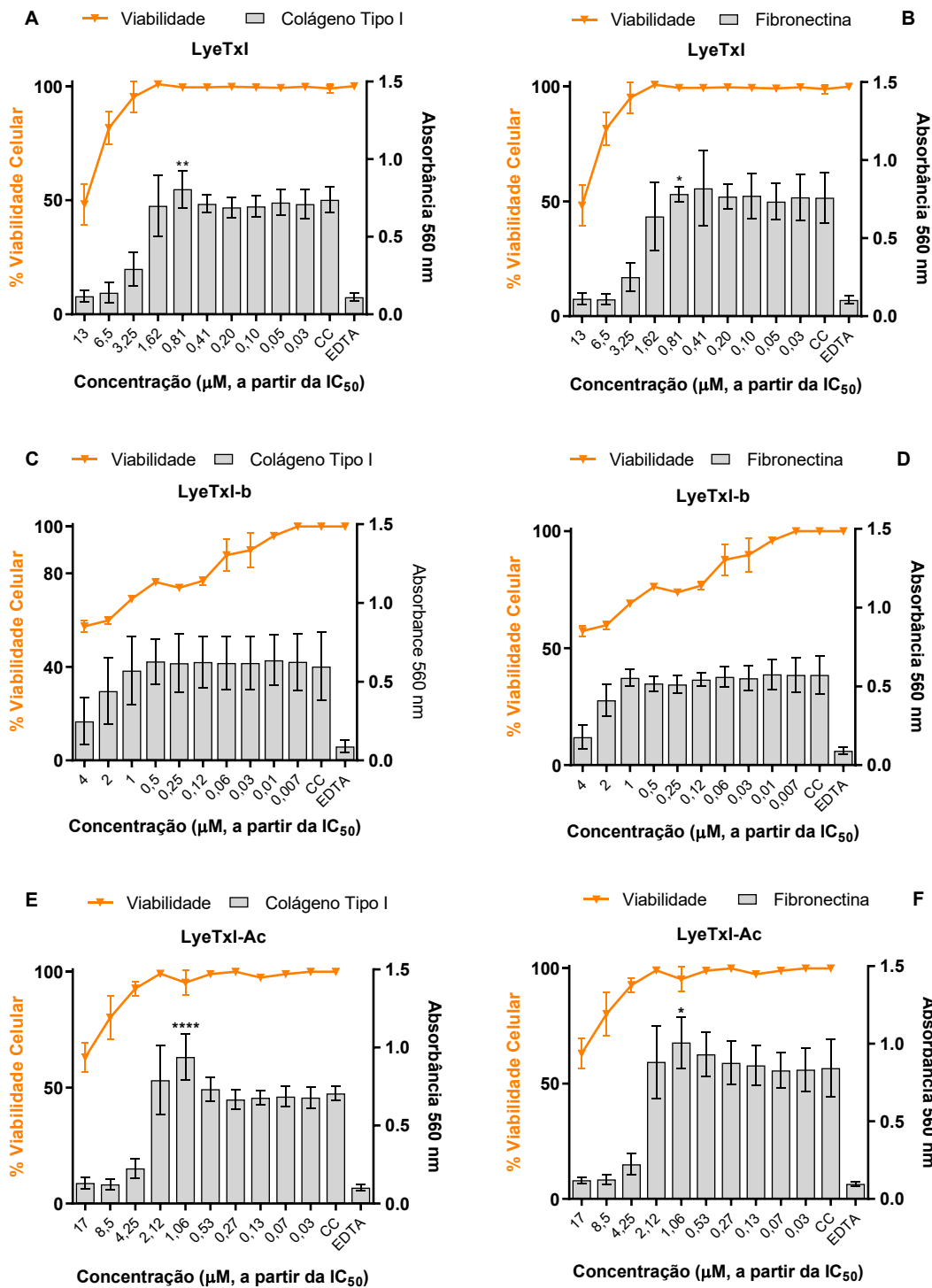


Figura 9.1 Efeito dos peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac sobre a adesão de células MDA-MB-231 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F). Placas de 96 poços foram revestidas com colágeno tipo I (0,2 μg/mL) ou fibronectina (2 μg/mL) e incubadas a 4 °C overnight. As células MDA-MB-231 foram ressuspensas em meio sem SFB a 50.000 células/poço, e imediatamente tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos (expressas em μM a partir da CI_{50}). EDTA 10 mM foi utilizado como controle positivo de inibição da adesão. A incubação foi realizada por

2–3 h para permitir a adesão à matriz. As células aderidas foram fixadas com etanol 70%, coradas com cristal violeta 0,2% e lavadas com água corrente. O corante foi extraído com Triton X-100 0,2% overnight, e a absorbância foi determinada a 560 nm (barras cinzas). A viabilidade celular foi determinada em paralelo pelo ensaio de MTT (linha alaranjada, eixo Y à esquerda). Observa-se que apenas o peptídeo LyeTxI-b não causou alterações significativas na adesão (**C e D**). LyeTxI (**A e B**) e LyeTxI-Ac (**E e F**) aumentaram a adesão significativamente, em concentrações não citotóxicas, ao colágeno tipo I e à fibronectina. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), e $p < 0,0001$ (****).

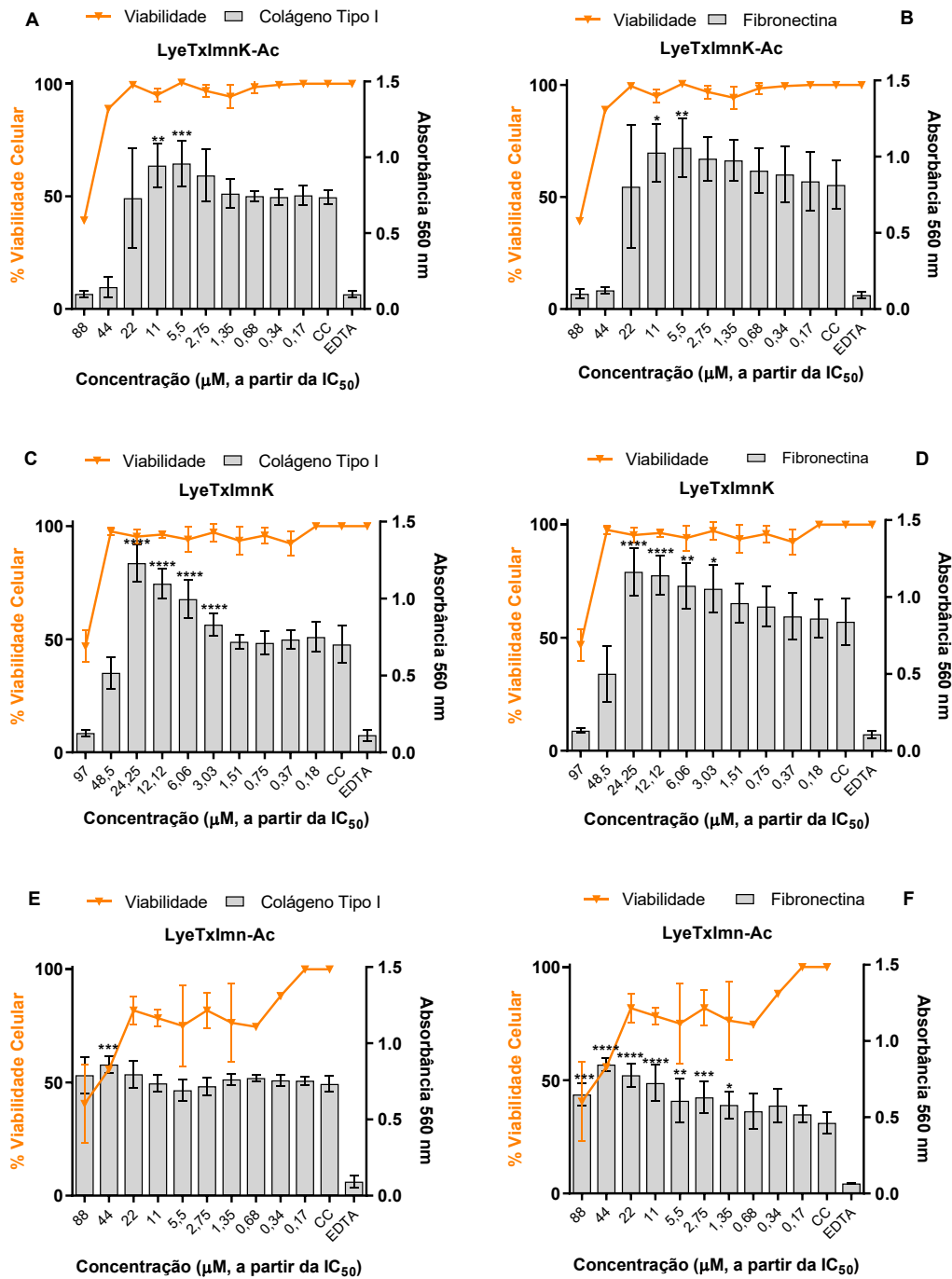


Figura 9.2. Efeito dos peptídeos LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK e LyeTxImn-Ac sobre a adesão de células MDA-MB-231 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F). Placas de 96 poços foram revestidas com colágeno tipo I (0,2 µg/mL) ou fibronectina (2 µg/mL) e incubadas a 4 °C por overnight. Células MDA-MB-231, previamente cultivadas e ressuspensas em meio sem SFB a uma densidade de 50.000 células/poço, foram imediatamente tratadas com diluições seriadas dos peptídeos (concentrações expressas em µM a partir da C_{I50}). EDTA 10 mM foi utilizado como controle positivo de inibição da adesão. As células foram incubadas por 2–3 h para permitir a adesão à matriz. Em seguida, foram fixadas com etanol 70%, coradas com cristal violeta 0,2% e lavadas em água corrente. O corante ligado foi extraído com

Triton X-100 0,2% overnight, e a absorbância foi determinada a 560 nm (barras cinzas). Em paralelo, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (linha alaranjada, eixo Y à esquerda). Observa-se que os peptídeos LyeTxImnK-Ac (**A e B**) e LyeTxImnK (**C e D**) promoveram aumento significativo da adesão a ambas as matrizes em concentrações com baixa citotoxicidade, enquanto LyeTxImn-Ac apresentou maior efeito na fibronectina (**F**), mesmo em concentrações que reduziram a viabilidade celular. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), e $p < 0,0001$ (****).

A **Figura 9.3** apresenta o efeito dos peptídeos derivados de LyeTxI sobre a adesão de células MCF-7 ao colágeno tipo I (**Figura 9.3 A, C e E**) e à fibronectina (**Figura 9.3 B, D e F**). Os peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac apresentaram efeitos discretos ou inexistentes sobre a adesão celular. Para o LyeTxI, observou-se um aumento significativo da adesão à fibronectina em concentrações não citotóxicas ($<0,5 \mu\text{M}$), sem alterações relevantes na adesão ao colágeno tipo I. Já para LyeTxI-b e LyeTxI-Ac, não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos substratos de matriz testados.

Em contrapartida, os peptídeos LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK promoveram aumento significativo da adesão celular tanto ao colágeno tipo I quanto à fibronectina em concentrações entre $0,13$ e $8 \mu\text{M}$ (**Figura 9.4**), quando comparados ao controle celular (CC). Esse efeito ocorreu predominantemente em concentrações associadas a baixa citotoxicidade (viabilidade celular $>70\%$).

Em resumo, os resultados obtidos com MDA-MB-231 foram semelhantes aos observados para MCF-7, demonstrando que os peptídeos minimizados LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK apresentaram maior capacidade de aumentar a adesão celular ao colágeno tipo I e à fibronectina, enquanto LyeTxI e suas variantes acetilada e “b” exibiram baixa atividade em induzir a adesão celular aos dois componentes da matriz extracelular avaliados.

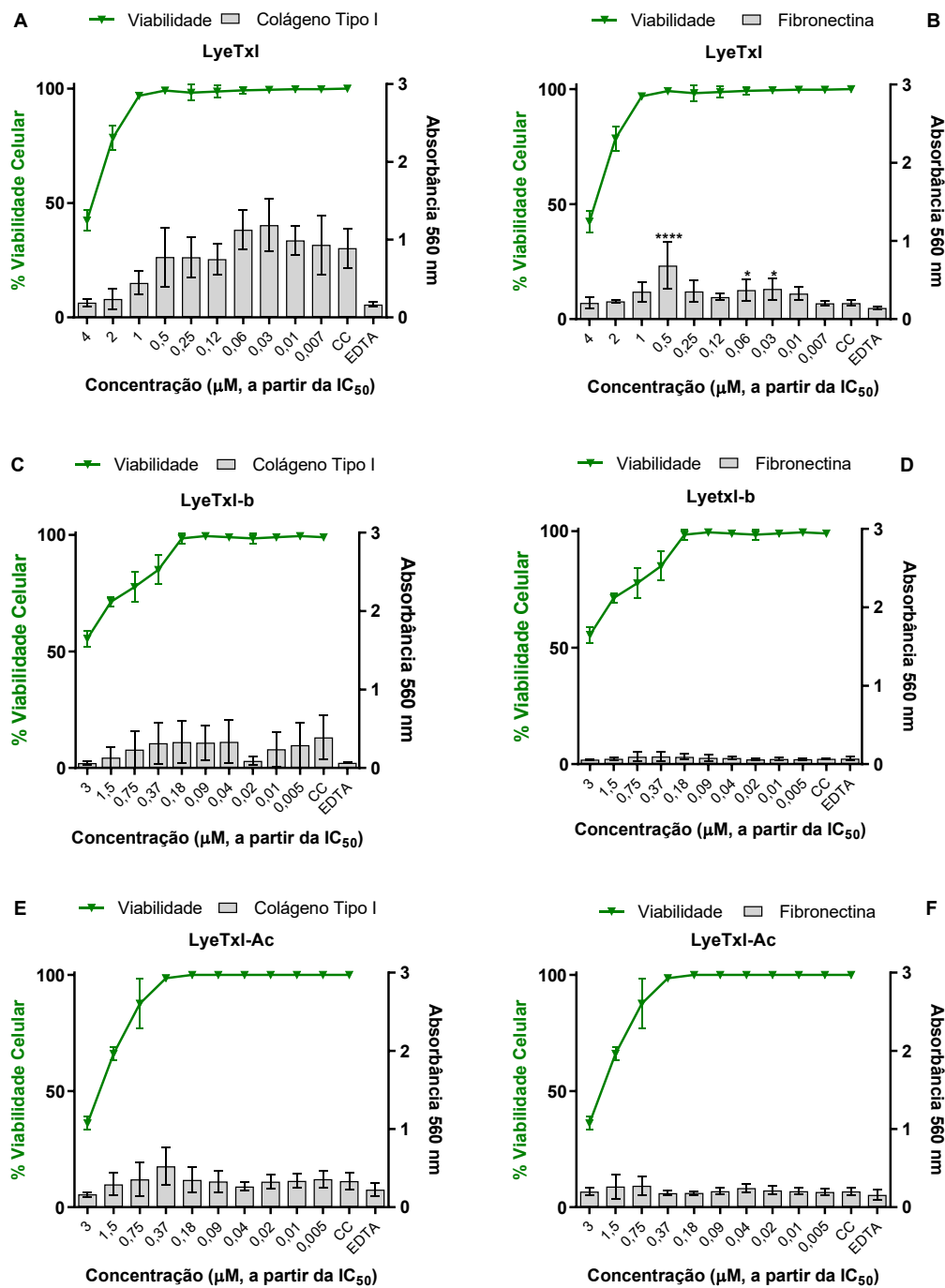


Figura 9.3. Efeito dos peptídeos LyeTxI, LyeTxI-b e LyeTxI-Ac sobre a adesão de células MCF-7 a colágeno tipo I (A, C e E) ou fibronectina (B, D e F). Placas de 96 poços foram revestidas com colágeno tipo I (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou fibronectina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 4 °C overnight. As células MCF-7 foram ressuspensas em meio sem SFB a 100.000 células/poço, e imediatamente tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos (expressas em μM a partir da CI_{50} previamente determinada para cada composto). EDTA 10 mM foi utilizado como controle positivo de inibição da adesão. A incubação foi realizada por 5–6 h para permitir a adesão à matriz. As células aderidas foram fixadas com etanol 70%, coradas com cristal violeta 0,2% e lavadas com água corrente. O corante foi extraído com Triton X-100 0,2% overnight, e a absorbância foi

determinada a 560 nm (barras cinzas). A viabilidade celular foi determinada em paralelo pelo ensaio de MTT (linha verde, eixo Y à esquerda). Observa-se alterações significativas na adesão apenas para LyeTxI em fibronectina (**B**), que apresentou aumento em concentrações específicas, sem alterar significativamente a viabilidade celular. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), e $p < 0,0001$ (****).

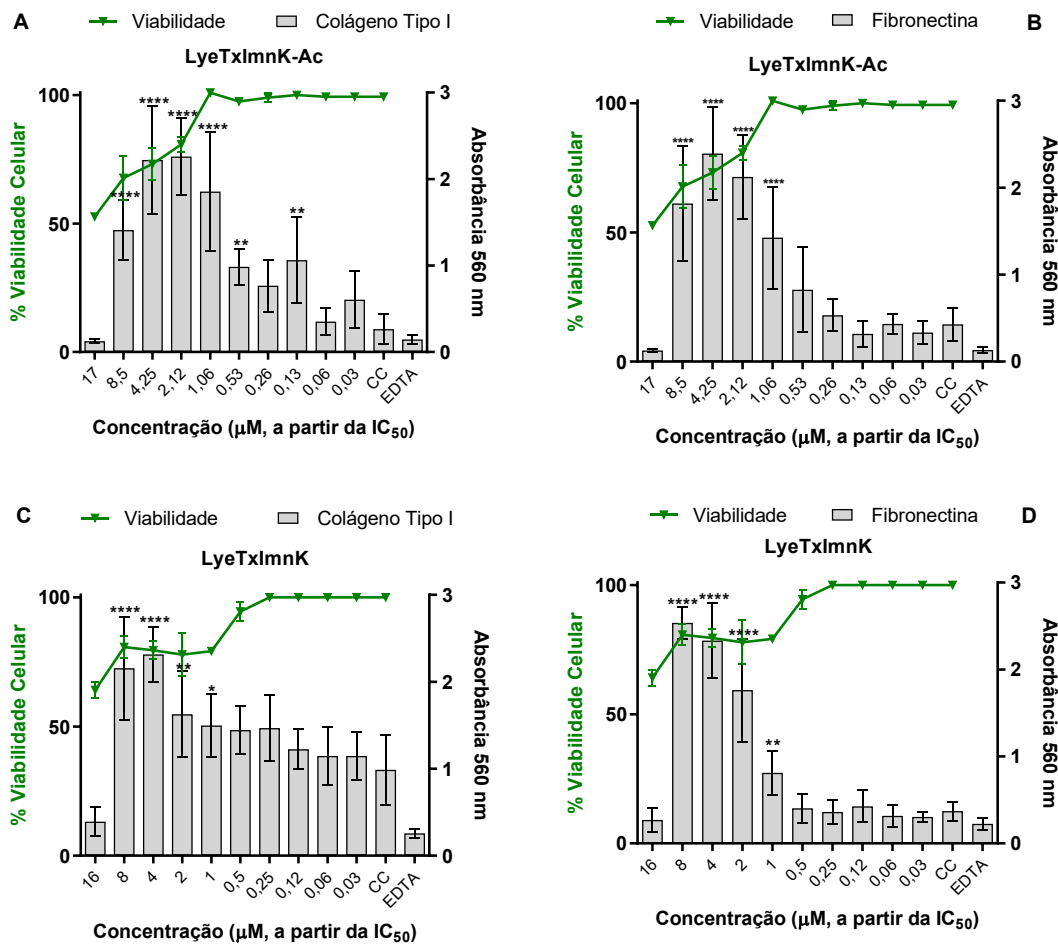


Figura 9.4. Efeito dos peptídeos LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK sobre a adesão de células MCF-7 a colágeno tipo I (A e C) ou fibronectina (B e D). Placas de 96 poços foram revestidas com colágeno tipo I (0,2 µg/mL) ou fibronectina (2 µg/mL) e incubadas a 4 °C por overnight. Células MCF-7, previamente cultivadas e ressuspensas em meio sem SFB a uma densidade de 100.000 células/poço, foram imediatamente tratadas com diluições seriadas dos peptídeos (concentrações expressas em µM a partir da CI_{50}). EDTA 10 mM foi utilizado como controle positivo de inibição da adesão. As células foram incubadas por 5–6 h para permitir a adesão à matriz. Em seguida, foram fixadas com etanol 70%, coradas com cristal violeta 0,2% e lavadas em água corrente. O corante ligado foi extraído com Triton X-100 0,2% overnight, e a absorbância foi determinada a 560 nm (barras cinzas). Em paralelo, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (linha verde, eixo Y à esquerda). Observa-se que, em concentrações específicas, ambos os peptídeos promoveram aumento significativo na adesão celular tanto ao colágeno tipo I quanto à fibronectina, inclusive em concentrações com baixa citotoxicidade. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), e $p < 0,0001$ (****).

4.4 Análise do efeito dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK na formação de complexos de adesão focal (FA) em células MDA-MB-231 por microscopia confocal

Nossos resultados, assim como a literatura, mostram que a adesão de células MDA-MB-231 à fibronectina foi mais forte em comparação ao colágeno tipo I. E essa adesão à fibronectina aumenta a sinalização mediada por integrinas e a fosforilação da quinase de adesão focal, etapas importantes e correlacionadas com a formação de complexos de adesão focal (Park e Helfman, 2019; Maity *et al.*, 2011; Taherian *et al.*, 2011).

Portanto, selecionamos o peptídeo sintético LyeTxI-b pelos resultados em modelo de tumor de câncer de mama triplo-negativo em camundongos, e o peptídeo minimizado LyeTxImnK pelo aumento significativo na adesão celular, para análise do efeito desses peptídeos na formação de complexos de adesão focal (FA) em MDA-MB-231. Para a análise da formação de FA foram selecionadas três proteínas, integrina $\beta 1$ (proteínas de membrana que promovem adesão à MEC), paxilina e actina (fibras de tensão anexas aos FA). A paxilina desempenha um papel crucial na formação dos complexos de adesão focal atuando como proteína adaptadora e recrutando outras proteínas como talina, vinculina e FAK, ela organiza o complexo e estabelece ligação entre as integrinas e os filamentos de actina do citoesqueleto (Ripamonti; Wehrle-Haller; Curtis, 2022).

Para avaliar a formação de FA as células MDA-MB-231 foram marcadas com anticorpo contra a integrina (marcação extracelular - anticorpo secundário fluorescente verde), anticorpo contra paxilina (marcação intracelular - anticorpo secundário fluorescente amarelo), além de faloidina para marcação da actina (marcação intracelular - vermelho) e os núcleos foram corados com solução de Hoechst 3342. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Zeiss com objetivas de 40x. As adesões focais foram identificadas como regiões de colocalização positiva das três proteínas analisadas (integrina $\beta 1$, paxilina e actina). A sobreposição desses sinais indica que os complexos foram formados por adesões mediadas por integrina, com conexão funcional às fibras contráteis de actina por meio da proteína adaptadora paxilina. Essas regiões de colocalização foram quantificadas utilizando o software Fiji/ImageJ e consideradas representativas da formação dos complexos de adesão focal.

Os resultados apresentados na **Figura 10** mostram que o tratamento com os peptídeos, em concentrações não citotóxicas, LyeTxImnK (12,5 μ M) e LyeTxI-b (0,5 μ M), aumentou significativamente a formação de complexos de adesão focal em relação ao controle não tratado. Especificamente, a quantificação do número de FAs por célula revelou um aumento acentuado em ambos os grupos tratados, com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Destaca-se o peptídeo LyeTxImnK, que induziu um efeito mais pronunciado na formação de FAs, com uma média de 71 ± 27 FA por célula, indicando uma maior capacidade de modulação da organização do citoesqueleto e da adesão celular, enquanto o peptídeo LyeTxI-b induziu uma média de 30 ± 14 FA por célula.

