

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Tese de Doutorado

Joaquim Teixeira de Avelar Júnior

Avaliação das atividades antimicrobiana e
citotóxica de peptídeos derivados do
veneno do anuro *Pithecopus megacephalus*
e da peçonha da aranha *Lycosa*
erythrognatha.

Belo Horizonte MG - Brasil
Outubro - 2019

Joaquim Teixeira de Avelar Júnior

Avaliação das atividades antimicrobiana e
citotóxica de peptídeos derivados do
veneno do anuro *Pithecopus megacephalus*
e da peçonha da aranha *Lycosa*
erythrognatha.

Tese apresentada à Universidade Federal de
Minas Gerais, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Imunologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Souza-Fagundes
e Dr^a. Raquel Gouvêa dos Santos

Belo Horizonte MG - Brasil
Outubro - 2019

043

Avelar Júnior, Joaquim Teixeira de.

Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de peptídeos derivados do veneno do anuro *Pithecopus megacephalus* e da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha* [manuscrito] / Joaquim Teixeira de Avelar Júnior. – 2019.

191 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia. Coorientadoras: Profa. Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes e Dra. Raquel Gouvêa dos Santos.

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

1. Peptídeos. 2. Aranhas. 3. Venenos de Aranha. 4. Anuros. 5. Venenos. I. Garcia, Maria Elena de Lima Perez. II. Souza-Fagundes, Elaine Maria. III. Santos, Raquel Gouvêa dos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JOAQUIM TEIXEIRA DE AVELAR JÚNIOR. Aos vinte e oito dias do mês de outubro de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "'Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de peptídeos derivados do veneno do anuro *Pithecopus megacephalus* e da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Renata Toscano Simões (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa - BH), aprovado; Dr. Mariana de Souza Castro (Universidade de Brasília), aprovado; Dr. Miriam Teresa Paz Lopes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Glória Regina Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Maria Elena de Lima Perez Garcia - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

☒ APROVADO
☐ REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de outubro de 2019.

Dr. Renata Toscano Simões (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa - BH)

Dr. Mariana de Souza Castro (Universidade de Brasília)

Dr. Miriam Teresa Paz Lopes (UFMG)

Dr. Glória Regina Franco (UFMG)

Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes - Coorientadora (UFMG)

Dr. Maria Elena de Lima Perez Garcia - Orientadora (UFMG)

Prof. Leda Quêrcia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Este projeto foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Elena de Lima Perez Garcia e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais sob coorientação da Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes.

APOIO FINANCEIRO:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES:

- Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Souza-Fagundes - UFMG
- Prof^a. Dr.^a Raquel Gouvêa dos Santos - CDTN
- Dr. Célio José de Castro Júnior - Santa Casa - BH
- Prof^a. Dr.^a Paula Cabral Eterovick - PUC-Minas
- Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende - UFMG
- Dr.^a Márcia Helena Borges - FUNED
- Prof. Dr. Luiz Macêdo Farias - UFMG
- Prof^a. Dr.^a Paula Prazeres Magalhães - UFMG
- Dr.^a Marie-France Martin-Eauclaire - Aix Marseille University
- Dr. Pierre Edouard Bougis - Aix Marseille University
- Dr. Pascal Mansuelle - Protéomique -IBiSA
- Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta UFMG

Dedico a meu pai Joaquim (*In memoriam*) e a minha mãe Terezinha

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças, conhecimento e me sustentado nestes quatro anos de trabalho.

Agradeço a minha mãe Terezinha por sempre ter me apoiado, de todas as maneiras, a seguir meus objetivos.

Agradeço a minha orientadora Dr.^a Maria Elena de Lima Perez Garcia pela oportunidade de trabalho na toxinologia, bem como as minhas coorientadoras Dr.^a Elaine Maria Souza-Fagundes e Dr.^a Raquel Gouvêa dos Santos pelas oportunidades de trabalho e de aprendizado.

Aos colaboradores: Dr.^a Paula Eterovick e Juan Espanha que se dispuseram a realizar as coletas das *Pithecopus megacephalus*. Aos Drs. Luiz de Macêdo Farias, Paula Prazeres Magalhães, Márcia Helena Borges, Jarbas Magalhães Resende Vera Lúcia dos Santos, Adriano Pimenta e Célio José Castro Junior, pela disposição e colaboração para diversos experimentos e discussões.

Aos colaboradores: Natália Guimarães, Juliana Ribeiro e Edleusa Marques, pela ajuda na bancada com os experimentos e pelas discussões dos mesmos.

Aos meus alunos de IC Açucena Barroso e Artur Rates pela ajuda nos experimentos do capítulo 1.

Aos amigos que sempre ajudaram em discussões científicas, experimentos e, claro, nos momentos de descontração: Ana Cristina, Wesley, Júlio Brito, Jonas Ramos, Kamila Gomes, Daniel Nobre, Amanda Carvalho, Mariane Melo, Paulo Alexandre, Andrea Ferreira, Bárbara Santiago, Natália Pinheiro, Juliana Alves, Lídia Barbosa Leidiane Costa, Daniel Galdino, Diego Rodney e Thiago Geraldo.

Aos técnicos: Jamil Oliveira (LEFQP), Adriana Raabe (LMPROT), Daniele Reis (Citometria de Fluxo), Elimar Faria (sala das águas), Vítor (FUNED) e Júlio César (*In memoriam*) por auxiliarem nos trabalhos e com "aquele equipamento tão vital para o experimento"

Ao Orlando e Alexandre da secretaria do departamento.

À infraestrutura dos laboratórios multiusuários (CELAM) de proteoma (LMPROT) e de Citometria de Fluxo, onde o espectrometro de massas e o citômetro de fluxo foram respectivamente utilizados.

Aos Phd Marie-France Martin-Eauclaire, Pierre Bougis e Pascal Mansuelle, por terem me recebido no laboratório deles na França, "merci beaucoup"!

Aos membros da banca: Dr.^a Mariana de Souza Castro, Dr.^a Renata Toscano Simões, Dr.^a Miriam Teresa Paz Lopes, Dr.^a Glória Regina Franco, Dr.^a Maria José Neves e Dr. Carlos Chavez Olórtegui por atenderem ao nosso convite para contribuir com este trabalho.

E claro, não seria possível esquecer do povo brasileiro que, através dos impostos, custeou as bolsas e verbas para este e outros projetos. Portanto, agradeço a CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCTox.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto ilustrativa de uma amostra da escrita cuneiforme.	1
Figura 2: Mapa do centro do Oriente Médio.....	2
Figura 3: Estela mágica de Esatum	3
Figura 4 a: Pintura a óleo de Jacques-Louis David b: Desenho do busto de Hipócrates.	4
Figura 5: Imperador Carlos Magno	5
Figura 6: Cloreto de D-tubocurarina	6
Figura 7 a: Albert Calmette, b: Alexandre Yersin,.....	7
Figura 8 a: João Batista de Lacerda e b: Vital Brazil Mineiro da Campanha.	8
Figura 9 a: Dr. Carlos Ribeiro Diniz, b: Dr. Lineu Freire-Maia	10
Figura 10: <i>Phoneutria nigriventer</i>	10
Figura 11: Cladograma dos tetrapodas.....	11
Figura 12: Cladograma dos Lissanfíbios.....	12
Figura 13: Batracotoxinas	15
Figura 14 a: Indolizidina 235B e b: quinolizidina 1-epi-207I.....	16
Figura 15: a: Epibatidina e phantasmidina e b: tetrodotoxina e zetekitoxina.....	16
Figura 16: Estrutura de algumas aminas biogênicas	17
Figura 17: Estrutura de dois exemplos de aminas biogênicas.....	18
Figura 18: Estrutura básica dos compostos pertencentes a classe dos esteroides.	18
Figura 19: Exemplos de dois derivados esteróides	19
Figura 20: Estrutura da magainina-2 (PDB ID: 2MAG).....	24
Figura 21: Dr. Michael Zasloff	25
Figura 22: Sequências das magaininas 1 e 2	25
Figura 23: Estrutura obtida por RMN (PDB ID: 2K9B) de uma dermaseptina	27
Figura 24 a: Cladograma com os grupos atuais de artrópodes.....	30
Figura 25: a: Aranha <i>Lycosa erythrognatha</i> , b: Sequências de LyeTx I e LyeTx I-b.....	32
Figura 26: a: Estrutura do captopril. b: esquema tridimensional do peptídeo ziconotide.	33
Figura 27: a: Sequência da lunatina 1 e b: estrutura de RMN da mesma.....	34
Figura 28: Mecanismo de ação da cisplatina.....	37
Figura 29: Estrutura química de alguns quimioterápicos.	38
Figura 30: Diagrama apresentando uma população hipotética.....	40
Figura 31: Frequência de diferentes tipos de câncer em mulheres.....	41
Figura 32: Foto de <i>Pithecopus megacephalus</i>	45
Figura 33: Representação esquemática dos equipamentos MALDI-TOF	51
Figura 34: Reação de formação do anidrido simétrico.....	53
Figura 35: Cromatograma obtido pelo fracionamento da secreção.....	62
Figura 36: Espectros de massa referentes a todas as frações.....	63
Figura 37: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1223,57.....	66
Figura 38: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1240,67.....	67
Figura 39: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1555,00.....	68
Figura 40: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1700,84.....	69
Figura 41: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1788,11.....	70
Figura 42: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1854,98.....	71

Figura 43: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1910,98.....	72
Figura 44: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1902,01.....	73
Figura 45: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2048,26.....	74
Figura 46: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2057,16.....	75
Figura 47: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2115,26.....	76
Figura 48: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1700,87.....	77
Figura 49: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 706,36.....	78
Figura 50: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1930,07.....	79
Figura 51: Alinhamento entre nove dos peptídeos encontrados.....	81
Figura 52: Alinhamento dos nove peptídeos.....	82
Figura 53: Cromatograma da purificação do peptídeo 705	83
Figura 54: Cromatograma da purificação do peptídeo 1221	83
Figura 55: Cromatograma da purificação do peptídeo 1222	84
Figura 56: Espectros de massa dos peptídeos sintéticos pós purificação.....	85
Figura 57: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 705.....	86
Figura 58: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 1221	86
Figura 59: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 1222	87
Figura 60: Avaliação de atividade biológica dos peptídeos 705, 1221 e 1222.	89
Figura 61: Alinhamento Clustal	92
Figura 62: Alinhamento Clustal	93
Figura 63: Alinhamento Clustal	93
Figura 64: Alinhamento Clustal.	93
Figura 65: Alinhamento Clustal	94
Figura 66: Alinhamento Clustal	95
Figura 67: Exemplo de um isoblograma	107
Figura 68: a: Histograma representativo da análise do ciclo celular.....	109
Figura 69: Viabilidade das células MDA-MB-231.	115
Figura 70: Viabilidade das células MDA-MB-231	116
Figura 71: Variação do IC ₅₀	117
Figura 72: Curvas concentração dependentes.	119
Figura 73: Curvas concentração dependentes	122
Figura 74: Regressões lineares geradas pelos dados obtidos nas figuras 63.	123
Figura 75: Isobogramas gerados na concentração da IC ₅₀	124
Figura 76: a Histogramas representativos dos ciclos celulares	126
Figura 77: a: Histogramas representativos dos ciclos celulares.	128
Figura 78: Dotplots representativos da análise de células.....	130
Figura 79: Dotplots representativos da análise de células.....	131
Figura 80: Análise quantitativa de células MDA-MB-231.	132
Figura 81: Análise da fosforilação de AKT1 por <i>western blot</i>	133
Figura 82: Análise da fosforilação de ERK por <i>western blot</i>	134
Figura 83: Análise da expressão de P53 por <i>western blot</i>	135
Figura 84: Análise da expressão de P21 por <i>western blot</i> ,.....	136
Figura 85: Exemplos dos quatro mecanismos de morte.....	141
Figura 86: Algumas proteínas envolvidas nos <i>checkpoints</i>	144
Figure 1: Comparison of cytotoxicity.	181

Figure 2: Cell death evaluation (%).	181
Figure 3: IC ₅₀ isobolograms to each combined treatment	182
Figure 4: Cell cycle evaluation.....	183
Figure 5: Flow cytometry acid vacuolar organelles representative profiles.....	184
Figure 6: Acridine orange fluorescent stain quantification.	185
Figure 7: Effects of each treatment (in their respective IC ₅₀ values).	185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de peptídeos bioativos	22
Tabela 2: Exemplos de peptídeos antimicrobianos de anuros.....	28
Tabela 3: Descrição do gradiente utilizado na purificação da secreção bruta, em ÄKTA.....	49
Tabela 4: Descrição do gradiente utilizado na purificação do peptídeo sintético.....	56
Tabela 5: Peptídeos cujas sequências foram elucidadas por sequenciamento <i>de novo</i>	65
Tabela 6: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 37.	66
Tabela 7: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 38.	67
Tabela 8: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 39.	68
Tabela 9: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 40	69
Tabela 10: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 41	70
Tabela 11: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 42.	71
Tabela 12: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 43.	72
Tabela 13: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 44	73
Tabela 14: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 45.	74
Tabela 15: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 46.	75
Tabela 16: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 45.	76
Tabela 17: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 46.	77
Tabela 18: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 49.	78
Tabela 19: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 50.	80
Tabela 20: Concentrações usadas no experimento de triagem.....	103
Tabela 21: Combinações de diferentes concentrações.....	104
Tabela 22: Concentrações usadas no experimento.....	105
Tabela 23: Concentrações de cada um dos compostos usados para cada uma das proporções.	108
Tabela 24: Proteínas pesquisadas, suas respectivas massas aproximadas.....	112
Tabela 25: Valores de IC ₅₀ encontrados para os tratamentos isolados.....	117
Tabela 26: IC ₅₀ s dos tratamentos das células MDA-MB-231 e HEK-293.....	121
Tabela 27: Relação dos IC ₅₀ s e índices de seletividade	138

LISTA DE ABREVIATURAS:

AKT: Proteína cinase B	LRP1B "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B"
ANOVA: Análise de variância	LyeTx I-b: Sinônimo de LyeTx I-Des-His
APD: "Antimicrobial Peptide Database"	MALDI-TOF: Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de voo
ATCC: "American Type Culture Collection"	p/v: Peso por volume
ATG: Proteína relacionado com autofagia	P:C: Razão entre LyeTx1 Des-His e cisplatina
ATP: Trifosfato de adenosina	P21: Inibidor 1 de CDK
ATPase: Enzima hidrolizadora de ATP	P53: Supressor tumoral P53
AVOs: Organelas vesiculares ácidas	PAA: Peptídeo antimicrobiano de anuros
BAK1: Antagonista homólogo de Bcl-2	PDB: "Protein Data Bank"
Bcl-2: Regulador de apoptose Bcl-2	Pep-B: Sinônimo de "Lye LyeTx1 Des-His"
BLAST: "Basic Local Alignment Search Tool"	pH: Potencial hidrogeniônico
BRCA1: "Breast cancer type 1 susceptibility protein"	PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
ERK: Cinases reguladas por sinal extracelular	PSD: Decaimento pós-fonte
GTPase: Enzima hidrolizadora de trifosfato de guanosina	RasGAP: Proteína ativadora de Ras
IC ₅₀ : Concentração inibitória de 50%	GTPase
KDa: Quilodalton	ULK1/2: Serina/treonina-proteína cinase

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO DA TOXINOLOGIA.....	1
1.1.1. Histórico dos venenos e toxinas no Brasil.....	8
1.2. OS LISSAMFÍBIOS E A TOXINOLOGIA.....	11
1.2.1. Anuros e seus compostos bioativos.....	13
1.2.1.1. Alcaloides.....	14
1.2.1.2. Derivados esteroides.....	17
1.2.1.3. Peptídeos bioativos.....	18
1.2.1.4. Os peptídeos antimicrobianos de Anuros.....	22
1.3. OS ARACNÍDEOS E A TOXINOLOGIA.....	30
1.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS COMO MODELOS PARA NOVOS FÁRMACOS ANTICÂNCER.....	33
1.5. OS TRATAMENTOS PARA PACIENTES COM CÂNCER.....	36
1.5.1. Associação de fármacos como estratégias para terapia anticâncer.....	39
1.6. CÂNCER DE MAMA.....	41
2. JUSTIFICATIVA GERAL DO TRABALHO.....	43
3. OBJETIVOS CAPÍTULO I.....	47
3.1. OBJETIVO GERAL CAPÍTULO I.....	46
3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO I.....	46
4. MÉTODOS CAPÍTULO I.....	48
4.1. CAPTURA DOS ANUROS E PREPARO DA SECREÇÃO.....	48
4.2. FRACIONAMENTO DO "POOL" DE SECREÇÃO BRUTA.....	48
4.3. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	50
4.3.1. Análises dos componentes fracionados.....	50
4.3.2. Fragmentação de componentes de baixa massa (MS/MS).....	50
4.4. ANÁLISES DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS.....	52
4.5. SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA.....	52
4.5.1. Síntese de peptídeos com C-terminal carboxilado.....	53
4.5.2. Síntese de peptídeos com C-terminal amidado.....	55
4.6. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	56
4.7. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	57
4.8. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS.....	58

4.8.1. Linhagens celulares e estratégias de cultura utilizadas.....	58
4.8.2. Ensaio de citotoxicidade.....	59
5. RESULTADOS.....	61
5.1. FRACIONAMENTO DA SECREÇÃO BRUTA.....	61
5.2. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	63
5.2.1. Análises dos componentes fracionados.....	63
5.2.2. Fragmentação de componentes de baixa massa (MS/MS).....	64
5.3. ANÁLISES DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS.....	81
5.4. SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA.....	82
5.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	87
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS PEPTÍDEOS.....	88
6. DISCUSSÃO CAPÍTULO I.....	90
7. CONCLUSÕES CAPÍTULO I.....	99
8. OBJETIVOS CAPÍTULO II.....	101
8.1. OBJETIVO GERAL CAPÍTULO II.....	101
8.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO II.....	101
9. MÉTODOS.....	102
9.1. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR.....	102
9.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE LYETX I-DES-HIS E CISPLATINA.....	103
9.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA ASSOCIAÇÃO DE LYETX I- DES-HIS COM CISPLATINA.....	103
9.4. CITOTOXICIDADE DE LYETX I DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS.....	104
9.5. ANÁLISE ISOBOLOGRÁFICA DAS COMBINAÇÕES DE LYETX I DES- HIS E CIS-PLATINA.....	106
9.6. ANÁLISES DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	109
9.7. ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DE LARANJA DE ACRIDINA.....	110
9.7.1. Avaliação do envolvimento de morte celular por autofagia usando o inibidor Bafilomicina A1.....	111
9.8. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	112
10. RESULTADOS.....	114
10.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DE LYETX I-DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS MDA-MB-231.....	114
10.2. EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE LYETX I DES-HIS COM CIS- PLATINA EM CÉLULAS MDA-MB-231.....	116
10.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA DO LYETX I DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS HEK-293.....	118
10.4. ANÁLISE ISOBOLOGRÁFICA DAS COMBINAÇÕES DE LYETX I DES-HIS E CIS-PLATINA.....	120
10.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LYETX I DES-HIS E CISPLATINA NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MDA-MB- 231.....	125

10.6.	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ORGANELAS VESICULARES ÁCIDAS (AVOS) EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS OU NÃO COM LYETX I DES-HIS, CISPLATINA OU EM ASSOCIAÇÃO.....	129
10.7.	AVALIAÇÃO DA VIA AKT1, ERK, P53 E P21 EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS COM LYETX I DES-HIS, CISPLATINA E ASSOCIAÇÃO DE AMBOS.....	133
11.	DISCUSSÃO CAPÍTULO II.....	137
12.	CONCLUSÕES CAPÍTULO II.....	147
13.	REFERÊNCIAS.....	148
14.	ANEXOS.....	164
14.1.	CERTIFICADOS DE CONGRESSOS.....	164
14.2.	PUBLICAÇÕES.....	166
14.3.	MATERIAIS UTILIZADOS NESTE PROJETO.....	189

RESUMO

Peptídeos bioativos são uma grande classe de biomoléculas com diversos potenciais farmacológicos, destacando-se os peptídeos antimicrobianos que agem sobre diferentes organismos tais como bactérias, fungos, protozoários e vírus. Muitos desses peptídeos apresentaram também atividade antitumoral.

Nesta tese, focamos na secreção de *Pithecopus megacephalus*, bem como no peptídeo LyeTx I-Des-His, uma variação sintética de LyeTx I, um peptídeo purificado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, com o objetivo de encontrar peptídeos ativos principalmente contra células de câncer, especificamente do tipo triplo negativo. O fracionamento da secreção de *P. megacephala*, apresentou rica variedade de peptídeos e 14 destes foram sequenciados. Desse grupo três peptídeos foram sintetizados e testados contra bactérias, fungos e três linhagens de células de câncer (MDA-MB-231, MCF-7, ambas de câncer de mama e HCT-116 de câncer colorretal) e uma linhagem não câncer (HEK-293), como controle. Os resultados sugeriram aumento da atividade proliferativa de dois peptídeos, sobre células de câncer, sem aparente atividade em células HEK-293. Numa segunda parte deste trabalho, propusemos testar LyeTx I-Des-His combinado com cisplatina, em três diferentes proporções molares. A proporção peptídeo:cisplatina (P:C) 1:1, na dose do IC₅₀, apresentou efeito sinérgico, bem como um valor de índice de seletividade maior que o da cisplatina isolada. Quando investigados os possíveis mecanismos de morte envolvidos, observamos diversos indícios de morte celular por autofagia. Este mecanismo de morte foi suportado pelos seguintes resultados: células tratadas com as combinações P:C pararam na fase G2/M do ciclo celular, células foram marcadas em vermelho com o corante pH sensível laranja de acridina e quando pré tratadas com inibidor de autofagia (Bafilomicina A1) esta correlação foi revertida. Além do mais, experimentos de *western blot* indicaram uma possível redução da expressão de P21 e da fosforilação de AKT. A redução da fosforilação de AKT pode ser indício de autofagia, como já descrito. Entretanto, outros estudos são necessários para melhor elucidar as vias envolvidas nas atividades desse peptídeo. Além do mais, estudos de toxicidade são essenciais na possível validação de LyeTx I-Des-His como um candidato a droga terapêutica. Esses achados demonstraram que o peptídeo LyeTx I-Des-His parece um bom candidato para ser combinado com alguns fármacos já bem estabelecidos, melhorando o combate a células de câncer, por induzir outras cascatas de morte.

ABSTRACT

Bioactive peptides are a vast class of molecules with diverse biopharmaceutical potentials, including antimicrobial activity over a broad organism classes such as bacteria, fungi, protozoa and viruses. Several of these peptides have also shown antitumoral activity.

In this thesis we focused on *Pithecopus megacephalus* frog secretion, as well as the peptide LyeTx I-Des-His, a synthetic variation of LyeTx I, a peptide purified from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*, with the objective to find bioactive peptides mainly against cancer cells, more specifically of the triple negative type. The fractionation of the *P. megacephala* secretion showed a rich variability on peptides and 14 of them were sequenced. From this set, three peptides were synthesized and tested against bacteria, fungi and three cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, both from breast cancer and HCT-116 from colorectal cancer) and one non-cancer cell line (HEK-293), as a control. The results suggested an increase on proliferative activity of two peptides over cancer cells, without apparent activity on HEK-293 cells. In a second part of this work, we proposed to test LyeTx I-Des-His combined with cisplatin, in three different molar proportions. The proportion peptide:cisplatin, (P:C) 1:1, in the IC₅₀ dose, showed synergistic effect as well as a selectivity index value, greater than cisplatin isolated treatment. When investigating the possible cell death mechanisms involved, we observed several indications of autophagic cell death process. This mechanism was supported by the following results: cells treated with P:C combinations arrested in G2/M cell cycle phase, cells were marked in red with the pH sensitive dye acridine orange and when pretreated with an autophagy inhibitor (Bafilomycin A1) this coloration was reversed. In addition, western blot experiments indicated a possible reduction of P21 expression and of AKT phosphorylation. The decreasing of AKT phosphorylation could be indicative of autophagy, as already described. However, other studies are necessary to better clarify the involved pathways on these activities of the drugs. In addition, toxicity studies are essential in a possible validation of LyeTx I-Des-His as a therapeutic drug candidate. These findings demonstrated that the peptide LyeTx I-Des-His seems a good candidate to be combined with some well-established drugs, improving the combat to cancer cells, by inducing other death cascades.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA TOXINOLOGIA

Venenos de origem animal e vegetal têm sido elementos de fascinação para o homem desde tempos remotos, seja pela precaução com relação aos seus efeitos nocivos, por sua utilidade como arma química natural, ou como método de assassinato ou suicídio.

Cita-se que uma das referências mais antigas (há cerca de 5000 anos) a animais peçonhentos são pinturas rupestres, na Espanha, mostrando pessoas sendo atacadas por abelhas (Gasi3n, 2013). Entre alguns dos documentos mais antigos da humanidade figuram as tábuas cuneiformes sum3rias (Figuras 1 e 2), onde est3o relatadas as propriedades t3xicas do ars3nio. As tábuas sum3rias de Filad3lfia p. ex. s3o um interessante exemplo da farmacopeia deste povo ancestral que conhecia diversos venenos tanto de origem aut3ctone, como de regi3es distantes, como do Vale do Indo (Gasi3n, 2013). Outro exemplo sum3rio, a respeito dos conhecimentos de animais peçonhentos, 3 um vaso de cerca de 2600 a. C. com uma serpente pintada, como s3mbolo m3gico.

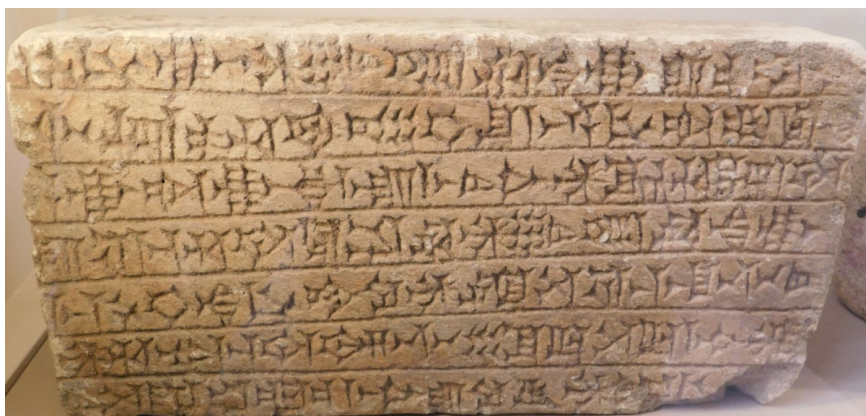


Figura 1: Foto ilustrativa de uma amostra da escrita cuneiforme sum3ria de cerca de 1140 a.C. do Museu do Louvre. Fonte: Arquivo pessoal.