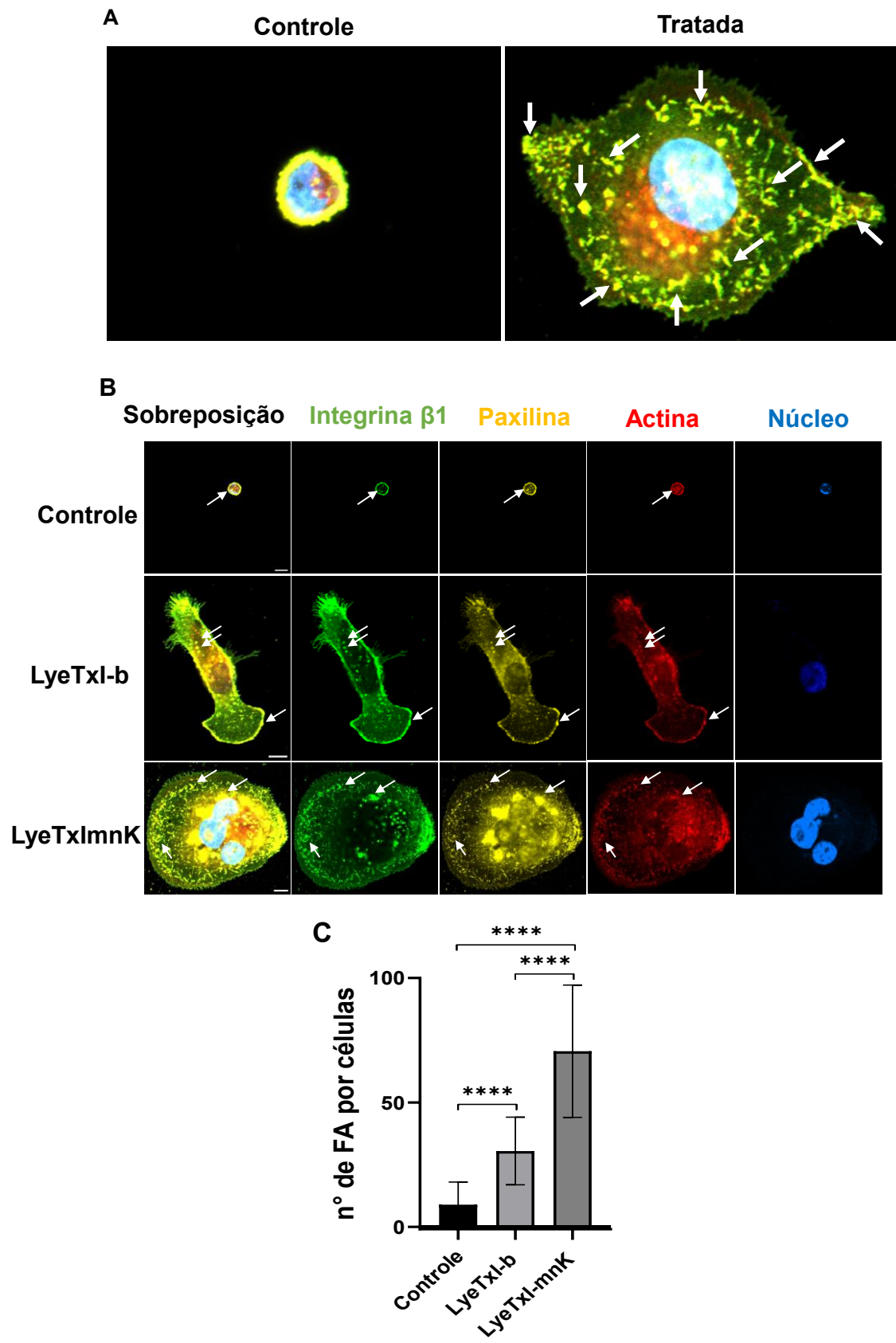


Figura 10. Aumento na formação de complexos de adesão focal em células MDA-MB-231 após tratamento com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxI-mnK. Foram plaqueadas 3.000 células por poço em lâminas revestidas com fibronectina (2 µg/mL). **(A)** Imagens ampliadas de uma célula não tratada e uma tratada para exemplificar e destacar os complexos de adesão focal (FA, do inglês *Focal Adhesions*) que foram analisados e contados. As setas brancas indicam algumas regiões de sobreposição entre integrina β1 (verde), paxilina (amarelo) e actina (vermelho), evidenciando a formação de complexos de adesão focal. **(B)** Imunofluorescência de MDA-MB-231 com marcação de integrina β1 (verde), paxilina (amarelo), actina (vermelho), tratadas com LyeTxI-b (0,5 µM) e LyeTxImnK (12,5 µM). Os núcleos foram marcados com de Hoechst 3342 (5 µg/mL). **(C)** Número de FAs por célula. O gráfico de barras ilustra o número médio de complexos de adesão focal por célula, células não tratadas (Controle), células tratadas com o peptídeo LyeTxI-b e células tratadas com o peptídeo LyeTxI-mnK. Os resultados mostram um aumento estatisticamente significativo na formação de complexos de adesão focal em ambos os grupos tratados com peptídeos, em comparação com o grupo controle. O peptídeo LyeTxI-mnK demonstrou o efeito mais pronunciado, resultando em um número médio substancialmente maior de FAs por célula (71 ± 27). Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). Os asteriscos (****) indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Barra de escala: 50 µm.

4.5 Efeito dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK na morfologia de células MDA-MB-231

Os resultados do ensaio de adesão e de imunofluorescência evidenciaram mudanças na morfologia das células MDA-MB-231 quando tratadas com os peptídeos. Considerando que a morfologia celular está associada ao seu fenótipo, podendo indicar maior invasividade ou não, quantificou-se os diferentes aspectos morfológicos para elucidar as alterações causadas pelos peptídeos nas células MDA-MB-231 aderidas em fibronectina, substrato da MEC que apresenta maior afinidade. Os parâmetros analisados foram: área (μm^2) e perímetro (μm) que indicam o espalhamento e tamanho das células. Analisou-se também a circularidade, índice de alongamento e arredondamento que indicam se a célula é arredondada, alongada e irregular. Assim os parâmetros avaliados foram: próximo de 1 = círculo perfeito e quanto menor o valor, mais alongada é a célula; solidez, indica o quão preenchida e irregular é a célula - próximo de 1 = célula sem protusões.

A análise dos aspectos morfométricos em células MDA-MB-231 mostrou diferenças marcantes entre o grupo controle e os grupos tratados com peptídeos (**Figura 11**). As células controle apresentaram projeções reduzidas, com morfologia predominantemente arredondada, como evidenciado pelos valores mais elevados de circularidade e arredondamento, além de índices de alongamento próximos de 1. Em contraste, o tratamento com peptídeos promoveu um aumento significativo da área e do perímetro celulares, compatível com maior espalhamento e adesão ao substrato (fibronectina). Nessas condições, observou-se redução dos índices de circularidade e arredondamento, refletindo um fenótipo mais alongado e irregular, enquanto a diminuição da solidez sugeriu a presença de protusões de membrana. Os valores elevados do índice de alongamento nas células tratadas corroboraram sua morfologia mais alongada. Em conjunto, esses achados indicam que a exposição aos peptídeos favorece maior adesão e espalhamento das células MDA-MB-231, promovendo a transição de um fenótipo compacto e arredondado para uma conformação mais alongada e irregular com a presença de projeções.

Figura 11. Alterações morfológicas em células MDA-MB-231 após tratamento com peptídeos. Células foram cultivadas na ausência (controle) ou presença de LyeTxI-b (0,5 μM) e LyeTxImnK (12,5 μM), fixadas e coradas para análise morfométrica. **(A)** Imagens ampliadas em aumento de 40x ilustrando a morfologia celular após os tratamentos, destacando o fenótipo mais espalhado, alongado e irregular induzido pelos peptídeos em comparação ao controle (barra de escala = 50 μm). **(B)** Imagens representativas em aumento de 10x evidenciam diferenças fenotípicas entre os grupos (barra de escala = 100 μm). **(C)** Análise quantitativa de parâmetros morfológicos realizada no ImageJ a partir de imagens binarizadas, incluindo área, perímetro, índice de alongamento, circularidade, arredondamento e solidez. Foram analisadas >100 células por grupo. Os dados estão representados como boxplots (mínimo–máximo, linha central = mediana). Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA unilateral. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; *p < 0,01.

4.6 Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na migração celular em modelos 2D (*wound healing*)

A migração celular é um processo fundamental na progressão do câncer, permitindo que as células tumorais deixem o sítio primário e estabeleçam metástase em órgãos distantes. Esse é um processo complexo que envolve interação com a matriz extracelular e diferentes dinâmicas do citoesqueleto. Portanto, baseado em nossos resultados de aumento de adesão e formação de complexos de adesão focal, objetivamos investigar a ação dos peptídeos na migração das células MDA-MB-231 e MCF-7. Para isso, selecionamos o peptídeo sintético LyeTxI-b, pelos resultados prévios *in vivo*, e os peptídeos minimizados LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK, pelos resultados expressivos no aumento da adesão celular.

A análise da migração celular em 24 horas mostrou que nas células MDA-MB-231, o peptídeo LyeTxI-b reduziu significativamente a migração celular, evidenciada pela maior área da ferida em relação ao controle (**Figura 12.1**), resultado confirmado pelo gráfico correspondente, com diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). Já os peptídeos minimizados não exerceram efeito relevante sobre a migração dessa linhagem.

Em contrapartida, as células MCF-7 não apresentaram migração no grupo controle, de modo que não foram observadas diferenças significativas na área da ferida entre os grupos experimentais (**Figura 12.2**). Esse resultado é consistente com o fenótipo menos invasivo característico dessa linhagem.

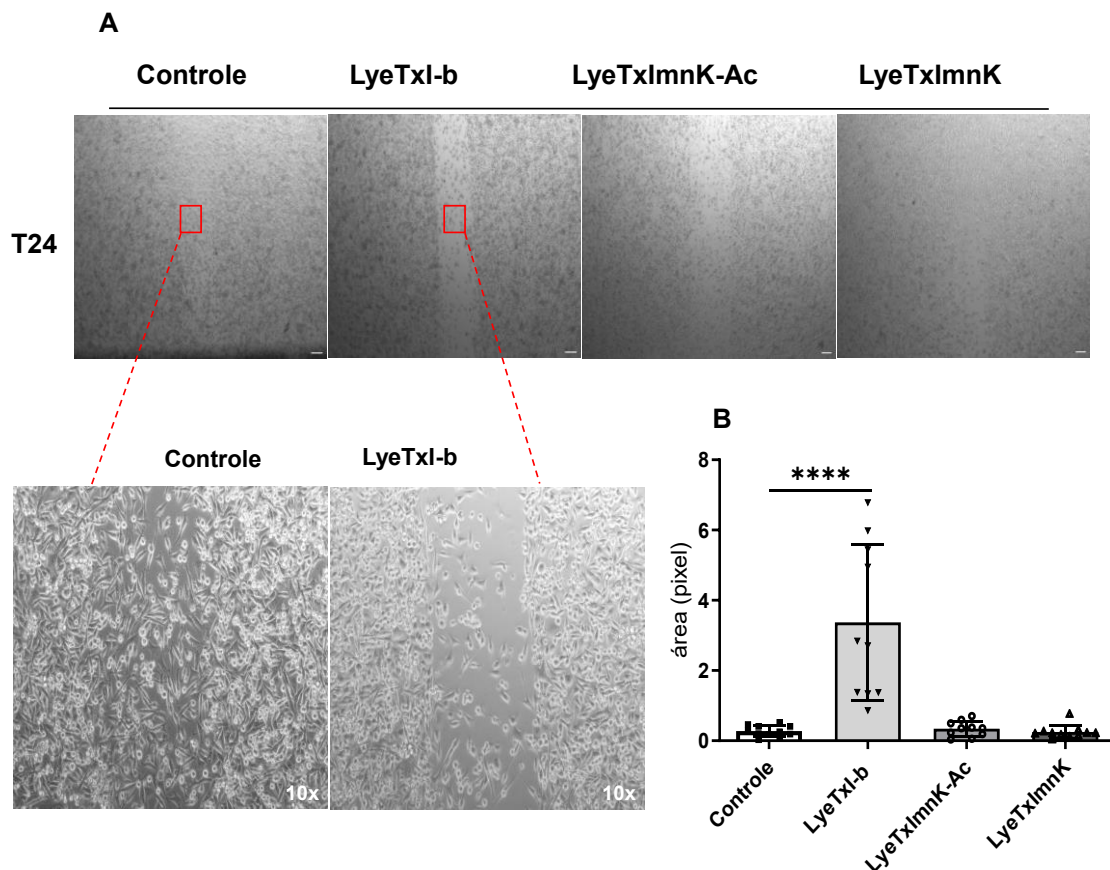


Figura 12.1. Ensaio de migração celular 2D (wound healing) em células MDA-MB-231 após 24 h de tratamento com os LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. As células foram cultivadas em *Culture-Inserts* de dois poços (Ibidi) posicionados em placas de 24 poços, semeadas a uma densidade de 50.000 células por câmara em 70 μ L de meio DMEM (10% de SFB) e incubadas overnight para formação de uma monocamada confluenta. Após a remoção dos inserts e lavagem com PBS, adicionou-se 400 μ L de DMEM sem SFB contendo os peptídeos na concentração de 1/8 da CI_{50} previamente determinada, sendo para LyeTxI-b 0,5 μ M e 12,5 μ M para LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. A migração foi monitorada ao final de 24 h por microscopia de contraste de fase (**A**). O gráfico (**B**) apresenta a análise quantitativa da área remanescente da “ferida” (em pixels), obtida por meio do software ImageJ. O peptídeo LyeTxI-b foi capaz de reduzir a migração significativamente em relação ao controle. Os dados representam média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional. Os asteriscos (****) indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Barra de escala: 100 μ m.

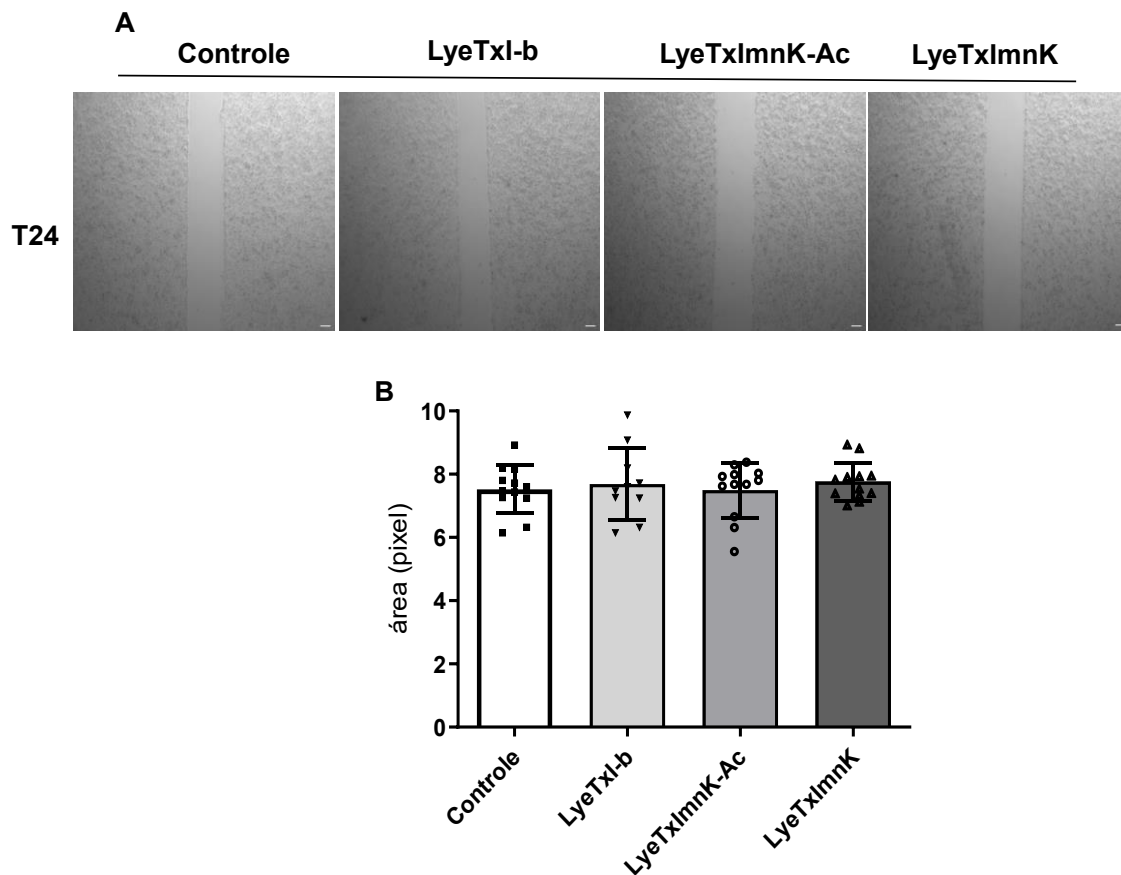


Figura 12.2. Ensaio de migração celular 2D (wound healing) em células MCF-7 após 24 h de tratamento com os LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. As células foram cultivadas em *Culture-Inserts* de dois poços (Ibidi) posicionados em placas de 24 poços, semeadas a uma densidade de 50.000 células por câmara em 70 μ L de meio DMEM (10% de SFB) e incubadas overnight para formação de uma monocamada confluenta. Após a remoção dos inserts e lavagem com PBS, adicionou-se 400 μ L de DMEM sem SFB contendo os peptídeos na concentração de 1/8 da CI_{50} previamente determinada, sendo para LyeTxI-b 0,4 μ M e 2,0 μ M para LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. **(A)** A migração foi monitorada ao final de 24 h por microscopia de contraste de fase. O gráfico **(B)** apresenta a análise quantitativa da área remanescente da “ferida” (em pixels), obtida por meio do software ImageJ. Não houve diferença entre o controle e os tratados. Os dados representam média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, considerando-se $p < 0,05$ como significativo. Barra de escala: 100 μ m.

4.7 Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na invasão de esferóides de MDA-MB-231 e MCF-7 em géis de colágeno tipo I (3D)

A invasividade local das células tumorais é considerada um passo inicial no complexo processo de metástase. Um modelo de cultura tridimensional (3D) de esferóides foi utilizado para determinar o efeito dos peptídeos na invasão tumoral em gel de colágeno. Para isso, selecionamos o peptídeo sintético LyeTxI-b, pelos resultados prévios *in vivo*, e os peptídeos minimizados LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK, pelos resultados expressivos no aumento da adesão celular.

Os resultados mostraram que células MDA-MB-231, quando cultivadas em sistema 3D imersas em colágeno tipo I apresentaram um esferoide de morfologia uniforme, arredondado e de contornos bem definidos. Após serem inseridos na matriz de colágeno tipo I por três dias (72h), as células MDA-MB-231 começaram a invadir a matriz circundante, em um padrão característico de “explosão estelar” (**Figura 13.1**). No entanto, essas protrusões invasivas foram reduzidas na presença dos três peptídeos testados. A área de invasão, calculada pelo *software* ImageJ, mostrou destaque para os peptídeos minimizados (LyetxImnK-Ac e LyetxImnK), que inibiram significativamente a capacidade invasiva dos esferóides MDA-MB-231, quando comparados ao LyetxI-b. Esse efeito também foi observado para a linhagem MCF-7 (**Figura 13.2**). Contudo, para essa linhagem, o espalhamento das células MCF-7 para a matriz circulante apresentou um padrão semelhante a uma “nuvem de células”, característico das células MCF-7, que apresentam um fenótipo menos invasivo em relação à MDA-MB-231

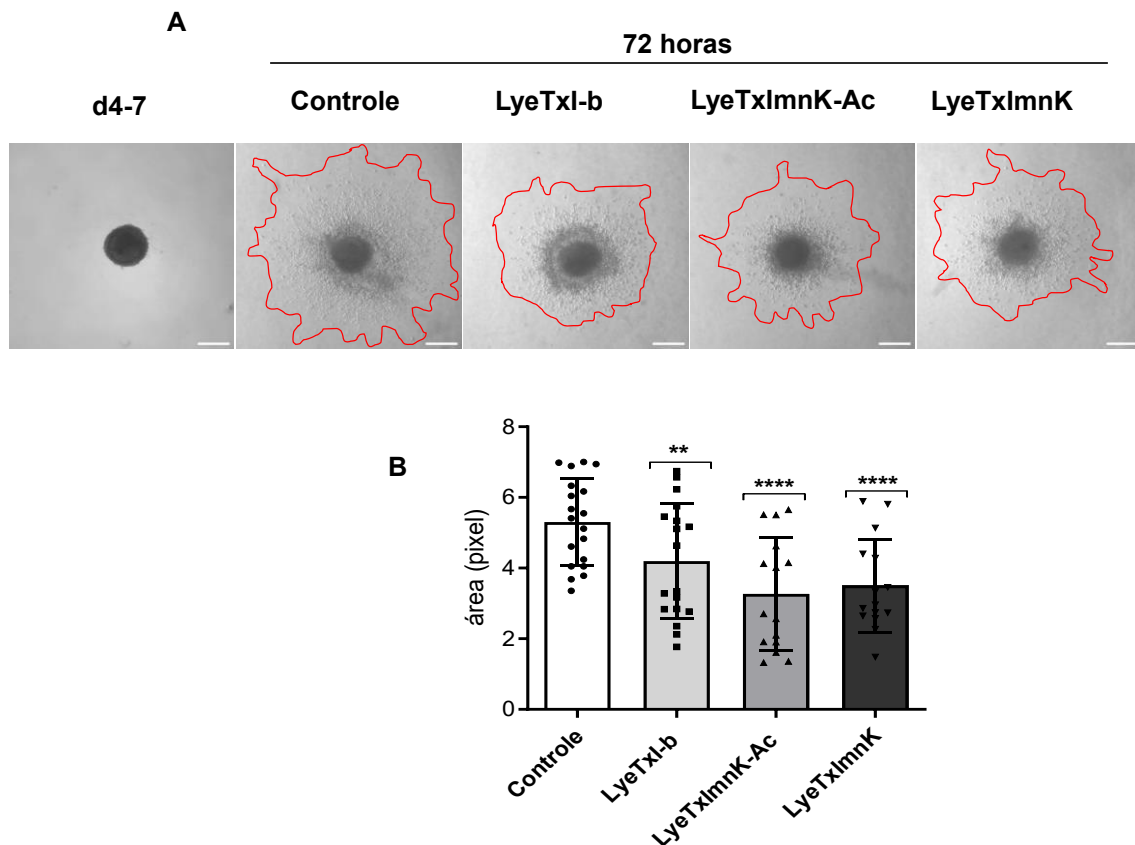


Figura 13.1. Os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK reduzem a invasão de esferoides de células MDA-MB-231 em gel de colágeno tipo I. As células MDA-MB-231 contendo 10 µg/mL de colágeno do tipo I (5.000 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços de baixa adesão, centrifugadas a 300 g por 3 min a 4 °C e incubadas por 4–7 dias para formação de esferoides. Após esse período, foi adicionado colágeno tipo I (1 mg/mL), seguido de incubação por 1 h a 37 °C para polimerização do gel. Os esferoides foram então tratados com os peptídeos na concentração correspondente a 1/8 da IC₅₀ previamente determinada e incubados por 72 h, sendo para LyeTxI-b 0,5µM e 12,5µM para LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. **(A)** As imagens foram adquiridas ao final do tratamento utilizando microscópio invertido AxioVert (Zeiss). **(B)** A área de invasão celular foi quantificada com o software Fiji/ImageJ. Observa-se que todos os peptídeos reduziram de forma significativa a invasão celular em matriz de colágeno tipo I em comparação ao controle, com destaque para os peptídeos minimizados. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi conduzida por ANOVA unidirecional, comparando-se cada condição tratada ao controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****). Barra de escala: 100 µm

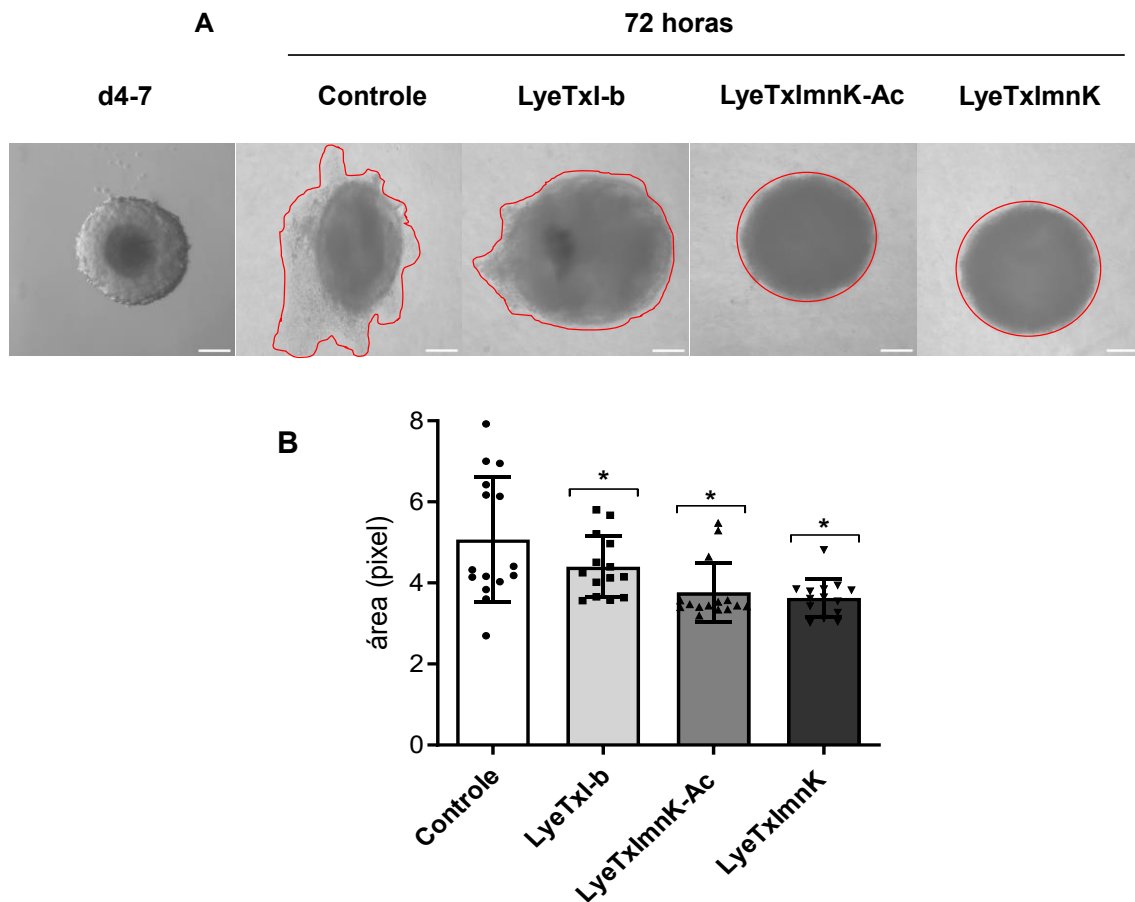


Figura 13.2. Os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK reduziram a invasão de esferoides de células MCF-7 em gel de colágeno tipo I. Células MCF-7 (2.000 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços de baixa adesão, centrifugadas a 300 g por 3 min a 4 °C e incubadas por 4–7 dias para formação de esferoides. Após esse período, foi adicionado colágeno tipo I (1 mg/mL), seguido de incubação por 1 h a 37 °C para polimerização do gel. Os esferoides foram então tratados com os peptídeos na concentração correspondente a 1/8 da IC₅₀ previamente determinada e incubados por 72 h, sendo para LyeTxI-b 0,4µM e 2,0µM para LyeTxImnK-Ac e LyeTximnK. **(A)** As imagens foram adquiridas ao final do tratamento utilizando microscópio invertido AxioVert (Zeiss). **(B)** A área de invasão celular foi quantificada com o software Fiji/ImageJ. Observa-se que todos os peptídeos reduziram de forma significativa a invasão celular em matriz de colágeno tipo I em comparação ao controle. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A análise estatística foi conduzida por ANOVA unidirecional, comparando-se cada condição tratada ao controle celular sem tratamento (CC). Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas como $p < 0,05$ (*). Barra de escala: 100 µm.

4.8 Efeito dos peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK na secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs)

A capacidade de degradar a matriz extracelular é fundamental para células cancerígenas se moverem e invadirem novos tecidos. Essa degradação é mediada por enzimas conhecidas como MMPs, cuja secreção elevada é um marcador de malignidade. Nossos resultados mostraram uma notável redução da invasão celular em géis de colágeno, o que sugere que o tratamento com os peptídeos causou um comportamento menos agressivo das células. Por isso, a próxima etapa foi determinar se essa diminuição da invasão estava diretamente ligada a uma menor secreção de MMPs.

A zimografia de gelatina identifica a atividade gelatinolítica em amostras biológicas utilizando géis de poli(acrilamida) impregnados (copolimerizados) com gelatina. Para manter a atividade enzimática, as amostras são eletroforeseadas sob condições não redutoras. Após a remoção do SDS do gel com Triton X-100 e incubação em um tampão contendo cálcio, as enzimas parcialmente renaturadas podem degradar a gelatina, deixando uma zona clareada que pode ser detectada após a coloração do gel. As imagens foram obtidas usando ImageQuant LAS 4000 (GE) e analisadas utilizando o *software* ImageJ. Os resultados obtidos representam a média da área sob a curva das bandas correspondentes às MMPs (pró MMP-9: 92 KDa e MMP-9 ativa: 84 KDa; pró MMP-2: 72 KDa).

A zimografia de gelatina mostrou que os três peptídeos foram capazes de suprimir de forma significativa a secreção de MMP-9 ativa (MMP9*), enquanto a forma pró-MMP-9 foi reduzida significativamente apenas pelo LyeTxI-b e o peptídeo LyeTxImnK foi capaz de reduzir a secreção de MMP-2 (**Figura 14.1**). Para as células MCF-7, as gelatinases MMP2 e MMP-9 ativa foram significativamente suprimidas na presença dos três peptídeos testados, enquanto a forma pró MMP-9 foi suprimida pelos dois peptídeos minimizados (**Figura 14.2**).

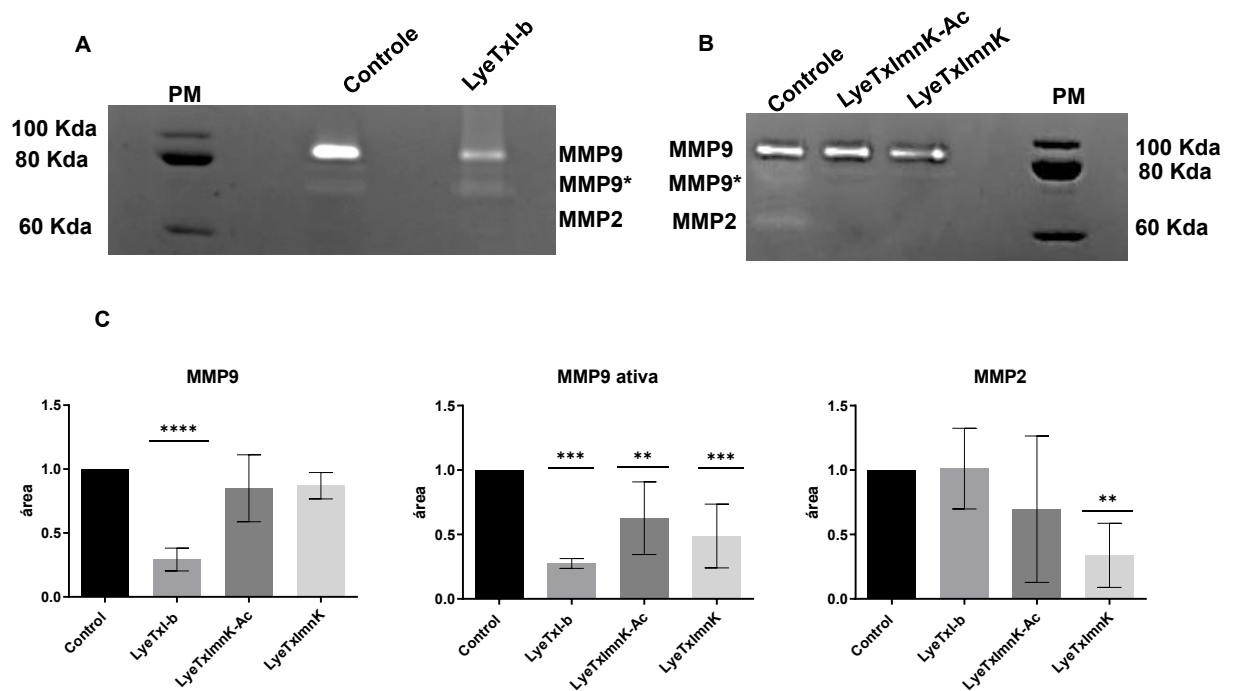


Figura 14.1. Os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-AC e LyeTxImnK suprimiram a secreção de metaloproteínas de matriz em células MDA-MB-231: zimograma para detecção de MMP-2 (72 KDa), MMP-9 (92 KDa) e MMP-9 ativa (84 KDa) utilizando meios condicionados de células cultivadas na ausência de soro por 24 horas, com ou sem tratamento com os peptídeos, sendo LyeTxI-b 0,5 μ M e 12,5 μ M para LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK. **(A)** e **(B)** A atividade gelatinolítica foi avaliada após 24 horas de incubação a 37°C em géis de eletroforese SDS-PAGE 10% copolimerizado com gelatina. **(C)** Quantificação das bandas com coloração negativa (Azul de Coomassie R-250) que correspondem às regiões onde a gelatina foi clivada pelas MMPs, as imagens foram obtidas usando ImageQuant LAS 4000 (GE) e análise foi realizada no *software* ImageJ. Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (Controle). As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

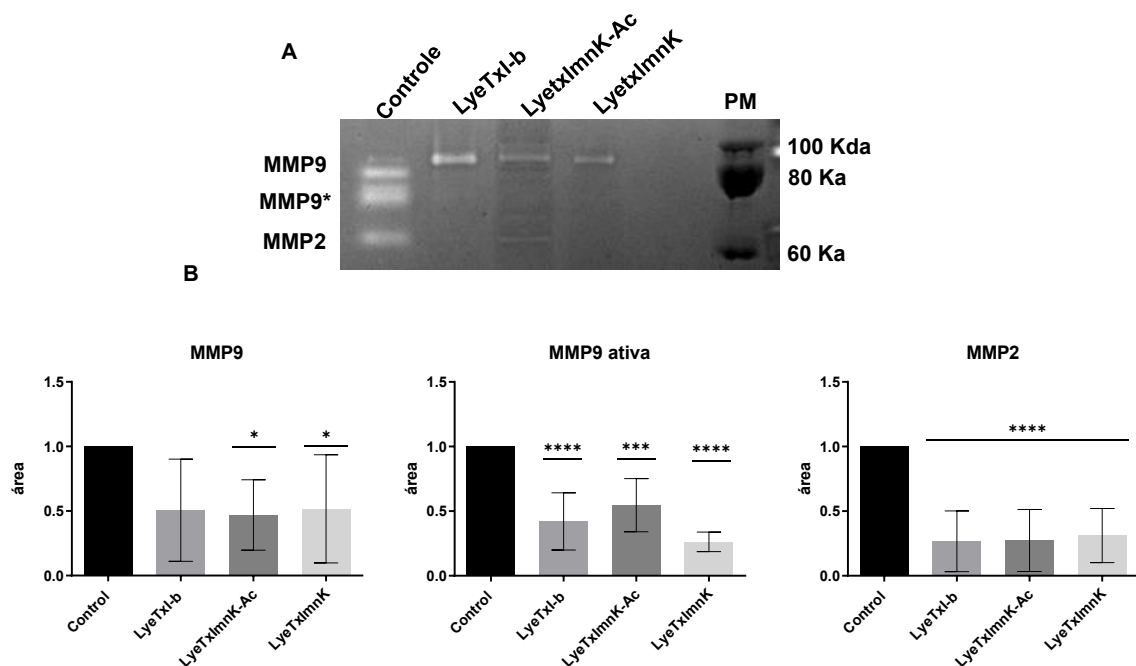


Figura 14.2. Os peptídeos LyeTxl-b, LyeTxlmnK-AC e LyeTxlmnK suprimiram a secreção de metaloproteinasas de matriz em células MCF-7: zimograma para detecção de MMP-2 (72 KDa), MMP-9 (92 KDa) e MMP-9 ativa (84 KDa) utilizando meios condicionados de células cultivadas na ausência de soro por 24 horas, com ou sem tratamento com os peptídeos, sendo LyeTxl-b 0,4 μ M e 2 μ M para LyeTxlmnK-AC e LyeTxlmnK. **(A)** A atividade gelatinolítica foi avaliada após 24 horas de incubação a 37°C em géis de eletroforese SDS-PAGE 10% copolimerizado com gelatina. **(B)** Quantificação das bandas com coloração negativa (Azul de Coomassie R-250) que correspondem às regiões onde a gelatina foi clivada pelas MMPs, as imagens foram obtidas usando ImageQuant LAS 4000 (GE) e análise foi realizada no *software* ImageJ. Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional, para comparar as médias de cada grupo tratado com o controle celular sem tratamento (CC). As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

4.9 Análise *in silico* da interação dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxmnK com subunidade β da integrina β 1

A interação entre os domínios transmembrana das subunidades α e β da integrina é um fator chave na regulação de sua ativação. O domínio transmembrana da integrina apresenta uma sequência de aminoácidos conservada que contém padrões específicos. A subunidade α contém um motivo de aminoácidos A-x3-G-x3-L que interage com o motivo V-x3-I-x3-G na subunidade β (Berger *et al.*, 2009). Essa interação heterodimérica estabiliza a conformação inativa e de baixa afinidade à matriz extracelular da integrina. Quando a interação entre esses dois domínios transmembrana, α e β , é desfeita, a integrina fica ativa e tem sua adesão à matriz extracelular ativada. Dentre as proteínas que ativam a integrina está a talina que, ao se ligar ao domínio citoplasmático da subunidade β , leva à ativação da integrina, por separar os domínios α e β , conforme demonstrado na Figura abaixo (**Figura 15**).

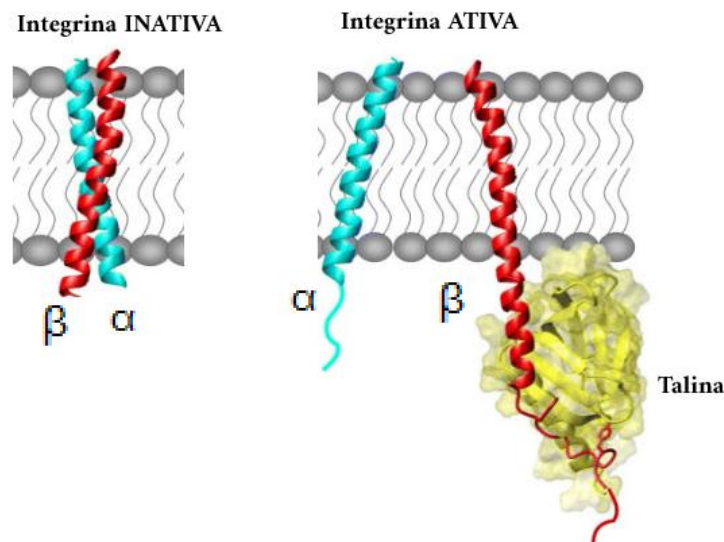


Figura 15. Ativação da integrina pela ligação da talina à subunidade β e separação das subunidades α e β da integrina (Modificado de Wegener; Campbell, 2008).

Ao observar o padrão de aminoácidos que permite a interação entre os aminoácidos da subunidade α (A-x3-G-x3-L) e os da subunidade β (V-x3-I-x3-G), ilustrado na Figura abaixo (**Figura 16**), percebemos que os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxlmnK possuem um padrão de aminoácidos semelhante ao da subunidade alfa, conforme mostrado na **Tabela 3**.

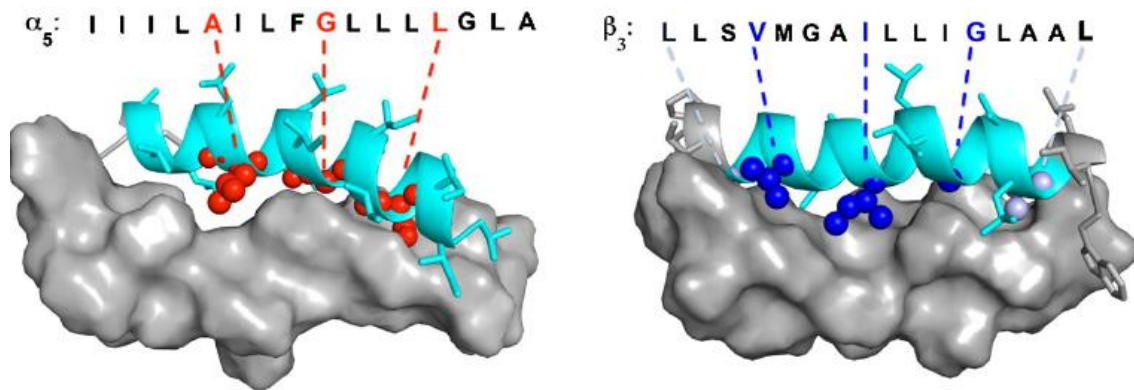


Figura 16: Padrão de aminoácidos da subunidade α (A-x3-G-x3-L) e da subunidade β (V-x3-l-x3-G) e a interação entre os domínios transmembranara α e β da integrina (Modificado de Berger *et al.*, 2009).

Tabela 3. Comparação entre o padrão de aminoácidos da subunidade α da integrina com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxmnK.

α_5 :	IIILAILFGLLLLGLA
LyeTxI-b:	IWLTAALKFLGKNLGKLAQQLAKL
LyeTxImnK:	IWLTKALKFLGKNLGK

*Os aminoácidos marcados em vermelho constituem o padrão de interação com a subunidade β da integrina.

Diante dessa semelhança no padrão de aminoácidos, foi realizada a análise *in silico* da possível interação entre os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK e a subunidade β da integrina. A hipótese é que os peptídeos se liguem à subunidade β das integrinas após sua ativação, como mostrado na **Figura 15**. A ligação do peptídeo à integrina ativada impede que a subunidade α da integrina volte a interagir com sua subunidade β , impedindo, dessa forma a inativação da integrina. Em suma, os peptídeos mantêm as integrinas ativadas por mais tempo, aumentando sua adesão à matriz extracelular.

Para a análise da interação dos peptídeos com a subunidade β_1 da integrina, foi utilizado o programa Chimerax (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>). Inicialmente, foi realizada a predição da estrutura secundária da sequência dos peptídeos e da sequência do domínio transmembrana da subunidade β_1 (IIPIVAGVVAGIVLIGLALLLIW). Em seguida a melhor posição de interação entre as estruturas secundárias (alfa hélices) de cada peptídeo foi definida pelo programa, que gerou a imagem com a predição de interação.

Os resultados apresentados demonstram que, tanto o peptídeo LyeTxI-b (**Figura 17.1**) quanto o peptídeo LyeTxImnK (não-acetilado) (**Figura 17.2**) são capazes de interagir com o domínio transmembrana da subunidade $\beta 1$ da integrina, o que impede que essa subunidade interaja como domínio transmembrana da subunidade α , mantendo a integrina em sua conformação ativa, e então, promove maior adesão aos componentes da matriz extracelular. A interação do peptídeo minimizado LyeTxImnK é mais estável que a do peptídeo LyeTxI-b, o que pode explicar os efeitos diferenciados observados para este peptídeo em promover maior adesão celular à substratos da MEC, assim como a maior formação de FA.

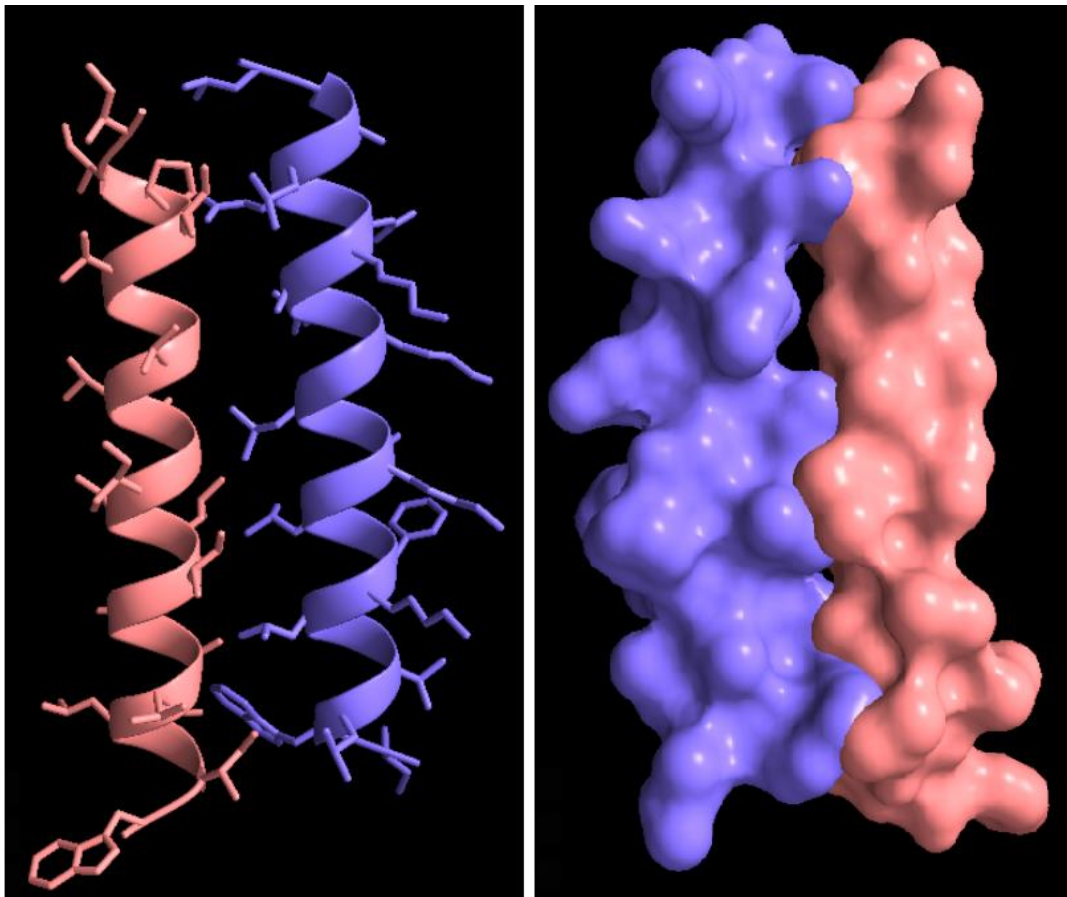


Figura 17.1. Representação estrutural da interação entre o peptídeo sintético LyeTxI-b (sequência: *IWL**T**AL**K**FL**G**KN**L**GKLAKQQLAKL*, em rosa) e o domínio transmembrana da integrina $\beta 1$ (sequência: *I**P**IVAGVVAGI**V**LIGLALLLI**W***, em roxo). A modelagem evidencia o acoplamento entre resíduos das duas cadeias, sugerindo possível interface de interação estável. Imagem gerada no software ChimeraX (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>).