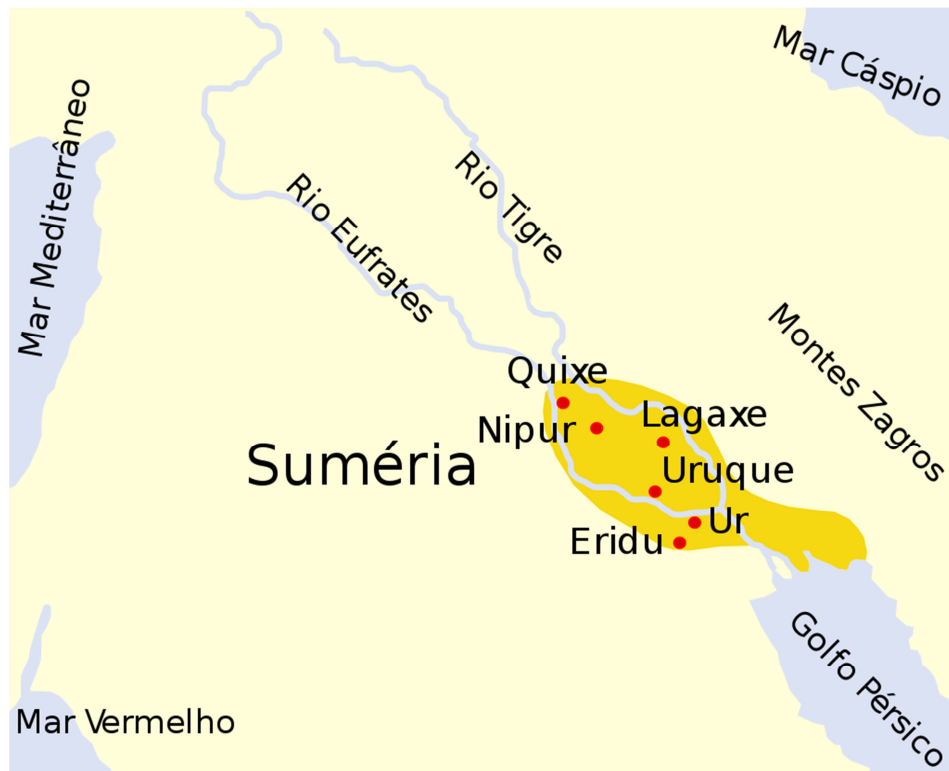


Figura 2: Mapa do centro do Oriente Médio destacando em amarelo a região da Suméria arcaica. Fonte: <https://pt.wikipedia.org>

Um papiro egípcio de 2700 a. C. dá instruções quanto à diferenciação de peixes comestíveis e venenosos. Outro exemplo, vindo do Antigo Egito seria, possivelmente, a primeira descrição de choque anafilático da história (2621 a.C.), relatando-se a morte do faraó Menés, em consequência da picada por uma vespa (Gasi3n, 2013). O papiro de Erbes, um dos tratados m3dicos mais antigos, possui uma se33o referente a correla33o entre venenos e seus respectivos ant3dotos. Havia inclusive no Antigo Egito, sacerdotes m3dicos cuja especializa33o era o tratamento por acidentes com cobras.

Algumas estelas como a de Esatum (Figura 3) foram constru3didas para prote33o contra picadas de serpente e seus efeitos t3xicos, o que mostra que essas culturas viam como sobrenatural os efeitos t3xicos dos venenos.



Figura 3: Estela mágica de Esatun contendo encantamentos protetores e curativos contra picadas de serpentes. Fonte: Gasi3n, 2013

Os gregos cl3ssicos tamb3m possu3am grandes conhecimentos toxinol3gicos, por exemplo com diversas plantas t3xicas que eram usadas como m3todo de execu33o - caso da morte do fil3sofo S3crates (Figura 4a), que foi obrigado a ingerir extrato de cicuta em 399 a.C. (Chau3, 2000). O famoso m3dico grego Hip3crates (Figura 4b) que viveu nos s3culos V e IV antes de Cristo, valia-se de diversas plantas t3xicas que usava em diferentes tratamentos (Petrovska, 2012; Gasi3n, 2013). Arist3teles do s3culo IV a.C. (Figura 4c) conhecia os efeitos t3xicos de medusas e de diversos peixes.



Figura 4 a: Pintura a óleo de Jacques-Louis David representando o momento em que Sócrates bebe cicuta. Fonte: Metropolitan Museum of Art b: Desenho do busto de Hipócrates. Fonte: <https://www.infoescola.com/> c: Busto de Aristóteles. Fonte: <https://www.todamateria.com.br>.

Outro relato da antiguidade a respeito de venenos, é o caso do rei do Ponto, Mitrídates VI (120-63 a.C.), que realizou um dos primeiros testes de doses letais de venenos da história. Ele administrava diferentes doses de venenos a prisioneiros, para verificar qual dose era tóxica, bem como buscou contravenenos (antídotos) para os mesmos. Posteriormente, ele mesmo ingeria doses seguras de venenos para adquirir resistência aos mesmos, bem como antídotos para prevenir um possível envenenamento (Gasi3n, 2013). Contudo, prática semelhante a esta era realizada na Índia por certas mulheres assassinas de aluguel.

Na idade média, o médico do Imperador Carlos Magno (Figura 5) utilizava picadas de abelhas, em quantidades seguras, para o tratamento de gota do Imperador (Gasi3n, 2013).



Figura 5: Imperador Carlos Magno em pintura do século XVI da autoria de Albrecht Dürer Fonte: <https://br.pinterest.com/>

Na era dos descobrimentos, os europeus se viram sob ataque de arsenais químicos desconhecidos deles, contidos em flechas envenenadas com toxinas de diversas fontes, como o curare, obtido de certas plantas (Figura 6), ou secreções de anfíbios. Os Maias eram um povo bastante versado nos conhecimentos de venenos de escorpiões, e consideravam o animal como um símbolo do fogo, por relacionarem a um dos efeitos de sua picada - uma dor como a de queimadura. Nesta mesma época, Paracelso definiu um paradigma, base da toxinologia e da toxicologia: somente a dose faz o veneno (Editorial Nature Nanotechnology, 2011).

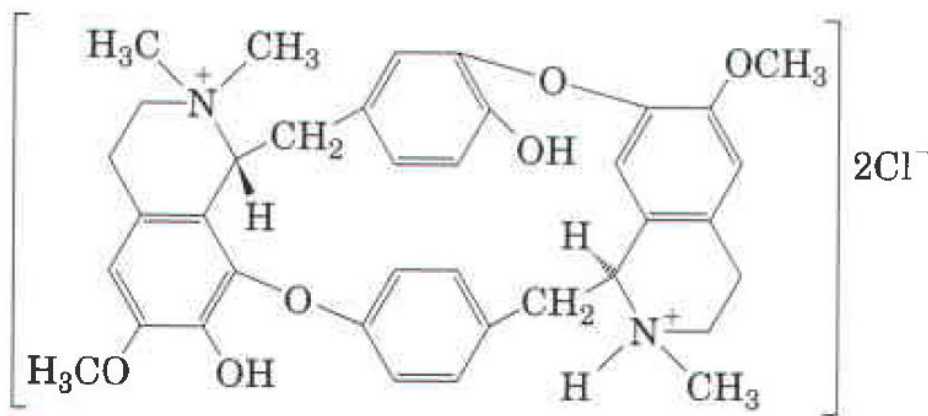


Figura 6: Cloreto de D-tubocurarina, um potente inibidor do receptor de acetilcolina, o princípio ativo do Curare. Fonte: Princípios de bioquímica, Nelson e Cox.

Durante a era napoleônica houve a primeira tentativa de purificação dos princípios ativos de peçonhas de serpentes. Luciano Bonaparte (irmão do imperador francês Napoleão Bonaparte) valendo-se de precipitações com álcool e éter conseguiu um primeiro fracionamento da peçonha da víbora *Vipera berus* (Lee, 2012). Alguns anos após este feito os campos da toxinologia e da microbiologia se cruzariam, quando o francês Albert Calmette (Figura 7a), em colaboração com Louis Pasteur, desenvolveu estudos com serpentes na Indochina (atual Vietnam). Calmette desenvolveu o primeiro soro contra a peçonha de serpentes ao imunizar cavalos (Calmette, 1896), fato que contribuiu para uma colaboração deste pesquisador com Alexandre Yersin (Figura 7b) na produção de um soro contra a peste bubônica, causada por *Yersina pestis* (Gasi3n, 2013; Yersin *et al*, 1895 *apud* Meyer, 1947).

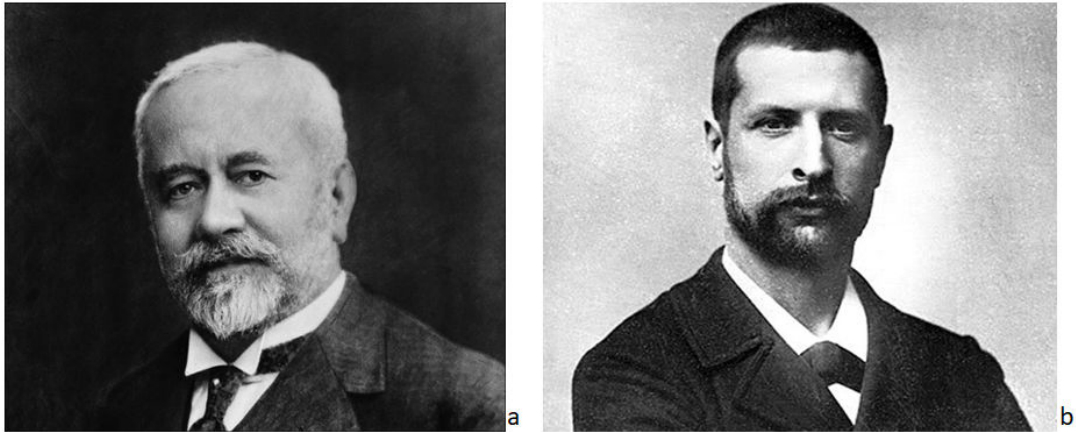


Figura 7 a: Albert Calmette, desenvolvedor do primeiro soro contra picadas de serpentes. Fonte: <https://www.thelancet.com/journals/> **b:** Alexandre Yersin, que seguindo o paradigma de neutralização por soros de Calmette desenvolveu o soro contra a peste bubônica. Fonte: <http://hospitaldocoracao.com.br/>

Desde a era de Calmette, até os dias de hoje, diversos avanços e descobertas com venenos e toxinas vem ocorrendo.

1.1.1. Histórico dos venenos e toxinas no Brasil

Embora o Brasil possua a maior e uma das mais ricas biodiversidades continentais do planeta, esta começou a ser pesquisada no campo da toxinologia científica apenas no século XIX, um dos estudiosos no assunto foi João Batista de Lacerda (Figura 8a). Ele estudou os efeitos da peçonha de *Bothrops* usando gema de ovos, leite e fibrina como material de teste (Lacerda, 1884 apud De Lima *et al*, 2010). Antes da virada do século o toxinologista Vital Brazil Mineiro da Campanha (Figura 8b) descobriu, em 1898, a especificidade do soro contra picadas de serpentes (De Lima *et al*, 2010), o que complementou o trabalho iniciado por Calmette dois anos antes e culminou na produção, pelo Instituto de Soroterapia, dos primeiros soros polivalentes contra acidentes por serpentes *Bothrops jarararaca*, e *Crotalus terrificus* (De Lima *et al*, 2010).



Figura 8 a: João Batista de Lacerda e **b:** Vital Brazil Mineiro da Campanha. Fontes: <http://www.anm.org.br>

Na pesquisa toxinológica de escorpiões, os pesquisadores Carlos Ribeiro Diniz e Lineu Freire-Maia (Figuras 9a e 9b) foram pioneiros no estudo das atividades tóxicas do escorpião *Tityus serrulatus* (Diniz, 1978; Prado e Gomez, 2000 *apud* De Lima *et al*, 2010), um escorpião muito comum nas regiões urbanas e responsável por muitos acidentes fatais.

Diniz também estudou os efeitos do envenenamento da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Figura 10) que é uma das três principais aranhas de importância médica no Brasil. Um fato curioso foi a observação do priapismo (*i. e.* ereção dolorosa e duradoura, independente de estímulo sexual) em crianças do sexo masculino picadas pela aranha. As implicações bioquímico-farmacológicas decorrentes deste sintoma ocasionado por uma toxina obtida deste veneno (PnTx2-6 também conhecida como δ -CNTX-Pn2a), vem sendo estudadas em nosso Laboratório há cerca de 10 anos (Nunes *et al*, 2008) e mais recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou o peptídeo PnPP-19, derivado desta toxina, que também potencia a função erétil (Silva *et al*, 2015), porém sem os efeitos tóxicos exibidos pela toxina e, aparentemente, por outros mecanismos de ação.



Figura 9 a: Dr. Carlos Ribeiro Diniz, **b:** Dr. Lineu Freire-Maia. Dois pesquisadores brasileiros da UFMG pioneiros nos trabalhos com peçonhas de escorpião. Fontes: www.canalciencia.ibict.br/ e <https://www.ufmg.br/boletim/>

A história da toxinologia brasileira mostra como a pesquisa nesta área, embora explore muito pouco a grande biodiversidade brasileira, pode, potencialmente, gerar tantos resultados para a sociedade em geral, seja na forma de qualidade de vida seja com a geração de fármacos que poderão concorrer para que o país detenha *royalties* decorrentes de produtos biotecnológicos num futuro próximo.



Figura 10: *Phoneutria nigriventer*, aranha de importância médica produtora de rico arsenal de toxinas. Fonte: <http://territorioselvagem.forumeiros.com/>

1.1. OS LISSANFÍBIOS E A TOXINOLOGIA

Os vertebrados terrestres são constituídos pelos Batracomorfos (ou Amphibia) e Reptiliomorfos, sendo cada um representado, respectivamente, pelos grupos atuais dos Lissanfíbios e Amniotas (Pough, 1999; Tree of Life, 2019). Contudo, grande número de táxons fósseis (figura 11) está presente na história evolutiva de ambos os grupos (Pough, 1999; Ruta e Coates, 2007).

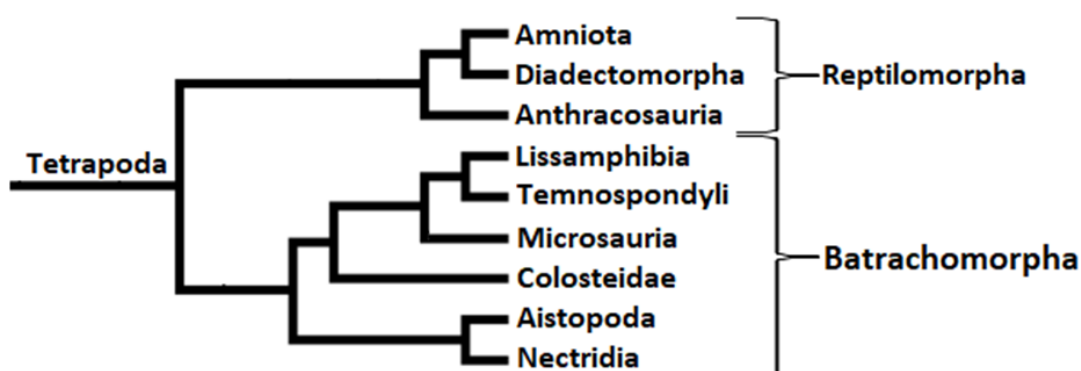


Figura 11: Cladograma dos tetrapoda (vertebrados terrestres verdadeiros). Amniota: engloba os Sauropsídeos (lagartos, crocodilianos e aves) e mamíferos, Lissamphibia engloba todos os grupos de anfíbios atuais. Reptilomorpha: características nos ossos craniais e na fórmula das falanges. Batrachomorpha: ausência de cinética cranial e teto do crânio ligado a caixa craniana via exoccipital. Somente os taxa Amniota e Lissamphibia possuem representantes atuais.

O táxon dos Lissanfíbios (Figura 12) possui como sinapomorfias a presença de bastonetes verdes na retina -segundo Yovanovich *et al*, 2017, possivelmente com função de distinção de cores em ambientes de pouca iluminação - dentes pedicelares *i. e.* dentes cuja coroa está ligada à raiz por uma camada não calcificada de dentina, presença de dois sistemas de captação de sons (a Papilla amphibiorum, responsável pela detecção de sons abaixo de 1000 Hz e a Papilla basilaris, com função de detecção de sons acima de 1000 Hz) e a presença de um conjunto de glândulas mucosas na pele (Pough, 1999). Estas glândulas mucosas são o motivo de grande interesse para a toxinologia visto que, são produtoras de uma secreção frequentemente com compostos

tóxicos, responsáveis pela defesa dos Lissanfíbios contra agressões, seja de ordem macroscópica, como p. ex. contra predadores, seja de ordem microscópica, como p. ex. contra micro-organismos (Jackway *et al*, 2008).

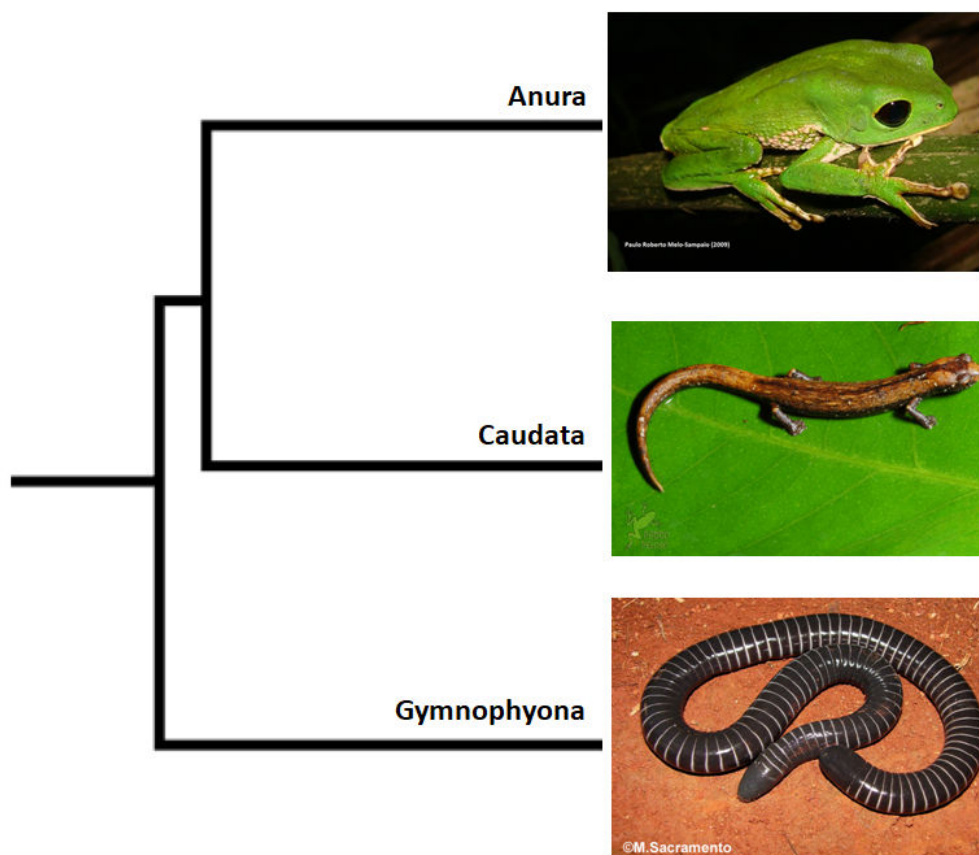


Figura 12: Cladograma dos Lissanfíbios, apresentando-se os três grupos atuais com fotografias, fora de escala, de exemplares de cada um dos mesmos. Anura: conhecidos popularmente por sapos, pererecas e rãs. Caudata: composto por salamandras e tritões. Gymnophyona: conhecidos popularmente como cobras-cegas. Fontes das fotos: <https://amphibiaweb.org>.

A secreção de Anfíbios possui ampla gama de compostos bioativos de diferentes classes (Bevins e Zasloff, 1990) como alcaloides (para revisão ver: Daly *et al*, 2005), derivados esteroides (revisão de Sousa *et al*, 2017) e peptídeos bioativos (para revisão: ver Azevedo Calderon *et al*, 2011).

Alguns poucos trabalhos com os grupos de Lissanfíbios gymnophyona e caudata foram realizados, como p. ex., a observação de atividade cardiotoxica da secreção da

pele de *Siphonops paulensis* (Ferroni Schwartz *et al*, 1999), que foi independente de receptores muscarínicos, bem como o isolamento de uma fração da secreção de *Siphonops annulatus* (Gymnophiona), com atividade contra *Leishmania (L.) infantum* na forma promastigota (Pinto *et al*, 2014). Na ordem Caudata, nos anos 90, foi descrita a samandarina, um derivado de colesterol, com DL₅₀ de 70 µg/kg em camundongos. A primeira defensina isolada de salamandras, da espécie *Cynops fudingensis* (Meng *et al*, 2013), com atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes, somente ocorreu na década de 2010. Nota-se que a grande maioria dos trabalhos com secreções de anfíbios engloba a ordem Anura, com milhares de trabalhos já publicados. Um possível motivo para esta discrepância é que quase 90% das espécies de Lissanfíbios estão contidos na ordem Anura (Amphibiaweb, 2016), sendo portanto mais estudadas que os outros dois grupos.

1.2.1. Anuros e seus compostos bioativos

Na década de 60 foi isolada a batracotoxina de *Phyllobates bicolor* (Daily *et al*, 1964), hoje conhecida por atuar em canais para sódio voltagem dependentes e sendo também evidenciada pela primeira vez, a existência de peptídeos bioativos com atividade semelhante à da bradiginina, em secreções de *Lithobates* (figura 13b) e *Phyllomedusa spp.* (Erspamer *et al* 1962; Bevins e Zasloff, 1990). A partir daí, diversos compostos bioativos vem sendo descobertos na secreção de anuros. De fato, milhares de compostos bioativos, sejam alcaloides, derivados esteroides ou peptídeos bioativos já foram descritos nessa ordem de animais, segundo revisões de Daly *et al*, 2005; Hayes *et al*, 2009; Azevedo Calderon *et al*, 2011 e buscas no PubMed, 2019 e Web Of Science, 2019.

1.2.1.1. Alcaloides

Alcaloides são compostos orgânicos cuja definição é muito controversa. Esta classe de compostos orgânicos pode ser definida pela presença de um nitrogênio básico bem como de uma cadeia carbônica cíclica, onde o nitrogênio não precisa necessariamente fazer parte do ciclo (Waller e Nowacki, 1978; Aniszewski, 2007). Existem mais de 800 destes compostos já relatados em Lissanfíbios, segundo revisão de Daly *et al*, 2005. Alguns deles são pouco tóxicos, já outros, extremamente potentes em toxicidade.

As batracotoxinas (figura 13), encontradas em grande frequência nos dendrobatídeos, estão nesse grupo. Ligam-se fortemente ao sítio 2 dos canais para sódio voltagem dependentes - Na_vs (Catterall *et al*, 2007). Estes alcaloides são potentes toxinas, sendo que a batracotoxina possui DL_{50} de 2 $\mu\text{g/kg}$ em camundongos (Tokuyama *et al*, 1968) contudo, a batracotoxina-A possui um DL_{50} de 1 mg/kg , onde a diferença entre as duas moléculas é a ausência de um anel pirrol dimetilado na batracotoxina-A, evidenciando-se com isso, a importância desse grupo químico para atividade da molécula. Essas toxinas mantêm os canais para sódio em estado permanentemente abertos (Wang *et al*, 2006; para revisão ver Catterall *et al*, 2007), bem como reduzem significativamente, a seletividade do canal Na_v permitindo a passagem de íons tão grandes quanto o amônio (Wang *et al*, 2006), o que é responsável pelos seus potentes efeitos tóxicos.

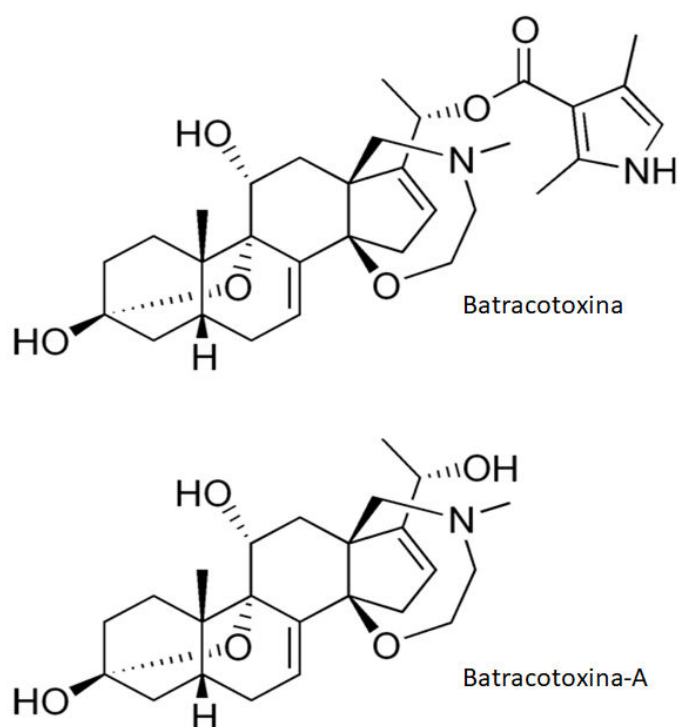


Figura 13: Batracotoxinas encontradas em secreções venenosas de diversos anfíbios.

Alguns dos alcaloides, como certas indolizidinas di-substituídas, não possuem atividades tóxicas relacionadas (para revisão ver Daly *et al*, 2005). Outros são inibidores não competitivos de receptores nicotínicos - caso das pirrolidinas e decahidroquinonas, muito embora, existam outras subclasses de indolizidinas di-substituídas que são potentes e seletivos bloqueadores de receptores nicotínicos como p. ex. a indolizidina 235B de *Dendrobates pumilo* (figura 14a) com IC_{50} de 70 nM sobre o receptor $\alpha 4\beta 2$, a quinolizidine 1-epi-207I (figura 14b) com IC_{50} de 600 nM sobre o receptor $\alpha 7$ (Tsuneki *et al*, 2004).

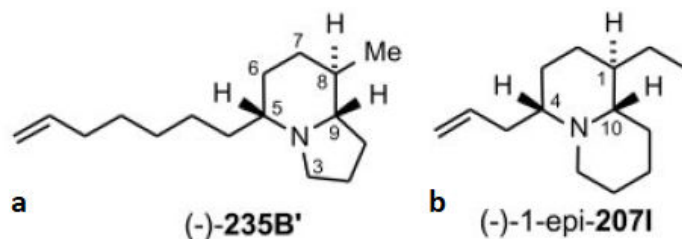


Figura 14 a: Indolizidina 235B com alta seletividade sobre o receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ e **b:** quinolizidina 1-epi-207I com alta seletividade sobre o receptor $\alpha 7$. Fonte: Tsuneki, *et al*, 2004.

Epibatidinas (de *Epipedobates spp*) e phantasmidina (figura 15a), de *Epipedobates tricolor*, são compostos derivados de piridina com atividade agonista de receptores nicotínicos. As epibatidinas possuem, além da atividade agonista de receptores nicotínicos, atividade analgésica em doses de 2,5 $\mu\text{g/kg}$ (Badio e Daly, 1994). Por outro lado, são muito tóxicos aos animais (0,4 $\mu\text{g/animal}$) (Daly *et al*, 2005). Já a phantasmidina possui atividade agonista sob receptores nicotínicos (Filch *et al*, 2010)

Muitos outros metabólitos, além da grande classe dos alcaloides, já foram também descritos na secreção de pele de anuros (revisão de Daly *et al*, 2005) como p. ex tetrodotoxina e zetekitoxina (figura 15b) (revisão de Rodríguez *et al*, 2017), ou a bufotenina com propriedades antivirais, atuando como um inibidor da infecção pelo vírus da raiva (Vigerelli *et al*, 2014; para revisão ver Rodríguez *et al*, 2017).

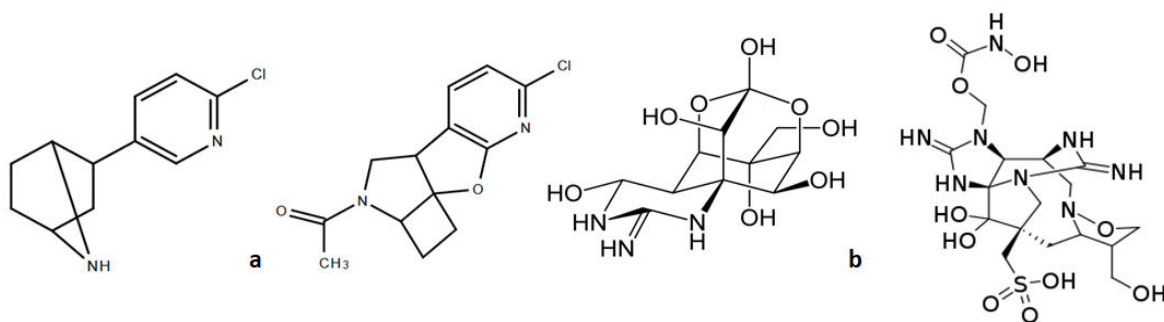


Figura 15: a: Epibatidina e phantasmidina e **b:** tetrodotoxina e zetekitoxina.

1.2.1.2. Aminas biogênicas

As aminas biogênicas também estão presentes na secreção de diversas espécies de anuros como p. ex. os do gênero *Bufo*. Alguns exemplos de aminas biogênicas são: triptamina, 5-hidróxitriptamina, N-metil-5-hidróxitriptamina, bufotenina e bufotenidina (figura 16), todas elas derivadas do aminoácido triptofano (Roseghini *et al*, 1989) com atividades sobre a musculatura lisa e outros atuando também, como alucinógenas (Chilton *et al*, 1979; Roseghini *et al*, 1989). Em especial, a bufotenina tem atividade psicotrópica potente, com relatos de atividade similar ao LSD (Räisänen e Kärkkäinen, 1979; Takeda *et al*, 1995; Costa, 2005).

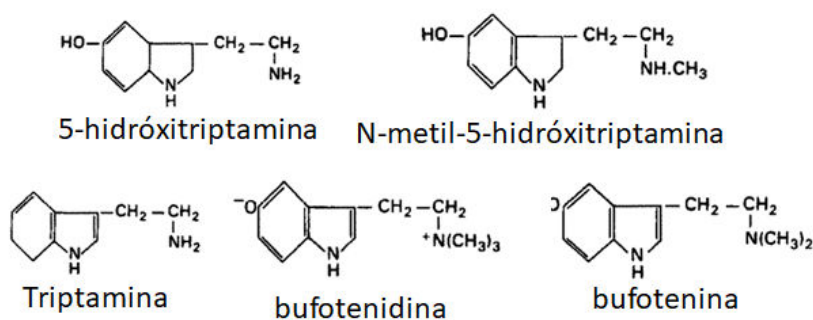


Figura 16: Estrutura de algumas aminas biogênicas derivadas do triptofano. Fonte: Roseghini *et al*, 1989.

Derivados de histamina (figura 17) também já foram relatados nessas secreções tais como N-metilhistamina, N,N-dimetilhistamina, espinaceamina e 6-metilespinaçamina (Roseghini *et al*, 1976).

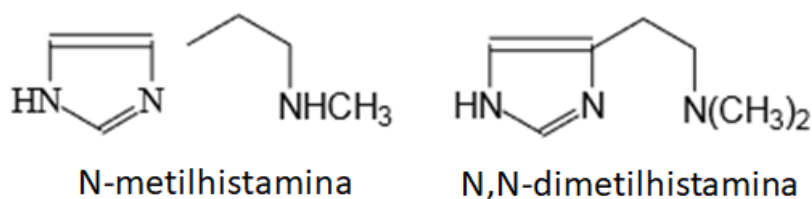


Figura 17: Estrutura de dois exemplos de amins biogênicas derivadas da histamina. Fonte: Roseghini *et al*, 1976.

1.2.1.3. Derivados esteroides

Os derivados esteroides de secreções de anuros possuem como característica a presença dos quatro anéis conjugados, próprios dos esteroides (figura 18). Estes compostos, geralmente, interferem na função da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (Hayes *et al*, 2009). Muitos deles, após serem secretados sobre a pele de sapos bufonídeos, sofrem transformações metabólicas pela microbiota indígena da pele desses sapos, originando maior diversidade de compostos bioativos (Hayes *et al*, 2009). Centenas destes compostos já foram isolados de anuros, segundo observado nas revisões de Hayes *et al*, 2009; Rodríguez *et al*, 2017).

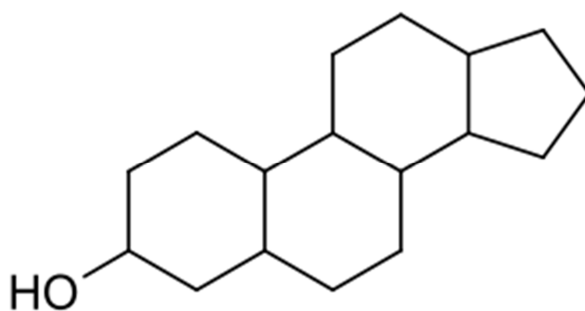


Figura 18: Estrutura básica dos compostos pertencentes a classe dos esteroides.

Derivados esteroides de anuro dos gêneros *Rhinella*, *Rhaebo* e *Bufo* já foram estudados para o tratamento de câncer (De Sousa *et al*, 2017). Estes derivados esteroides (figura 19) foram relatados como possuindo grande seletividade na inibição

do crescimento de células cancerosas, quando comparadas a células normais (para revisão ver De Sousa *et al*, 2017).

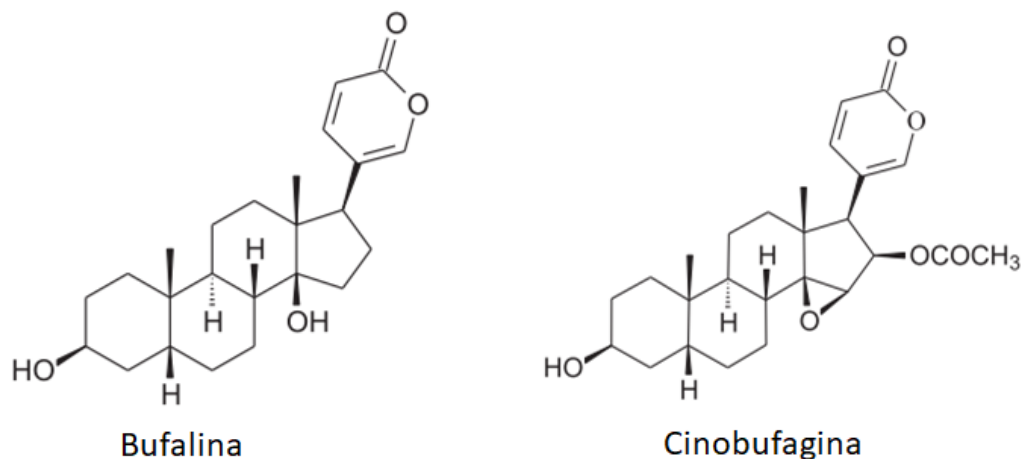


Figura 19: Exemplos de dois derivados esteroides com atividade antitumoral. Fonte: De Sousa *et al*, 2017

1.2.1.4. Peptídeos bioativos

Peptídeos são formados pela polimerização de resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, uma ligação tipo amida (Nelson e Cox, 2011). A diferença entre um peptídeo e uma proteína dá-se pelo número de resíduos de aminoácidos em cada uma das classes, onde o primeiro é formado por uma cadeia curta de resíduos e a segunda é formada por uma cadeia bem mais longa, embora o critério para considerar uma cadeia como curta ou longa seja arbitrário (Rates, 2011; Nature, 2014).

O grupo de peptídeos bioativos vem sendo estudado em anuros desde 1962 quando, Espasmer e colaboradores, apresentaram evidências de peptídeos com atividade semelhante à da bradicinina, a partir das secreções de mais de 80 espécies de Lissanfíbios obtidas com extrações com metanol. Foram isolados três peptídeos cujas estruturas primárias não foram elucidadas (Espasmer *et al* 1962). Desde então, diversos

outros peptídeos bioativos, com as mais variadas atividades, já foram descritos em anuros.

Rãs australianas do gênero *Crinia* apresentam diversos peptídeos bioativos com atividades contra bactérias Gram-positivas e que atuam como inibidores da enzima óxido nítrico sintase neuronal. Além disso, estimulam a contração de músculo liso de íleo de cobaia, por ativação de receptores muscarínicos (Jackway *et al*, 2008).

Há também relatos de peptídeos semelhantes a angiotensina, isolados de *Crinia georgiana* (Espasmer *et al*, 1979) e peptídeos semelhantes à bradicinina, isolados de *Heleophryne purceili* (Nakajima *et al*, 1979). Um peptídeo O-sulfatado, com atividade semelhante à da bradicinina foi isolado de *Phyllomedusa rohdei* (Anastasi; Bertaccini; Erspamer, 1966). Em 2016 foi isolado de *Phyllomedusa baltea* um peptídeo (Baltikinin) com EC₅₀ de 7,16 nM sobre relaxamento de músculo liso, valor bem próximo ao EC₅₀ da própria bradicinina de 1,29 nM, porém, o máximo de relaxamento em músculo liso de artérias de ratos obtido com "baldikinin" foi ligeiramente superior ao da bradicinina (Shi *et al*, 2016). Dezenas de outros peptídeos semelhantes à bradicinina já foram isolados de secreções de diversos outros anuros (Rates *et al*, 2011; Xi *et al*, 2015). Foram também descritos peptídeos agonistas de receptores opioides (μ e δ) na família Phyllomedusinae (Melchiorri e Negri, 1996) com constantes de ligação na ordem de nanomolar.

Peptídeos ativos, análogos a hormônios ativos sobre o sistema digestório, também já foram descritos. As caeruleinas possuem atividade semelhante à da gastrina e da colecistocinina, atuando por estimular músculos lisos do trato gastrointestinal, bem como, promover a secreção de HCl no estômago e a liberação da secreção biliar (Bevins e Zasloff, 1990; Bilusich *et al*, 2009). Taquicininas são conhecidas por possuírem atividades semelhantes às da substância P (Bevins e Zasloff, 1990), um peptídeo que

possui atividades vasodilatadoras (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1282120>) e eméticas (Hornby, 2001). Outras atividades, também já foram descritas como análogas a p. ex, neuromedina B e C, encefalina, neurotensina, entre outros (para revisão ver Bevins e Zasloff, 1990).

A tabela 1 apresenta exemplos de peptídeos bioativos, bem como algumas informações bioquímicas sobre os mesmos.

Tabela 1: Exemplos de peptídeos bioativos já descritos em secreções de anuros, com suas respectivas atividades conhecidas listadas,

Peptídeo	Espécie fonte	Sequência	Atividade biológica	Referência
RD-11	<i>Ascaphus truei</i>	RPPGFSPFRVD	Vasodilatador	Conlon <i>et al</i> , 2005
Signiferina 1	<i>Crinia signifera</i>	RLCIPYIIPC	Contraí músculos lisos, estimula proliferação de linfócitos	Jackway <i>et al</i> , 2008
Crinia-angiotensina-2	<i>Crinia georgiana</i>	APGDRIYVHPF	Vasoconstritor	Uniprot id: P09037
Baltikinin	<i>Phyllomedusa baltea</i>	pQDKPFGPPPIYPV	Vasodilatador	Shi <i>et al</i> , 2016
*Dermorfina	<i>Phyllomedusa spp</i>	YdAFGYPK	Agonista de receptor μ opioide	Melchiorri e Negri, 1996
Caeruleina	<i>Hyla peronii</i>	pQQDsYTGWMDF-NH ₂	Semelhante à da colecistocinina	Bilusich <i>et al</i> , 2009.
Phyllomedusina	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	pQNPNRFIGLM-NH ₂	Semelhante à da substância P	Anastasi e Espasmer, 1970

*: Nome da família do peptídeo, o peptídeo citado não possui um nome formal; pQ: resíduo de aminoácido piroglutâmico; dA: resíduo de D-alanina; sY: resíduo de sulfotirosina; -NH₂: C-terminal amidado.

Outra classe de atividades de peptídeos bioativos de anuros é a dos antimicrobianos. Nesta classe existem peptídeos com diferentes formas, sejam lineares (Zasloff, 1987), ou com pontes dissulfeto em suas estruturas primárias (Batista *et al*, 2004). Estes peptídeos possuem as mais diversas atividades antimicrobianas, alguns atuando inclusive, contra vírus (Da Mata *et al*, 2017).

Os peptídeos antimicrobianos de anuros, além de apresentarem função de defesa contra microrganismos patogênicos, apresentam também função de entrega de toxinas, como proposto por Raaymakers *et al* (2017).

1.2.1.5. Os peptídeos antimicrobianos de anuros

O primeiro peptídeo antimicrobiano de anuros (PAA) foi descrito em 1987 por Michael Zasloff, da secreção de *Xenopus laevis*, um anuro encontrado na região da África Subsaariana (Zasloff, 1987). Desde então, um grande número de tais peptídeos vem sendo descrito em anuros, bem como nas outras duas ordens de Lissanfíbios.

Os PAAs possuem ampla gama de atividades antimicrobianas, podendo atuar contra bactérias Gram-positivas (Zasloff, 1987; Zhang *et al*, 2010; Azevedo Calderon *et al*, 2011; Wan *et al*, 2015), Gram-negativas (Zasloff, 1987; Batista *et al*, 2004; Leite *et al*, 2005; Calderon *et al*, 2011), contra fungos, como no caso das phylloseptinas (Resende *et al*, 2008) e de outros peptídeos antifúngicos (para revisão ver Azevedo Calderon *et al*, 2011). Alguns peptídeos antimicrobianos são também ativos contra protozoários de diferentes grupos como *Trypanosoma cruzi* (Leite *et al*, 2005; Brand *et*

al, 2002), *Leishmania spp.* (Feder *et al*, 2000; Brand *et al*, 2006; Zampa *et al*, 2009) e *Plasmodium sp.* (para revisão ver Calderon *et al*, 2011).

O "Antimicrobial Peptide Database (APD)" é um banco de dados que possui 1084 peptídeos antimicrobianos de Anfíbios cadastrados, segundo esta base de dados (2019), sendo 1015 provenientes da ordem Anura *i. e*, 93% dos peptídeos antimicrobianos de Anfíbios foram descritos nas secreções de anuros (Wang *et al*, 2016). O primeiro peptídeo isolado, como parte dessa lista, foi a magainina (figura 20), em 1987 por Zasloff (figura 21), sendo também o primeiro proveniente de vertebrados.

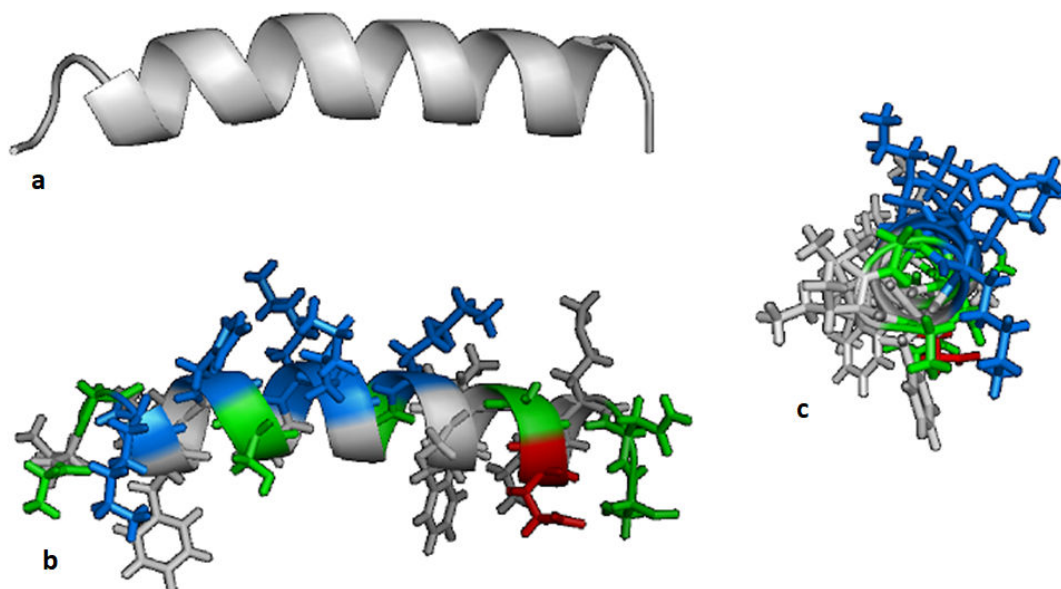


Figura 20: Estrutura da magainina-2 (PDB ID: 2MAG), isolada do anuro *Xenopus laevis*. **a:** Representação de fita da magainina-2 que evidencia a sua estrutura em α -hélice. **b:** Representação da fita com as cadeias laterais dos 23 resíduos de aminoácidos que a compõe em evidência, sendo usado o código de cores verde para resíduos hidrofílicos mais a glicina, cinza para resíduos hidrofóbicos, azul para resíduos básicos e vermelho para os ácidos. **c:** Representação da mesma estrutura descrita na subfigura b em perspectiva ortogonal ao plano da página, sendo observada com o N-terminal exibido frontalmente.



Figura 21: Dr. Michael Zasloff, pioneiro no trabalho com peptídeos antimicrobianos de anfíbios, ao descrever a magainina quando trabalhava no "National Institutes of Child Health and Human Development". Fonte: <https://www.georgetown.edu/news/>.

A magainina apresenta-se sob a forma de duas variantes (magainina-1 e magainina-2) as quais diferem em apenas dois resíduos de aminoácidos (figura 22). Ambas possuem atividades contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como atividade antiviral, já documentadas (Wang *et al*, 2016; APD, 2019).

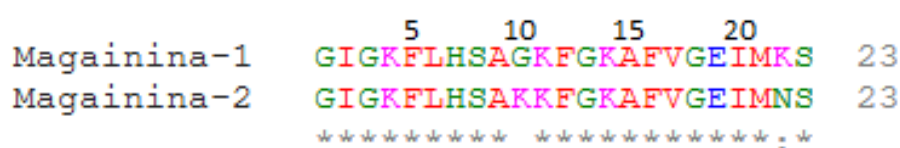


Figura 22: Sequências das magaininas 1 e 2 alinhadas através do Clustal Omega. As diferenças entre elas estão nos resíduos 10 e 22 onde, na magainina-1 são glicina e lisina, respectivamente e na magainina-2 são lisina e asparagina, respectivamente. Fonte: uniprot, 2019.

Este peptídeo já sofreu diversas modificações para uso em diferentes situações como: melhoramento genético de plantas contra pragas (Chakrabarti *et al*, 2003), no tratamento tópico de úlceras diabéticas (Lipsky, 2008) onde o derivado da magainina-2 - pexiganan - foi testado, com objetivo de evitarem infecções oportunistas, embora este

não tenha sido aprovado meramente por não ser mais eficaz que outros medicamentos já utilizados (Moore, 2003).

Outras classes de PAA já foram descritas como p. ex as phylloseptinas, caracterizadas pela sequência N-terminal FLSLI/LP e as dermaseptinas. As phylloseptinas foram caracterizadas pela primeira vez em 2005 na secreção de *Phyllomedusa hypochondrialis* e *Phyllomedusa oreades*. Seis peptídeos da nova família foram isolados e sequenciados por espectrometria de massa e suas atividades antimicrobianas foram observadas (Leite *et al*, 2005). Outros peptídeos desta família já foram caracterizados como p. ex. seis novos peptídeos da *Phyllomedusa azurea*, utilizando-se espectrometria de massa e bibliotecas de cDNA (Thompson *et al*, 2007). Em 2015 foi isolado da espécie *Phyllomedusa baltea* uma nova phylloseptina (PBa) com atividades *in vitro* contra bactérias Gram positivas, fungos e células tumorais (Wan *et al*, 2015).

A família das dermaseptinas (figura 23) constitui-se de PAAs mais longos que as phylloseptinas e de uma forma geral com um resíduo de triptofano na posição 3 conservado (Azevedo Calderon *et al*, 2011). Quase uma centena de peptídeos pertencentes a classe das dermaseptinas já foram isolados ou descritos, segundo análise no banco de dados do Uniprot (Uniprot, 2019). Esta classe já mostrou atividades contra bactérias e fungos (Mor e Nicolas, 1994), contra protozoários como p. ex. *Trypanosoma cruzi* (Brand *et al*, 2002), contra vírus como o do HIV (Lorin *et al*, 2005) entre outras atividades (Para revisão ver Azevedo Calderon *et al*, 2011).

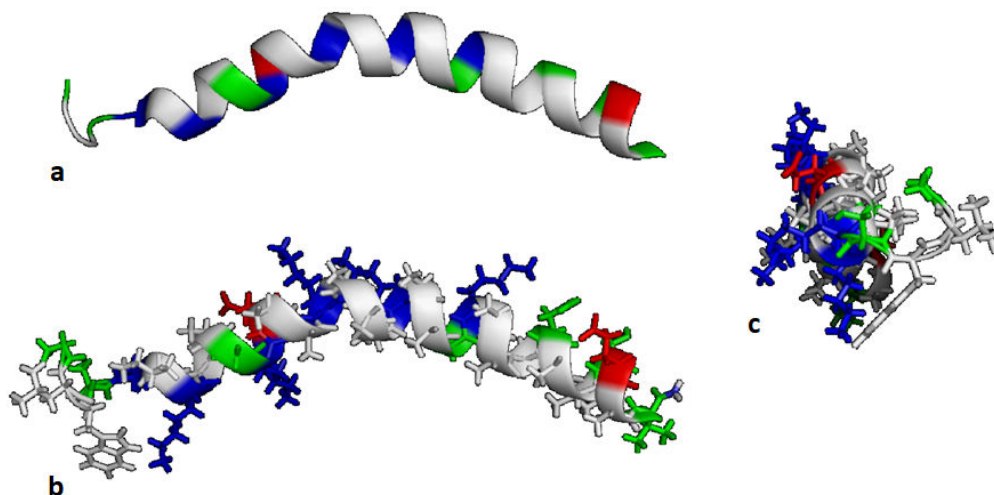


Figura 23: Estrutura obtida por RMN (PDB ID: 2K9B) de uma dermaseptina de *Phyllomedusa distincta*. **a:** representação de fita da estrutura deste peptídeo antimicrobiano. **b:** Representação de fita com as cadeias laterais dos 33 resíduos que compõe a dermaseptina em evidência, sendo usado o código de cores verde para resíduos hidrofílicos mais a glicina, cinza para resíduos hidrofóbicos, azul para resíduos básicos e vermelho para os ácidos. **c:** Vista frontal a partir do N-terminal onde consegue-se observar, nesta perspectiva, que os resíduos carregados ocupam o lado esquerdo do peptídeo *i. e.* sua anfipaticidade quando estruturado.

Além das magaininas, phylloseptinas e dermaseptinas existem outras classes de PAAs como p. ex. as dermatoxinas, distinctinas - estas com duas cadeias, phylloxinas, plasticinas, entre outras (Azevedo Calderon *et al*, 2010).

De igual modo alguns PAAs já foram descritos como possuindo atividades antivirais contra diferentes tipos de vírus, como p. ex. magainina e brevinina, ativas contra o vírus da herpes (Yasin *et al*, 2000; Matanic e Castilla, 2003). Outros PAAs apresentam atividade contra o vírus HIV (VanCompernelle *et al*, 2015; para revisões ver Azevedo Calderon *et al*, 2011; Da Mata *et al*, 2017). A tabela 2 apresenta alguns exemplos de PAAs e alguns parâmetros destes.

Tabela 2: Exemplos de peptídeos antimicrobianos de anuros

Peptídeo	Espécie fonte	Sequência	Atividade	Citotoxicidade	Estrutura	Referência
Magainina-2	<i>Xenopus laevis</i>	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Antimicrobiano (bactérias, vírus), espermicida, ativo contra células cancerígenas	ND	α -hélice (PDB 2MAG)	Zasloff, 1987; Lehmann <i>et al</i> , 2006 APD, 2019
Phylloseptina PS-1	<i>Phyllomedusa spp.</i>	FLSLIPHAINAVSAIAKH-NH ₂	Antimicrobiano (bactérias)	Baixa hemólise	α -hélice	Leite <i>et al</i> , 2005
Phylloseptina PBa	<i>Phyllomedusa baltea</i>	FFSMIPKIAGGIASLVKNL-NH ₂	Antimicrobiano (bactérias, fungos) ativo contra céls cancerígenas	Contra células endoteliais	α -hélice	Wan <i>et al</i> , 2015
Phylloseptina PLS-J1	<i>Phasmahyla jandaia</i>	FLSLIPHAINAISAIA-NH ₂	ND	ND	α -hélice	Rates <i>et al</i> , 2011
Dermaseptina-K (Dermadistinctina-K)	<i>Phyllomedusa distincta</i>	GLWSKIKAAAGKEAAKAAKAAGKAA LNAVSEAV-NH ₂	Antimicrobiano (bactérias, fungos) e antiparasitário (<i>T. cruzi</i>)	Hemólise	α -hélice (PDB 2K9B)	Batista <i>et al</i> , 1999; Brand <i>et al</i> , 2002 e Uniprot, 2019
Distinctina	<i>Phyllomedusa distincta</i>	ENREVPPGFTALIKTLRKCKII (cadeia 1) NLVSGLIEARKYLEQLHRKLKNCKV (cadeia 2)	Antimicrobiano (bactérias)	ND	Fita- β heterodimérica	Batista <i>et al</i> , 2001
Phylloxina	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ-NH ₂	Antimicrobiano (bactérias)	ND	α -hélice	Pierre <i>et al</i> , 1999

ND: não determinado.