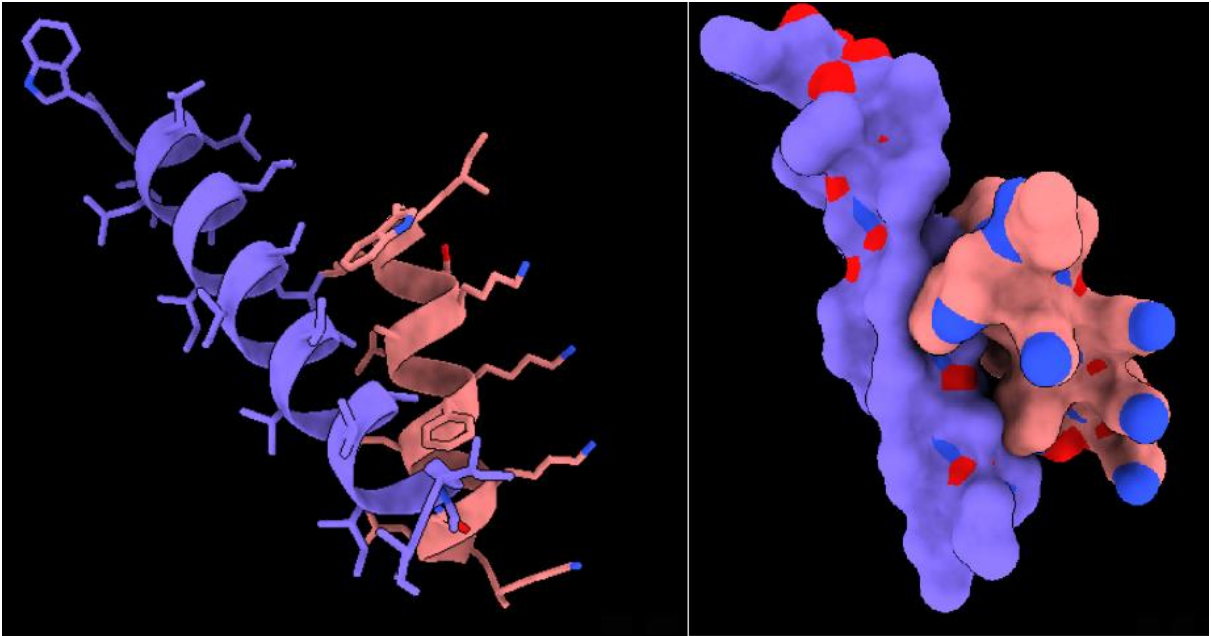


Figura 17.2. Representação estrutural da interação entre o peptídeo sintético LyeTxImnK (sequência: *IWLTKALKFLGKNLGK*, em rosa) e o domínio transmembrana da integrina $\beta 1$ (sequência: *IPIVAGVVAGIVLIGLALLLIW*, em roxo). A modelagem evidencia o acoplamento entre resíduos das duas cadeias, sugerindo possível interface de interação estável. Imagem gerada no software ChimeraX (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>).

Resumo Dos Resultados

Os dados mostraram que os peptídeos LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK apresentam maior afinidade por membranas aniônicas, como as tumorais, promovendo perturbações estruturais distintas. Enquanto o peptídeo sintético LyeTxI-b forma poros estáveis na membrana, os derivados minimizados atuam de forma semelhante a detergentes, causando perda acentuada de lipídeos. Além disso, as interações dos peptídeos não se restringem aos componentes lipídicos da membrana citoplasmática, uma vez que as análises *in silico* sugerem interação direta com integrinas, proteínas essenciais nos processos de adesão celular.

Os peptídeos modulam a adesão celular, aumentando a interação da MDA-MB-231 e MCF-7 com dois componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina) e promovendo maior formação de complexos de adesão focal em células MDA-MB-231. Além do aumento da adesão, os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK também causaram mudanças na morfologia de células MDA-MB-231, aumentaram a área, perímetro e alongamento dessas células e reduziram a circularidade e o arredondamento, aspectos característicos de um fenótipo mais aderente e, conseqüentemente, de motilidade reduzida.

Adicionalmente, LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK inibiram a migração 2D e a invasão 3D em géis de colágeno tipo I, além de reduzirem a secreção das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, enzimas-chave no processo metastático. Em conjunto, esses achados indicam o potencial desses peptídeos na redução da metástase em câncer de mama triplo-negativo, uma vez que os efeitos mais expressivos foram observados na linhagem MDA-MB-231 (**Figura 18**).

Embora os dados *in vivo* já publicados para o LyeTxI-b e os resultados *in vitro* aqui apresentados para LyeTxI-b, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK sejam promissores, estudos adicionais na cascata de sinalização envolvendo os fenômenos aqui descritos, bem como estudos em modelos animais de câncer de mama triplo-negativo são necessários para confirmar se esses efeitos se traduzem em inibição da metástase *in vivo*, por exemplo, por meio de modelos ortotópicos de câncer de mama ou ensaios de metástase experimental.

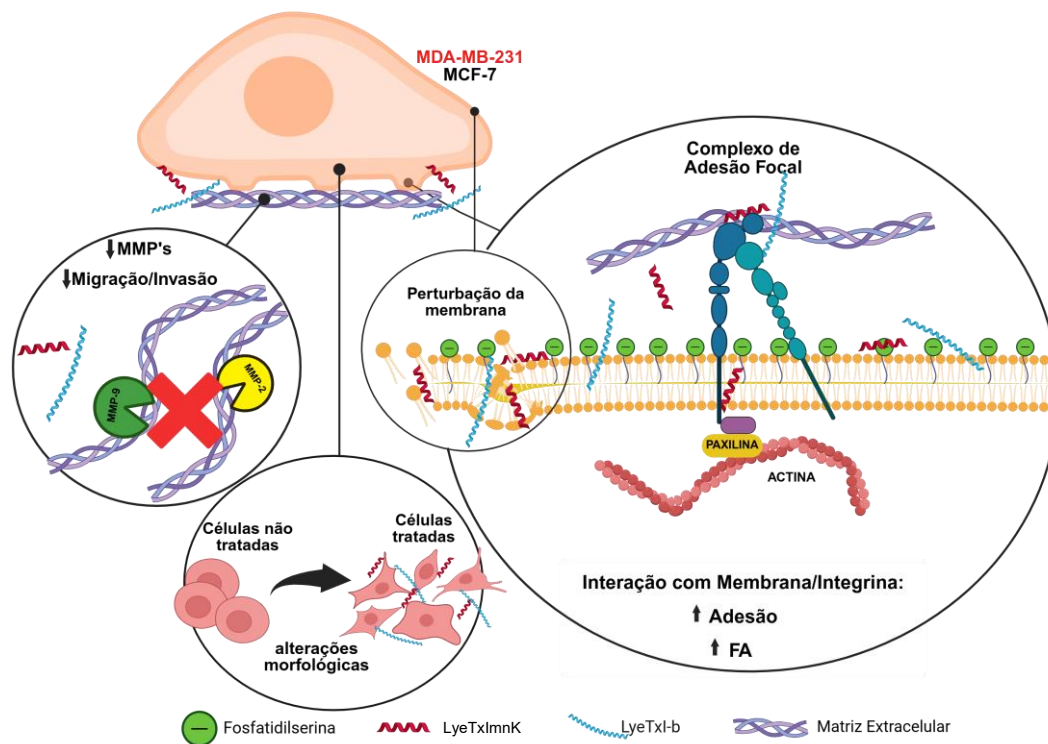


Figura 18. Resumo dos resultados. Os peptídeos derivados da toxina LyeTxI interagem preferencialmente com membranas aniônicas, como as de células tumorais observado pelos ensaios de QCM-D, causando perturbação na bicamada lipídica e modulando processos-chave associados à progressão tumoral. Essa interação diminui a secreção de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), evidenciado pela zimografia, reduzindo a degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, a invasão celular em ambiente 3D com géis de colágeno. Paralelamente, a ligação dos peptídeos à membrana e às integrinas promove aumento da adesão celular e da formação de complexos de adesão focal (FA) em MDA-MB-231, reduzindo a migração 2D (*wound healing*) e induzindo alterações morfológicas compatíveis com maior ancoragem. Em conjunto, esses resultados indicam que os peptídeos estudados exercem efeito antimetastático em concentrações subcitotóxicas, principalmente na linhagem triplo-negativa MDA-MB-231.

5. DISCUSSÃO

Com base nas propriedades estruturais e funcionais dos peptídeos antimicrobianos derivados da toxina LyeTx1 e seus efeitos promissores observados previamente em modelos tumorais, torna-se fundamental investigar os mecanismos celulares relacionados à sua atividade antimetastática. Neste contexto, diferentes abordagens experimentais foram adotadas para elucidar esses mecanismos em nosso trabalho.

As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 representam dois modelos clássicos e contrastantes de câncer de mama: a primeira com perfil luminal e baixa agressividade, e a segunda com fenótipo triplo-negativo altamente invasivo e metastático. As células MDA-MB-231 não expressam E-caderina e, portanto, possuem adesão célula-célula fraca, apresentando um fenótipo muito invasivo e metastático. A MCF-7 expressa E-caderina e apresenta adesão célula-célula, o que explica sua tendência a formar aglomerados celulares, sendo menos invasiva e metastática (Mohammed *et al.*, 2021). Além disso, maiores quantidades de PS foram observadas para MDA-MB-231 quando comparadas com MCF-7. A comparação entre essas duas linhagens permite compreender a seletividade e especificidade dos efeitos dos peptídeos (Klaiss-Luna *et al.*, 2023).

Modelos tridimensionais (3D), como esferoides celulares em matriz de colágeno tipo I, foram incluídos para mimetizar com mais fidelidade a complexidade do microambiente tumoral, superando as limitações dos modelos bidimensionais (2D) tradicionais. A análise da migração e invasão celular nesses modelos permite uma avaliação mais robusta da capacidade dos peptídeos de interferirem nos processos envolvidos na metástase (Barbosa *et al.*, 2021).

Além disso, a adesão das células tumorais à matriz extracelular e a formação de complexos de adesão focal são processos cruciais para a migração e invasão. Por isso, ensaios de imunofluorescência com marcação de proteínas como paxilina, actina e integrina $\beta 1$ foram empregados para caracterizar o efeito dos peptídeos sobre a dinâmica do citoesqueleto e adesão celular (Alharbi; Al-Fahad; Dash, 2021).

Por fim, a utilização da técnica de QCM-D representa uma abordagem inovadora e sensível para estudar, em tempo real, a interação dos peptídeos com

modelos de membranas lipídicas tumorais e não tumorais, fornecendo dados biofísicos complementares aos efeitos celulares observados (McCubbin *et al.*, 2011).

O uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs) na terapia anticâncer, tanto isoladamente quanto em combinação com fármacos convencionais, tem sido amplamente investigado devido à sua alta seletividade por células tumorais em comparação às células normais. A seletividade dos AMPs por células tumorais se deve às suas características estruturais: eles têm carga líquida positiva em pHs de 1 a 11 (Manrique-Moreno *et al.*, 2021), são pequenos, formados por 5 a 50 resíduos de aminoácidos (10 kDa ou menos), e têm uma estrutura anfipática, com alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos (Aghamiri *et al.*, 2021). As membranas das células tumorais apresentam translocação da fosfatidilserina aniônica (PS) da camada citoplasmática para a exoplasmática, o que faz com que as células tumorais tenham carga líquida negativa. Os aminoácidos de AMPs carregados positivamente interagem eletrostaticamente com lipídios carregados negativamente (PS), bem como com moléculas carregadas negativamente (gangliosídeos sialilados, mucinas O-glicosiladas e sulfatos de heparina) presentes nas membranas de células tumorais (Klaiss-Luna *et al.*, 2023).

Essa seletividade, aliada à crescente demanda por novas abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras, justifica o interesse por esses compostos no contexto do tratamento do câncer, uma das principais causas de mortalidade no mundo (Gaspar; Veiga; Castanho, 2013; Guo *et al.*, 2024).

A Tabela I apresenta os valores de IC_{50} obtidos para os seis peptídeos testados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (triplo-negativa). De modo geral, observou-se que ambas as linhagens são suscetíveis à ação citotóxica dos peptídeos, porém a sensibilidade apresentada se difere entre elas. As células MCF-7 foram mais sensíveis tanto à toxina original (LyeTxI) e seus análogos (LyeTxI-b e LyeTxI-Ac), quanto aos peptídeos minimizados (LyeTxImnK, LyeTxImnK-Ac e LyeTxImn-Ac), quando comparadas às células MDA-MB-231. Os peptídeos minimizados apresentaram menor citotoxicidade, provavelmente devido a seu tamanho reduzido, que diminui sua capacidade de penetração, formação de poros ou destruição da membrana citoplasmática, comprometendo a ativação de vias de morte celular. Os efeitos de formação de poros dos AMPs são mais prováveis de ocorrer em peptídeos com mais

de 21 resíduos de aminoácidos, e isso pode estar relacionado à espessura da bicamada lipídica (Sani e Separovic, 2016). Dessa forma, as modificações estruturais devem ser criteriosamente revistas a fim de preservar a bioatividade da toxina original e evitar a perda de seu potencial citotóxico (Tolos *et al.*, 2024).

Os valores de IC_{50} encontrados neste estudo são semelhantes aos já publicados pelo grupo para o peptídeo LyeTxI-b. No trabalho de Avelar Júnior *et al.* (2022), o peptídeo LyeTxI-b apresentou valor de IC_{50} para MDA-MB-231 de 2,47 μ M, enquanto Abdel-Salam *et al.* (2021) testaram a citotoxicidade de LyeTxI-b em MDA-MB-231 e MCF-7, encontrando valores de IC_{50} de 5,77 μ M e 7,34 μ M, respectivamente.

Assim como nossos peptídeos, os quimioterápicos tradicionais também apresentam valores de IC_{50} que variam para as linhagens de câncer de mama. A doxorrubicina, por exemplo, apresenta IC_{50} entre 0,52 e 9,91 μ M para MCF-7 e entre 0,69 e 0,71 μ M para MDA-MB-231 (RAZAK *et al.*, 2019; WAN *et al.*, 2021). Abu *et al.* (2014) reportou que o tamoxifeno apresenta IC_{50} de 25,84 μ M para MDA-MB-231 e 24,76 μ M para MCF-7. Vale destacar que a toxina original (LyeTxI) e seus análogos, LyeTxI-Ac e LyeTxI-b, apresentaram valores de IC_{50} inferiores aos do tamoxifeno.

Outros AMPs derivados de veneno vêm sendo testados quanto ao seu potencial anticâncer. O Smp43, derivado do veneno de escorpião, apresentou IC_{50} de 6,94 μ M para MCF-7 e 25,30 μ M para MDA-MB-231 (Teleb *et al.*, 2023). Soares *et al.* (2022) avaliaram a atividade anticâncer do peptídeo Chartergellus-CP1, extraído do veneno da vespa *Chartergellus communis*, e encontraram IC_{50} de 44,17 μ M para MCF-7 e 44,83 μ M para MDA-MB-231. Dessa forma, a toxina original (LyeTxI) e seus análogos apresentaram maior eficácia contra as linhagens de câncer de mama em comparação a outros AMPs derivados de veneno descritos na literatura.

A presença ou ausência de receptores hormonais — especialmente receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) — influencia significativamente a forma como as células cancerígenas da mama MCF7 (ER/PR-positivas) e MDA-MB-231 (triplo-negativas) sofrem morte celular. As células MCF7, que expressam receptores hormonais, são geralmente mais sensíveis a terapias baseadas em hormônios e certos quimioterápicos, enquanto as células MDA-MB-231, que não possuem esses receptores, são mais resistentes e dependem de vias alternativas de morte celular. A

expressão de receptores hormonais nas células MCF7 aumenta sua sensibilidade à apoptose e às terapias baseadas em hormônios, enquanto a falta desses receptores nas células MDA-MB-231 leva a uma maior resistência e a uma preferência pela autofagia em vez da apoptose. Essa diferença fundamental molda sua resposta ao tratamento e aos mecanismos de morte celular (Arisan *et al.*, 2015; Scherbakov *et al.*, 2023). Porém, sob tratamento com peptídeos antimicrobianos, as células cancerígenas da mama MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam alterações moleculares muito semelhantes, caracterizadas principalmente por um aumento da apoptose e uma redução da proliferação, migração e invasão. A resposta envolve a regulação positiva de genes pró-apoptóticos e a regulação negativa de genes relacionados com a sobrevivência, proliferação e metástase em ambas as linhas celulares (Li *et al.*, 2018; Najm *et al.*, 2021).

Portanto, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 são suscetíveis e respondem bem e de forma semelhante a tratamentos com peptídeos antimicrobianos, visto que as vias de morte celular desencadeadas por AMPs não dependem da ligação direta dos peptídeos a algum receptor de membrana, como os receptores hormonais, mas sim da interação com a membrana celular, levando à sua desestabilização e formação de poros, além da indução de vias intracelulares de morte celular ao serem translocados para o interior das células.

Com o objetivo de elucidar a interação dos peptídeos com a membrana celular o ensaio de QCM-D foi realizado com membranas modelo de bicamadas lipídicas. Esse ensaio fornece informações em tempo real sobre como os peptídeos perturbam ou modificam as estruturas da membrana, passo crucial para entender seus mecanismos. O QCM-D rastreia tanto as mudanças de massa (mudanças de frequência Δf) quanto as propriedades viscoelásticas (mudanças de dissipação ΔD), permitindo uma análise detalhada das interações peptídeo-membrana, incluindo inserção de peptídeos, agregação e ruptura da membrana (Wang *et al.*, 2011; Ferhan *et al.*, 2016; Di Iorio *et al.*, 2020). Neste experimento, foram utilizadas bicamadas lipídicas neutras e negativamente carregadas (acrescidas de fosfatidilserina), com e sem colesterol (para modelos mais compatíveis com as membranas eucarióticas). As células cancerígenas da mama MDA-MB-231 e MCF-7 têm um teor de colesterol mais elevado na sua bicamada lipídica — especialmente nos *lipid rafts* — do que as células

mamárias normais, o que é uma característica geral das células tumorais em comparação com as células normais (Maja *et al.*, 2022; Gu *et al.*, 2024).

Todos os peptídeos interagem com os dois tipos de membranas modelo, porém, essa interação é mais forte com as membranas negativamente carregadas. Além disso, a dinâmica de interação com a bicamada lipídica entre os peptídeos minimizados e o peptídeo LyeTxI-b é diferente. A composição lipídica das membranas modelo afeta a ligação e a seletividade do AMP, a interação dos AMPs com membranas aniônicas é mais forte e resulta em maior desestabilização em comparação com membranas zwitteriônicas (neutras) (Gong *et al.*, 2019). Os peptídeos anfipáticos podem adsorver na bicamada lipídica e então, o QCM-D detecta essas mudanças como mudanças na massa e viscoelasticidade. O aumento da hidrofobicidade melhora a ligação do AMP e a ruptura da membrana, mas também pode aumentar a citotoxicidade, destacando a importância do design do peptídeo (Ferhan *et al.*, 2016; Gong *et al.*, 2019; Migón *et al.*, 2020).

A análise por QCM-D demonstrou comportamentos distintos entre os peptídeos testados em relação à interação com membranas lipídicas. O peptídeo LyeTxI-b apresentou maior afinidade por membranas aniônicas, com variações acentuadas de frequência (Δf) e dissipação (ΔD) durante a fase de adsorção, mantendo sinais estáveis após a etapa de lavagem. Esse perfil sugere forte interação eletrostática com a bicamada, promovendo a formação de poros organizados e estáveis do tipo toroidal ou de barril, com inserção persistente na membrana, no entanto, essa dinâmica só é visualizada quando utilizamos a concentração de Cl_{50} (4 μM), sugerindo que o efeito é concentração-dependente (Briand *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2024). Em baixas concentrações, os AMPs como a crisofina-3 apresentam interação mínima com a membrana modelo, indicado por mudanças insignificantes na frequência e dissipação do QCM-D. Em concentrações mais altas, mudanças negativas na frequência sugerem a inserção do peptídeo na membrana, enquanto concentrações muito altas levam à perda líquida de massa, provavelmente devido à formação de poros e à ruptura da membrana (Briand *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Por outro lado, os peptídeos minimizados mostraram sinais mais discretos durante a adsorção e rápida recuperação dos valores de Δf e ΔD após a lavagem, indicando interações transitórias e desorganização da bicamada lipídica ou até remoção de lipídios, o que é compatível com mecanismos de ação do tipo carpete (Briand *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2024).

Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Moreira Brito *et al.* (2022), que demonstraram, que LyeTxI-b possui afinidade significativamente maior por membranas com carga negativa em comparação à sua versão PEGilada. A elevada afinidade favorece interações duradouras e organizadas com a bicamada, sem induzir ruptura completa da membrana. Reis *et al.* (2021) também relataram que LyeTx I-b, exibe forte interação com vesículas compostas por POPG, formando poros com aumento de permeabilidade, porém sem causar destruição irreversível da estrutura lipídica. Esses dados reforçam a ideia de que LyeTxI-b forma poros de forma estruturada e controlada na membrana. Em contraste, os peptídeos minimizados, como discutido por Vieira *et al.* (2024) no caso do LyeTxImnK, podem ter atuação mais agressiva, com forte desestabilização da membrana e liberação de conteúdo celular. Isso condiz com os perfis obtidos no nosso trabalho, nos quais a instabilidade dos sinais após a lavagem sugere ação membranolítica rápida e não sustentada. Portanto, os dados de QCM-D, aliados à literatura, indicam que LyeTxI-b se liga de forma mais estável e seletiva às membranas, formando poros organizados, enquanto os peptídeos minimizados provocam perturbações mais disruptivas e menos controladas, refletindo diferentes mecanismos de ação sobre a bicamada lipídica.

Considerando os resultados prévios *in vivo* para o LyeTxI-b, que reduziu significativamente a metástase pulmonar após injeção intratumoral em camundongos (Abdel-Salam *et al.*, 2021), levantamos a hipótese de que esse peptídeo possa aumentar a adesão celular à MEC e, por consequência, reduzir a migração e a invasão celular — possíveis mecanismos envolvidos em sua atividade antimetastática (Abduljawad & Ahmed, 2019).

Testamos todos os derivados dos peptídeos (1 a 6) para investigar seus efeitos sobre a adesão celular. Nossos resultados mostram que a toxina nativa (LyeTxI), seu análogo acetilado (LyeTxI-Ac, peptídeo 5) e os peptídeos minimizados LyeTxI-mnK-Ac (3), LyeTxI-mnK (4) e LyeTxI-mn-Ac (6) foram capazes de aumentar a adesão celular ao colágeno, à fibronectina, de maneira dose-dependente, em todas as linhagens celulares testadas. Esse efeito é relevante pois, embora a adesão à MEC seja um requisito para a migração celular, o processo de migração só se completa com o desprendimento celular da matriz. Portanto, aumentar a adesão celular tende a dificultar a mobilidade e, por consequência, a capacidade metastática (Parsons, Horwitz & Schwartz, 2010).

Ao contrário de promover a adesão celular para reduzir a metástase, a literatura indica que AMPs atingem seus efeitos antimetastáticos principalmente interferindo ou suprimindo a adesão, a migração, a invasão e a transição endotélio-mesenquimal (TEM) ou extravasamento de células cancerígenas, além de exercer citotoxicidade direta (Qu *et al.*, 2024; Zare-Zardini *et al.*, 2024). Ramos *et al.* (2016) observaram que áreas de adesão menores favorecem a migração em células de carcinoma oral, e estudos mais recentes (Fuhrmann *et al.*, 2017; Kane *et al.*, 2025) mostraram que células com menor adesividade apresentam maior potencial metastático, tanto em modelos murinos quanto em modelos com amostras de pacientes humanos.

Dessa forma, nossos dados indicam uma ação inovadora dos peptídeos, aumentando a adesão celular em concentrações não citotóxicas — um efeito até então não relatado na literatura. Esses resultados permitiram o depósito do pedido de patente BR1320240257811, depositado junto ao - Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 10/12/2024, que reivindica o uso dos peptídeos minimizados na produção de medicamentos para o tratamento de câncer de mama metastático.

Vale ressaltar que o efeito dos peptídeos no aumento da adesão aos componentes de matriz celular foi observado de forma consistente para os dois tipos de revestimento testados (colágeno e fibronectina), o que sugere que os peptídeos não têm um efeito restrito a um tipo específico de integrina. Por exemplo, as integrinas $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$ estão relacionadas à adesão ao colágeno I e laminina, mas não à fibronectina, que se liga mais comumente à integrina $\alpha5\beta1$ (Koistinen; Heino, 2000). Portanto, a hipótese é de que os peptídeos promovam ativação inespecífica de diferentes integrinas e suas vias de sinalização intracelular.