Além das atividades listadas, existem outros peptídeos que são imunomoduladores (revisão de Jackway *et al*, 2011), liberadores de insulina e indutores de sono (revisão de Gomes *et al*, 2007). A razão de tantos peptídeos bioativos com diferentes atividades, estarem presentes na secreção de anuros deve-se, possivelmente, à necessidade de defesa destes animais contra predadores, ou contra o ataque de patógenos, que poderiam facilmente colonizar a pele fina dos mesmos. Logo, houve uma pressão evolutiva para o aparecimento deste mecanismo de defesa (Zasloff, 2002; König *et al*, 2014).

1.3. OS ARACNÍDEOS E A TOXINOLOGIA

Um outro grupo de animais de grande interesse para a toxinologia é o dos aracnídeos. Os aracnídeos pertencem ao clado dos artrópodes, estando contidos no subclado cheliceriformes (figura 24a). Este clado, segundo Tree of Life.org (2019), possui uma grande diversidade, com os integrantes mais importantes sendo as aranhas (araneae), escorpiões (scorpionida) e ácaros (acari) -figura 24b. As aranhas são classificadas em três principais taxa: mesothelae mygalomorphae e araneamorphae, onde este último contém as aranhas de importância médica no Brasil (Dias-Lopes *et al*, 2018), composta pelos gêneros *Loxosceles*, *Latrodectus* e *Phoneutria* que são conhecidas popularmente como aranhas marrom, viúvas negras e aranhas armadeiras, respectivamente.

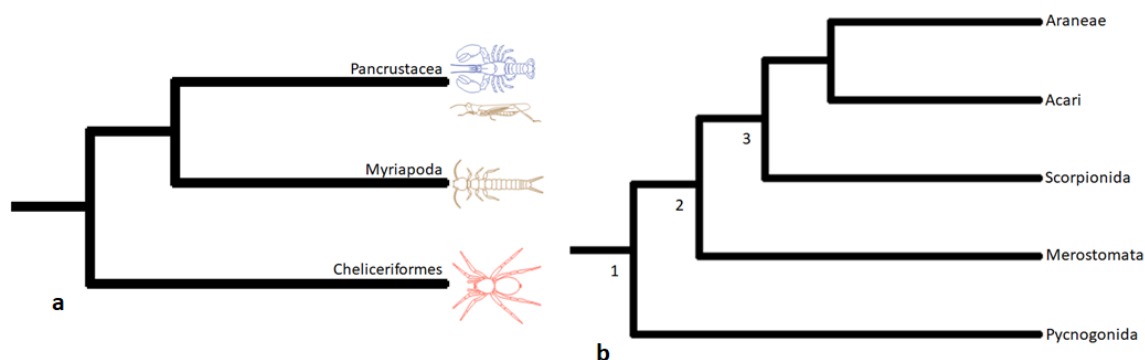


Figura 24 a: Cladograma com os grupos atuais de artrópodes (Edgecombe, 2010), onde pancrustacea contém crustáceos em geral mais hexapoda, myriapoda os diplopoda e quilópoda e cheliceriformes engloba os taxa chelicerata e pycnogonida. **b:** Clado cheliceriformes (1), chelicerata (2) e arachinida (3), onde neste último está contida as aranhas (araneae).

As peçonhas de aranhas são compostas por um rico arsenal bioquímico tais como peptídeos bioativos (Santos *et al*, 2010), toxinas polipeptídicas de médio peso molecular i. e entre 3 a 8 KDa (De Lima *et al*, 2009), enzimas (Escoubas *et al*, 2000), biocompostos tais como ATP (Chan *et al* 1975), glutamato (Early e Michaelis, 1987), noradrenalina (Frew *et al*, 1994), serotonina (Welsh e Batty, 1963), aminas como espermindina, espermina, aspartato, ácido γ -aminobutírico, histamina, (Escoubas *et al*, 2000), ácidos de origem biológica como o cítrico e láctico, íons como Na^+ K^+ Mg^{2+} Ca^{2+} e Cl^- , bem como acilpoliaminas (Escoubas *et al*, 2000).

As aranhas podem fornecer, através do estudo de suas peçonhas, muitas moléculas que podem ser aproveitadas para fins biotecnológicos. As utilidades podem ser o uso como sondas no estudo de marcadores biológicos (enzimas, receptores, etc) como no caso de toxinas com afinidade para canais iônicos (De Lima *et al*, 2009), ou ainda com possíveis modelos para fármacos como no caso da toxina δ -CNTX-Pn2a (antiga PnTx2-6) de *Phoneutria nigriventer*, descrita por Nunes e colaboradores, em 2008, como um potenciador da função erétil. A estrutura desta biomolécula foi estudada por técnicas de bioinformática, obtendo-se um peptídeo menor com 39% dos resíduos de aminoácidos da toxina original (Nunes *et al*, 2015). Este peptídeo preservou a

atividade biológica da toxina, com a vantagem de ser bem menor (pouco mais de um terço do número de resíduos da sequência original), não ser tóxico (Nunes *et al*, 2015) e também mostrou atividade antinociceptiva em ratos (Freitas *et al*, 2017), contrariamente ao que se observa para a toxina. Tanto o trabalho de Nunes e colaboradores e de Freitas e colaboradores renderam, respectivamente, em 2013 e 2014 patentes de usos, dirigidas ao tratamento de disfunção erétil e da dor.

O trabalho de Reis *et al* em 2018, apresentou um derivado de uma toxina da *Lycosa erythrogynatha* (figura 25a) como um potente agente antimicrobiano, com atividade *in vitro* e *in vivo* no modelo de artrite séptica, causada pela bactéria *Staphylococcus aureus*. O peptídeo resultou da perda de um resíduo de histidina na posição 16, durante a síntese química de LyeTx I, já caracterizado como um peptídeo antimicrobiano (Santos *et al*, 2010) e foi denominado LyeTx I-b I (figura 25b). O peptídeo derivado, LyeTx I-b, mostrou relativo aumento da atividade antimicrobiana (dependendo da espécie testada) (Reis *et al*, 2018). Estudos *in vitro* deste peptídeo como possível agente citotóxico, em linhagens celulares de glioblastoma multiforme (GBM), mostraram resultados promissores (Abdel-Salam *et al*, 2019). Foi verificado que as células de glioblastoma U87-MG, após 3 horas de exposição ao peptídeo, tiveram mais da metade de sua população comprometida pela morte celular por necroptose.



Figura 25: **a:** Aranha *Lycosa erythrognatha*, onde pode ser vista a parte frontal do cefalotórax, as quelíceras e os olhos (Fonte: Santos, 2009). **b:** Sequências de LyeTx I e LyeTx I-b. Observa-se em vermelho a histidina presente em LyeTx I (sequência superior) e ausente em LyeTx I-b (sequência inferior). Os aminoácidos K e L foram destacados para melhor visualização da deleção da H. O N-terminal apresenta-se na forma acetilada e o C-terminal na forma amidada (destacado pelo NH₂).

1.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS COMO MODELOS PARA NOVOS FÁRMACOS ANTICANCER

Os compostos bioativos provenientes de venenos e peçonhas, podem ser de grande ajuda como possíveis fármacos ou como modelos para os mesmos. Como citado acima, desde tempos antigos estes compostos vêm sendo utilizados pelos seres humanos como forma de ajudar na sua sobrevivência (Gasi3n, 2013).

Muitas peçonhas de serpentes ou de aracnídeos, têm sido estudadas visando-se a criação de fármacos para o tratamento de diversas doenças, desde a hipertensão até a disfunção erétil. O captopril®, um fármaco antihipertensivo (figura 26a) que atua como um inibidor da enzima conversora de angiotensina - ECA- (Patlak, 2004) foi projetado com base em um peptídeo bioativo da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, estudado pelo pesquisador brasileiro Sérgio Ferreira. Contudo, a falta de investimentos e também de uma política de patentes no país naquela época, não permitiram a evolução do

trabalho para a obtenção de um fármaco no Brasil. Estudos de *drug design* foram realizados por um grupo de pesquisa no Reino Unido, o que levou à criação do fármaco hoje comercialmente conhecido como captopril® (Smith and Vane, 2003). Outro caso de fármaco derivado de uma toxina natural é o ziconotide (nome comercial prialt®; figura 26b), desenhado a partir da ω -conotoxina MVIIA, do caramujo marinho peçonhento *Conus magus* (Bowersox e Luther, 1998). A ω -conotoxina MVIIA é um peptídeo analgésico muito potente que foi utilizado para a obtenção do fármaco ziconotide (Prommer, 2006).

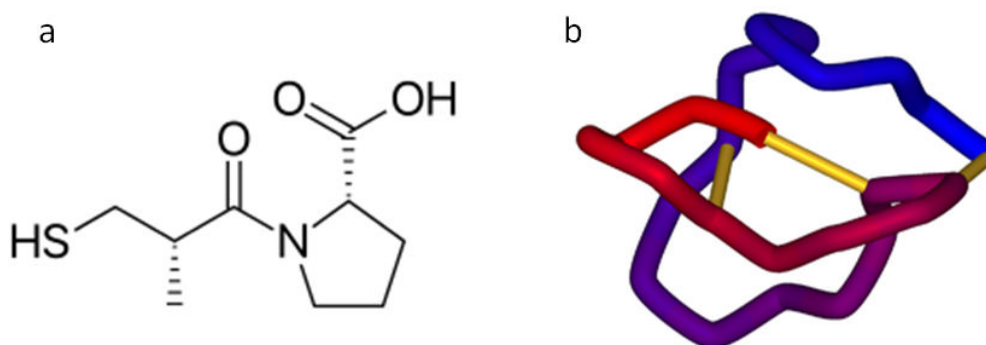


Figura 26: **a:** Estrutura química do captopril. **b:** esquema tridimensional do peptídeo ziconotide (prialt®), onde em amarelo encontra-se representado as três pontes dissulfeto da estrutura. Fonte: <https://medpedia.framar.bg>.

Como estas toxinas/peptídeos citados, que serviram de modelos para novos medicamentos, outros são também sugeridas como potenciais modelos de drogas para o tratamento do câncer, como por exemplo algumas toxinas de escorpiões (Ortiz *et al*, 2015), a magainina-2, da rã *Xenopus laevis*, e alguns de seus análogos (Gaspar *et al*, 2013; APD, 2019), dentre outros.

Alguns peptídeos com atividade anticâncer podem ser usados por ação direta sobre as células de câncer a serem tratadas, outros podem ser carreadores de um fármaco principal, ou até mesmo, podem atuar em sinergismo com uma ou mais drogas,

já usadas em tratamentos de câncer (Gaspar *et al*, 2013; Ortiz *et al*, 2015; Blanco-Míguez *et al*, 2016; Qiao *et al*, 2018).

Em vários estudos, alguns peptídeos antimicrobianos têm demonstrado atividade anticâncer, como por exemplo, a magainina-2 em modelos *in vitro* de câncer de bexiga (Lehmann, 2006), peptídeos isolados de organismos marinhos (tubarões, moluscos ou cordados basais), que agem por diversos mecanismos como p. ex. indução de apoptose, inibição da angiogênese, entre outros mecanismos (revisão de Zheng *et al*, 2011). Outros peptídeos de artrópodes, como aranhas (para revisão ver Wang e Wang, 2017) ou escorpiões como a Lunatina-1 (figura 27) e alguns de seus derivados (Gomes, 2018) têm também demonstrado atividade anticâncer.

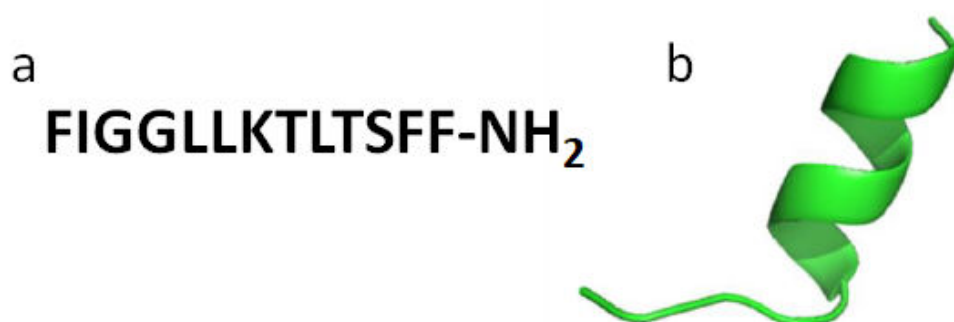


Figura 27: **a:** Sequência da lunatina 1 e **b:** estrutura de RMN da mesma. Fonte: Gomes, 2018.

Dentro do grupo das aranhas o peptídeo LyeTx I-b apresentou resultados promissores, como já exposto no tópico anterior, portanto há também a possibilidade de associação entre fármacos, usando-se os peptídeos anticâncer como um dos componentes dessa associação (Ortiz *et al*, 2015; Qiao *et al*, 2018)

1.5. OS TRATAMENTOS PARA PACIENTES COM CANCER

Atualmente os tratamentos para os diferentes tipos de cânceres baseiam-se na quimioterapia, tratamento cirúrgico, radioterapia, imunoterapia, terapia hormonal, transplantes de células tronco e medicina personalizada (NCI, 2019).

O tratamento cirúrgico consiste na remoção física do tumor, tratamento muito eficaz para tumores sólidos bem delimitados (NCI, 2019). Ele pode ser tanto um tratamento que solucione a patologia em alguns casos como pode também mitigar os efeitos da doença em estágios avançados com presença de metástases, pela remoção de alguns tumores que causem desconforto maior ao paciente (NCI, 2019), sendo necessário combinar outros tratamentos como p. ex. a quimioterapia (Lind, 2007).

A radioterapia é outro procedimento bem conhecido no tratamento de tumores, consistindo no uso de radiações ionizantes para danificar o DNA (NCI, 2019). A radioterapia pode ser realizada por radioterapia externa, onde a fonte de radiação está externa ao corpo do paciente (proveniente de uma máquina) ou radioterapia interna onde a fonte de radiação é introduzida no paciente na forma de solução líquida com o radiofármaco (radioterapia sistêmica) ou de uma cápsula sólida, caso da braquiterapia (NCI, 2019). Esta tem como benefício controlar o crescimento dos tumores, poder ser focada praticamente na área afetada bem como eliminar pequenas populações de células tumorais após um tratamento cirúrgico.

A imunoterapia consiste no uso do sistema imune ou de moléculas deste sistema (NCI, 2019) para o tratamento do câncer. Pode ser feita por administração de anticorpos monoclonais como p. ex. rituximab (anti-CD20), cetuximab (anti-EGFR), trastuzumab (anti-HER2) (Adler e Dimitrov, 2013); por administração de citocinas (Lee e Margolin, 2011) ou por vacinas, que ativam o próprio sistema imune do paciente (Lee e Margolin,

2011; NCI, 2019). Existe inclusive a técnica de transferência de linfócitos T do paciente, que foram previamente crescidos em cultura (NCI, 2019). A vantagem desta técnica é a alta especificidade, bem como os efeitos colaterais são muito mais brandos (Dimberu e Leonhardt, 2011). Ainda, as terapias hormonais são comuns para tratamento de cânceres dependentes destas moléculas, como p. ex. câncer de mama e de próstata, com isso tendo a vantagem de impedir o avanço de seu crescimento e auxiliando outras abordagens terapêuticas (NCI, 2019)

A quimioterapia se baseia no uso de fármacos que matem as células cancerosas (NCI, 2019). Existem diversos tipos de quimioterápicos como os agentes alquilantes, que interagem com DNA, tendo como exemplos: Agentes Mostarda, Oxazafosforinas, Alquil Sulfonatos, entre outros (Lind, 2007). Outro grupo inclui os derivados de platina como por exemplo a Cisplatina, primeiro fármaco dessa classe, Carboplatina e Oxaliplatina. Estes fármacos são classificados como fármacos citotóxicos por não apresentarem seletividade para células cancerosas com relação as não cancerosas. Eles ligam-se covalentemente ao DNA formando “cross-links” entre bases, bloqueando com isso a replicação e a transcrição do genoma da célula tumoral (Lind, 2007), que são células com alta taxa de replicação de DNA para realização de mitose. Com esses bloqueios as células afetadas sofrem uma parada do ciclo celular (Wang e Lippard, 2005) A figura 28 exemplifica o mecanismo de ligação bem como alguns eventos envolvidos.

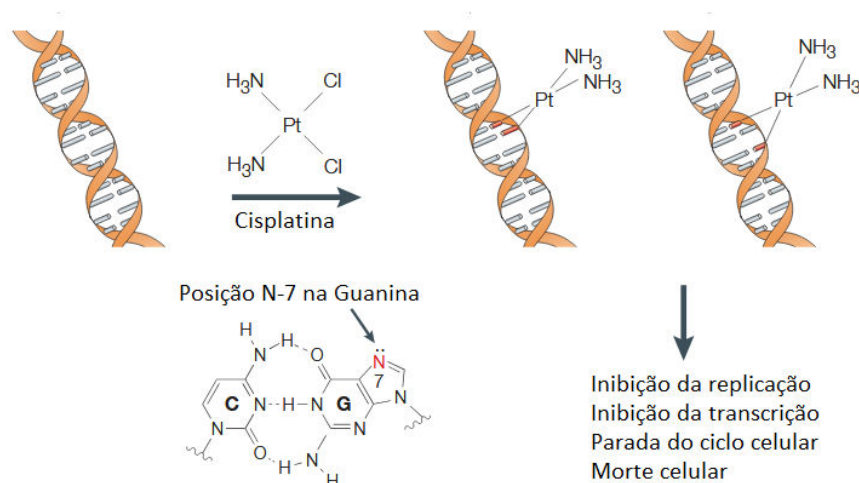


Figura 28: Mecanismo de ação da cisplatina ressaltando-se a posição N-7 da guanina como um dos sítios de ligação deste fármaco (esquerda) e alguns eventos desencadeados pelos efeitos químicos deste quimioterápico (direita). Fonte: Wang e Lippard, 2005

Os antimetabólitos são quimioterápicos que atuam como inibidores de reações enzimáticas importantes na síntese de DNA como, p. ex. os antifolatos que inibem a diidrofolato redutase -importante na síntese de timidina, ou antipurinas (6-mercaptopurina p. ex.) que inibem a síntese de novo de purinas (Lind, 2007). As antraciclinas atuam como agentes intercalantes de DNA induzindo quebras simples da molécula de DNA (Lind, 2007). Ainda existem agentes quimioterápicos que atuam como inibidores das enzimas topoisomerases I e II (etoposídeos), da despolimerização de microtúbulos (paclitaxel e taxotere) e de enzimas tirosina cinase (imatanib, erlotinib, etc) (Lind, 2007). A figura 29 apresenta algumas estruturas químicas de quimioterápicos.

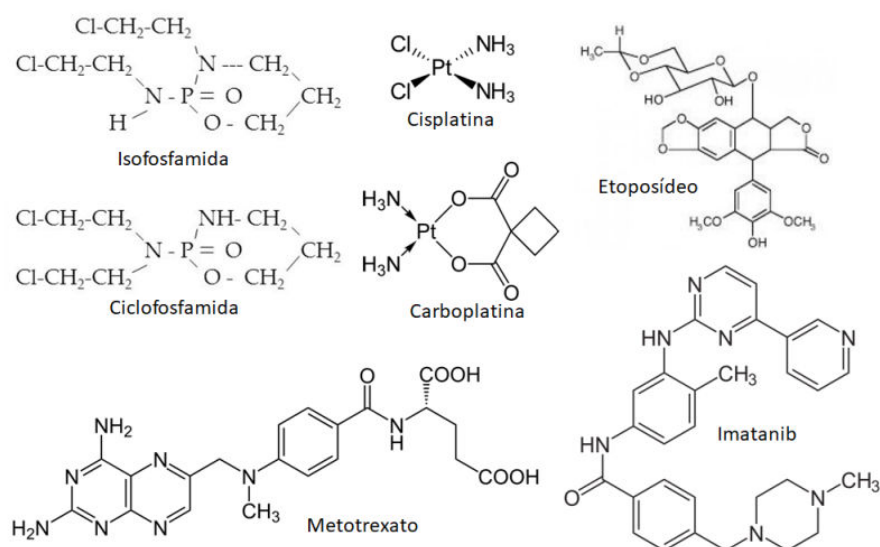


Figura 29: Estrutura química de alguns quimioterápicos bem conhecidos de uso clínico. Isofosfamida e ciclofosfamida são agentes alquilantes, cisplatina e carboplatina são derivados de platina, metotrexato é um antimetabólito do tipo antifolato e imatanib é um inibidor de tirosina cinase. Figura elaborada pelo autor.

1.5.1. Associação de fármacos como estratégias para terapia anticâncer

Devido à atividade de alguns peptídeos antimicrobianos contra células malignas, eles podem ser bons candidatos para desenvolver um novo fármaco no tratamento certos tipos de câncer, como p. ex. glioblastoma (Abdel-Salam *et al*, 2019) ou hepatocarcinoma (Qiao *et al*, 2018). Alguns peptídeos bioativos endógenos possuem atividade anticâncer já caracterizada como os HNPs (defensinas de neutrófilos humanos), produzidos por neutrófilos, que são ativos contra tumores sólidos e são associados à necrose tumoral quando agindo no interior de um tumor, talvez por reduzir a angiogênese (para revisão ver Gaspar *et al*, 2013). Portanto, existem peptídeos que são naturalmente anticâncer, o que seria um fator de interesse no uso desses contra o câncer. Uma vantagem suposta para o uso destes peptídeos contra o câncer, segundo alguns autores, seria sua atividade sobre a membrana, aparentemente não envolvendo um

receptor específico, o que reduziria, o aparecimento da resistência contra os mesmos (Gaspar *et al*, 2013).

A proposta de combinação entre peptídeo ativo e fármaco convencional anticâncer já vem sendo testada em diferentes ensaios (Gaspar *et al*, 2013; Ortiz *et al*, 2015) e tem mostrado resultados promissores. Como exemplo, um peptídeo derivado da sequência da granulina (proteína com função na regulação da função lisossomal, segundo UniProt, 2019), denominado granulina A, apresentou efeito sinérgico com a Cisplatina no tratamento de hepatocarcinoma, *in vitro* e *in vivo* (Qiao *et al*, 2018).

Um tratamento combinado tem muitas vantagens como p. ex. minimização da resistência aos fármacos se fossem usados individualmente (Mokhtari *et al*, 2017), retenção dos fármacos no interior das células e redução de sua “expulsão” através de bombas de efluxo tipo ABC - (Cancer.gov, 2016), redução da toxicidade dos fármacos usados (Palmer *et al*, 2017), aumento da probabilidade de mais pessoas serem eficazmente responsivas ao tratamento, figura 30 (Palmer *et al*, 2017), dentre outros. A proposta da combinação de fármacos já é bem explorada contra p. ex. o câncer de mama, onde alguns exemplos de combinações tais como: adriamicina e ciclofosfamida (citoxan), adriamicina e Docetaxel (taxotere) ou ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracil são comumente empregadas (Breastcancer.org, 2020; Drug.com, 2020).

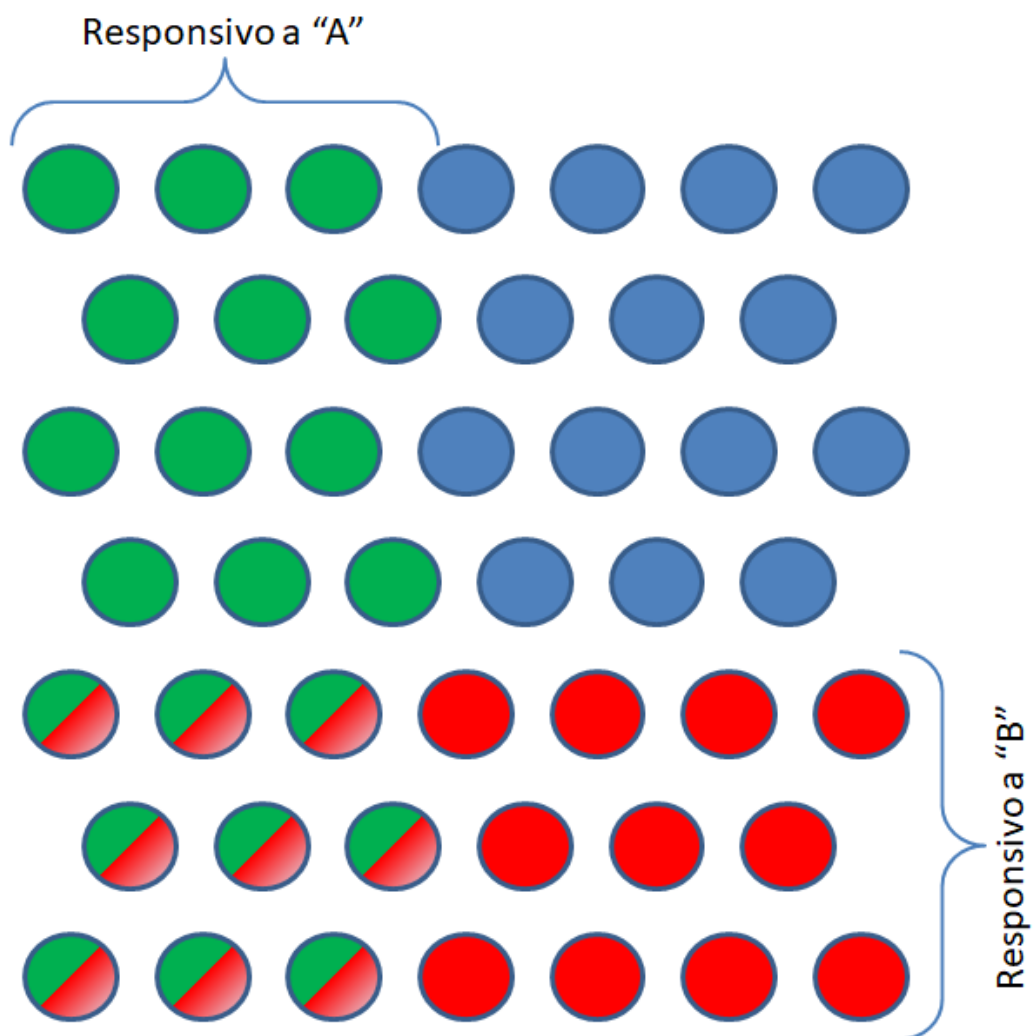


Figura 30: Diagrama apresentando uma população hipotética, onde a população em verde é responsiva a droga A, a população em vermelho é responsiva a droga B e a população em verde e vermelho é responsiva a ambas as drogas. Fonte: Palmer *et al*, 2017.

1.6. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a maior causa de mortes por câncer em mulheres no mundo. Ele é responsável por quase 25% de todos os casos anuais de câncer em mulheres ao redor do mundo (figura 31), bem como por 15% das mortes por câncer no sexo feminino (Bray *et al*, 2018). No Brasi são mais de 66 mil casos deste tipo de câncer por ano (INCA, 2020). O subtipo de câncer de mama denominado triplo negativo, é responsável por 15 a 20% de todos os casos de câncer de mama (Anders *et al*, 2016), sendo o mais agressivo e de pior evolução clínica (Gonçalves Jr *et al*, 2018). Algumas características deste câncer são: alta expressão de AKT3, inativação do gene BRCA1 (Anders *et al*, 2016) e a ausência de três receptores, a saber, para estrógeno, progesterona e fator de crescimento epidermal HER2 (Bauer *et al*, 2007), daí o nome triplo negativo.

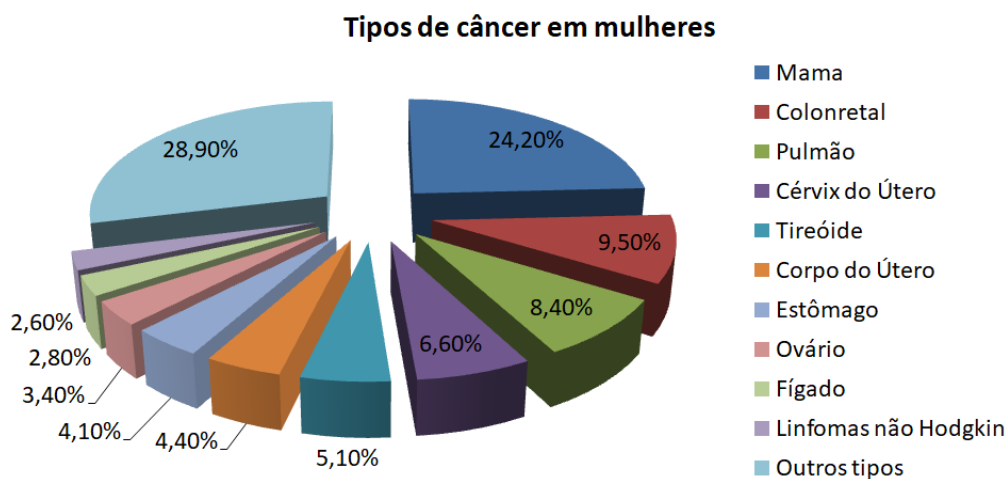


Figura 31: Frequência de diferentes tipos de câncer em mulheres. Fonte: Bray *et al*, 2018

Em todo o mundo surgem mais de 2 milhões de novos casos de câncer de mama todos os anos, sendo este tipo superado, numericamente, somente pelo câncer de pulmão (Bray *et al*, 2018). Considerando-se os dados acima citados, é de grande

importância o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de mama. Uma opção é o emprego da terapia combinada, onde podem ser combinados fármacos já utilizados na clínica, bem como um conjunto envolvendo um fármaco clinicamente utilizado e um novo candidato a fármaco. Esta última abordagem pode auxiliar na eficácia da formulação ao aumentar as chances de serem mortas populações diferentemente responsivas (Mokhtari *et al*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA GERAL DO TRABALHO.

Como já discutido na introdução, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre mulheres no mundo (Bray *et al*, 2018). Considerando-se a quantidade de óbitos resultantes desta patologia, fica claro que os tratamentos disponíveis tem se mostrado insuficientes para o combate ao câncer visto que este tem figurado entre as 10 maiores causas de morte em países desenvolvidos (WHO, 2018). Portanto, é de grande importância a pesquisa por novos tratamentos contra essa patologia.

O Brasil detém grande biodiversidade, possuindo amplas áreas de ricos biomas como a Amazônia, o Pantanal, o Cerrado e a Mata Atlântica. Compondo esta biodiversidade há muitas espécies de animais venenosos e peçonhentos, cujos venenos constituem um rico material, ainda pouco estudado, apesar dos vários trabalhos publicados na área. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na análise de venenos e peçonhas brutas visando sua caracterização bioquímica bem como o estudo das atividades biológicas de toxinas provenientes dessas fontes e algumas delas tem sido sugeridas como possíveis modelos de fármacos.

Portanto, neste trabalho propusemos buscar e estudar moléculas ativas, especialmente, contra células de câncer, dentre outras atividades como p. ex. antibacteriana e antifúngica. Inicialmente trabalhamos com a secreção de *Pithecopus megacephalus* (figura 32).

Pithecopus megacephalus é um anfíbio annuro endêmico da região da Serra do Cipó em, em Minas Gerais (Amphibiaweb, 2019). Descrita por Miranda-Ribeiro (1926) como *Phyllomedusa megacephala* esta espécie foi renomeada em 2016 por Duellman *et al* para seu nome atual. Entretanto nenhum estudo concernente a sua secreção foi

realizado até o momento conforme observado nos bancos de dados Web of Science, PubMed, e Scielo nos anos de 2015 e 2019.

Em uma segunda etapa do trabalho, exploramos a ação anticâncer de LyeTx1-b, um peptídeo modificado a partir de uma molécula obtida da peçonha de aranha *Lycosa erythrognatha*, denominado LyeTx1.

Em estudos prévios, nosso grupo mostrou que o peptídeo LyeTx I-b, apresenta citotoxicidade para algumas linhagens de células de câncer humanas e murina, incluindo a representativa de câncer de mama triplo-negativa MDA-MB-231 (Abdel-Salam *et al*, 2019). No presente projeto, este peptídeo foi avaliado em associação com o fármaco cisplatina que é amplamente utilizado na clínica para tratamento de tumores sólidos, mas que causa efeitos adversos graves como a neuropatia periférica, o que contribui para o abandono do tratamento pelos pacientes. Portanto a ideia desta proposta foi investigar se a combinação farmacológica do peptídeo com a cisplatina resultaria em efeito sinérgico, aditivo ou de potencialização, com o objetivo de reduzir a citotoxicidade da cisplatina para células não tumorais. Assim, este trabalho abriu perspectivas para novas abordagens terapêuticas visando-se o uso da associação de quimioterápicos com peptídeos como uma estratégia para a redução da dose dos quimioterápicos citotóxicos utilizados na clínica e com consequente redução dos efeitos adversos e maior eficácia.



Figura 32: Foto de *Pithecopus megacephalus*. Fonte: Espanha, 2014

CAPÍTULO I

3. OBJETIVOS CAPÍTULO I

Hipótese: Secreção de *Pithecopus megacephalus* possui peptídeos com atividades antimicrobiana e/ou antitumoral.

3.1 OBJETIVO GERAL CAPÍTULO I

Estudar a secreção do anuro *Pithecopus megacephalus* com enfoque em isolar e caracterizar peptídeos dessa secreção, testando-se possíveis atividades biológicas, sobre células de câncer e micro-organismos.

3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO I

Fracionar a secreção bruta de *Pithecopus megacephalus* por cromatografia.

Caracterizar peptídeos provenientes das frações por espectrometria de massa.

Sequenciar alguns peptídeos purificados da secreção, para comparação de suas estruturas primárias com as de moléculas depositadas em bancos de dados, visando-se obter possíveis indicações como, atividade biológica, sítios alvos, dentre outras.

Selecionar dentre as moléculas caracterizadas, aquelas de maior de interesse e realizar ensaios biológicos em linhagens de bactérias, fungos, células de câncer de mama e não câncer imortalizadas.

4. MÉTODOS CAPÍTULO I

Os materiais utilizados estão especificados no anexo "14.4".

4.1 CAPTURA DOS ANUROS E PREPARO DA SECREÇÃO

Vinte indivíduos de *Pithecopus megacephalus*, de ambos os sexos, foram coletadas na Áreas de Proteção Ambiental (APA) do Morro da Pedreira, Lagoa Santa Minas Gerais, Brasil (licença de coleta do Ministério do Meio Ambiente, SISBio número 37608-1), pelo grupo de pesquisa da Dr^a Prof^a Paula Cabral Eterovick. A secreção foi obtida logo após a coleta dos animais, por estímulo elétrico de baixa voltagem (~8V), protocolo já utilizado na literatura (Nascimento *et al*, 2004; Leite *et al*, 2005) e aprovado pelo CEUA/UFMG sob o no. protocolo 391/2012. Vinte outras coletas de secreção foram também realizadas, com os animais mantidos em um terrário montado em caixas de dimensão de 80 cm x 40 cm x 60 cm. Após as coletas, o pool resultante foi dissolvido em água Milli-Q estéril, filtrado e liofilizado, conforme descrito por Batista *et al* (1999 e 2001).

4.2 FRACIONAMENTO DO "POOL" DE SECREÇÃO BRUTA

A secreção bruta liofilizada foi dissolvida em água Milli-Q com 0,1% de TFA (ácido 2,2,2-trifluoroacético) sendo manualmente agitada. Em seguida, esta solução foi filtrada em filtros com 0,22 µm de porosidade para remoção de impurezas e componentes insolúveis.

Após a etapa de preparo, descrita anteriormente, cromatografias de fase reversa em equipamento ÄKTA Explorer foram realizadas, com a solução da secreção bruta

pós-filtragem, utilizando-se como solução A 0,1% de TFA em água Milli-Q e como solução de eluição B 0,1% de TFA em ACN (acetonitrila). Foi escolhida a Coluna C8 semiprep Supelco™ (Sigma-Aldrich), uma coluna com cadeias n-octil ligadas em sua resina, para fracionamento por fase reversa. Dois miligramas de secreção bruta, por corrida cromatográfica, foram submetidos a um gradiente segmentado, conforme descrito na tabela 3 em um fluxo de 5 ml/min.

Tabela 3: Descrição do gradiente utilizado na purificação da secreção bruta, em ÄKTA Explorer, coluna de fase reversa (coluna C8 semiprep).

Tempo	% Solução B
7,5 min	0%
15 min	9%
82 min	50%
90 min	100%
97 min	100%
107 min	0%

As cromatografias foram monitoradas por leituras espectrofotométricas em três comprimentos de onda, a 280 nm -comprimento de onda de absorção dos anéis aromáticos presentes nos resíduos de triptofano e tirosina - a 214 nm -comprimento de onda de absorção das ligações peptídicas- e a 254 nm - que pode dar indícios da presença de glicoproteínas, sendo coletadas frações de 1 ml. Os picos de interesse foram integrados através do programa Origin 8, isto é, a área sob a curva que representa cada um dos picos foi calculada.

As frações de interesse foram reunidas, por picos, e foram, posteriormente, estimadas quanto à quantidade de massa através da relação, segundo Harris & Bashford (1987):

$$A_{215} = 15 \approx 1\text{mg/ml}$$

Ou seja, uma leitura teórica de A_{215} igual a 15, equivale a aproximadamente 1 mg/mL de proteína na solução.

4.3 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

4.3.1 Análises dos componentes fracionados

As análises de pureza das frações cromatográficas foram realizadas utilizando-se um MALDI-TOF AutoflexIII (LMOPROT, UFMG) e um UltraflexII (CRN2M, Aix Marseille University). Para o preparo das amostras 0,5 µl de cada uma das frações de interesse foram co-cristalizadas com 0,5 µl de matriz α -ciano (10 mg/ml) na placa MTP AnchorChip600/384 ou com 0,5 µL de Super DHB (uma mistura de DHB e HMB, proporção 9:1) a 10mg/ml.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa RP-Pep-Mix (modo refletor para análises de peptídeos, utilizando-se a faixa de 500 a 4.000 Da), LP-Prot-Mix (modo linear para análises de proteínas utilizando-se a faixa de 5.000 a 20.000 Da) e o modo LP-66KDa (modo linear para análises de proteínas na faixa de 20.000 Da até 500.000 Da).

4.3.2 Fragmentação de componentes de baixa massa (MS/MS)

Moléculas com menos de 4000 Da foram submetidas a fragmentação por PSD (*Post Source Decay* i. e. decaimento pós fonte) no MALDI-TOF AutoflexIII e UltraflexII. Neste sistema de fragmentação um íon metaestável parental, é selecionado através do sistema LIFT, e este sofre fragmentação via decaimento, sendo os fragmentos gerados reacelerados, gerando um padrão de fragmentação correspondente a estrutura primária do íon parental. A figura 33 representa esquematicamente os dois

espectrômetros de massa usados. A montagem das sequências dos peptídeos foi realizada manualmente nos softwares FlexAnalysis ou PepSeq.

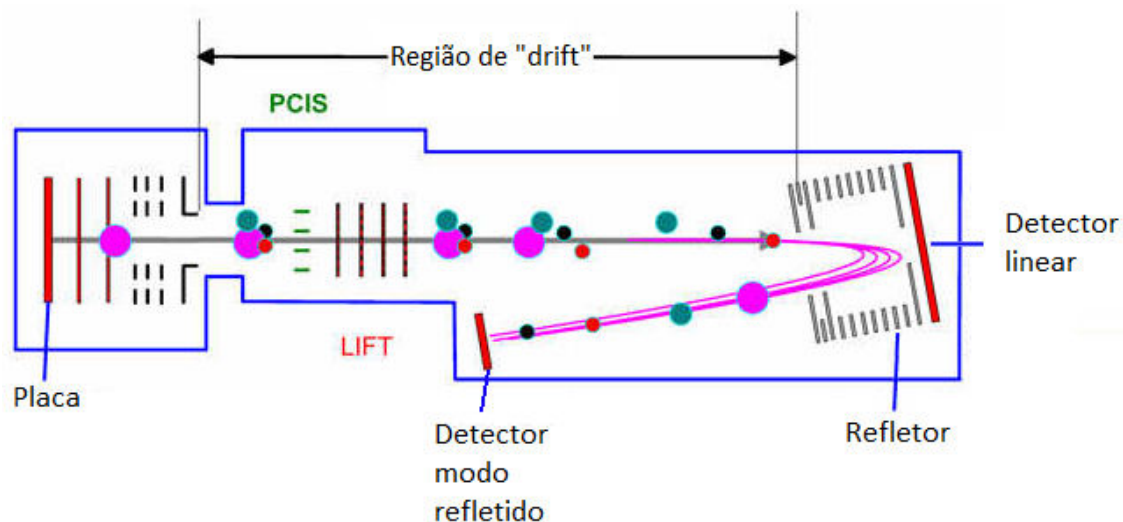


Figura 33: Representação esquemática dos equipamentos MALDI-TOF utilizados, destacando-se o sistema de fragmentação usado (PSD). A amostra está na placa, sendo um dos íons metaestáveis presentes nela selecionados no LIFT que é reacelerado e detectado no detector modo refletido para alta resolução necessária a fim de obtenção de espectros de qualidade.

Uma etapa de validação *in silico* também foi realizada, para verificar a confiabilidade das sequências encontradas, utilizado-se para tal finalidade o MS-Product, disponível em:

< <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgibin/msform.cgi?form=msproduct> >.

4.4 ANÁLISES DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS

Buscas por similaridades foram realizadas após o sequenciamento "de novo" dos peptídeos através da plataforma Protein BLAST do NCBI, disponível em [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Estas análises foram realizadas utilizando-se diferentes parâmetros de busca. Primeiramente foram feitas buscas procurando-se similaridades com o grupo "*frogs & toads*" do NCBI, e depois similaridades com o banco de dados "*Homo sapiens*".

Sequências que obtiveram similaridades com proteínas presentes no banco de dados do NCBI foram submetidas ao Clustal [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>] para melhor visualização de pontos de similaridade.

4.5 SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Os peptídeos de interesse foram sintetizados utilizando-se o método de síntese manual de Fmoc/t-butila (Merrifield, 1963; Chan & White, 2000). As sínteses foram realizadas ou utilizando a resina Wang, para peptídeos com N-terminal carboxilados ou a resina Fmoc-Rink amide para peptídeos com N-terminal amidados. A resina Wang utilizada é provida de um grupo hidroxila livre que é o alvo para a primeira reação de acoplamento e a Rink amide com um grupo amina como sítio para a primeira reação de acoplamento.

4.5.1 Síntese de peptídeos com C-terminal carboxilado

O primeiro acoplamento foi realizado pelo método do anidrido simétrico (CHAN & WHITE, 2000), que consiste na ativação de dois aminoácidos e a reação deles entre si, formando um anidrido do aminoácido a ser acoplado (figura 34), através do uso do DIC (diisopropilcarbodiimida) como ativador utilizando-se DCM (diclorometano) como solvente.

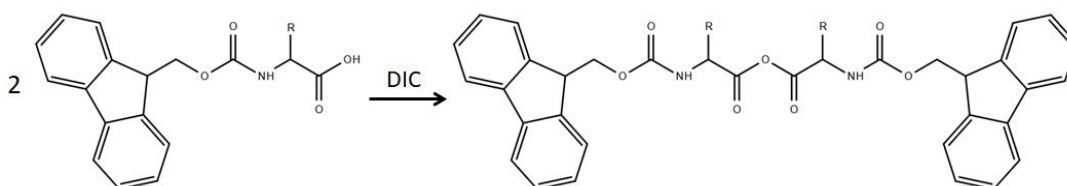


Figura 34: Reação de formação do anidrido simétrico. Dois equivalentes do aminoácido-Fmoc reagem entre si pelo C-terminal sob prévia ativação de DIC. O anidrido formado é o reagente da primeira reação de acoplamento para este tipo de síntese.

Após a formação do anidrido simétrico, 5 equivalentes deste foram reagidos com a resina Wang sob catálise de 0,1 equivalente de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) por uma hora. Após a reação foi realizado o teste de Kaiser (para detectar aminas livres) utilizando-se uma solução de ninidrina (Chan & White, 2000), onde um teste negativo acusou ausência de aminas livres, portanto um acoplamento adequado.

Para preparo dos acoplamentos seguintes foram utilizadas duas lavagens, de 15 min cada, com uma solução de 4-metil-piperidina a 20% (v/v) em DMF (N,N-dimetilformamida) para a remoção do grupo Fmoc protetor. Nesta etapa foi realizado o teste de Kaiser para monitorar a etapa de desproteção, onde um resultado positivo, cor azul, acusa a presença de aminas, os sítios de acoplamento dos aminoácidos a serem

adicionados. Caso o resultado fosse negativo, uma lavagem adicional com solução de piperidina era realizada.

Após a desproteção, a resina foi incubada com o segundo aminoácido protegido pelo Fmoc. Nesta etapa foi utilizada uma solução contendo 3 ml de DMF como solvente, para o acoplamento. Utilizaram-se 5 equivalentes molares do aminoácido Fmoc e de hidroxibenzotriazol (HOBt), 4,4 equivalentes molares de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU) e 6 equivalentes molares de N,N'-diisopropiletanolamina (DIPEA). Após uma hora de incubação, uma alíquota da resina era removida para realização do teste de Kaiser, onde um resultado negativo significava um acoplamento eficiente, porém em caso de um teste positivo, a etapa de acoplamento era repetida.

As etapas de desproteção e acoplamento foram repetidas até todos os resíduos de aminoácidos serem adicionados. Entre cada etapa de desproteção e de acoplamento, a resina foi lavada três vezes com DMF e metanol, alternadamente, e depois por duas vezes com diclorometano DCM.

Para a clivagem, inicialmente o último grupamento Fmoc foi removido dos peptídeos, após o teste de Kaiser acusar a eficácia do processo, a clivagem foi realizada utilizando-se uma solução de TFA a 95% (v/v) e triisopropilsilano (TIS) a 2,5% (v/v) por 1 hora. A clivagem ácida, além de liberar os peptídeos da resina, remove os grupos protetores de algumas cadeias laterais de aminoácidos protegidos. A clivagem ácida dos peptídeos ligados à resina Wang, libera-os com o C-terminal carboxilado.

Os peptídeos sintetizados foram ressuspensos em 20 mL de água milli-Q® e depois liofilizados em liofilizador da marca Thermo, ModulyoD FR-drying. Desta forma, foram obtidos 140 mg de cada um dos peptídeos que foram novamente ressuspensos em 14 mL de água milli-Q® e congelados a -20°C até a purificação.

4.5.2 Síntese de peptídeos com C-terminal amidado

Peptídeos amidados foram sintetizados usando a resina Rink Amide como suporte, resina esta com grupos protetores Fmoc nos respectivos sítios de acoplamento. Duas lavagens, de 15 min cada, com uma solução de piperidina a 20% (v/v) em DMF foram efetuadas para remoção do Fmoc protetor. Após a reação de desproteção foi realizado o teste de Kaiser em uma alíquota da resina para verificação da eficiência dessa reação, quanto a não presença de grupos aminas primárias livres.

Seguindo-se a desproteção, a resina foi incubada com 4 equivalente de HOBt, DIC e do Fmoc-aminoácido em uma solução de proporção 2:1 de DMF e DCM. A reação foi realizada por 3 horas. Em seguida uma alíquota da resina foi removida para um novo teste de Kaiser e verificação de ausência de grupos aminas primárias livres.

Os passos de desproteção e acoplamento foram repetidos até todos os resíduos de aminoácidos serem adicionados à sequência. Entre cada etapa de desproteção e de acoplamento, a resina foi lavada três vezes com DMF e metanol, alternadamente, e depois por duas vezes com DCM. Para a clivagem dos peptídeos seguiu-se o fluxo de trabalho semelhante ao da síntese dos peptídeos com C-terminal carboxilados.

4.6 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos sintéticos foram purificados por cromatografia de fase reversa em Coluna C8 semiprep. Oito miligramas de produto de síntese foram submetidos a esta técnica cromatográfica utilizando-se um gradiente segmentado, conforme especificado na tabela 4, em equipamento HPLC Shimadzu em um fluxo de 5 ml/min.

Tabela 4: Descrição do gradiente utilizado na purificação do peptídeo sintético, em HPLC, coluna de fase reversa (coluna C8 semiprep).

Tempo	% Solução B
5 min	0%
10 min	15%
30 min	35%
35 min	100%
40 min	100%
45 min	0%

As frações de interesse foram monitoradas em A_{220} nm, sendo coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa conforme especificado no item 4.3 para verificação da presença do peptídeo sintetizado.

Após a purificação, as frações correspondentes ao peptídeo de interesse foram reunidas e liofilizadas para posterior uso nos próximos experimentos. Após a etapa de liofilização foi realizada uma triagem de qualidade do produto que consistiu em realizar mais uma etapa de espectrometria de massa, para assegurar que após o processo não houve degradação da amostra liofilizada, bem como uma nova cromatografia analítica. A cromatografia foi feita em um gradiente linear de solução B por 30 min partindo-se de 5% de solução B até 100% da mesma.

Os picos de interesse foram integrados através do programa Origin 8, isto é a área sob a curva que representa cada um dos picos foi calculada. Para isso foi utilizada a ferramenta de integração de picos do programa (Integrate). Para tal foi traçada uma

linha de base com o auxílio de 20 pontos para esta modelagem, observando-se ser suficiente esta quantia de pontos. Após a integração de cada pico a área total foi calculada como o somatório de todas as áreas obtidas e o teor de pureza foi calculado como a porcentagem da área do pico de interesse com relação ao somatório de todas as áreas.

4.7 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os peptídeos sintéticos purificados foram submetidos a uma triagem de testes para verificar suas possíveis atividades antimicrobianas. Para a triagem de atividade antibacteriana foi utilizado o ensaio de microdiluição, feito de acordo com as normas dos respectivos CLSI para bactérias e fungos.

Os ensaios antibacterianos foram executados baseados da norma M100-S23 de 2013. Para o preparo dos inóculos, as espécies de bactérias a serem testadas (números de ATCCs discriminados na tabela) foram semeadas em placas de ágar MH (Mueller-Hinton) por 24 h em estufa para o controle da temperatura a 37 °C. Após as bactérias serem crescidas nas placas de ágar, uma colônia foi escolhida e ressuspensa em solução salina de NaCl a 0,85% (p/v). A quantidade de bactérias foi ajustada usando-se uma escala de 0,5 de McFarland, para obter cerca de 10^8 UFC/ml em leituras de absorbância a 625 nm em espectrofotômetro. A seguir o inóculo foi diluído 200 vezes em placas de 96 poços contendo as diluições na base 2 dos peptídeos a serem testados.

Os ensaios antifúngicos foram procedidos com base na norma M27-A2 de 2001. Inóculos da espécie de fungos testado (espécie e respectiva ATCC, vide tabela) foram preparados em placas de ágar SB (Sabouraud) e incubadas por 72 h a 37 °C. Posteriormente, a essa etapa, colônias foram removidas e ressuspensas na solução

salina de NaCl a 0,85% (p/v) e a quantidade de células ajustadas em escala de McFarland para 5×10^6 células/ml, pela leitura de transmitância de 530 nm. A seguir o inóculo foi diluído 2000 vezes em placas de 96 poços contendo as diluições na base 2 dos peptídeos a serem testados.

Espécie microbiana	Código ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591
<i>Candida albicans</i>	18804

Para ambos os grupos (bactérias e fungo) partiu-se da concentração máxima dos peptídeos de 256 µg/ml até a mínima de 0,25 µg/ml, nas placas de 96 poços.

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS

4.8.1 Linhagens celulares e estratégia de cultura utilizadas

Células das linhagens MDA-MB-231 (linhagem de câncer de mama, com fenótipo negativo para receptor de estrógeno, progesterona e de fator de crescimento epidermal, provenientes de uma mulher de 51 anos), MCF-7 (linhagem de câncer de mama, com fenótipo positivo para receptor de estrógeno e crescimento inibido em presença de TNF- α , originárias de uma mulher de 69 anos), HCT 116 (linhagem de carcinoma colorretal de um homem) e HEK-293 (linhagem de rim embrionário de um feto abortado) foram mantidas em cultura com o meio DMEM, tipo *high glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-Glutamina, 1% de solução de antibiótico (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C. Estas células foram mantidas em sua fase

logarítmica de crescimento, conforme especificado e utilizadas apenas entre as passagens de 5 a 20. Todas as linhagens foram testadas contra contaminações por micoplasmas e preservadas até o uso por criogenia, em 45% de SFB, 45% de DMEM e 10% de DMSO.

4.8.2 Ensaios de citotoxicidade

Células das linhagens MDA-MB-231, MCF-7, HCT 116 e HEK-293 foram plaqueadas em placas de 96 poços na quantidade de 10.000 células por poço, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, e incubadas em estufa de CO₂ por 24 h a 37 °C. Em seguida a esta etapa as células foram tratadas com diferentes diluições, na base 2, dos peptídeos partindo-se de uma concentração de 100 µM até a de 1,56 µM e incubadas por 48 h.

A viabilidade celular posterior ao tratamento foi analisada pelo ensaio de sulforodamina B (Vichai & Kirtikara, 2006; com modificações). Brevemente, as células, foram fixadas com adição de 10 µl de TCA (ácido 2,2,2-tricloroacético) a 10% (v/v) por 1 h. Em seguida o meio foi desprezado e as placas foram mergulhadas quatro vezes em água Milli-Q para remoção do TCA. Foram adicionados 50 µl Sulforodamina B a 0,04% (p/v) por 30 min à temperatura ambiente. Para remoção do excesso de sulforodamina B as placas foram lavadas com solução de 1% (v/v) de ácido acético. Para leitura da quantidade de sulforodamina B incorporada as células foram adicionados 100 µl de Tris-Base 10 mM pH 10,5 e as placas foram agitadas em homogeneizador por 5 min a temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram feitas em λ de 510 nm no Varioskan Lux.