A ativação de integrinas na superfície celular é normalmente seguida pela formação de complexos de adesão focal (focal adhesions, FAs) intracelularmente. Quando a bicamada lipídica sofre perturbações mecânicas, como a formação de poros e a perda de lipídeos que alteram sua espessura, proteínas receptoras localizadas principalmente nos domínios conhecidos como lipid rafts – incluindo as integrinas – podem mudar de conformação, passando do estado inativo para o ativo. As interações entre as células e a matriz extracelular têm sido amplamente estudadas utilizando células cultivadas *in vitro*. Esses estudos indicam que as interações entre as células e a matriz extracelular baseadas na adesão focal (FA) são essenciais para a fixação e migração celular (Yamaguchi; Knaut, 2022). De fato, os peptídeos

testados, LyeTxI-b (2), LyeTxI-mnK (4), aumentaram o número de FAs, conforme demonstrado por imunomarcção de integrina $\beta 1$, paxilina e filamentos de actina em superfícies revestidas com fibronectina. Essa ativação promove maior adesão celular e formação de complexos de adesão focal (FA). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são conhecidos por induzir essas alterações em membranas lipídicas (Son; Moroney; Butler, 2017; Lietha; Izard, 2020; Koynarev *et al.*, 2024).

O aumento na formação de complexos de adesão focal observado após o tratamento com os peptídeos pode estar associado à modulação de vias de sinalização intracelular mediadas por proteínas-chave, como a paxilina. De acordo com Alpha, Xu e Turner (2020), a paxilina é um componente central na regulação das interações célula-matriz extracelular, sendo recrutada precocemente para os sítios de adesão e promovendo a maturação das FAs. Esse processo resulta em maior estabilidade das adesões, reforça o ancoramento celular ao substrato e contribui para a supressão da motilidade, favorecendo um fenótipo menos migratório. A vinculina também é uma proteína importante na formação de FAs, Metsiou *et al.* (2022) registrou o aumento da sua expressão induzido por tamoxifeno em células MCF-7 e SKBR-3 e associou esse aumento à dificuldade das células se desprenderem da MEC, reduzindo motilidade, migração e potencial metastático.

A maturação das FAs envolve a coordenação dinâmica de diversas proteínas, incluindo FAK (focal adhesion kinase), Src, vinculina, talina e integrinas, que se organizam em torno de um núcleo central composto por paxilina (Deakin & Turner, 2011; Gulvady *et al.*, 2018). Nesse contexto, Anguiano *et al.* (2020) demonstraram que a intensificação na formação de FAs estáveis em matrizes contendo colágeno resulta em maior adesão celular e redução da migração. Quando numerosas e bem maturadas, essas estruturas fixam de maneira mais robusta as células à matriz extracelular, restringindo sua capacidade de movimento. Além disso, estudos de Lock *et al.* (2012) apontam que a formação de FAs maiores e mais estáveis, associadas ao aumento da fosforilação da paxilina, estão correlacionadas com uma desaceleração no turnover dessas estruturas, o que compromete a dinâmica migratória das células. Assim, os peptídeos testados podem estar interferindo nesse processo, promovendo a estabilização dos complexos de adesão e, conseqüentemente, inibindo a migração celular.

Portanto, o aumento nos complexos de adesão focal observados nas células tratadas pode representar não apenas uma resposta gerando alteração estrutural, mas também funcional, com impacto direto sobre a capacidade de migração e, potencialmente, sobre o comportamento metastático das células tumorais.

Além disso, a partir da observação microscópica das células aderidas também foi possível perceber mudanças morfológicas acentuadas entre as células tratadas e não tratadas. Sendo assim, utilizamos as imagens imunofluorescentes para quantificar as alterações nos parâmetros morfométricos das células MDA-MB-231, visto que existe relação entre o formato celular e um fenótipo considerado metastático ou não. Foi possível observar que as células tratadas com os peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK tiveram aumento significativo nos parâmetros área, perímetro e índice de alongamento em relação às células sem tratamento. Enquanto as células do grupo controle apresentaram um tamanho menor em comparação as células tratadas e com aspectos mais arredondados e circulares, com poucas irregularidades. A literatura relaciona o aumento de área, perímetro e alongamento com um fenótipo preditivo de migração e invasão, porém, para que o processo de movimento e migração seja concluído esse alongamento celular precisa ser seguido de uma rápida contração em uma dinâmica de repetição de alongamento e contração (Baskaran *et al.*, 2020; Zhang; Chan; Mak, 2021). Caso contrário, quando o alongamento não é seguido dessa rápida contração e essas alterações ocorrem associadas a fatores que aumentam a força de adesão celular à MEC e como uma elevada formação de FAs significa que ocorre redução da capacidade migratória visto que as células estarão mais fortemente aderidas e terão maior dificuldade para se desprenderem (Metsiou *et al.*, 2022).

Na série de etapas que compõem o potencial metastático das células cancerosas, a taxa de disseminação, espalhamento na MEC e as forças de adesão entre a célula e a MEC estão intimamente ligadas à progressão da doença. Dessa forma, na transformação maligna, a reorganização do citoesqueleto ocorre com uma perda simultânea de fortes forças intracelulares, contribuindo para uma célula cancerosa “mais macia”, com a capacidade de migrar facilmente sobre a MEC, ou seja, quanto mais aderida ao substrato, menor é a capacidade migratória (Swaminathan *et al.*, 2011; Metsiou *et al.*, 2022). Portanto, as alterações morfológicas induzidas pelos peptídeos reforçam a ideia de que aumentar a adesão ao substrato

reduz a capacidade das células de migrarem e invadirem outros sítios, conseqüentemente, reduzindo seu potencial metastático.

Baseado nos resultados de adesão, selecionamos os peptídeos mais promissores para os ensaios de migração (2D) e invasão (3D): os peptídeos minimizados LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK e o derivado LyeTxI-b, este último por seu comprovado efeito antimetastático *in vivo*. No sistema 3D, o ensaio foi realizado com colágeno tipo I (1 mg/mL), medindo a distância que as células se espalham a partir de um esferoide central. Os resultados mostraram que os três peptídeos reduziram significativamente a invasão das células MDA-MB-231 e MCF-7, com destaque para os minimizados LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK. No ensaio de migração ("scratch assay") ao longo de 24h, apenas o peptídeo LyeTxI-b foi capaz de reduzir significativamente a migração das células MDA-MB-231. Os peptídeos minimizados não mostraram efeito neste ensaio. Em MCF-7, nenhum peptídeo causou alteração significativa na migração.

Os efeitos observados foram mais evidentes na linhagem MDA-MB-231, que possui um fenótipo mais agressivo e invasivo, sendo triplo-negativa e altamente migratória, em comparação à MCF-7, que é positiva para receptores hormonais e apresenta comportamento menos invasivo (Scherbakov *et al.*, 2023; Hassan; Aubel, 2025). Essa diferença pode explicar a maior sensibilidade da MDA-MB-231 aos efeitos dos peptídeos, reforçando o potencial desses compostos em tumores com alto grau de agressividade. Estudos prévios reforçam que diversos AMPs interferem na migração e metástase por mecanismos distintos: melitina, por exemplo, inibe Rac1 em carcinoma hepatocelular, importante nos processos de adesão célula-célula, motilidade e organização do citoesqueleto (Liu *et al.*, 2008), e bloqueia a via NF- κ B em linhagens de câncer de mama, que modula a expressão de integrinas e MMPs (Jeong *et al.*, 2014). Outros APMs interferem diretamente na TEM, processo que permite as células se desprenderem do tumor primário, migrar através da MEC e atingir novos sítios. A mercedina reduz a TEM e regula negativamente a vimentina em células de câncer de mama triplo-negativas, importante proteína do citoesqueleto em processos de adesão e migração (Ma *et al.*, 2024), já o peptídeo lycosin-I afeta a via STAT3 em células de câncer de próstata, via determinante em processos de sobrevivência e TEM (Shen *et al.*, 2018). Guo *et al.* (2022) relataram que o peptídeo Smp24, derivado de escorpião, promoveu dano à membrana plasmática e

desorganização do citoesqueleto em células de carcinoma de pulmão (A549 e H1299), o que resultou em uma redução significativa na migração e invasão, novamente demonstrando que mecanismos de perturbação estrutural e de permeabilidade celular podem ser um eixo comum para a atividade antimetastática de peptídeos bioativos.

Outro mecanismo importante foi evidenciado por Guha *et al.* (2013), no qual o glicopeptídeo TFD100, isolado de bacalhau, inibiu a interação entre a galectina-3 (Gal-3) e o antígeno Thomsen-Friedenreich, bloqueando adesão endotelial, angiogênese e metástase em modelo murino de câncer de próstata. Visto que a Gal-3 também está relacionada com a progressão de câncer de mama, os dados sugerem que a redução da motilidade celular observada em nossos ensaios pode decorrer da interferência dos peptídeos com vias reguladas por lectinas ou por receptores de matriz extracelular semelhantes.

Nosso grupo tem investigado o potencial anticâncer de peptídeos de peçonhas e seus derivados sintéticos. Estudos realizados utilizando modelo murino de câncer de mama triplo-negativo 4T1 (Abdel-Salam *et al.*, 2021) mostraram que o peptídeo LyeTxI-b (5 mg/kg) reduziu significativamente a expressão de TGF- β , TNF- α e IL1- β em diferentes órgãos como cérebro, baço e pulmão, assim como no tumor primário, culminando na redução de metástase pulmonar. Considerando que TGF- β e TNF- α têm demonstrado induzir a expressão de MMPs (Yadav *et al.*, 2015), o efeito anti-metastático de LyeTxI-b pode também estar associado à menor expressão de MMPs. Uma das vias envolvidas na secreção de MMPs é a via MAPK/ERK/JNK, ativada por citocinas (IL-6, IL-1 β , TNF- α) e fatores de crescimento (TGF- β , EGF, VEGF), que também são produzidas pelas células MDA-MB-231 e MCF-7 (Kim *et al.*, 2009; Chua *et al.*, 2024). Adicionalmente, os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases), reguladores críticos da atividade das MMPs, podem estar sendo modulados direta ou indiretamente pelos peptídeos. Um possível mecanismo envolvido seria o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido pelos danos na bicamada lipídica, que ativam p53 por fosforilação, resultando em maior expressão de TIMPs (Thomas; Reisman, 2006; Shi *et al.*, 2014; Shoari *et al.*, 2025).

Considerando que a menor secreção de MMPs pode estar associada a um aumento de adesão à MEC (Yadav *et al.*, 2015; Gurgul *et al.*, 2022), avaliamos se os peptídeos apresentam efeito sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 por

zimografia. Os resultados demonstraram que, além da redução da migração e da invasão celular, os peptídeos levaram a uma diminuição significativa da atividade de MMP-2 e MMP-9, que são fundamentais para a degradação da MEC durante o processo de invasão tumoral.

Como os peptídeos minimizados apresentaram efeitos semelhantes sobre adesão, priorizamos os peptídeos LyeTxImnK-Ac, LyeTxImnK por possuírem estrutura anfipática (segundo análises *in silico*), e por serem mais estáveis quando acetilados (Fuscaldi *et al.*, 2020) — características desejáveis para aplicações *in vivo*. O peptídeo 2 foi mantido em todos os ensaios devido à sua eficácia comprovada *in vivo*. A atividade elevada de MMP-9 e MMP-2 está frequentemente associada a um fenótipo mais agressivo em células MDA-MB-231 e MCF-7, que apesar de serem menos agressivas que MDA-MB-231, ainda assim expressam MMPs relevantes para invasão e metástase (Das *et al.*, 2008). A inibição dessas enzimas pode ser um dos mecanismos pelos quais os peptídeos exercem seus efeitos anti-invasivos. Estudos indicam que a expressão e ativação de MMPs é regulada por vias intracelulares como MAPK e NF- κ B, que podem ser moduladas por peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Guo *et al.*, 2022; Selvarathinam *et al.*, 2023).

Soleimanifar *et al.* (2023) demonstraram que a Nisina, um AMP produzido por *Lactococcus lactis*, reduziu a adesão de células de câncer colorretal, além de reduzir a expressão gênica de *mmp2* e *mmp9*, genes envolvidos na migração celular através da MEC. Segundo Tian *et al.* (2012) o AMP PR39 foi capaz de reduzir atividade invasiva e migratória em células 4T1 ao regular a expressão de MMP-9. Shen *et al.* (2018) demonstraram que o peptídeo lycosin-I, derivado de veneno de aranha, também foi capaz de suprimir a migração de células de câncer de próstata (DU-145 e PC-3) ao causar redução de MMP-9 e aumento de TIMP1/2 (proteínas inibidoras de MMPS), sugerindo um mecanismo molecular bem definido de ação antimetastática.

AMPs como o Smp43 podem reduzir a expressão de MMP-9 e possivelmente MMP-2 em células MDA-MB-231 e MCF-7, contribuindo para a diminuição do potencial invasivo e metastático dessas células. Isso reforça o potencial terapêutico dos AMPs no tratamento do câncer de mama. Compostos naturais como EGCG (do chá verde) também mostraram reduzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 em ambas as

linhagens, embora não sejam AMPs clássicos (Farabegoli *et al.*, 2017; Teleb *et al.*, 2023).

A redução simultânea de MMP-2 e MMP-9 em ambas as linhagens após o tratamento sugere que os peptídeos interferem na cascata de eventos pró-invasivos, não apenas limitando a capacidade de remodelar a MEC, mas também possivelmente atuando sobre vias de sinalização associadas, como PI3K/Akt, MAPK e TGF- β , conhecidas por regular positivamente a expressão dessas enzimas (Maity *et al.*, 2011; Izdebska *et al.*, 2021; Shakery; Safari, 2023).

Uma das principais vias envolvidas na secreção de MMPs é a via FAK/Src, ativada pela interação célula-MEC mediada por integrinas. Nesse processo, a ativação de integrinas leva ao recrutamento e auto fosforilação de FAK, que subsequentemente recruta Src. O complexo FAK/Src potencializa a atividade de ambas as proteínas, fosforilando componentes estruturais do FA, como paxilina, talina e vinculina, além de ativar as vias MAPK/ERK e PI3K-AKT-mTOR-NF- κ B, que aumentam a expressão de MMPs. O complexo também pode ativar diretamente fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1, associados ao aumento da expressão de MMPs (Wu; Gan; Yoo; Guan, 2005; Mon; Senga; Ito, 2017; Juárez-Cruz *et al.*, 2019). Em condições fisiológicas, a ativação de integrinas e FAs culmina na secreção de MMP-2 e MMP-9 pelas células MDA-MB-231 e MCF-7. Entretanto, neste trabalho foi demonstrado que, apesar do aumento da adesão, os peptídeos reduzem a secreção dessas MMPs, sugerindo uma interferência direta nas vias de sinalização responsáveis por sua expressão. Assim, os peptídeos podem limitar a capacidade dessas células de invadir e migrar através da MEC. Corroborando esse mecanismo, Avelar Júnior *et al.* (2022) demonstraram que o peptídeo LyeTxI-b reduz a fosforilação de ERK e AKT em células MDA-MB-231.

A via de sinalização intracelular FAK/Src, além de favorecer a invasão, direciona a MMP-14 (MT1-MMP) para regiões especializadas da membrana plasmática denominadas invadopódias, que são protusões ricas em actina projetadas pelas células cancerígenas durante o processo de invasão e que concentram MMPs, sobretudo MMP-14, promovendo a degradação localizada da MEC. Nesses sítios, a MMP-14 que permanece ancorada à membrana plasmática é fosforilada e ativada por essas quinases (FAK/Src) para exercer papel essencial na degradação da MEC, sendo responsável pela ativação da pró-MMP-2, gerando MMP-2 ativa. A ação

subsequente de MMP-2 e a remodelação matricial induzida favorecem a secreção e ativação de MMP-9, enzima crucial não apenas para degradação adicional da MEC, mas também para a liberação de fatores angiogênicos, como VEGF, armazenados na matriz. Além disso, a MMP-14 colocaliza-se com algumas proteínas, como integrinas $\beta 1$ e essa interação previne a endocitose de MMP-14, prolongando sua atividade enzimática na superfície celular. Assim, a MMP-14 tende a permanecer menos ativa durante o contato firme entre célula e matriz e mais ativa após a dissolução dessas interações. Estudos demonstram que a integrina $\beta 1$ coordena tanto a redistribuição quanto a estabilização da MMP-14 na membrana, promovendo a formação de complexos multiproteicos nos pontos de adesão célula-MEC e essa interação também pode ativar a via das MAPKs (Pahwa *et al.*, 2014; Grafinger *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2023; Niland e Eble, 2025).

Dessa forma, a interação funcional entre MMP-14, integrina $\beta 1$ e a cascata proteolítica MMP-2/MMP-9 constitui um eixo central no processo invasivo e metastático de células tumorais, reforçando a hipótese de que a ligação dos peptídeos ao domínio transmembrana de $\beta 1$ estabilizaria sua conformação aberta. Esta conformação manteria a integrina no seu estado ativo por mais tempo, interrompendo assim a interação da integrina com a MMP-14 e conseqüentemente, inibindo a ativação de MMP-2 e MMP-9, reduzindo a capacidade migratória e invasiva das células tumorais. Esta ligação pode ser indireta por meio de proteínas do arcabouço do invadosoma ou talvez pelo recrutamento dessas proteínas para os mesmos microdomínios de membrana. Experimentos para elucidar esse mecanismo serão realizados no futuro (Niland e Eble, 2025).

Em conjunto, os dados apresentados na presente investigação fornecerão uma visão abrangente dos mecanismos de ação relacionados à atividade antimetastática *in vitro* dos peptídeos aqui estudados e subsidiarão estudos futuros de Relação Estrutura-Atividade de novos derivados que possam otimizados a candidatos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de novas terapias para do câncer de mama triplo-negativo.

5.1 Proposta de mecanismo do potencial antimetastático dos peptídeos derivados e sintéticos da peçonha de *Lycosa erythrognatha*

Todos os dados em conjunto permitiram propor algumas possíveis vias envolvidas na atividade antimetastática dos derivados sintéticos LyeTxI-b e LyeTxImnK. A proposta deste mecanismo foi baseada nos resultados obtidos nessa investigação. A **Figura 19** resume essas possibilidades de ação dos peptídeos investigados nesse trabalho, com destaque para LyeTxI-b e LyeTxImnK.

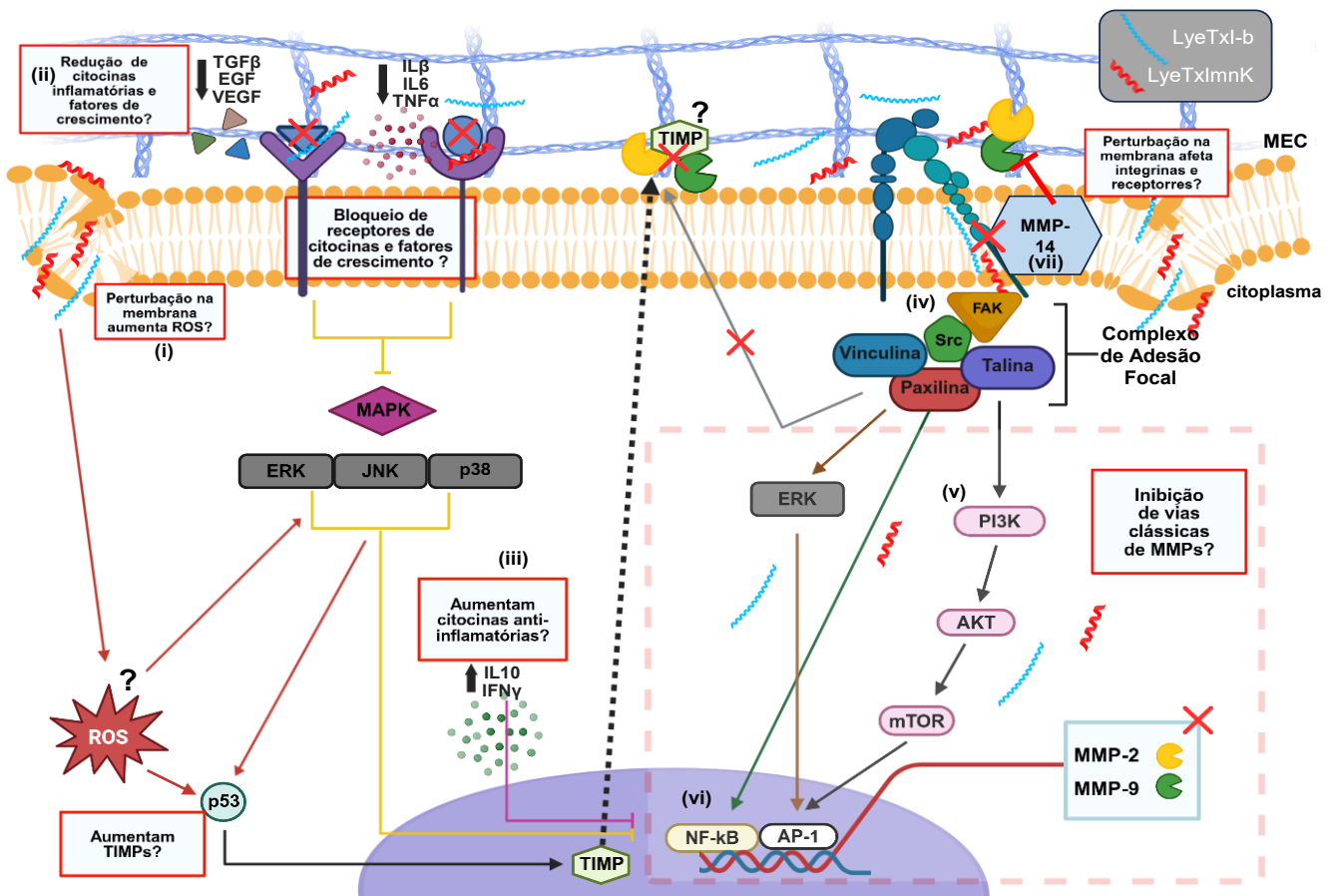


Figura 19. Possível mecanismo de ação dos peptídeos LyeTxI-b e LyeTxImnK em células de câncer de mama. (i) perturbação da membrana plasmática, com dois principais efeitos: aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à ativação de p53 e/ou aumento de TIMPs, e ativação de integrinas, favorecendo a adesão à MEC e a formação de complexos de adesão (FA); (ii) redução de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento e/ou bloqueio de seus receptores, modulando negativamente a via MAPK (ERK, JNK e p38); (iii) aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias; (iv) ativação direta da via FAK/Src por meio da interação com integrinas, intensificando a adesão celular e a formação de FA; (v) modulação das vias PI3K/AKT/mTOR e ERK; (vi) inibição da ativação dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1, resultando na redução da expressão e secreção de MMP-2 e MMP-9, além da (vii) inibição da ativação de MMP-14 pela interação com a subunidade β1 das integrinas, impedindo a ativação de MMP-2 e MMP-9. Em conjunto, esses efeitos contribuem para o

aumento da adesão celular e para a diminuição da migração e invasão em concentrações subcitotóxicas dos peptídeos (1/8 da CI_{50}).

6. CONCLUSÃO

Os peptídeos derivados da toxina LyeTxI e seus derivados LyeTxI-b, bem como as formas minimizadas acetilada ou não (LyeTxImnK-Ac e LyeTxImnK) possuem atividade antimetastática em concentrações subtóxicas. Este efeito foi confirmado por maior interação com membranas aniônicas, pelo aumento da adesão celular e a formação de complexos de adesão focal, menor migração e invasão reduzindo a secreção de MMP-2/MMP-9. Esses achados permitem classificar os peptídeos como candidatos promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de mama triplo-negativo, embora estudos em modelos animais sejam necessários para confirmar sua eficácia *in vivo*.

Perspectivas futuras.

Estudos futuros devem aprofundar a caracterização dos mecanismos por meio do uso de inibidores farmacológicos ou silenciamento gênico direcionados contra componentes da via FAK/Src, integrinas e proteínas associadas às adesões focais. Ensaios de quantificação proteica (Western blotting) devem incluir FAK (e p-FAK), Src, paxilina, vinculina e talina, bem como a análise das proteínas MAPK, ERK, p53 e da metaloproteinase MMP-14 (e p-MMP-14). Complementarmente, ensaios como invasão 3D associados ao bloqueio de vias específicas, são estratégicos para correlacionar as alterações moleculares com fenótipos celulares. A análise da secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, de fatores de crescimento (TGF- β , EGF, VEGF) por ELISA e qPCR, será essencial para relacionar os efeitos sobre adesão/migração com a modulação do microambiente tumoral. Por fim, priorizar a avaliação dos peptídeos em modelos ortotópicos de câncer de mama triplo-negativo e em ensaios de metástase experimental (ex.: injeção caudal ou intracárdica), possibilitando investigar a colonização secundária e a progressão metastática em órgãos-alvo.