Os dados foram analisados através do software Graphpad Prism 5.0 sendo usado o teste de análise de variância (One way ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni, sendo considerado um p-valor igual ou menor que 5%, para analisar a diferença estatística entre o grupo controle (tratamento com PBS) com os grupos que foram tratados com as diferentes concentrações dos peptídeos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 FRACIONAMENTO DAS SECREÇÕES BRUTAS

A etapa de fracionamento cromatográfico das secreções brutas de *P. megacephala*, obtidas no item 4.1 resultou em um perfil cromatográfico (fig. 35) com 68 frações, cujas absorbâncias indicaram quantidades mais abundantes de material. Estas frações foram isoladas e submetidas às análises por espectrometria de massa. Algumas dessas frações possuíam quantidade de material mais abundante, que reunido foi suficiente para a realização de análises adicionais. Outras frações tinham quantidades limitantes e não foram analisadas.

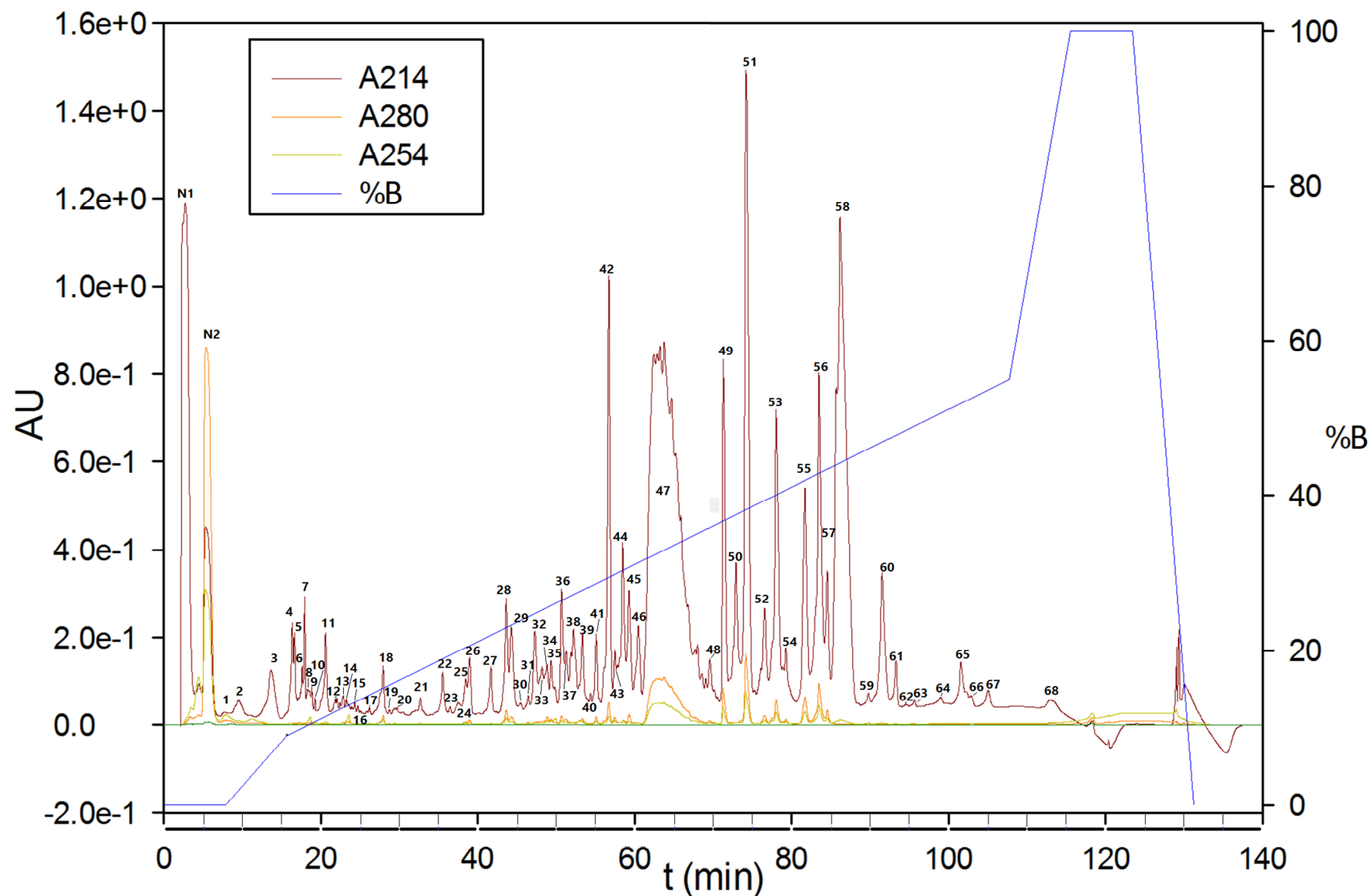


Figura 35: Cromatograma obtido pelo fracionamento da secreção (2 mg) da *P. megacephala*, em cromatografia de fase reversa. Em vermelho é visível a absorbância A214, em laranja A280, em verde A254 e em azul o gradiente de solução B (0,1% de TFA em ACN). A numeração refere-se às 68 frações obtidas nesta cromatografia. Os eixos mostram em x o tempo de eluição, y - à esquerda são as absorbâncias e y à direita a % de solução B.

5.2 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

5.2.1 Análises dos componentes fracionados

Frações coletadas na etapa de cromatografia de fase reversa foram analisadas por espectrometria de massa, para verificação dos componentes que poderiam ser encontrados na faixa de massa de 400 a 500.000 Da, utilizando-se para isso os três métodos disponíveis para estas análises, conforme já descrito na seção 4. Quando utilizado o método que detecta na faixa de 20.000 Da até 500.000 Da, não foram encontrados sinais referentes a macromoléculas, somente na faixa de 600 a 9.000 Da (método de análise para peptídeos e proteínas menores) foram encontrados sinais referentes a macromoléculas biológicas (fig. 36).

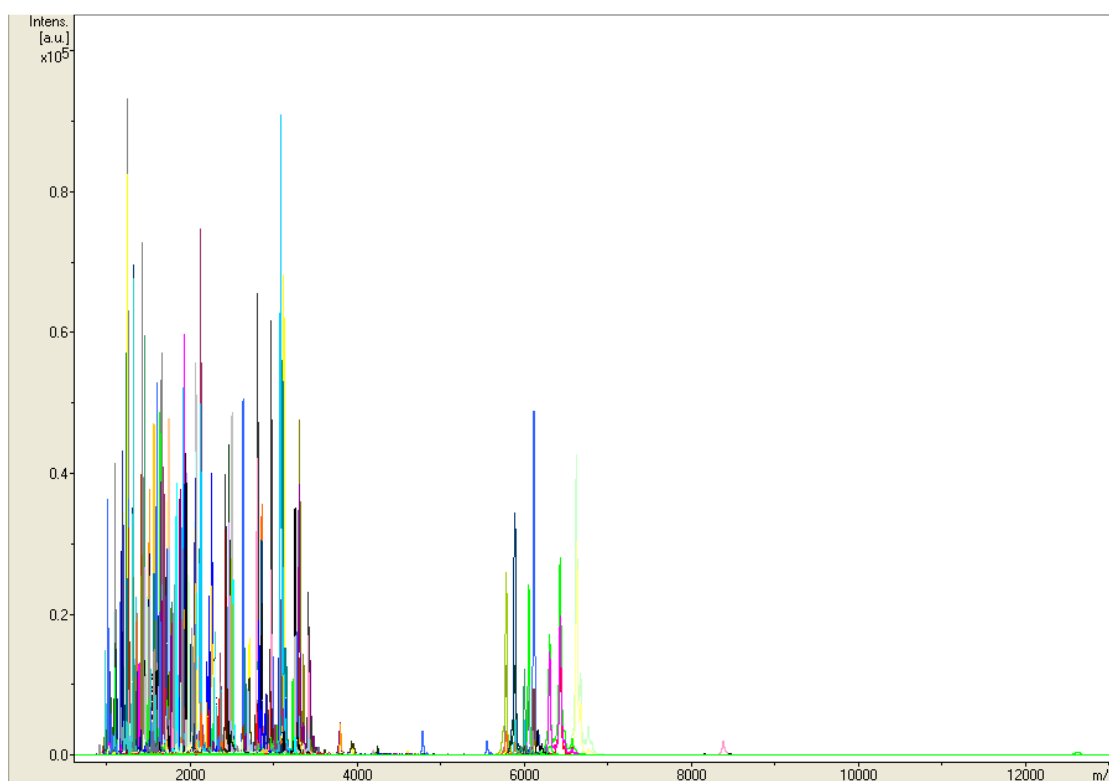


Figura 36: Espectros de massa referentes a todas as frações do cromatograma obtido na figura 35 do item 5.1. Observa-se que a grande maioria das macromoléculas estão nas faixas de 1.000 a 3.500 Da e de 5.600 a 6.800 Da. Entretanto, alguns sinais com valores maiores, como 8.500 Da foram também registrados. No eixo x está a relação massa/carga (m/z) e no eixo y a intensidade do sinal.

Com relação aos resultados utilizando-se diferentes matrizes, somente a matriz de ácido α -ciano foi eficaz na ionização das amostras analisadas. Análises feitas com a matriz Super DHB não acusaram a presença de sinais significativos e, portanto, esta matriz não foi mais utilizada após os testes iniciais.

5.2.2 Fragmentação de componentes de baixa massa (MS/MS)

Alguns peptídeos foram eficazmente fragmentados por PSD (*post source decay*) resultando em espectros de fragmentação passíveis de interpretação. Outras macromoléculas foram também submetidas a este tipo de fragmentação, porém os resultados não foram satisfatórios. A tabela 5 apresenta as massas monoisotópicas dos íons que foram submetidos à fragmentações bem sucedidas, na geração dos espectros.

Em conjunto com a tabela 5 são apresentados também resultados de degradação de Edman (assinalados com asterisco (*)) obtidos no Institute de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille Protéomique -IBiSA, em Marseille.

Tabela 5: Peptídeos cujas sequências foram elucidadas por sequenciamento *de novo*. A sequência do peptídeo assinalado com asterisco foi elucidado por degradação de Edman.

Massa encontrada experimentalmente	Massa teórica	Sequência encontrada
1222,57	1222,62	VMYTLNYLAH-NH ₂
1221,62	1221,64	MVHPFAVFLY-NH ₂ *
1239,67	1239,69	RQLASALAQHF-NH ₂
1554,00	1553,95	RFPALLVRTKGAGGL-NH ₂
1699,84	1699,99	LLPHALNAVSAKHF-NH ₂
1787,11	1787,02	SLLPHALNAVSAKHF-NH ₂
1853,98	1854,03	LSLPHALNAVSTLVHHF-NH ₂
1909,98	1910,05	FLSLLPHALNAVSAHH
1901,01	1901,09	FLSLLPHALNAVSAKH
2047,26	2047,14	FLSLLPHALNAVSAK/QHF-NH ₂
2056,16	2056,14	FLSLLPHALNAVSAHHF-NH ₂
2114,26	2114,18	FLSLLPHALNAVSTLVHHF-NH ₂
1929,07	1929,01	FLSLLPHALNAVSMHSG-NH ₂
705,36	705,38	SPLRFS

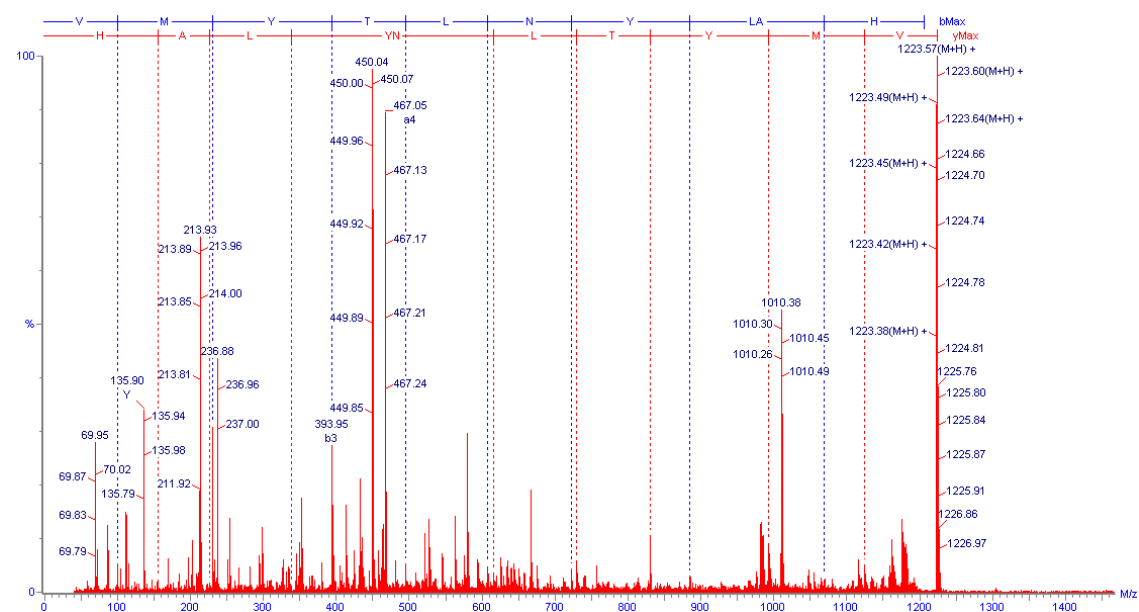


Figura 37: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1223,57 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul, a série b e, abaixo em vermelho, a série y.

Tabela 6: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 37, comparados com as respectivas massas teóricas, geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

VMYTLNLAH-NH2				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
V	99,94	-	1223,57	1223,62
M	230,87	231,11	1124,52	1124,55
Y	393,95	394,17	993,28	993,51
T	494,93	495,22	830,28	830,45
L	608,09	608,31	729,15	729,40
N	722,08	722,35	616,03	616,32
Y	885,31	885,41	NE	502,27
L	NE	998,50	339,00	339,21
A	1069,53	1069,53	225,91	226,12
H	NE	-	154,96	155,09

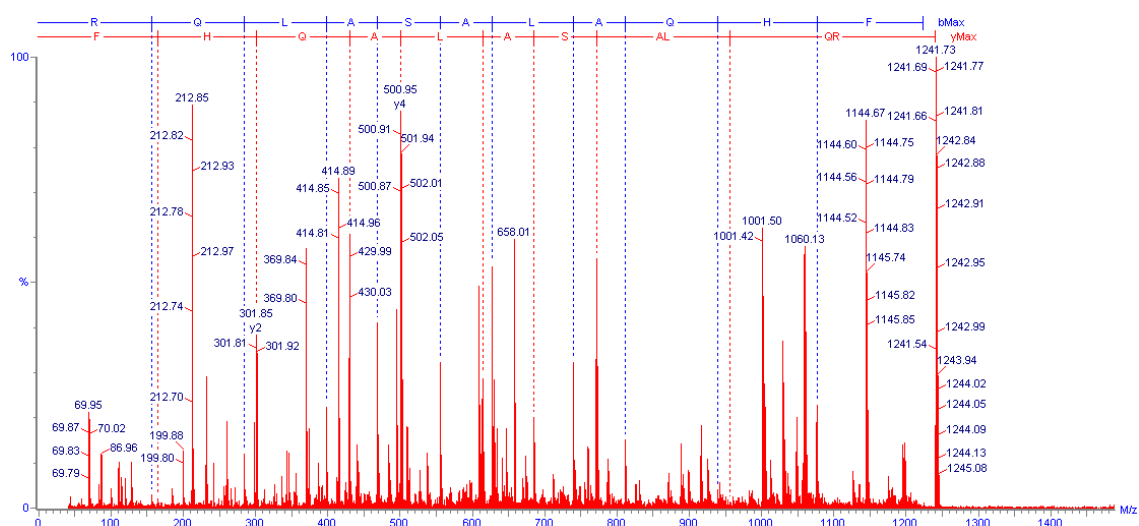


Figura 38: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1240,67 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 7: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 38, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE= íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

RQLASALAQHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
R	156,92	-	1240,67	1240,69
Q	284,84	285,16	NE	1084,58
L	397,84	398,25	956,49	956,53
A	468,95	469,28	NE	843,44
S	556,00	556,32	772,15	772,41
A	627,04	627,35	685,06	685,37
L	740,11	740,44	614,03	614,34
A	811,19	811,47	500,95	501,25
Q	939,29	939,53	429,92	430,21
H	1076,49	1076,59	301,81	302,16
F	NE	-	164,88	165,10

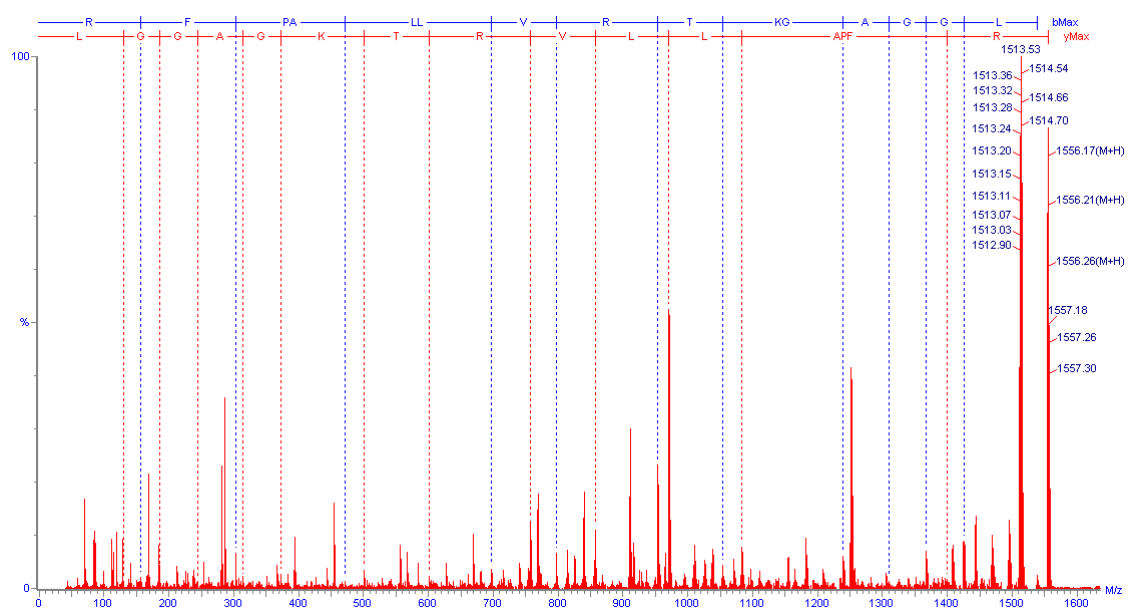


Figura 39: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1555,00 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 8: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 39, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE= íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

RFAPLLVVRTKGAGGL-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
R	156,67	-	1555,00	1554,95
F	303,53	304,17	1399,01	1398,85
A	373,48	375,21	NE	1251,78
P	471,70	472,26	1182,49	1180,75
L	NE	585,35	1083,39	1083,69
L	697,77	698,43	971,17	970,61
V	796,96	797,50	857,07	857,53
R	953,16	953,60	757,97	758,46
T	1054,19	1054,65	601,72	602,36
K	NE	1182,74	500,69	501,31
G	1239,59	1239,76	372,56	373,21
A	1310,04	1310,80	314,46	316,19
G	1367,89	1367,82	244,51	245,16
G	1426,11	1424,84	186,62	188,13
L	1538,12	-	129,65	131,11

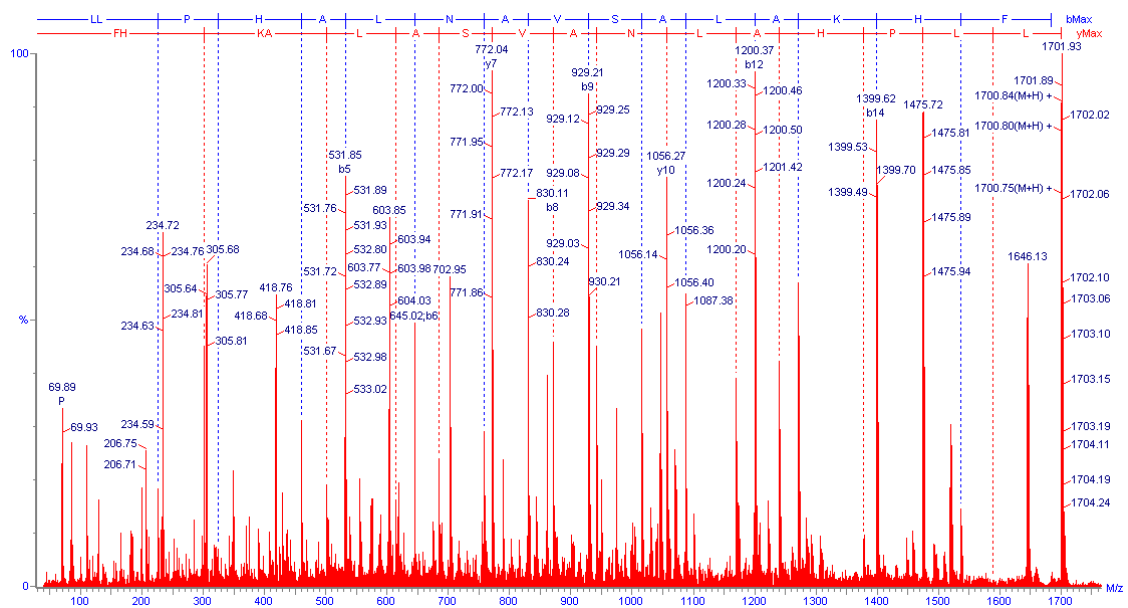


Figura 40: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1700,84 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 9: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 40, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE= íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

LLPHALNAVSALAKHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
L			1700,84	1700,99
L	226,79	227,17	1588,23	1587,91
P	323,76	324,22	1474,67	1474,82
H	460,80	461,28	1377,44	1377,77
A	531,85	532,32	1240,45	1240,71
L	645,02	645,40	1169,36	1169,67
N	759,06	759,45	1056,27	1056,59
A	830,11	830,48	942,19	942,55
V	929,21	929,55	871,14	871,51
S	1016,24	1016,58	772,04	772,44
A	1087,33	1087,62	685,05	685,41
L	1200,37	1200,70	613,96	614,37
A	1271,51	1271,74	500,83	501,29
K	1399,62	1399,84	NE	430,25
H	1536,79	1536,90	301,67	302,16
F	1683,85	-		165,10

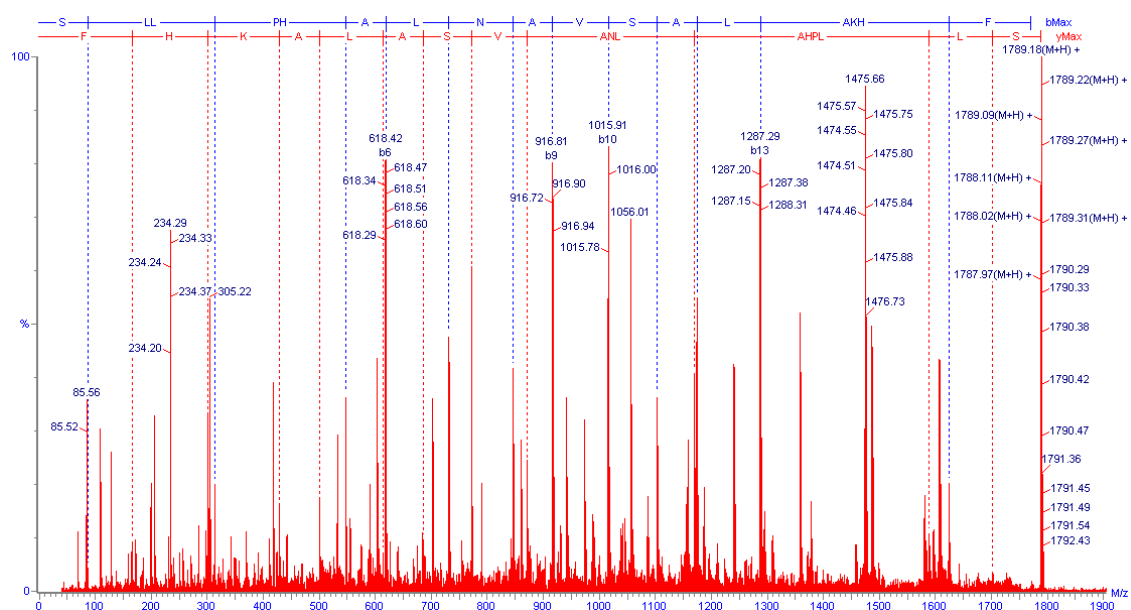


Figura 41: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1788,11 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 10: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 41, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

SLLPHALNAVSALAKHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
S	86,58	-	1788,11	1788,02
L	NE	201,12	1702,35	1700,99
L	313,28	314,20	1587,90	1587,91
P	NE	411,26	NE	1474,82
H	547,40	548,31	NE	1377,77
A	618,42	619,35	NE	1240,71
L	731,59	732,44	1169,13	1169,67
N	845,70	846,48	NE	1056,59
A	916,81	917,52	NE	942,55
V	1015,91	1016,58	870,75	871,51
S	1103,09	1103,62	771,64	772,44
A	1174,12	1174,65	685,49	685,41
L	1287,29	1287,74	613,53	614,37
A	NE	1358,77	500,36	501,29
K	NE	1486,87	429,25	430,25
H	1623,90	1623,93	301,26	302,16
F	NE	-	165,40	165,10

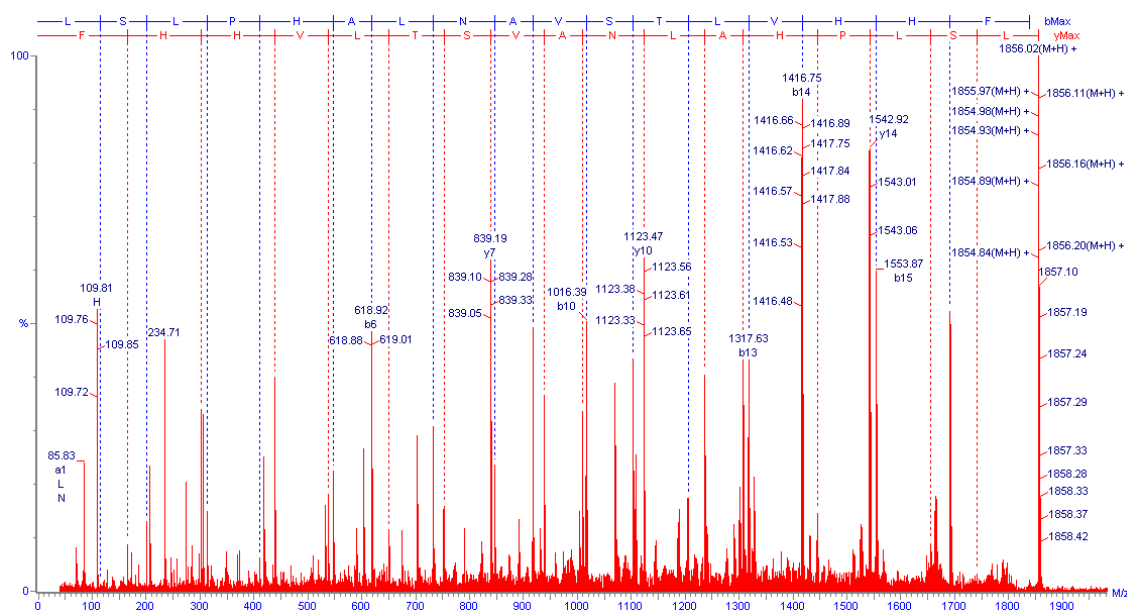


Figura 42: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1854,98 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 11: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 42, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

LSLPHALNAVSTLVVHHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
L	115,78	-	1854,98	1855,03
S	200,78	201,12	1741,25	1741,94
L	313,74	314,20	1656,06	1654,91
P	410,92	411,26	1542,92	1541,83
H	547,90	548,31	1445,93	1444,78
A	618,92	619,35	1307,68	1307,72
L	732,25	732,44	1236,57	1236,68
N	846,29	846,48	1123,47	1123,60
A	917,41	917,52	1009,42	1009,55
V	1016,39	1016,58	938,31	938,52
S	1103,52	1103,62	839,19	839,45
T	1205,62	1204,66	752,33	752,42
L	1317,63	1317,75	651,09	651,37
V	1416,75	1416,82	537,86	538,28
H	1553,87	1553,87	438,74	439,22
H	1690,99	1690,93	301,71	302,16
F	NE	-	165,77	165,10

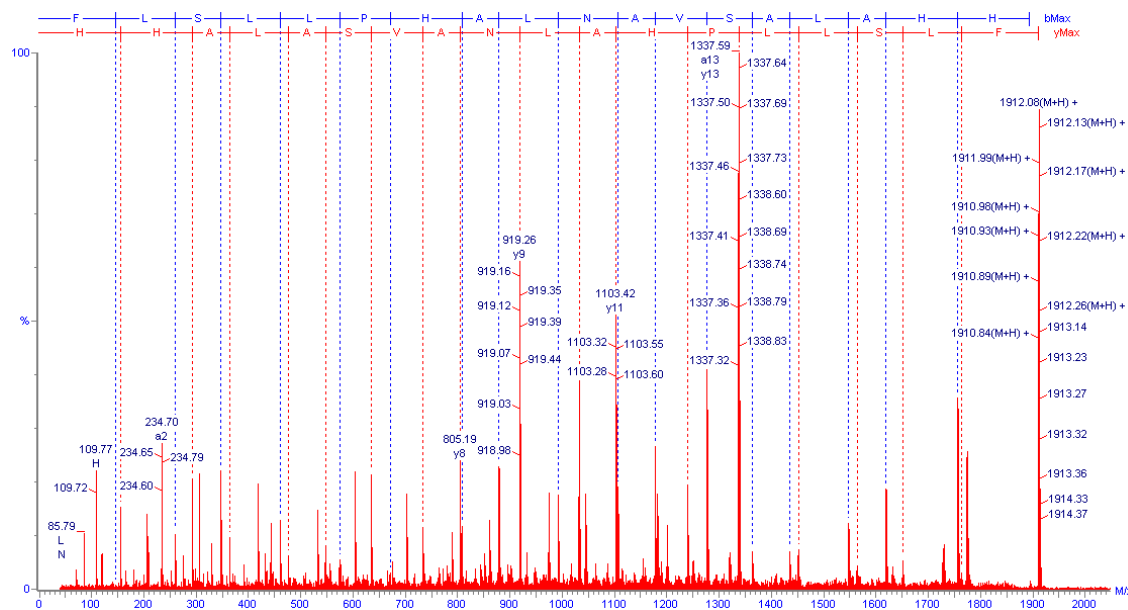


Figura 43: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1910,98 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 12: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 43, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSALAH				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	146,81	-	1910,98	1911,05
L	260,73	261,15	1763,95	1763,99
S	347,75	348,19	1651,77	1650,90
L	460,71	461,27	1563,75	1563,87
L	575,88	574,35	1451,75	1450,79
P	670,91	671,41	1337,59	1337,70
H	808,17	808,47	1240,54	1240,65
A	879,37	879,50	1103,42	1103,59
L	992,42	992,59	1032,36	1032,55
N	1106,53	1106,63	919,26	919,47
A	1177,59	1177,67	805,19	805,43
V	1276,53	1276,74	734,13	734,39
S	1363,77	1363,77	634,92	635,32
A	1434,56	1434,81	548,00	548,29
L	1547,84	1547,89	476,80	477,25
A	1618,85	1618,93	363,70	364,17
H	1755,98	1755,99	292,69	293,13
H	NE	-	155,75	156,07

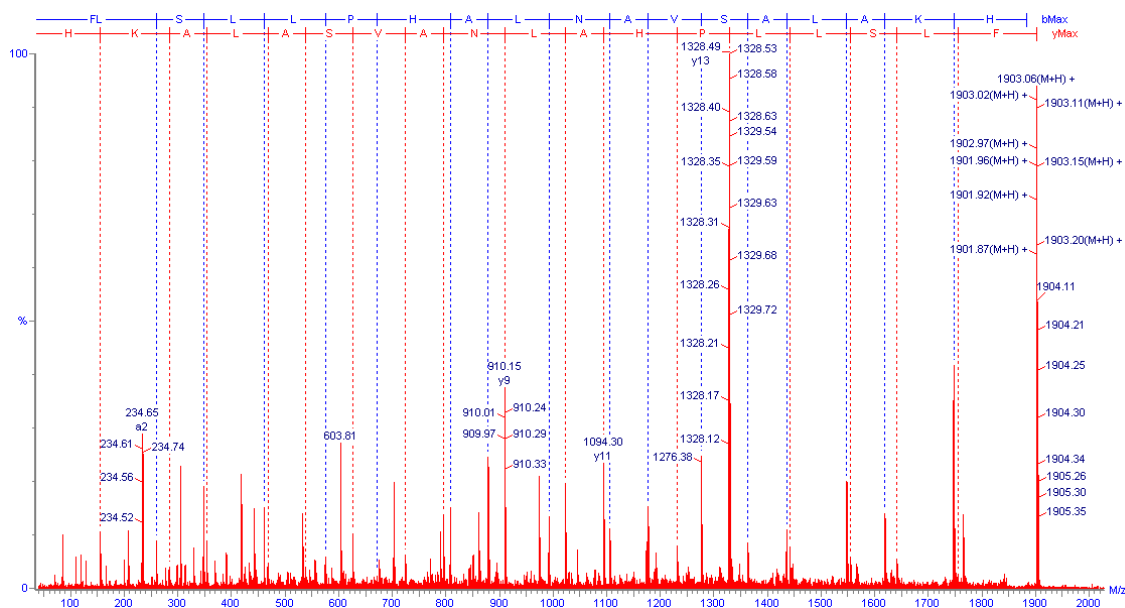


Figura 44: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1902,01 e analisado pelo programa PepSeq. Acima em azul a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 13: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 44, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSALAKH				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	NE	=	1902,01	1902,09
L	260,64	261,15	1755,15	1755,02
S	347,61	348,19	1641,88	1641,94
L	460,66	461,27	1554,72	1554,91
L	575,72	574,35	1441,58	1441,82
P	671,89	671,41	1328,49	1328,74
H	808,04	808,47	1231,36	1231,69
A	879,04	879,50	1094,30	1094,63
L	992,23	992,59	1023,24	1023,59
N	1106,28	1106,63	910,15	910,51
A	1177,33	1177,67	795,96	796,46
V	1276,43	1276,74	724,91	725,43
S	1363,44	1363,77	625,77	626,36
A	1435,64	1434,81	538,94	539,33
L	1547,72	1547,89	467,80	468,29
A	1618,73	1618,93	354,61	355,20
K	1747,92	1747,02	283,83	284,17
H	NE	-	155,74	156,07

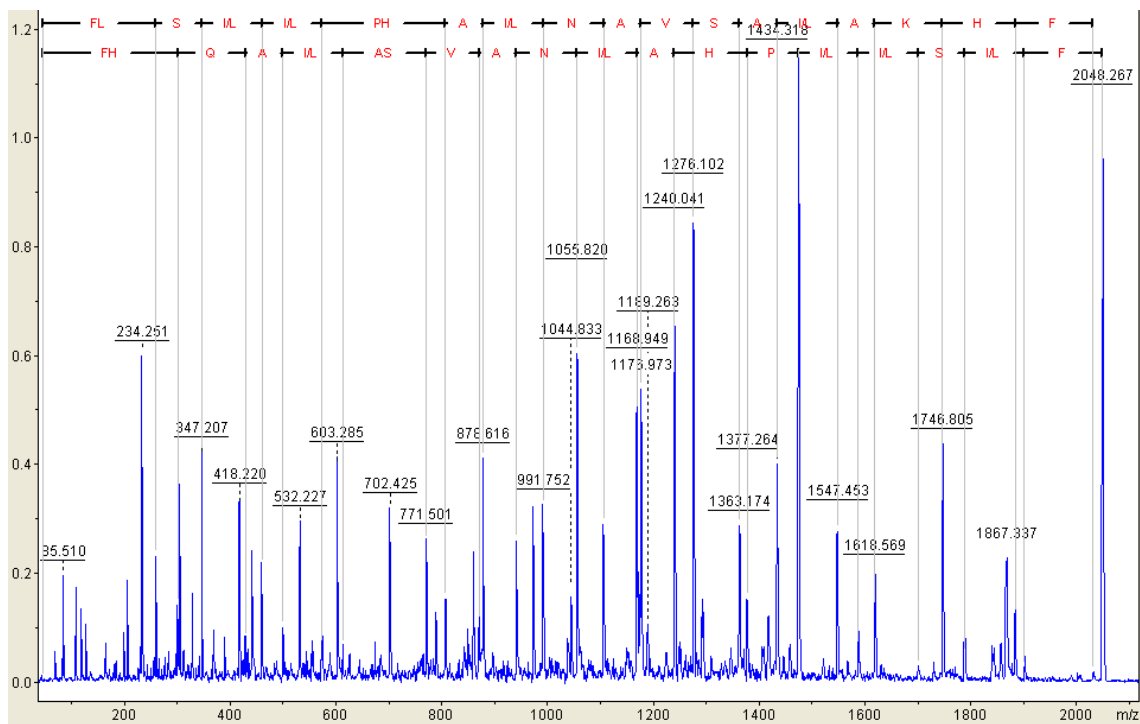


Figura 45: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2048,26 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 14: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 45, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSAK/QHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	NE	<u>148,06</u>	2048,26	<u>2048,14</u>
L	260,27	261,15	1901,12	1901,07
S	347,20	348,19	1787,73	1787,99
L	460,21	461,27	1700,67	1700,95
L	573,32	574,35	1587,56	1587,87
P	NE	671,41	1474,36	1474,79
H	807,53	808,47	1377,26	1377,73
A	878,61	879,5	1240,04	1240,67
L	991,75	992,59	1168,94	1169,64
N	1105,88	1106,63	1055,82	1056,55
A	1176,97	1177,67	941,71	942,51
V	1276,10	1276,74	870,59	871,47
S	1363,17	1363,77	771,50	772,41
A	1434,31	1434,81	NE	685,37
L	1547,45	1547,89	613,34	614,34
A	1618,56	1618,93	500,27	501,25
Q/K	1746,80	1746,99	429,22	430,21
H	1884,01	1884,04	301,22	302,16
F	2031,30	<u>2031,1</u>	-	165,10

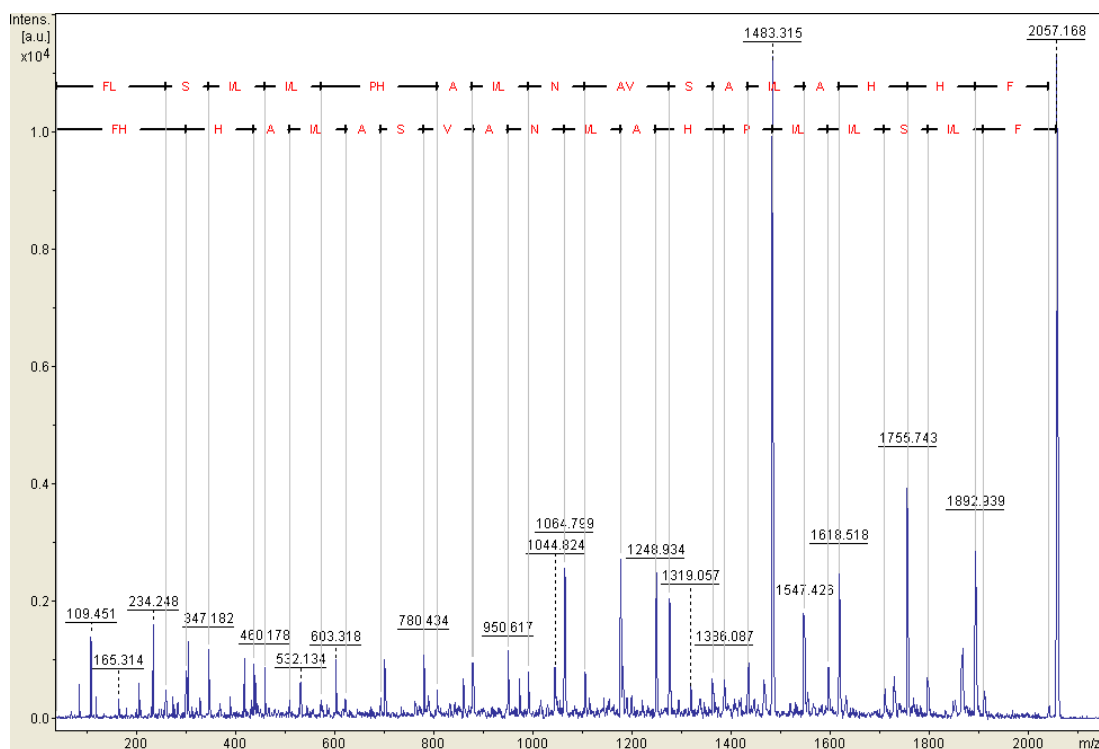


Figura 46: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2057,16 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 15: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 46, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSALAHHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	NE	148,06	2057,16	2057,14
L	260,28	261,15	1909,98	1910,07
S	347,18	348,19	1796,83	1796,99
L	460,17	461,27	1709,80	1709,95
L	573,10	574,35	1596,42	1596,87
P	NE	671,41	1483,31	1483,79
H	807,53	808,47	1386,08	1386,73
A	878,72	879,50	1248,93	1249,68
L	991,80	992,59	1177,89	1178,64
N	1105,81	1106,63	1064,79	1065,55
A	NE	1177,67	950,61	951,51
V	1276,04	1276,74	879,71	880,47
S	1363,08	1363,77	780,43	781,41
A	1434,23	1434,81	693,32	694,37
L	1547,42	1547,89	622,26	623,34
A	1618,51	1618,93	509,12	510,25
H	1755,74	1755,99	438,17	439,22
H	1892,93	1893,04	301,20	302,16
F	2040,04	-	NE	165,10

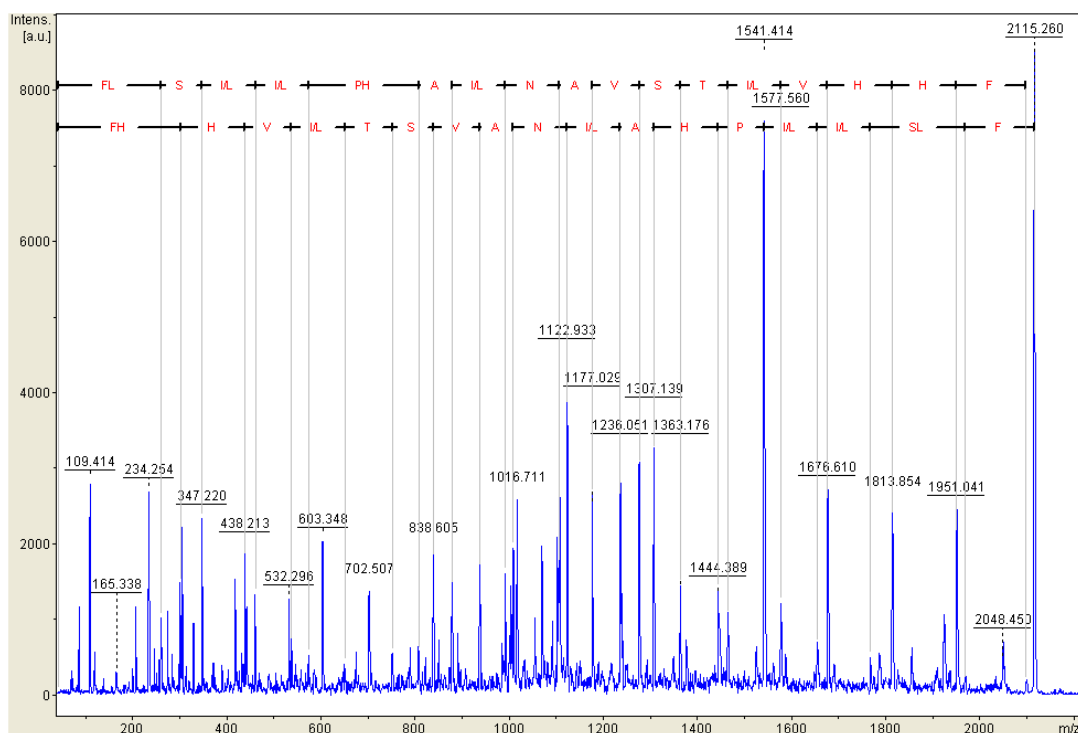


Figura 47: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 2115,26 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 16: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 45, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSTLVHVF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	NE		2115,26	<u>2115,18</u>
L	260,26	261,15	1968,04	1968,11
S	347,22	348,19	NE	1855,03
L	460,28	461,27	1767,74	1768,00
L	573,31	574,35	1654,64	1654,91
P	NE	671,41	1541,41	1541,83
H	807,61	808,47	1444,38	1444,78
A	878,69	879,50	1307,13	1307,72
L	991,83	992,59	1236,05	1236,68
N	1105,94	1106,63	1122,93	1123,60
A	1177,02	1177,67	1008,79	1009,55
V	1276,12	1276,74	937,76	938,52
S	1363,17	1363,77	838,60	839,45
T	1464,37	1464,82	751,58	752,42
L	1577,56	1577,90	650,43	651,37
V	1676,61	1676,97	537,29	538,28
H	1813,85	1814,03	438,21	439,22
H	1951,04	1951,09	301,22	302,16
F	2098,21	-	NE	165,10

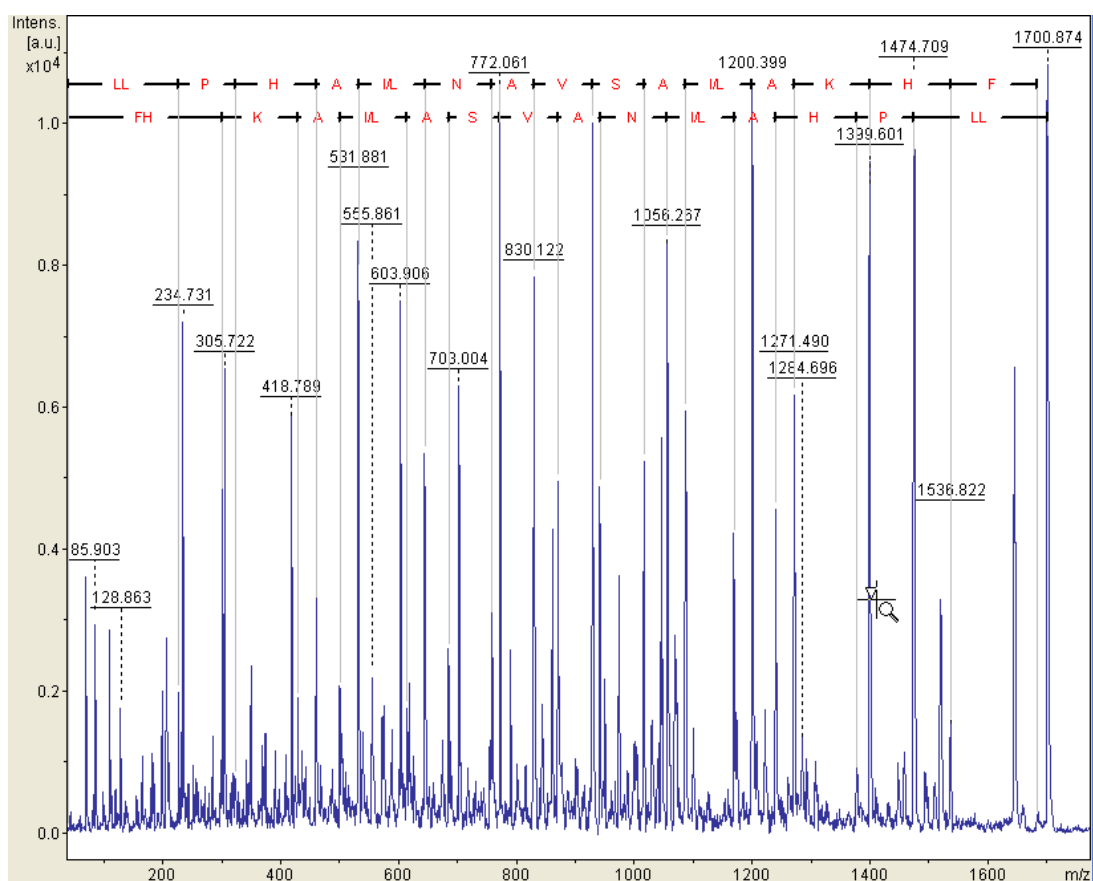


Figura 48: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1700,87 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 17: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 46, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

LLPHALNAVSALAK/QHF-NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
L	NE	-	1700,87	1700,99
L	226,80	227,17	NE	1587,91
P	323,75	324,22	1474,70	1474,82
H	460,82	461,28	1377,65	1377,77
A	531,88	532,32	1240,44	1240,71
L	645,01	645,40	1169,38	1169,67
N	759,08	759,45	1056,26	1056,59
A	830,12	830,48	942,18	942,55
V	929,20	929,55	871,14	871,51
S	1016,25	1016,58	772,06	772,44
A	1087,31	1087,62	685,01	685,41
L	1200,39	1200,70	613,96	614,37
A	1271,49	1271,74	500,87	501,29
K/Q	1399,60	1399,84	429,80	430,25
H	1536,82	1536,90	301,71	302,16
F	1683,85	-	NE	165,10

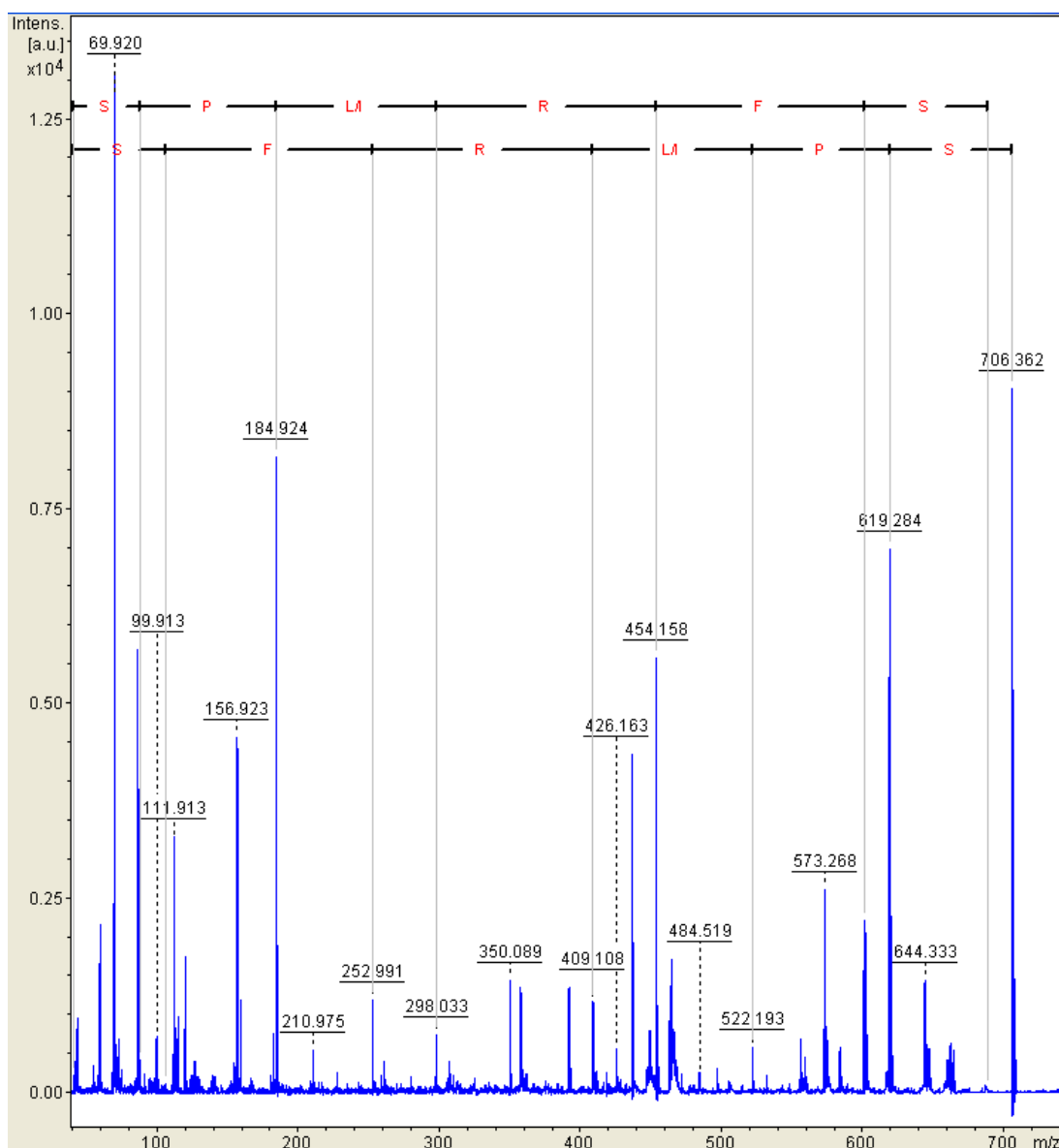


Figura 49: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 706,36 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 18: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 49, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

SPLRFS				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
S	88,1	-	706,54	706,38
P	185,12	185,09	619,51	619,35
L	298,26	298,17	522,39	522,3
R	454,37	454,27	409,32	409,21
F	601,43	601,34	253,21	253,11
S	689,35-	-	106,1	106,04

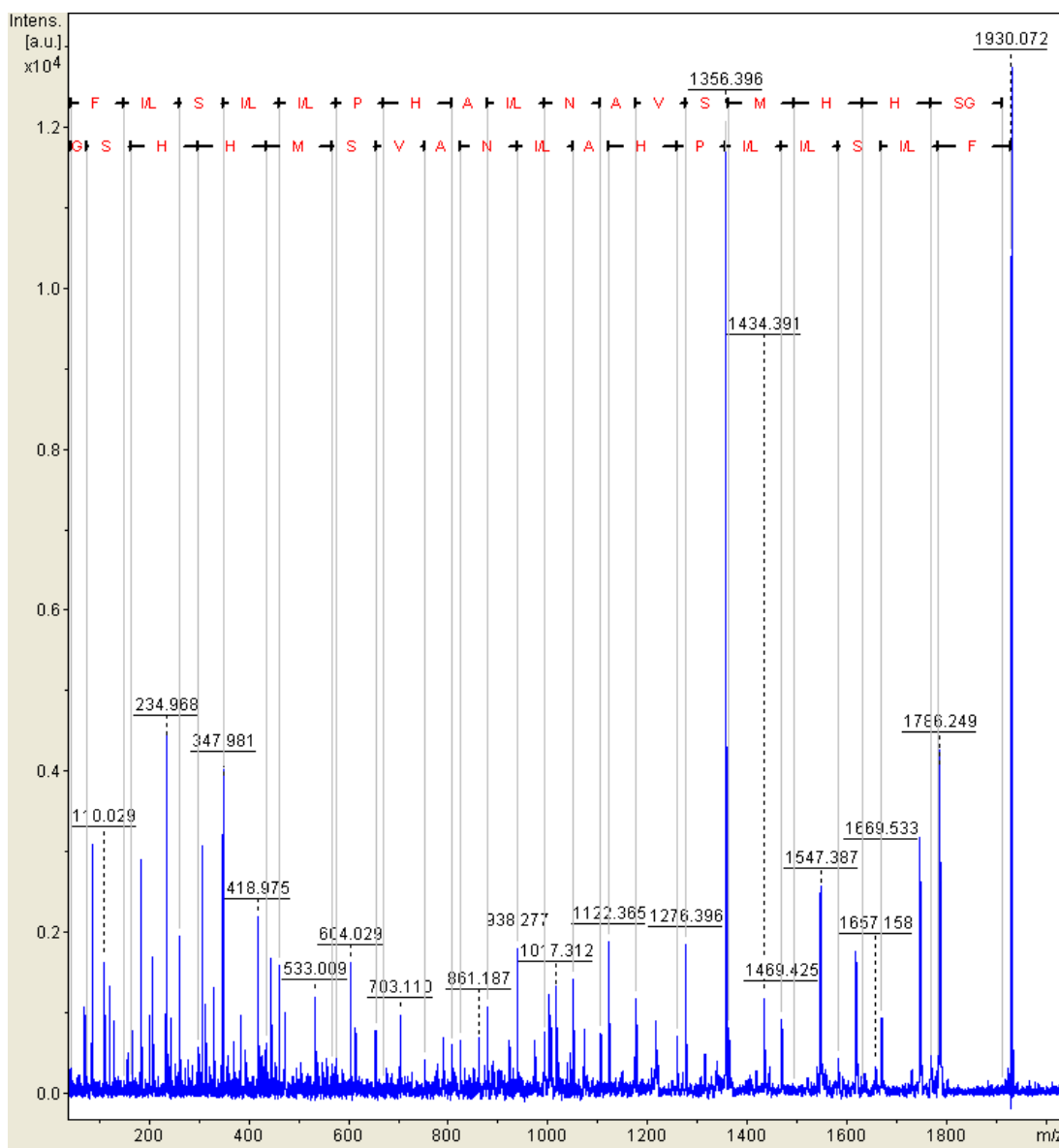


Figura 50: Espectro de massa obtido pela fragmentação por PSD do íon 1930,07 e analisado pelo programa Flex Analysis. Acima em vermelho a série b e abaixo em vermelho a série y.