Referências Bibliográficas

- ABDEL-SALAM, M. A. L.; CARVALHO-TAVARES, J.; GOMES, K. S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; KITTEN, G. T.; NYFFELER, J.; DIAS, F. F.; DOS REIS, P. V. M.; PIMENTA, A. M. C.; LEIST, M.; DE LIMA, M. E.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M. The synthetic peptide LyeTxI-b derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom is cytotoxic to U-87 MG glioblastoma cells. *Amino Acids*, v. 51, n. 3, p. 433–449, Mar. 2019. DOI: 10.1007/s00726-018-2678-4. Acesso em: 25 jul. 2024.
- ABDEL-SALAM, M. A. L.; PINTO, B.; CASSALI, G.; BUENO, L.; PÊGAS, G.; OLIVEIRA, F.; SILVA, I.; KLEIN, A.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; DE LIMA, M. E.; CARVALHO-TAVARES, J. LyeTx I-b peptide attenuates tumor burden and metastasis in a mouse 4T1 breast cancer model. *Antibiotics (Basel)*, v. 10, n. 9, p. 1136, Sep. 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10091136. Acesso em: 25 jul. 2024.
- ABDULJAUWAD, S. N.; AHMED, H. Enhancing cancer cell adhesion with clay nanoparticles for countering metastasis. *Scientific Reports*, v. 9, art. 5935, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-42498-y. Acesso em 10 jan 2025.
- AGHAMIRI, S.; ZANDSALIMI, F.; RAEI, P.; ABDOLLAHIFAR, M. A.; TAN, S. C.; LOW, T. Y.; NAJAFI, S.; ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; GHANBARIAN, H.; BANDEHPOUR, M. Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer. *Pharmacological Research*, v. 171, p. 105777, Sep. 2021. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105777. Acesso em: 18 jul. 2024.
- AGHAMIRI, S.; ZANDSALIMI, F.; RAEI, P.; ABDOLLAHIFAR, M. A.; TAN, S. C.; LOW, T. Y.; NAJAFI, S.; ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; GHANBARIAN, H.; BANDEHPOUR, M. Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer. *Pharmacological Research*, v. 171, p. 105777, Sep. 2021. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105777. Acesso em 12 jan 2025.
- AHMAD, I.; PAL, S.; SINGH, R.; AHMAD, K.; DEY, N.; SRIVASTAVA, A.; AHMAD, R.; SULIMAN, M.; ALSHAHRANI, M. Y.; BARKAT, M. A.; SIDDIQUI, S. Antimicrobial peptide moricin induces ROS mediated caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer via suppression of notch pathway. *Cancer Cell International*, v. 23, n. 1, p. 121, Jun. 2023. Erratum in: *Cancer Cell International*, v. 23, n. 1, p. 139, Jul. 2023. DOI: 10.1186/s12935-023-02958-y. Acesso em: 18 jul. 2024.
- ALHARBI, B. F.; AL-FAHAD, D.; DASH, P. R. Roles of endocytic processes and early endosomes on focal adhesion dynamics in MDA-MB-231 cells. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, v. 10, n. 2, p. 145–155, Jul. 2021. DOI: 10.52547/rbmb.10.2.145. Acesso em: 17 jul. 2024.
- ALI, M. Y. *et al.* Cytoskeleton and Focal Adhesion Organization Assay: An Immunofluorescence-based Method to Study Cell Adhesion and

Spreading on Substrates. *Journal of Visualized Experiments*, [S. I.], v. 2023, n. 20345. Disponível em: <https://www.jove.com/pt/t/20345/cytoskeleton-focal-adhesion-organization-assay-an-immunofluorescence>. Acesso em: 4 jun. 2025.

ALPHA, K. M.; XU, W.; TURNER, C. E. Paxillin family of focal adhesion adaptor proteins and regulation of cancer cell invasion. *International Review of Cell and Molecular Biology*, [S.I.], v. 355, p. 1–52, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.05.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32859368/>. Acesso em: 16 jul. 2025.

ANGUIANO, M. *et al.* The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: MEC sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion. *PLoS One*, [S.I.], v. 15, n. 1, p. e0220019, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220019>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31945053/>. Acesso em: 07 jul. 2025.

ARISAN, E. D.; AKKOÇ, Y.; AKYÜZ, K. G.; KERMAN, E. M.; OBAKAN, P.; ÇOKER-GÜRKAN, A.; ÜNSAL, N. P. Polyamines modulate the roscovitine-induced cell death switch decision autophagy vs. apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 11, n. 6, p. 4532-4540, jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3303>. Acesso em: 10 jan. 2024.

AVELAR JÚNIOR, J. T. de; LIMA, M. E. de; CASTRO JÚNIOR, C. J. de *et al.* LyeTxI-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, is highly active in triple-negative breast cancer cells and acts synergistically with cisplatin. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 876833, 2022. DOI: [10.3389/fmolb.2022.876833](https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.876833). Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.876833>. Acesso em: 25 jul. 2025.

BARBOSA, M. A. G.; XAVIER, C. P. R.; PEREIRA, R. F.; PETRIKAITÉ, V.; VASCONCELOS, M. H. 3D cell culture models as recapitulators of the tumor microenvironment for the screening of anti-cancer drugs. *Cancers (Basel)*, v. 14, n. 1, p. 190, Dec. 2021. DOI: [10.3390/cancers14010190](https://doi.org/10.3390/cancers14010190). Acesso em: 17 jul. 2024.

BASKARAN, Janani P.; WELDY, Anna; GUARIN, Justinne; MUÑOZ, Gabrielle; SHPILKER, Polina H.; KOTLIK, Michael; SUBBIAH, Nandita; WISHART, Andrew; PENG, Yifan; MILLER, Miles A.; COWEN, Lenore; OUDIN, Madeleine J. Cell shape, and not 2D migration, predicts extracellular matrix-driven 3D cell invasion in breast cancer. *APL Bioengineering*, v. 4, art. 026105, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5143779>. Acesso em: 7 set. 2025.

BERGER, B. W.; *et al.* Consensus motif for integrin transmembrane helix association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 2, p. 703–708, 18 dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0910873107>. Acesso em: 7 set. 2025.

- BERGERHAUSEN, L.; GROSCHE, J.; MEISSNER, J.; HECKER, C.; CALIANDRO, M. F.; WESTERHAUSEN, C.; KAMENAC, A.; REZAEI, M.; MÖRGELIN, M.; POSCHMANN, G.; VESTWEBER, D.; HANSCHMANN, E. M.; EBLE, J. A. Extracellular redox regulation of $\alpha7\beta$ integrin-mediated cell migration is signaled via a dominant thiol-switch. *Antioxidants (Basel)*, v. 9, n. 3, p. 227, Mar. 2020. DOI: 10.3390/antiox9030227. Acesso em 10 jan 2025.
- BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021. DOI: 10.3390/ijms22136995. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>. Acesso em: 23 ago. 2025.
- BRIAND, E.; ZÄCH, M.; SVEDHEM, S.; KASEMO, B.; PETRONIS, S. Combined QCM D and EIS study of supported lipid bilayer formation and interaction with pore forming peptides. *Analyst*, [S.l.], v. 135, n. 2, p. 343–350, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1039/B918288H>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- CALKINS, S.; YOUSSEF, N. H. Insights into the utility of the focal adhesion scaffolding proteins in the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. C1A. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, e0163553, Sept. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163553.
- CHEN, J. J. *et al.* JP3, an antiangiogenic peptide, inhibits growth and metastasis of gastric cancer through TRIM25/SP1/MMP2 axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01617-8>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- CHUA, P. J.; OW, S. H.; NG, C. T.; HUANG, W.-H.; LOW, J. T.; TAN, P. H.; CHAN, M. W. Y.; BAY, B. H. Peroxiredoxin 3 regulates breast cancer progression via ERK-mediated MMP-1 expression. *Cancer Cell International*, v. 24, n. 1, art. 59, fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03248-x>. Acesso em: 15 set. 2025.
- COSTA, R. E. A. R.; OLIVEIRA, F. T. R.; ARAÚJO, A. L. N.; VIEIRA, S. C. Prognostic factors in triple-negative breast cancer: a retrospective cohort. *Revista da Associação Médica Brasileira (1992)*, v. 67, n. 7, p. 950–957, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20210249>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- DAS, S.; BANERJI, A.; FREI, E.; CHATTERJEE, A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life Sciences*, v. 82, n. 9-10, p. 467–476, 2008. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.12.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.12.013>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- DEAKIN, N. O.; TURNER, C. E. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis. *Molecular Biology of the Cell*, Bethesda, v. 22, n. 3, p. 327–341, 1 fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-09-0790>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148292/>. Acesso em: 16 jul. 2025.

- DI IORIO, D., LU, Y., MEULMAN, J., & HUSKENS, J. (2020). Recruitment of receptors at supported lipid bilayers promoted by the multivalent binding of ligand-modified unilamellar vesicles. *Chemical Science*, 11(12), 3307–3315. <https://doi.org/10.1039/D0SC00518E>
- DOCHEVA, D.; PADULA, D.; SCHIEKER, M.; CLAUSEN-SCHAUMANN, H. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 402, n. 2, p. 361–366, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.034>. Acesso em: 7 set. 2025.
- EBLE, J. A. *et al.* Collagen-binding integrins in cancer: regulation, function and therapeutic perspectives. *Cells*, Basel, v. 11, n. 2, p. 277, 2022. DOI: [10.3390/cells11020277](https://doi.org/10.3390/cells11020277). Acesso em: 16 jul. 2024.
- EBLE, J. A. *et al.* Matrix interactions of cells in vitro: a survey of recent models. *Histochemistry and Cell Biology*, Berlin, v. 118, p. 307–316, 2002. DOI: [10.1007/s00418-002-0441-2](https://doi.org/10.1007/s00418-002-0441-2). Acesso em: 07 abr. 2024.
- EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, v. 36, n. 3, p. 171-198, Jun. 2019. DOI: [10.1007/s10585-019-09966-1](https://doi.org/10.1007/s10585-019-09966-1). Acesso em 10 jan. 2025.
- FARABEGOLI, F.; GOVONI, M.; SPISNI, E.; PAPI, A. EGFR inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate and IIF treatments reduces breast cancer cell invasion. *Bioscience Reports*, v. 37, n. 3, p. BSR20170168, 2017. DOI: [10.1042/BSR20170168](https://doi.org/10.1042/BSR20170168). Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20170168>. Acesso em: 11 mai. 2025.
- FERHAN, A. R. *et al.* Integration of Quartz Crystal Microbalance Dissipation and Reflection Mode Localized Surface Plasmon Resonance Sensors for Biomacromolecular Interaction Analysis. *Analytical Chemistry*, [S.l.], v. 88, n. 24, p. 12524–12531, 20 dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04303>. Acesso em: 25 jan. 2023
- FREIHAT, O.; SIPOS, D.; KOVÁCS, A. Global burden and projections of breast cancer incidence and mortality to 2050: a comprehensive analysis of GLOBOCAN data. *Frontiers in Public Health*, v. 13, art. 1622954, 2025. DOI: [10.3389/fpubh.2025.1622954](https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1622954).
- FRIDMAN, R. Surface association of secreted matrix metalloproteinases. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 54, p. 75-100, 2003. DOI: [10.1016/s0070-2153\(03\)54005-4](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(03)54005-4). Acesso em 10 jan. 2025.
- FUHRMANN, A.; BANISADR, A.; BERI, P.; TLSTY, T. D.; ENGLER, A. J. Metastatic state of cancer cells may be indicated by adhesion strength. *Biophysical Journal*, [S.l.], v. 112, n. 4, p. 736–745, 28 fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.12.038>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- FUSCALDI, L. L.; AVELAR JÚNIOR, J. T.; SANTOS, D. M.; BOFF, D.; OLIVEIRA, V. L. S.; GOMES, K. A. G. G.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, P. L.; MAGALHÃES,

- P. P.; CISALPINO, P. S.; FARIAS, L. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; DELP, J.; LEIST, M.; RESENDE, J. M.; AMARAL, F. A.; PIMENTA, A. M. C.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N.; DE LIMA, M. E. Shortened derivatives from native antimicrobial peptide LyeTx I: in vitro and in vivo biological activity assessment. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, v. 246, n. 4, p. 414–425, Feb. 2021. DOI: 10.1177/1535370220966963. Acesso em: 15 jan. 2025.
- GARCIA, M. E. L. P.; ALMEIDA, F. D. M.; FAGUNDES, E. M. S.; EBLE, J. A.; SILVA, M. O.; NILAND, S. Composições farmacêuticas para o tratamento de tumores sólidos e usos. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais. Pedido de patente BR1320240257811, prioridade 10 dez. 2024.
- GARCIA, M. E. L. P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; REIS, P. V. M.; SANTOS, D. M.; RESENDE, J. M.; PIMENTA, A. M. C.; PERDIGÃO, G. M. C. Synthetic peptides, pharmaceutical compositions and uses. Brasil: Pedido de patente BR 10 2015 031860-0, prioridade 18 dez. 2015. Acesso em 13 abr 2024.
- GASPAR, Diana; VEIGA, A. Salomé; CASTANHO, Miguel A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides: a review. *Frontiers in Microbiology*, [S.l.], v. 4, 2013. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00294/full>. Acesso em: 10 jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>. ISSN 1664-302X.
- GRAFINGER, O. R.; GORSHTAIN, G.; STIRLING, T.; BRASHER, M. I.; COPPOLINO, M. G. β 1 integrin-mediated signaling regulates MT1-MMP phosphorylation to promote tumor cell invasion. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 9, p. jcs239152, 14 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.239152>. Acesso em: 25 set. 2025.
- GU, L.; PILLAY, R.; ARONSON, R.; KAUR, M. Cholesteryl ester transfer protein knock-down in conjunction with a cholesterol-depleting agent decreases tamoxifen resistance in breast cancer cells. *IUBMB Life*, Hoboken, v. 76, p. 712-730, 2024. DOI: 10.1002/iub.2823. Acesso em 08 mar. 2025.
- GUHA, P. *et al.* Cod glycopeptide with picomolar affinity to galectin-3 suppresses T-cell apoptosis and prostate cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 13, p. 5052–5057, Mar. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1202653110. Acesso em: 01 jul. 2025
- GULVADY, A. C. *et al.* Hic-5 expression is a major indicator of cancer cell morphology, migration, and plasticity in three-dimensional matrices. *Molecular Biology of the Cell*, Bethesda, v. 29, n. 13, p. 1704–1717, 15 jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-02-0092>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29771639/>. Acesso em: 19 jul. 2025.
- GUO, R. *et al.* Scorpion peptide Smp24 exhibits a potent antitumor effect on human lung cancer cells by damaging the membrane and cytoskeleton in vivo and

in vitro. *Journal of Membrane Biology*, v. 255, n. 3, p. 291–305, Mar. 2022. Acesso em: 16 jul. 2025

GUO, R.; GUO, G.; WANG, A.; XU, G.; LAI, R.; JIN, H. Spider-venom peptides: structure, bioactivity, strategy, and research applications. *Molecules*, Basel, v. 29, n. 1, p. 35, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29010035>. Acesso em: 10 jul. 2025.

GURGUL, I.; JANCZY-CEMPA, E.; MAZURYK, O.; LEKKA, M.; ŁOMZIK, M.; SUZENET, F.; GROS, P. C.; BRINDELL, M. Inhibition of metastasis by polypyridyl Ru(II) complexes through modification of cancer cell adhesion – In vitro functional and molecular studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, n. 15, p. 10459–10470, Aug. 2022. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00580. Acesso em 17 fev 2025.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 9, p. 533–548, Sept. 2018. DOI: 10.1038/s41568-018-0038-z. Erratum in: *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 3, p. 179, Mar. 2019. PMID: PMC6629548. Acesso em: 23 ago. 2025.

HASSAN, A.; AUBEL, C. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in triple-negative breast cancer: a resistance pathway and a prime target for targeted therapies. *Cancers*, [S.l.], v. 17, n. 13, p. 2232, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers17132232>. Acesso em: 16 jul. 2025.

HUANG, H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors (Basel)*, v. 18, n. 10, p. 3249, Sep. 2018. DOI: 10.3390/s18103249. Acesso em 10 jan 2025.

IBIDI. Wound Healing Assay Using the ibidi Culture-Inserts 2 Well in a 24 Well Plate. Martinsried, Alemanha: Ibidi GmbH, 2021. Disponível em: <https://ibidi.com/content/281-experimental-workflow>. Acesso em: 04 jun. 2025.

IMAGEJ. *Analyze Menu*. Disponível em: <https://imagej.net/ij/docs/menus/analyze.html>. Acesso em: 25 jul. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). *Estimativa — incidência de câncer no Brasil, triênio 2023-2025 – Introdução*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao>. Acesso em: 25 jul. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). *O que é câncer*. Rio de Janeiro: INCA, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 25 jul. 2025.

IZDEBSKA, M. *et al.* Downregulation of MMP-9 enhances the anti-migratory effect of cyclophosphamide in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12783, 2021.

DOI: 10.3390/ijms222312783. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12783>. Acesso em: 16 jul. 2025.

- JANSSEN, L. M. E.; RAMSAY, E. E.; LOGSDON, C. D.; OVERWIJK, W. W. The immune system in cancer metastasis: friend or foe? *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 5, n. 1, p. 79, Oct. 2017. DOI: 10.1186/s40425-017-0283-9. Acesso em 12 fev 2024.
- JEONG, Yun-Jeong *et al.* Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, [S.l.], v. 68, p. 218–225, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.022>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- JUÁREZ-CRUZ, J. C.; ZUÑIGA-EULOGIO, M. D.; OLEA-FLORES, M.; CASTAÑEDA-SAUCEDO, E.; MENDOZA-CATALÁN, M. Á.; ORTUÑO-PINEDA, C.; MORENO-GODÍNEZ, M. E.; VILLEGAS-COMONFORT, S.; PADILLA-BENAVIDES, T.; NAVARRO-TITO, N. Leptin induces cell migration and invasion in a FAK-Src-dependent manner in breast cancer cells. *Endocrine Connections*, v. 8, n. 11, p. 1539-1552, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1530/EC-19-0442> . Acesso em: 15 set. 2025.
- KANE, M. A.; BIRMINGHAM, K. G.; YEOMAN, B.; PATEL, N.; SPERINDE, H.; MOLLEY, T. G.; *et al.* Adhesion strength of tumor cells predicts metastatic disease in vivo. *Cell Reports*, [S.l.], v. 44, n. 3, p. 115359, 25 mar. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115359>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- KARIYA, Y.; NISHITA, M. Integrins in cancer drug resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 7, p. 3143, 2025. DOI: 10.3390/ijms26073143. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms26073143>. Acesso em: 23 ago. 2025.
- KIM, B. G.; MALEK, E.; CHOI, S. H.; IGNATZ-HOOVER, J. J.; DRISCOLL, J. J. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 14, n. 1, p. 55, Apr. 2021. DOI: 10.1186/s13045-021-01053-x. Acesso em 10 jan 2025.
- KLAISS-LUNA, M. C. *et al.* Biophysical insights into the antitumoral activity of Crotalicidin against breast cancer model membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 22, p. 16226, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242216226>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- KOISTINEN, P.; HEINO, J. Integrins in cancer cell invasion. In: MADAME CURIE BIOSCIENCE DATABASE [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6070/>. Acesso em: 05 jul. 2025.
- KOYNAREV, V. R.; BORGOS, K. K. A.; KOHLBRECHER, J.; PORCAR, L.; NIELSEN, J. E.; LUND, R. Antimicrobial peptides increase line tension in raft-forming lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, v.

146, n. 30, p. 20891-20903, julho 2024. DOI:
<https://doi.org/10.1021/jacs.4c05377>. Acesso em: 19 set. 2025.

- KWON, M. J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 12, p. 1108695, Jan. 2023. DOI: 10.3389/fonc.2022.1108695. Acesso em 12 jan 2025.
- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, Jun. 2018. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052. Acesso em: 18 jul. 2024.
- LAW, D.; ABDULKAREEM NAJM, A.; CHONG, J. X.; K'NG, J. Z. Y.; AMRAN, M.; CHING, H. L.; WONG, R. R.; LEONG, M. H.; MAHDI, I. M.; FAZRY, S. In silico identification and in vitro assessment of a potential anti-breast cancer activity of antimicrobial peptide retrieved from the ATMP1 *Anabas testudineus* fish peptide. *PeerJ*, v. 11, p. e15651, 2023. DOI: 10.7717/peerj.15651.
- LEE, H.; *et al.* The role of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase in extracellular matrix remodeling, angiogenesis, inflammation and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, art. 2183, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24032183>. Acesso em: 25 set. 2025.
- LI, C.; LIU, H.; YANG, Y.; XU, X.; LV, T.; ZHANG, H.; LIU, K.; ZHANG, S.; CHEN, Y. N-myristoylation of antimicrobial peptide CM4 enhances its anticancer activity by interacting with cell membrane and targeting mitochondria in breast cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, art. 1297, 13 nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01297>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- LIETHA, D.; IZARD, T. Roles of membrane domains in integrin-mediated cell adhesion. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, p. 5531, 1 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155531>. Acesso em: 19 set. 2025.
- LIU, S.; YU, M.; HE, Y.; XIAO, L.; WANG, F.; SONG, C.; SUN, S.; LING, C.; XU, Z. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1 dependent pathway. *Hepatology*, [S.I.], v. 47, n. 6, p. 1964–1973, jun. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.22240>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- LOCK, F. E. *et al.* Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2. *PLOS ONE*, [S.I.], v. 7, n. 2, p. e31423, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031423>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031423>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- MA, F.; SONG, J.; HE, M.; WANG, X. The antimicrobial peptide Merecoidin inhibits the metastasis of triple-negative breast cancer by obstructing TEM via miR 30d 5p/vimentin. *Technology in Cancer Research & Treatment*, [S.I.], v. 23,

n. 9, p. (article 23), 2024. DOI:
<https://doi.org/10.1177/15330338241281310>. Acesso em: 16 jul. 2025.

- MAITY, G. *et al.* Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. *Tumour Biology*, v. 32, n. 1, p. 129–138, 2011. DOI: 10.1007/s13277-010-0106-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0106-9>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- MAITY, G.; CHOUDHURY, P. R.; SEN, T.; *et al.* Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. *Tumour Biology*, v. 32, p. 129–138, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0106-9>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- MAJA, M.; MOHAMMED, D.; DUMITRU, A. C.; VERSTRAETEN, S.; LINGURSKI, M.; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; ALSTEENS, D.; TYTECA, D. Surface cholesterol-enriched domains specifically promote invasion of breast cancer cell lines by controlling invadopodia and extracellular matrix degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 79, n. 8, art. 417, 12 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04426-8>. Acesso em: 08 mar. 2025.
- MALANDRINO, A.; KAMM, R. D.; MOEENDARBARY, E. In vitro modeling of mechanics in cancer metastasis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 4, n. 2, p. 294-301, Feb. 2018. DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00041. acesso 05 mai 2024.
- MANNIELLO, M. D.; MORETTA, A.; SALVIA, R.; SCIEUZO, C.; LUCCHETTI, D.; VOGEL, H.; SGAMBATO, A.; FALABELLA, P. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 78, p. 4259–4282, 2021. DOI: 10.1007/s00018-021-03784-z. Acesso em: 18 jul. 2024.
- MANRIQUE-MORENO, M.; SANTA-GONZÁLEZ, G. A.; GALLEGO, V. Bioactive cationic peptides as potential agents for breast cancer treatment. *Bioscience Reports*, v. 41, n. 12, p. BSR20211218C, Dec. 2021. DOI: 10.1042/BSR20211218C. Acesso em: 18 jul. 2024.
- MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Cell matrix adhesions in cancer: the proteins that form the glue. *Oncotarget*, [S.l.], v. 8, n. 29, p. 48471–48487, 18 jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17265>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- MCCUBBIN, G. A.; PRAPORSKI, S.; PIANTAVIGNA, S.; *ET AL.* QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides. *European Biophysics Journal*, v. 40, p. 437–446, 2011. DOI: 10.1007/s00249-010-0652-5. Acesso em 05 nov 2024.
- MENDONSA, A. M.; NA, T. Y.; GUMBINER, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, v. 37, n. 35, p. 4769–4780, Aug. 2018. DOI: 10.1038/s41388-018-0304-2. Acesso em 10 jan 2025.

- METSU, D. N.; DELIGIANNI, D.; GIANNOPOULOU, E.; KALOFONOS, H.; KOUTRAS, A.; ATHANASSIOU, G. Adhesion strength and anti-tumor agents regulate vinculin of breast cancer cells. *Frontiers in Oncology*, v. 12, art. 811508, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.811508>. Acesso em: 6 set. 2025.
- MIGOÑ, D.; WASILEWSKI, T.; SUCHY, D. Application of QCM in peptide and protein-based drug product development. *Molecules*, v. 25, p. 3950, 2020. DOI: [10.3390/molecules25173950](https://doi.org/10.3390/molecules25173950). Acesso em 20 ago 2025.
- MILARD, M.; ODDE, S.; NEAMATI, N. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics*, v. 1, p. 154–188, Feb. 2011. DOI: [10.7150/thno/v01p0154](https://doi.org/10.7150/thno/v01p0154). Acesso em 12 jan 2025.
- MON, N. N.; SENGA, T.; ITO, S. Interleukin-1 β activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Letters*, v. 13, n. 2, p. 955–960, Feb. 2017. DOI: [10.3892/ol.2016.5521](https://doi.org/10.3892/ol.2016.5521). Acesso em 12 jan 2025.
- MON, N. N.; SENGA, T.; ITO, S. Interleukin-1 β activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Letters*, v. 13, n. 2, p. 955-960, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5521>. Acesso em: 15 set. 2025.
- MONTEIRO, G. A.; FERNANDES, A. V.; SUNDARARAGHAVAN, H. G.; SHREIBER, D. I. Positively and negatively modulating cell adhesion to type I collagen via peptide grafting. *Tissue Engineering Part A*, v. 17, n. 13–14, p. 1663–1673, Jul. 2011. DOI: [10.1089/ten.tea.2008.0346](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0346). Acesso em: 4 jun. 2025.
- MOON, H.-R.; OSPINA-MUÑOZ, N.; NOE-KIM, V.; YANG, Y.; ELZEY, B. D.; KONIECZNY, S. F.; HAN, B. Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform. *PLoS ONE*, v. 15, n. 6, e0234012, Jun. 2020. DOI: [10.1371/journal.pone.0234012](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012). Acesso em: 23 ago. 2025.
- MOREIRA BRITO, J. C. *et al.* PEGylation of the antimicrobial peptide LyeTx I-b maintains structure-related biological properties and improves selectivity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 1001508, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1001508>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- MOUSSET, A.; LECORGNE, E.; BOURGET, I.; LOPEZ, P.; JENOVAI, K.; CHERFILS-VICINI, J.; DOMINICI, C.; RIOS, G.; GIRARD-RIBOULLEAU, C.; LIU, B.; SPECTOR, D. L.; EHMSSEN, S.; RENAULT, S.; HEGO, C.; MECHTA-GRIGORIOU, F.; BIDARD, F. C.; TERP, M. G.; EGEblad, M.; GAGGIOLI, C.; ALBRENGUES, J. Neutrophil extracellular traps formed during chemotherapy confer treatment resistance via TGF- β activation. *Cancer Cell*, v. 41, n. 4, p. 757–775.e10, Apr. 2023. DOI: [10.1016/j.ccell.2023.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.03.008). Acesso em: 25 jul. 2025.
- NAGANO, M.; HOSHINO, D.; KOSHIKAWA, N.; AKIZAWA, T.; SEIKI, M. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International Journal of Cell*

- Biology, [S.I.], v. 2012, art. no. 310616, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/310616>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- NAJM, A. A. K.; AZFARALARIFF, A.; DYARI, H. R. E.; OTHMAN, B. A.; SHAHID, M.; LAW, D.; ALWI, S. S. S.; FARZY, S. Anti-breast cancer synthetic peptides derived from the Anabas testudineus skin mucus fractions. *Scientific Reports*, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 23182, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02007-6>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- NEOPHYTOU, C. M.; PANAGI, M.; STYLIANOPOULOS, T.; PAPAGEORGIS, P. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel)*, v. 13, n. 9, p. 2053, 2021. DOI: 10.3390/cancers13092053. Acesso em: 18 jul. 2024.
- NIH IMAGEJ. ImageJ/Fiji – Image Processing and Analysis in Java. Bethesda, MD: U.S. National Institutes of Health. Disponível em: <https://imagej.net/software/fiji/>. Acesso em: 04 jun. 2025.
- NILAND, S.; RISCANEVO, A. X.; EBLE, J. A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 1, p. 146, 23 dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23010146>. Acesso em: 18 jul. 2024.
- NILAND, Stephan; EBLE, Johannes A. Decoding the MMP14 integrin link: Key player in the secretome landscape. *Matrix Biology*, [S.I.], v. 136, p. 36-51, abr. 2025. DOI: 10.1016/j.matbio.2025.01.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2025.01.004>. Acesso em: 25 set. 2025.
- PAHWA, S.; STAWIKOWSKI, M. J.; FIELDS, G. B. Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer progression. *Cancers*, v. 6, n. 1, p. 416-435, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers6010416>. Acesso em: 25 set. 2025.
- PARK, H.-J.; HELFMAN, D. M. Up-regulated fibronectin in 3D culture facilitates spreading of triple-negative breast cancer cells on 2D through integrin β -5 and Src. *Scientific Reports*, v. 9, art. 19950, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56276-3>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- PARSONS, J.; HORWITZ, A.; SCHWARTZ, M. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 11, p. 633–643, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2957>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- POWERS, J. P.; TAN, A.; RAMAMOORTHY, A.; HANCOCK, R. E. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*, v. 44, n. 47, p. 15504–15513, Nov. 2005. DOI: 10.1021/bi051302m. Acesso em: 18 jul. 2024.
- QU, B.; YUAN, J.; LIU, X.; ZHANG, S.; MA, X.; LU, L. Anticancer activities of natural antimicrobial peptides from animals. *Frontiers in Microbiology*, [S.I.], v. 14, art. 1321386, 17 jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1321386>. Acesso em: 23 jul. 2025.

- RAMOS, G. de O.; BERNARDI, L.; LAUXEN, I.; SANT'ANA FILHO, M.; HORWITZ, A. R.; LAMERS, M. L. Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, [S.l.], v. 11, n. 3, p. e0151338, 15 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151338>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- RAZAK, N. A. *et al.* Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Scientific Reports*, [S.l.], v. 9, p. 1514, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37796-w>. Acesso em: 8 jul. 2025.
- REIS, P. V. M. *et al.* Synthetic peptides derived from *Lycosa erythrognatha* venom: interaction with phospholipid membranes and activity against resistant bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 680940, 2021. DOI: [10.3389/fmolb.2021.680940](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.680940).
- REIS, P. V. M.; BOFF, D.; VERLY, R. M.; MELO-BRAGA, M. N.; CORTÉS, M. E.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; AMARAL, F. A.; RESENDE, J. M.; DE LIMA, M. E. LyeTxI-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, shows potent antibiotic activity in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 667, Apr. 2018. DOI: [10.3389/fmicb.2018.00667](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00667). Acesso em: 25 jul. 2024.
- REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 36, n. 9, p. 1481–1507, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1177/0271678X16655551>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- RIPAMONTI, M.; WEHRLE-HALLER, B.; DE CURTIS, I. Paxillin: A hub for mechano-transduction from the β_3 integrin-talin-kindlin axis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, art. 852016, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852016>. Acesso em: 7 set. 2025.
- SANI, M. A.; SEPAROVIC, F. How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of Chemical Research*, v. 49, n. 6, p. 1130–1138, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00074>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- SANTOS, D. M.; VERLY, R. M.; PILÓ-VELOSO, D.; DE MARIA, M.; DE CARVALHO, M. A.; CISALPINO, P. S.; SOARES, B. M.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, D. F.; FRÉZARD, F.; BEMQUERER, M. P.; PIMENTA, A. M.; DE LIMA, M. E. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids*, v. 39, n. 1, p. 135–144, Jun. 2010. DOI: [10.1007/s00726-009-0385-x](https://doi.org/10.1007/s00726-009-0385-x). Acesso em: 20 jul. 2024.
- SCHERBAKOV, A. M. *et al.* Targeting hormone-resistant breast cancer cells with docetaxel: a look inside the resistance. *Cancer Drug Resistance*, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 103-115, 7 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.96>. Acesso em: 21 jul. 2025.

- SCHERBAKOV, A. M.; BASHARINA, A. A.; SOROKIN, D. V.; MIKHAEVICH, E. I.; MIZAEVA, I. E.; MIKHAYLOVA, A. L.; BOGUSH, T. A.; KRASIL'NIKOV, M. A. Targeting hormone-resistant breast cancer cells with docetaxel: a look inside the resistance. *Cancer Drug Resistance*, v. 6, n. 1, p. 103-115, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.96>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- SCHERBAKOV, A.; BASHARINA, A.; SOROKIN, D.; MIKHAEVICH, E.; MIZAEVA, I.; MIKHAYLOVA, A.; BOGUSH, T.; KRASIL'NIKOV, M. Targeting hormone-resistant breast cancer cells with docetaxel: a look inside the resistance. *Cancer Drug Resistance*, v. 6, p. 103-115, 2023. DOI: [10.20517/cdr.2022.96](https://doi.org/10.20517/cdr.2022.96). Acesso em: 23 ago. 2025.
- SELVARATHINAM, K. *et al.* Wnt signaling pathway collapse upon β -catenin destruction by a novel antimicrobial peptide SKACP003: unveiling the molecular mechanism and genetic activities using breast cancer cell lines. *Molecules*, Basel, v. 28, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28030930>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- SHAKERY, T.; SAFARI, F. Downregulation of Pinkbar/pAKT and MMP2/MMP9 expression in MDA-MB-231 breast cancer cells as potential targets in cancer therapy by hAMSCs secretome. *Cells Tissues Organs*, v. 212, n. 2, p. 155–163, 2023. DOI: [10.1159/000520370](https://doi.org/10.1159/000520370). Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000520370>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- SHEIKHPOUR, E.; NOORBAKHS, P.; FOROUGH, E.; FARAHNAK, S.; NASIRI, R.; NEAMATZADEH, H. A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: a narrative. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, v. 7, n. 1, p. 30–37, Oct. 2018. Acesso em 13 abr 2024.
- SHEN, H. *et al.* Spider peptide toxin lycosin-I induces apoptosis and inhibits migration of prostate cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 243, n. 8, p. 725–735, May 2018. DOI: [10.1177/1535370218772802](https://doi.org/10.1177/1535370218772802). Acesso em: 15 jul. 2025
- SHI, Y.; NIKULENKOV, F.; ZAWACKA-PANKAU, J.; LI, H.; GABDOULLINE, R.; XU, J.; ERIKSSON, S.; HEDSTRÖM, E.; ISSAEVA, N.; KEL, A.; ARNÉR, E. S.; SELIVANOVA, G. ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, v. 21, n. 4, p. 612-623, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.186>. Acesso em: 15 set. 2025.
- SHOARI, A.; COBAN, M. A.; HOCKLA, A.; REZHDO, A.; DIMESA, A. M.; RAEESZEH-SARMAZDEH, M.; VAN DEVENTER, J. A.; RADISKY, E. S. Directed evolution of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 for selective inhibition of MMP-9 exploits catalytic and fibronectin domain interactions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 301, n. 6, art. 110258, jun. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110258>. Acesso em: 15 set. 2025.
- SOARES, S.; LOPES, K. S.; MORTARI, M.; OLIVEIRA, H.; BASTOS, V. Antitumoral potential of Chartergellus-CP1 peptide from Chartergellus communis wasp venom in two different breast cancer cell lines (HR+ and triple-negative).

- Toxicon, [S.l.], v. 216, p. 148–156, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.07.004>. Acesso em: 8 jul. 2025.
- SOLEIMANIFAR, H. *et al.* The anti adhesion effect of nisin as a robust lantibiotic on the colorectal cancer cells. *Advanced Biomedical Research*, [S.l.], v. 12, art. 113, 28 abr. 2023. DOI: https://doi.org/10.4103/abr.abr_267_21. Acesso em: 10 jul. 2025.
- SON, S.; MORONEY, G. J.; BUTLER, P. J. β_1 -Integrin-Mediated Adhesion Is Lipid-Bilayer Dependent. *Biophysical Journal*, v. 113, n. 5, p. 1080-1092, set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.010>. Acesso em: 19 set. 2025.
- SU, C.-Y.; LI, J.-Q.; ZHANG, L.-L.; WANG, H.; WANG, F.-H.; TAO, Y.-W.; WANG, Y.-Q.; GUO, Q.-R.; LI, J.-J.; LIU, Y.; YAN, Y.-Y.; ZHANG, J.-Y. The biological functions and clinical applications of integrins in cancers. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, art. 579068, Sept. 2020. DOI: [10.3389/fphar.2020.579068](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.579068). Acesso em: 23 ago. 2025.
- SUNG, H. *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, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- SWAMINATHAN, V.; MYTHREYE, K.; O'BRIEN, E. T.; BERCHUCK, A.; BLOBE, G. C.; SUPERFINE, R. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Research*, v. 71, n. 15, p. 5075–5080, 1 ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0247>. Acesso em: 7 set. 2025.
- TAHERIAN, A.; LI, X.; LIU, Y.; HAAS, T. A. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 11, p. 293, Jul. 2011. DOI: [10.1186/1471-2407-11-293](https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-293). Acesso em 12 jan. 2025.
- TAHERIAN, A.; LI, X.; LIU, Y.; HAAS, T. A. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 11, art. 293, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-293>. Acesso em: 25 jul. 2025.
- TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. *Genome Biology*, v. 8, n. 5, p. 215, 2007. DOI: [10.1186/gb-2007-8-5-215](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215). Acesso em 11 jan. 2025.
- TELEB, W. K.; TANTAWY, M. A.; XU, X.; *et al.* Cytotoxicity and molecular alterations induced by scorpion venom antimicrobial peptide Smp43 in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, [S.l.], v. 29, n. 8, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10474-2>. Acesso em: 8 jul. 2025.
- THOMAS, S.; REISMAN, D. Localization of a mutant p53 response element on the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 promoter: mutant p53 activities are distinct from wild-type. *Cancer Letters*, v. 240, n. 1, p. 48-59, ago. 2006.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.027>. Acesso em: 15 set. 2025.

- TIAN, W. *et al.* Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39. *Oncology Reports*, [S.l.], v. 28, n. 4, p. 1362–1368, out. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2012.1911>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- TOLOS, A. M.; MOISA, C.; DOCHIA, M.; POPA, C.; COPOLOVICI, L.; COPOLOVICI, D. M. Anticancer potential of antimicrobial peptides: focus on buforins. *Polymers*, Basel, v. 16, n. 6, p. 728, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym16060728>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. In: MIESTYČ, I. (org.). *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2012. v. 878, p. 121-135. DOI: 10.1007/978-1-61779-854-2_8. Acesso em: 5 jul. 2024.
- VIEIRA, A. P. G. C. *et al.* The Synthetic Peptide LyeTx I mnΔK, Derived from *Lycosa erythrognatha* Spider Toxin, Is Active against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) In Vitro and In Vivo. *Antibiotics*, v. 13, n. 3, p. 248, 2024. DOI: 10.3390/antibiotics13030248. Acesso em: 3 jun. 2024.
- WAN, X.; HOU, J.; LIU, S.; ZHANG, Y.; LI, W.; ZHANG, Y.; *et al.* Estrogen Receptor α Mediates Doxorubicin Sensitivity in Breast Cancer Cells by Regulating E Cadherin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S.l.], v. 9, 4 fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.583572>. Acesso em: 8 jul. 2025.
- WANG, C.; HUANG, S. Drug development against metastatic cancers. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 90, n. 1, p. 119-123, Mar. 2017. Acesso em 12 fev. 2024.
- WANG, C.; SHEN, N.; GUO, Q.; TAN, X.; HE, S. YAP/STAT3 inhibited CD8⁺ T cells activity in the breast cancer immune microenvironment by inducing M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer Medicine*, v. 12, n. 15, p. 16295–16309, Aug. 2023. DOI: 10.1002/cam4.6242. Acesso em 10 jan. 2025.
- WANG, K. F.; NAGARAJAN, R.; MELLO, C. M.; CAMESANO, T. A. Characterization of supported lipid bilayer disruption by Chrysopsin 3 using QCM D. *The Journal of Physical Chemistry B*, [S.l.], v. 115, n. 51, p. 15228–15235, 29 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp209658y>. Acesso em: 25 jul. 2025
- WEGENER, K. L.; CAMPBELL, I. D. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (Review). *Molecular Membrane Biology*, v. 25, n. 5, p. 376–387, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/09687680802269886>. Acesso em: 7 set. 2025.

- WU, X.; GAN, B.; YOO, Y.; GUAN, J.-L. FAK-mediated Src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Developmental Cell*, v. 9, n. 2, p. 185-196, ago. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.006>. Acesso em: 15 set. 2025.
- XU, J.; GAO, F.; LIU, W.; GUAN, X. Cell-cell communication characteristics in breast cancer metastasis. *Cell Communication and Signaling*, v. 22, art. 55, Jan. 2024. DOI: [10.1186/s12964-023-01418-4](https://doi.org/10.1186/s12964-023-01418-4). Acesso em 20 ago. 2025.
- YADAV, S. S.; PRASAD, C. B.; PRASAD, S. B.; PANDEY, L. K.; SINGH, S.; PRADHAN, S.; *et al.* Anti-tumor activity of staurosporine in the tumor microenvironment of cervical cancer: an in vitro study. *Life Sciences*, v. 133, p. 21–28, 2015. DOI: [10.1016/j.lfs.2015.04.019](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.019). Acesso em 10 abr. 2025.
- YAMAGUCHI, N.; KNAUT, H. Focal adhesion-mediated cell anchoring and migration: from in vitro to in vivo. *Development*, v. 149, n. 10, p. dev200647, 15 maio 2022. DOI: [10.1242/dev.200647](https://doi.org/10.1242/dev.200647). Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.200647>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- YOUSEF, E. M.; TAHIR, M. R.; ST-PIERRE, Y.; GABOURY, L. A. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, v. 14, p. 609, Aug. 2014. DOI: [10.1186/1471-2407-14-609](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-609). Acesso em 13 abr. 2024.
- ZARE ZARDINI, H.; SABERIAN, E.; JENČA, A.; GHANIPOUR MEYBODI, R.; JENČA, A.; PETRÁŠOVÁ, A.; JENČOVÁ, J. From defense to offense: antimicrobial peptides as promising therapeutics for cancer. *Frontiers in Oncology*, [S.l.], v. 14, art. 1463088, 9 out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1463088>. Acesso em: 16 jul. 2025.
- ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 38, p. 35714–35722, Sep. 2001. DOI: [10.1074/jbc.M104925200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104925200). Acesso em: 18 jul. 2024.
- ZHANG, X.; CHAN, T.; MAK, M. Morphodynamic signatures of MDA-MB-231 single cells and cell doublets undergoing invasion in confined microenvironments. *Scientific Reports*, v. 11, art. 6529, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85640-5>. Acesso em: 7 set. 2025.

APÊNDICE A - Interação de LyeTxl-b com a subunidade β da integrina $\beta 1$

```
/tmp/ipython-input-1625460541.py:117: DeprecationWarning:
datetime.datetime.utcnow() is deprecated and scheduled for removal in a future
version. Use timezone-aware objects to represent datetimes in UTC:
datetime.datetime.now(datetime.UTC).
```

```
% datetime.datetime.utcnow().strftime('%Y-%m-%d')
```

```
INFO: __main__: Starting prediction on 2025-12-11 UTC time
```

```
INFO: __main__: Installing ColabFold on Google Colab virtual machine.
```

```
Installing Conda
```

```
Installing OpenMM
```

```
Using Tesla T4 graphics processor
```

```
Downloading alphafold2_multimer_v3 weights to .: 100% ██████████
3.82G/3.82G [00:41<00:00, 99.5MB/s]
```

```
2025-12-11 21:24:21,057 Running on GPU
```

```
2025-12-11 21:24:21,526 Found 6 citations for tools or databases
```

```
2025-12-11 21:24:21,526 Query 1/1: af47 (length 47)
```

```
COMPLETE: 100% ██████████ 300/300 [elapsed: 00:01 remaining:
00:00]
```

```
COMPLETE: 100% ██████████ 300/300 [elapsed: 00:01 remaining:
00:00]
```

```
2025-12-11 21:24:24,188 Setting max_seq=107, max_extra_seq=1
```

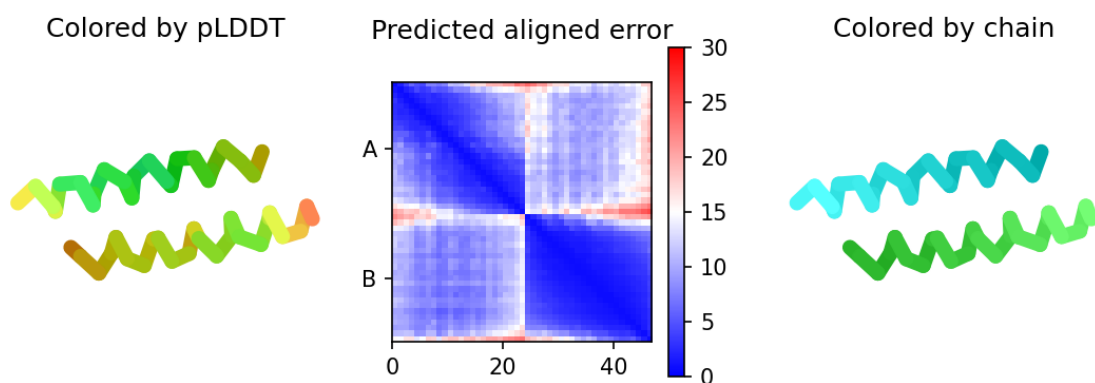
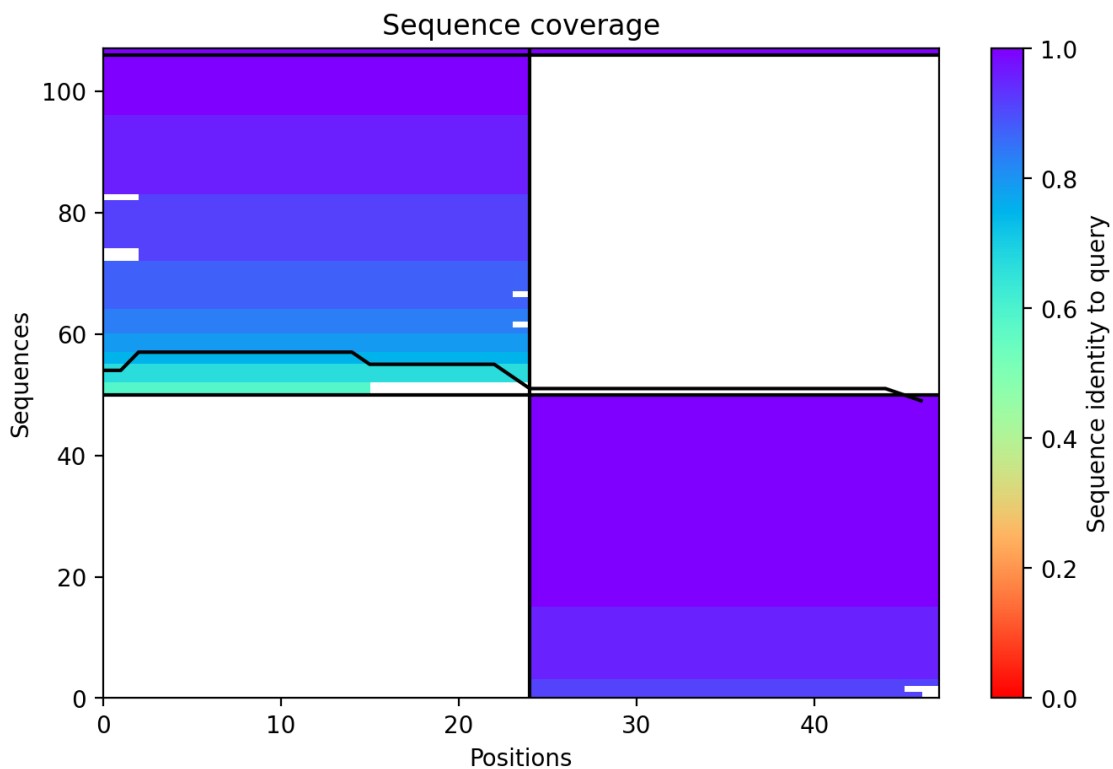
```
2025-12-11 21:25:07,777 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000
recycle=0 pLDDT=58.2 pTM=0.325 ipTM=0.0716
```

```
2025-12-11 21:25:08,660 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000
recycle=1 pLDDT=61.1 pTM=0.345 ipTM=0.103 tol=1.18
```

```
2025-12-11 21:25:09,545 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000
recycle=2 pLDDT=64.2 pTM=0.375 ipTM=0.148 tol=0.907
```

```
2025-12-11 21:25:10,434 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000
recycle=3 pLDDT=65.1 pTM=0.394 ipTM=0.169 tol=0.341
```

```
2025-12-11 21:25:10,435 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 took
39.2s (3 recycles)
```

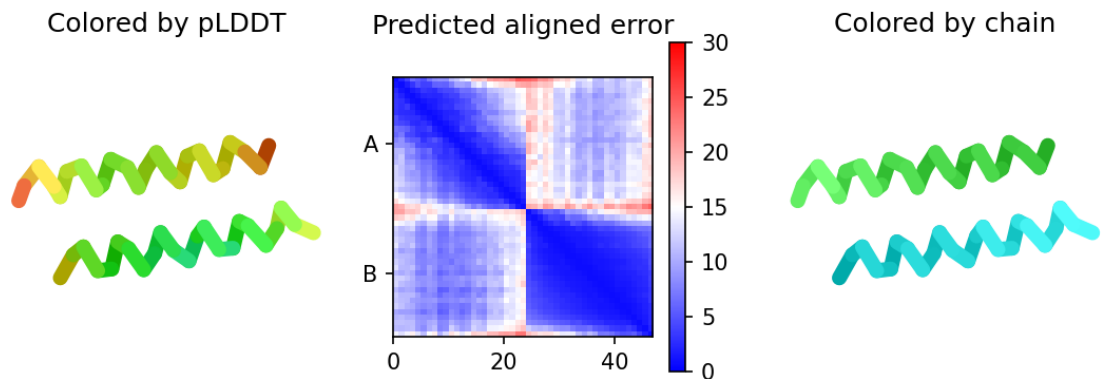


2025-12-11 21:25:12,000 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=0 pLDDT=60.2 pTM=0.333 ipTM=0.0713

2025-12-11 21:25:12,876 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=1 pLDDT=62.8 pTM=0.368 ipTM=0.116 tol=1.31

2025-12-11 21:25:13,754 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=2 pLDDT=65.9 pTM=0.394 ipTM=0.159 tol=0.368

2025-12-11 21:25:13,754 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000 took
 2.6s (2 recycles)

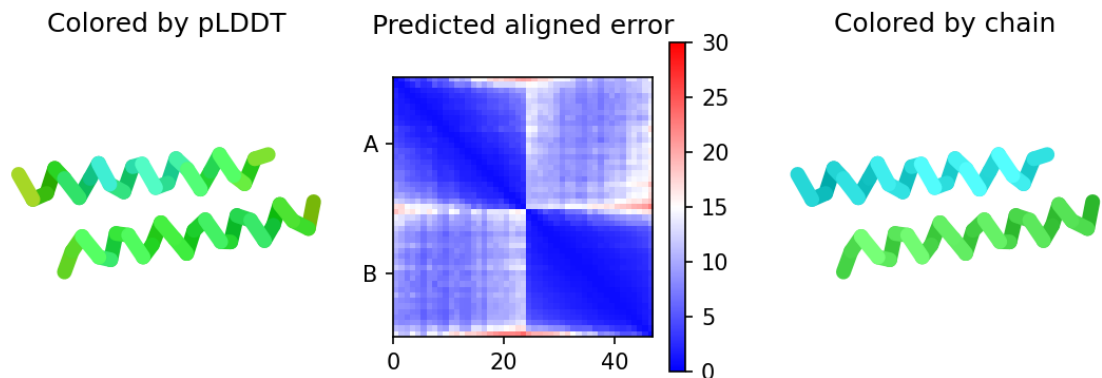


2025-12-11 21:25:14,853 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=0 pLDDT=66.3 pTM=0.383 ipTM=0.103

2025-12-11 21:25:15,731 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=1 pLDDT=69.5 pTM=0.41 ipTM=0.143 tol=0.682

2025-12-11 21:25:16,609 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=2 pLDDT=72.1 pTM=0.435 ipTM=0.186 tol=0.245

2025-12-11 21:25:16,610 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000 took
 2.6s (2 recycles)

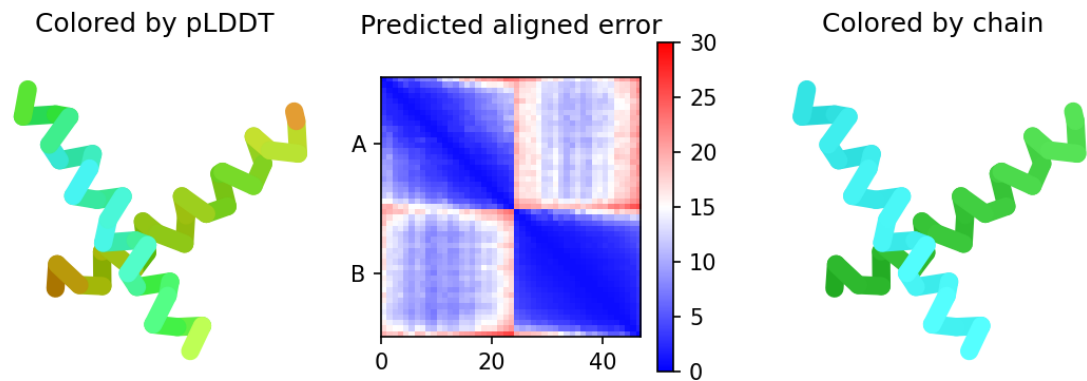


2025-12-11 21:25:17,704 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=0 pLDDT=63.7 pTM=0.382 ipTM=0.0992

2025-12-11 21:25:18,582 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=1 pLDDT=67.9 pTM=0.39 ipTM=0.11 tol=0.575

2025-12-11 21:25:19,463 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=2 pLDDT=68.9 pTM=0.397 ipTM=0.12 tol=0.309

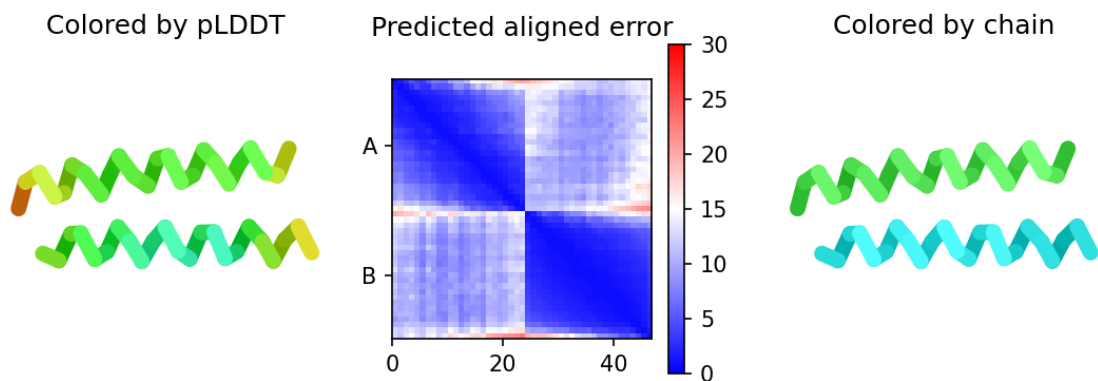
2025-12-11 21:25:19,464 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000 took
 2.6s (2 recycles)



2025-12-11 21:25:20,564 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000
 recycle=0 pLDDT=66.8 pTM=0.391 ipTM=0.117

2025-12-11 21:25:21,451 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000
 recycle=1 pLDDT=69.1 pTM=0.417 ipTM=0.153 tol=0.411

2025-12-11 21:25:21,452 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000 took
 1.8s (1 recycles)



2025-12-11 21:25:21,720 reranking models by 'multimer' metric

2025-12-11 21:25:32,281 Relaxation took 10.6s

2025-12-11 21:25:32,282

rank_001_alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000 pLDDT=72.1 pTM=0.435
 ipTM=0.186

2025-12-11 21:25:34,477 Relaxation took 2.2s

2025-12-11 21:25:34,478

rank_002_alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 pLDDT=65.1 pTM=0.394
 ipTM=0.169

2025-12-11 21:25:37,358 Relaxation took 2.9s

2025-12-11 21:25:37,359

rank_003_alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000 pLDDT=65.9 pTM=0.394
 ipTM=0.159

2025-12-11 21:25:39,197 Relaxation took 1.8s

2025-12-11 21:25:39,198

rank_004_alphaFold2_multimer_v3_model_5_seed_000 pLDDT=69.1 pTM=0.417
ipTM=0.153

2025-12-11 21:25:41,044 Relaxation took 1.8s

2025-12-11 21:25:41,044

rank_005_alphaFold2_multimer_v3_model_4_seed_000 pLDDT=68.9 pTM=0.397
ipTM=0.12

2025-12-11 21:25:41,895 Done

Downloading structure predictions to directory
Downloads/ChimeraX/AlphaFold

APÊNDICE B - Interação de LyeTxImnK com a subunidade β da integrina β 1

/tmp/ipython-input-583089367.py:117: DeprecationWarning: datetime.datetime.utcnow() is deprecated and scheduled for removal in a future version. Use timezone-aware objects to represent datetimes in UTC: datetime.datetime.now(datetime.UTC).

```
% datetime.datetime.utcnow().strftime('%Y-%m-%d')
```

Using Tesla T4 graphics processor

2025-12-11 21:43:42,366 Running on GPU

2025-12-11 21:43:42,369 Found 5 citations for tools or databases

2025-12-11 21:43:42,369 Query 1/1: af39 (length 39)

PENDING: 0%| | 0/300 [elapsed: 00:00 remaining: ?]

2025-12-11 21:43:42,904 Sleeping for 5s. Reason: PENDING

COMPLETE: 100%|██████████| 300/300 [elapsed: 00:06 remaining: 00:00]

PENDING: 0%| | 0/300 [elapsed: 00:00 remaining: ?]

2025-12-11 21:43:49,679 Sleeping for 10s. Reason: PENDING

COMPLETE: 100%|██████████| 300/300 [elapsed: 00:11 remaining: 00:00]

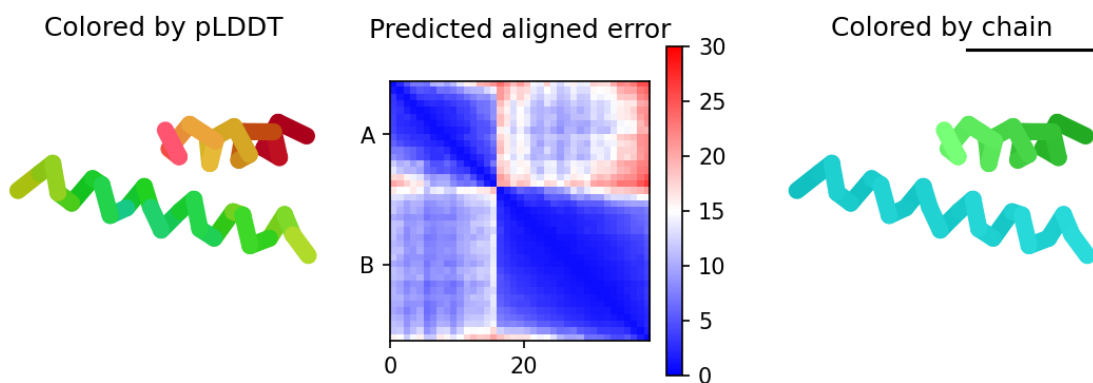
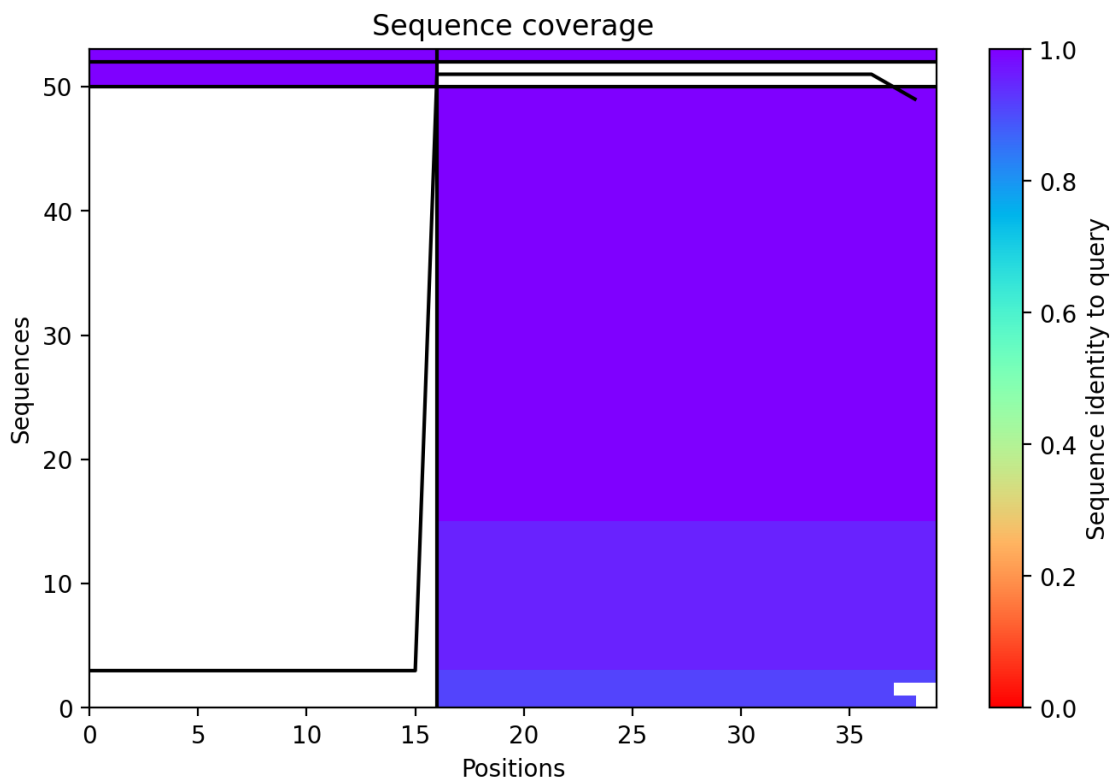
2025-12-11 21:44:01,136 Setting max_seq=53, max_extra_seq=1

2025-12-11 21:44:45,316 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 recycle=0 pLDDT=62.1 pTM=0.368 ipTM=0.0817

2025-12-11 21:44:45,858 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 recycle=1 pLDDT=62.6 pTM=0.377 ipTM=0.0972 tol=0.524

2025-12-11 21:44:46,404 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 recycle=2 pLDDT=63 pTM=0.381 ipTM=0.109 tol=0.168

2025-12-11 21:44:46,405 alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 took 38.0s (2 recycles)

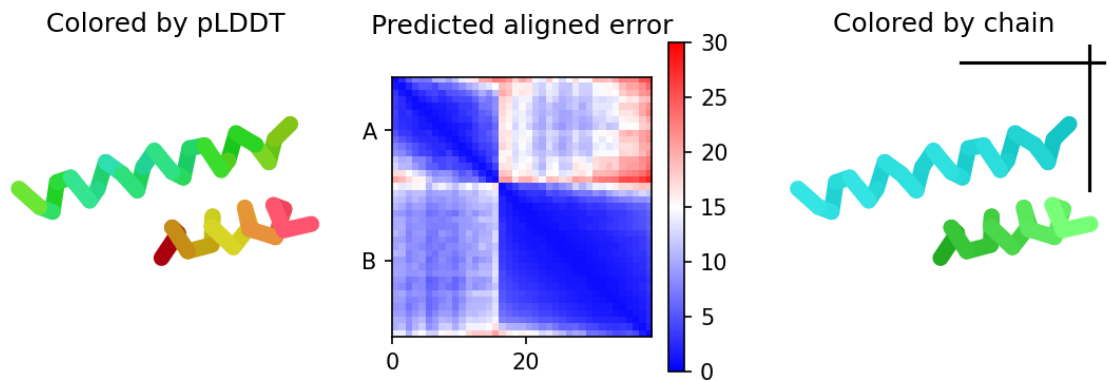


2025-12-11 21:44:47,716 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=0 pLDDT=64.6 pTM=0.371 ipTM=0.0962

2025-12-11 21:44:48,261 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=1 pLDDT=65.1 pTM=0.384 ipTM=0.109 tol=0.508

2025-12-11 21:44:48,806 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000
 recycle=2 pLDDT=65.4 pTM=0.391 ipTM=0.123 tol=0.178

2025-12-11 21:44:48,806 alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000 took
 1.6s (2 recycles)

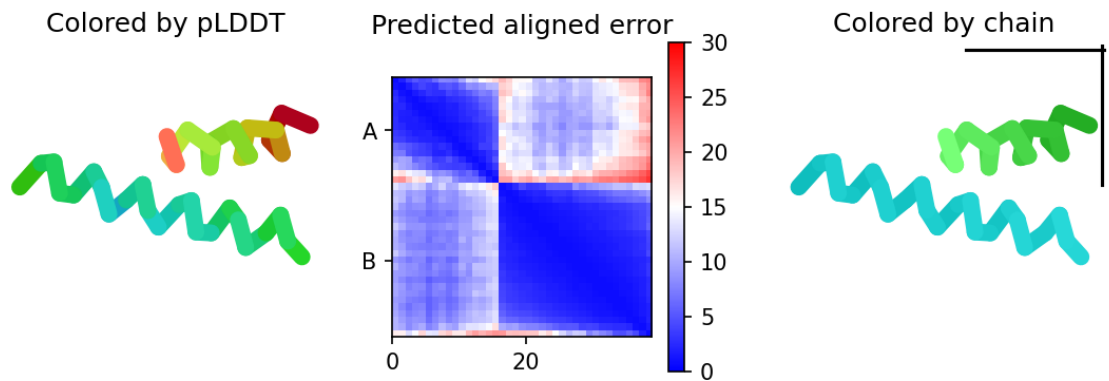


2025-12-11 21:44:49,561 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=0 pLDDT=67.9 pTM=0.412 ipTM=0.0922

2025-12-11 21:44:50,106 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=1 pLDDT=68.6 pTM=0.422 ipTM=0.11 tol=0.678

2025-12-11 21:44:50,651 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000
 recycle=2 pLDDT=69.4 pTM=0.429 ipTM=0.127 tol=0.143

2025-12-11 21:44:50,651 alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000 took
 1.6s (2 recycles)

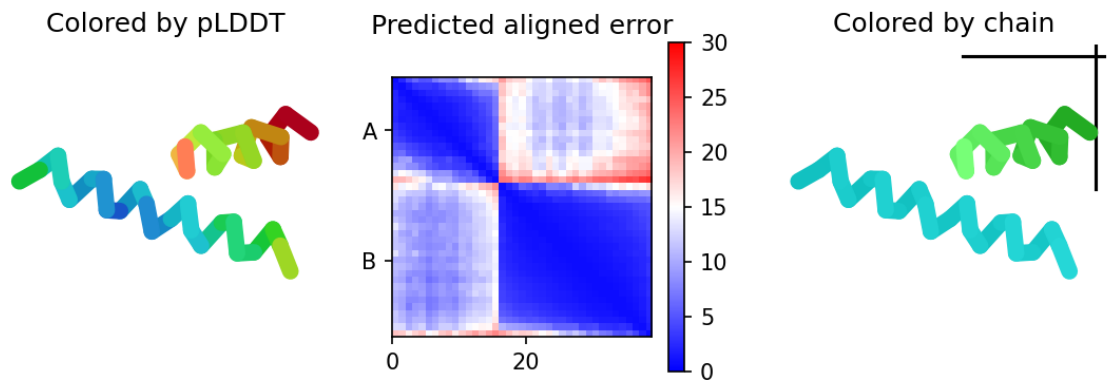


2025-12-11 21:44:51,398 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=0 pLDDT=69.3 pTM=0.411 ipTM=0.0916

2025-12-11 21:44:51,942 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=1 pLDDT=70.7 pTM=0.419 ipTM=0.0995 tol=0.646

2025-12-11 21:44:52,486 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000
 recycle=2 pLDDT=70.6 pTM=0.421 ipTM=0.108 tol=0.182

2025-12-11 21:44:52,487 alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000 took
 1.6s (2 recycles)

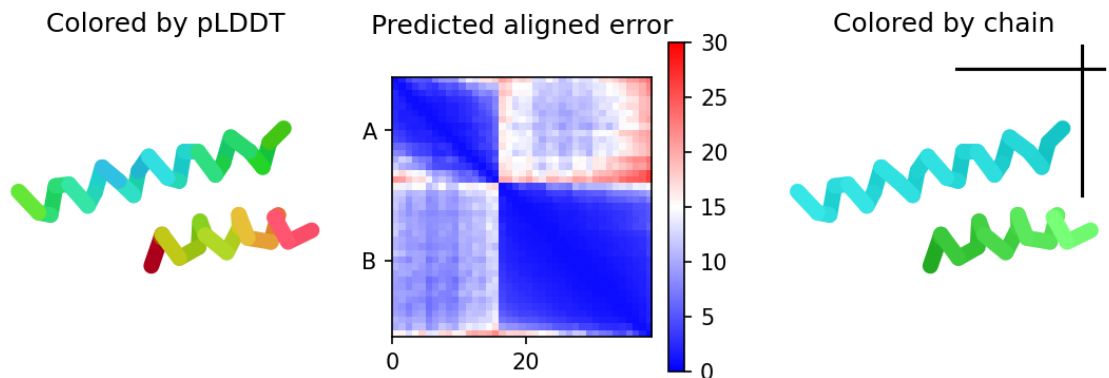


2025-12-11 21:44:53,228 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000
 recycle=0 pLDDT=68.9 pTM=0.417 ipTM=0.1

2025-12-11 21:44:53,772 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000
 recycle=1 pLDDT=68.2 pTM=0.424 ipTM=0.111 tol=0.562

2025-12-11 21:44:54,317 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000
 recycle=2 pLDDT=68.6 pTM=0.429 ipTM=0.122 tol=0.191

2025-12-11 21:44:54,317 alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000 took
 1.6s (2 recycles)



2025-12-11 21:44:54,523 reranking models by 'multimer' metric

2025-12-11 21:44:54,523
 rank_001_alphafold2_multimer_v3_model_3_seed_000 pLDDT=69.4 pTM=0.429
 ipTM=0.127

2025-12-11 21:44:54,524
 rank_002_alphafold2_multimer_v3_model_5_seed_000 pLDDT=68.6 pTM=0.429
 ipTM=0.122

2025-12-11 21:44:54,524
 rank_003_alphafold2_multimer_v3_model_2_seed_000 pLDDT=65.4 pTM=0.391
 ipTM=0.123

2025-12-11 21:44:54,525
rank_004_alphafold2_multimer_v3_model_4_seed_000 pLDDT=70.6 pTM=0.421
ipTM=0.108

2025-12-11 21:44:54,525
rank_005_alphafold2_multimer_v3_model_1_seed_000 pLDDT=63 pTM=0.381
ipTM=0.109

2025-12-11 21:44:55,369 Done

Downloading structure predictions to directory
Downloads/ChimeraX/AlphaFold