Tabela 19: Íons encontrados no sequenciamento de peptídeo mostrado na figura 50, comparados com as respectivas massas teóricas geradas *in silico*. NE = íon não encontrado. (-) íon teórico não previsto pelo sequenciamento *in silico*.

FLSLLPHALNAVSMHHS ⁺ -NH ₂				
	b experimental	b teórico	y experimental	y teórico
F	147,99	–	1930,07	<u>1930,01</u>
L	261	261,15	1782,55	1782,94
S	347,98	348,19	1699,53	1669,85
L	461,01	461,27	1582,45	1582,82
L	574,05	574,35	1469,42	1469,74
P	NE	671,41	1356,39	1356,65
H	808,17	808,47	1259,39	1259,60
A	879,25	879,5	1122,36	1122,54
L	992,38	992,59	1051,35	1051,51
N	1106,34	1106,63	938,27	938,42
A	1177,37	1177,67	824,22	824,38
V	1276,39	1276,74	753,16	753,34
S	1363,41	1363,77	654,08	654,27
M	1494,53	1494,81	567,03	567,24
H	NE	1631,87	436,03	436,20
H	1768,25	1768,93	298,98	299,14
S	NE	1855,96	161,97	162,08
G	1913,01	–	74,89	75,05

5.3 ANÁLISES DE SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS

As análises das sequências em bancos de dados, pelo BLAST, mostraram que algumas das sequências, nove no total, pertencem a uma mesma família de peptídeos bioativos (phylloseptinas). Os outros seis peptídeos podem ser agrupados em famílias diferentes.

Os nove peptídeos que se alinharam com membros da família das phylloseptinas estão apresentados abaixo (figura 51), onde foram alinhados visando-se verificar as possíveis semelhanças entre eles.

1929	FLSLLPHALNAVSMHHS-	18
1853	--LSLPHALNAVSTLVHHF	17
2114	FLSLLPHALNAVSTLVHHF	19
1901	FLSLLPHALNAVSALAKH-	18
1699	--LLPHALNAVSALAKHF	16
1787	--SLLPHALNAVSALAKHF	17
2047	FLSLLPHALNAVSALAKHF	19
1909	FLSLLPHALNAVSALAHH-	18
2056	FLSLLPHALNAVSALAHHF	19

Figura 51: Alinhamento entre nove dos peptídeos encontrados, mostrando as similaridades entre eles. Estes peptídeos podem ser definidos em três grupos: os peptídeos 1853 e 2114 com a mesma assinatura C-terminal, os seguintes 2056 e 1909 e por fim os quatro últimos (1901, 1699, 1787 e 2047). O peptídeo 1929, trata-se de um novo tipo da família das phylloseptinas, contendo uma metionina na porção próxima ao C-terminal. Em vermelho resíduos hidrofóbicos, verde hidrofílicos e, em rosa, os básicos.

Somente dois destes peptídeos (1909 e 1901) apresentam-se na forma não amidada, sendo os demais sete, todos com C-terminal amidado. A figura 52 mostra o alinhamento dos nove peptídeos com phylloseptinas já descritas na literatura e com sequências depositadas em bancos de dados.

1929	-----FLSLLPHALNAVSMHHS-
1910	-----FLSLLPHALNAVSALAH-
1901	-----FLSLLPHALNAVSALAKH-
1700	-----LLPHALNAVSAIAKHF-
1787	-----SLPHALNAVSAIAKHF-
2047	-----FLSLLPHALNAVSAIAKHF-
1854	-----LSLPHALNAVSTLVVHHF-
2115	-----FLSLLPHALNAVSTLVVHHF-
Phylloseptin-4_PO2113	-----FLSLIPHAINAVSTLVVHSG
Phylloseptin-2_PA	---EKRFSLIPHAINAVSTLVVHHFG
Phylloseptin-2_PH	---EKRFSLIPHAINAVSTLVVHHFG
Phylloseptin-12_PH2086	-----FLSLIPHAINAVSALVHHF-
2056	-----FLSLIPHAINAVSALAHHF-
Phylloseptin-3_PH1945	-----FLSLIPHAINAVSALANHG-
Phylloseptin-15_PA	-SEEKRLSLVPHAINAVSAIAKHFG
Phylloseptin-8_PN2013	-----FLSLIPTAINAVSAIAKHF-
Phylloseptin-1_PH2016	-----FLSLIPHAINAVSAIAKHN-
Phylloseptin-5_PO1989	-----FLSLIPHAINAVSAIAKHS-
Phylloseptin-8_PT2049	-----FLSLIPHAINAVSAIAKHF-
Phylloseptin-8_PT2048	-----FLSLIPHAINAVSAIAKHF-
Phylloseptin-6_PH1789	-----SLIPHAINAVSAIAKHF-
Phylloseptin-P1_PP2049	-----FLSLIPHAINAVSAIAKHF-
Phylloseptin-7_PA	KSEKRFSLIPHAINAVSAIAKHFG
Phylloseptin-7_PH	---EEKRFSLIPHAINAVSAIAKHFG
Phylloseptin-J1_PJ2049	-----FLSLIPHAINAISAIANHF-
Phylloseptin-J2_PJ	-----FLSLIPHAINAISAIADHF-
Phylloseptin-J4_PJ2038	-----FLSLIPHAINAISAIHHL-

Figura 52: Alinhamento dos nove peptídeos com entradas de bancos de dados encontrados após o Blast. Todos os alinhamentos com o banco de dados do NCBI foram com peptídeos já descritos da classe das phylloseptinas. Em vermelho resíduos hidrofóbicos, verde hidrofílicos, em rosa os básicos e em azul os ácidos.

5.4 SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Três peptídeos que se mostraram inéditos foram selecionados para serem sintetizados e testados em modelos biológicos. As sequências correspondentes aos peptídeos SPLRFS (705), MVHPFAVFLY-NH₂ (1221) e VMYTLNYLAH-NH₂ (1222) foram sintetizadas conforme descrito e, em seguida, foram liofilizadas e purificadas em HPLC, resultando nos perfis apresentados nas figuras 53, 54 e 55.

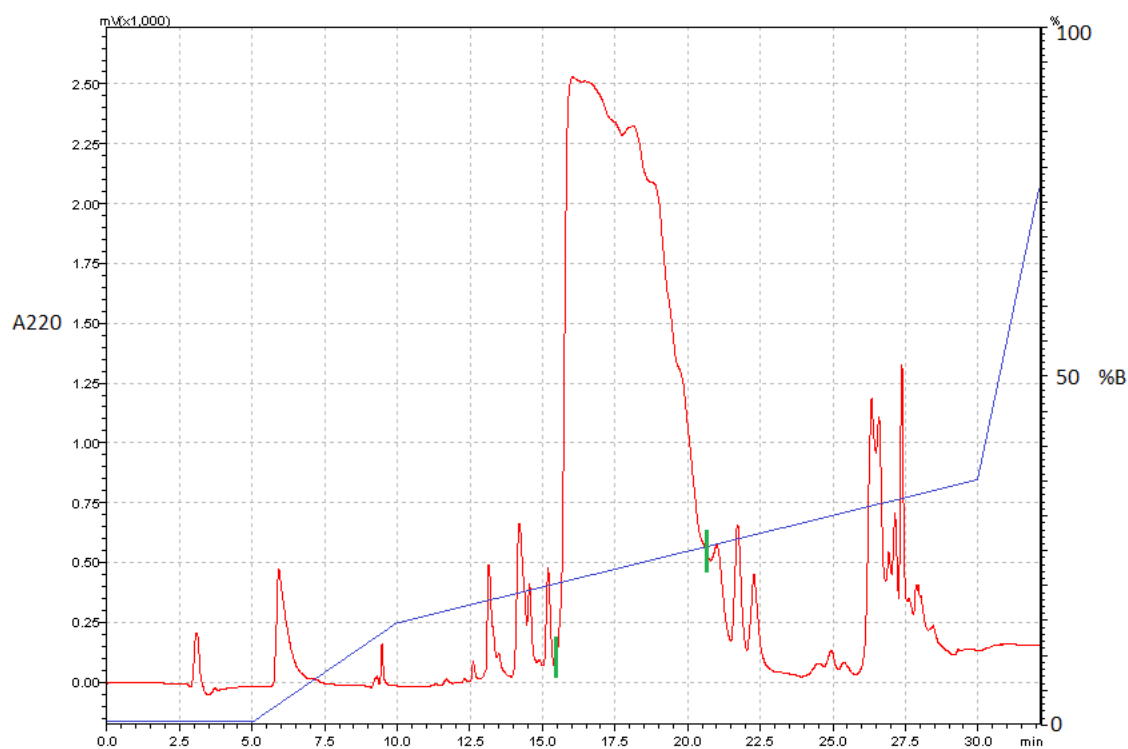


Figura 53: Cromatograma da purificação do peptídeo 705. Em vermelho as leituras em A220, azul o gradiente de solução B e, em verde, a delimitação da fração correspondente ao peptídeo 1222 purificado.

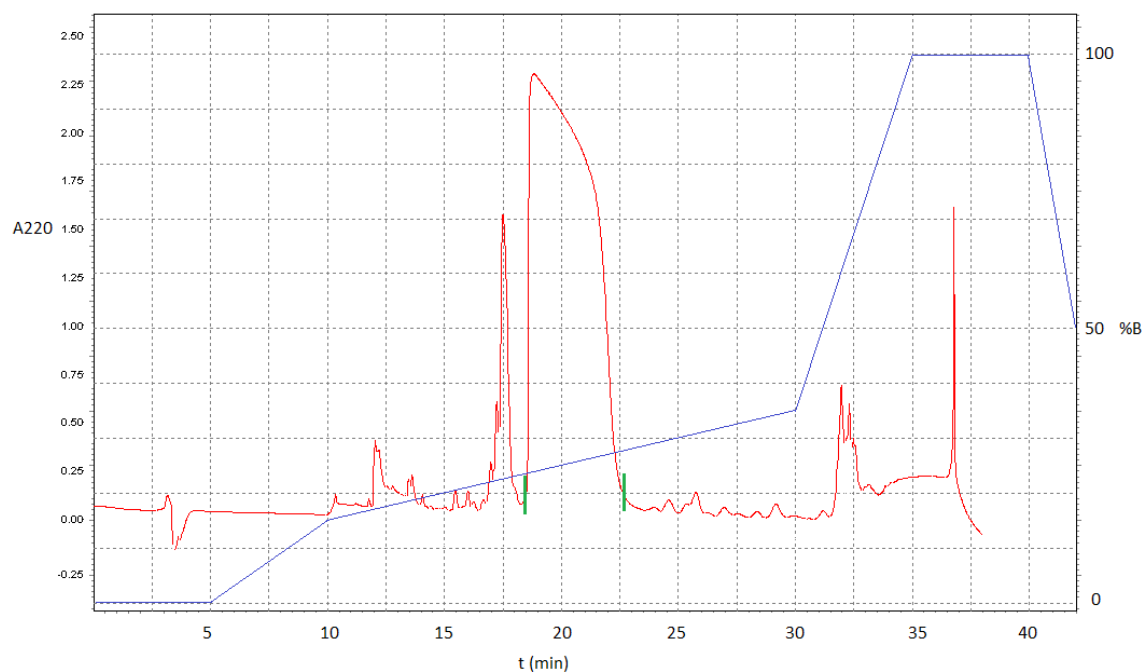


Figura 54: Cromatograma da purificação do peptídeo 1221. Em vermelho as leituras em A220, azul o gradiente de solução B e, em verde, a delimitação da fração correspondente ao peptídeo 1221 purificado.

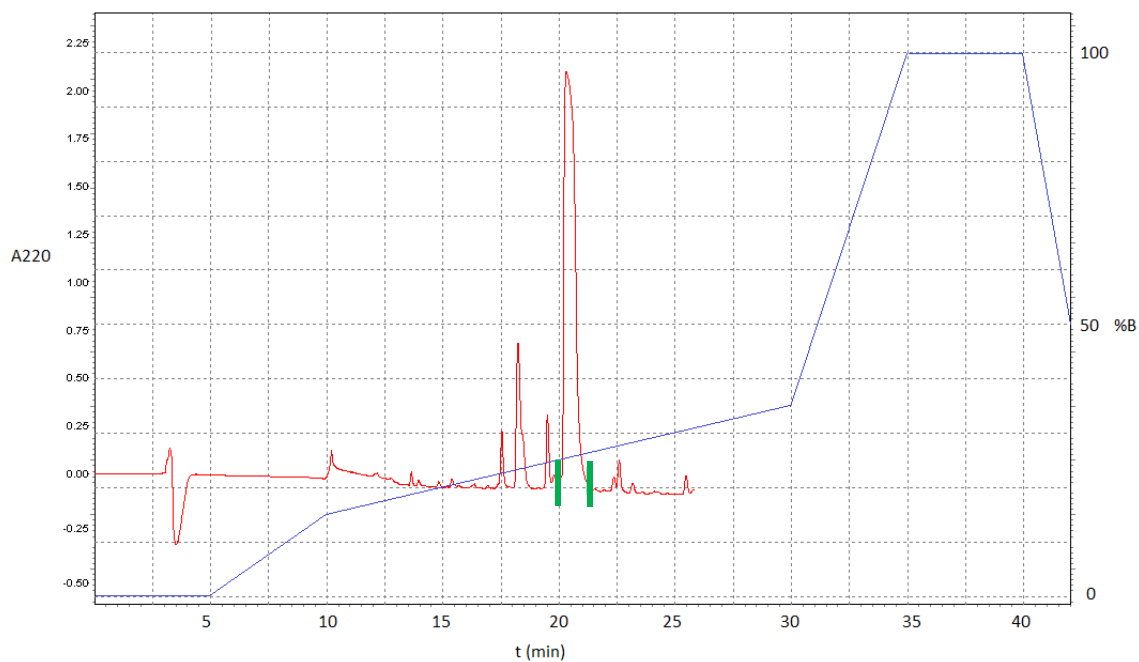


Figura 55: Cromatograma da purificação do peptídeo 1222. Em vermelho as leituras em A220, azul o gradiente de solução B e, em verde, a delimitação da fração correspondente ao peptídeo 1222 purificado.

A pureza das frações principais (delimitadas pelas barras verdes nas figuras acima) foram determinadas por espectrometria de massa (figura 56) e por uma segunda corrida analítica onde foram observados os perfis a seguir nas figuras 57 a 59.

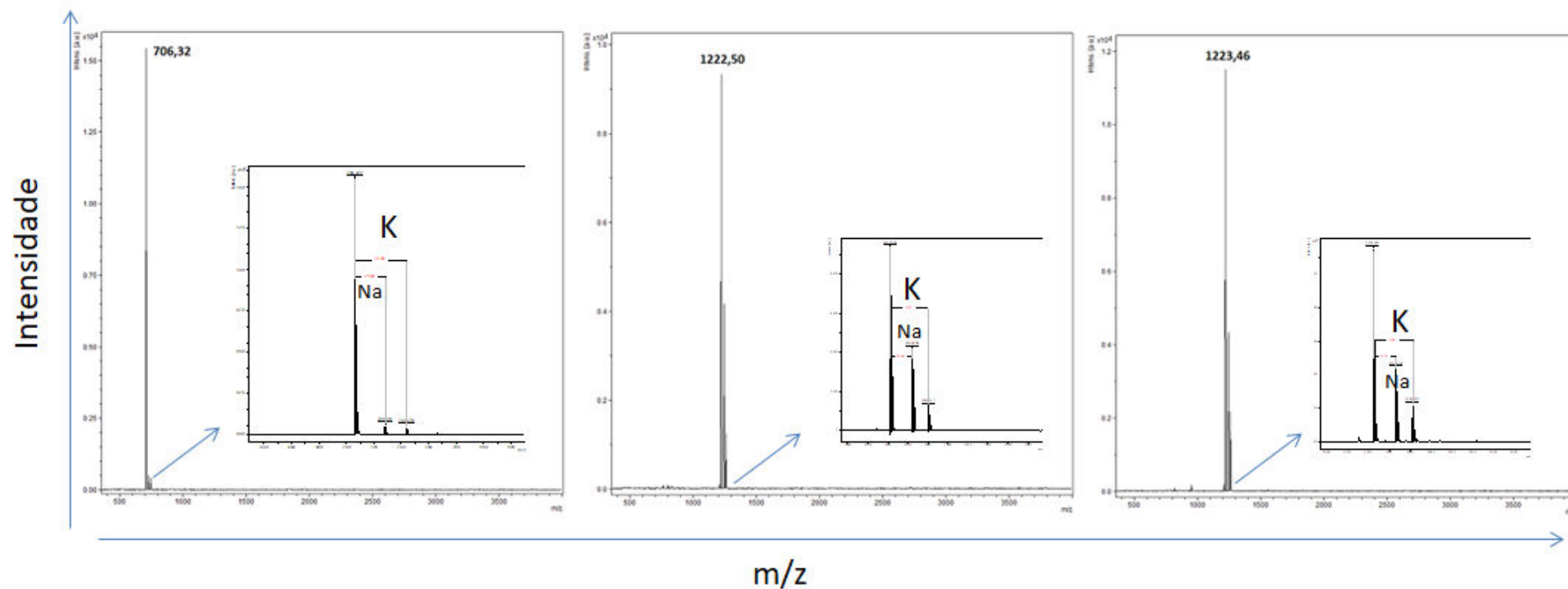


Figura 56: Espectros de massa dos peptídeos sintéticos pós purificação semipreparativa. (figuras 53 a 55). No eixo "x" está m/z (relação massa sobre carga) e no eixo "y" a intensidade do sinal obtido na análise. Dentro de cada um dos espectros está apresentado uma ampliação salientando-se os adutos de sódio (Na) e de potássio (K).

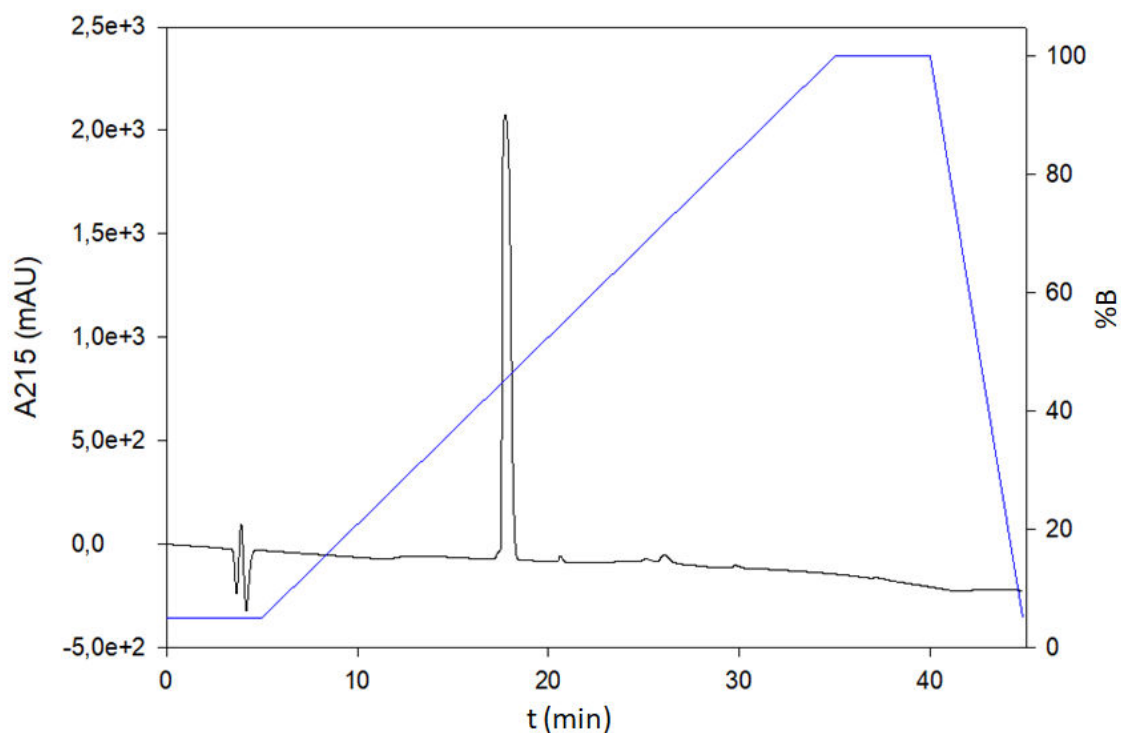


Figura 57: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 705. Em preto perfil das leituras (A215, eixo y) *versus* o tempo de eluição (eixo x), azul o gradiente de solução B.

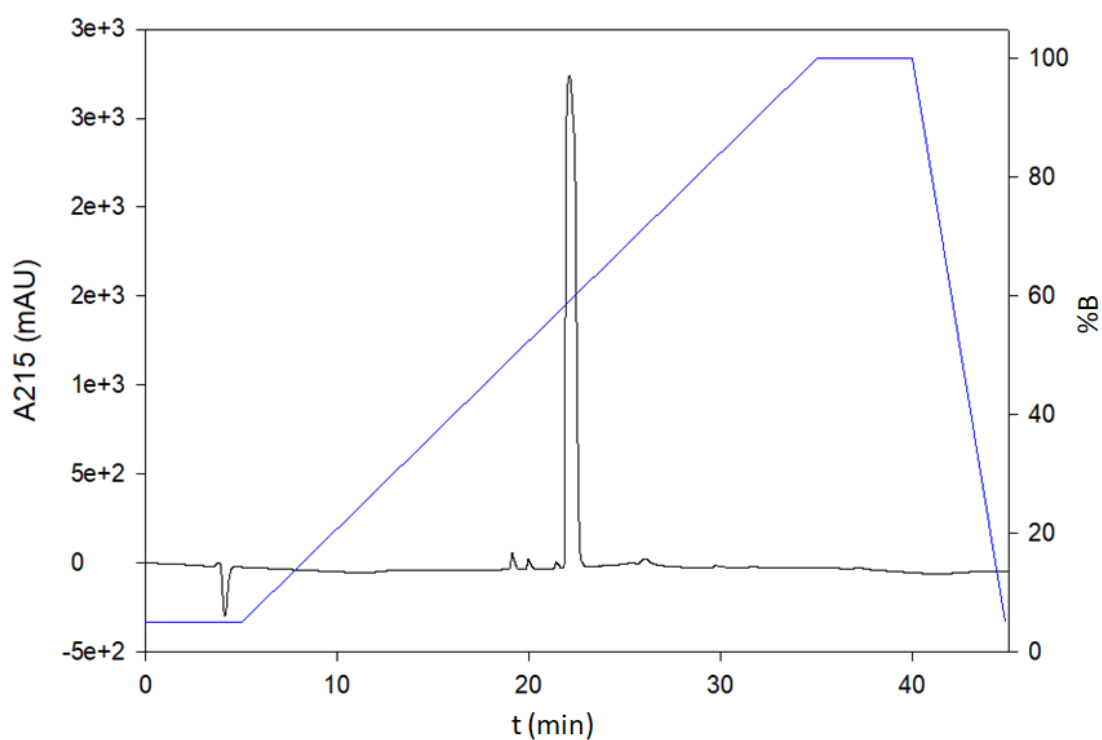


Figura 58: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 1221. Em preto perfil das leituras (A215 nm, eixo y) *versus* o tempo de eluição (eixo x), azul o gradiente de solução B.

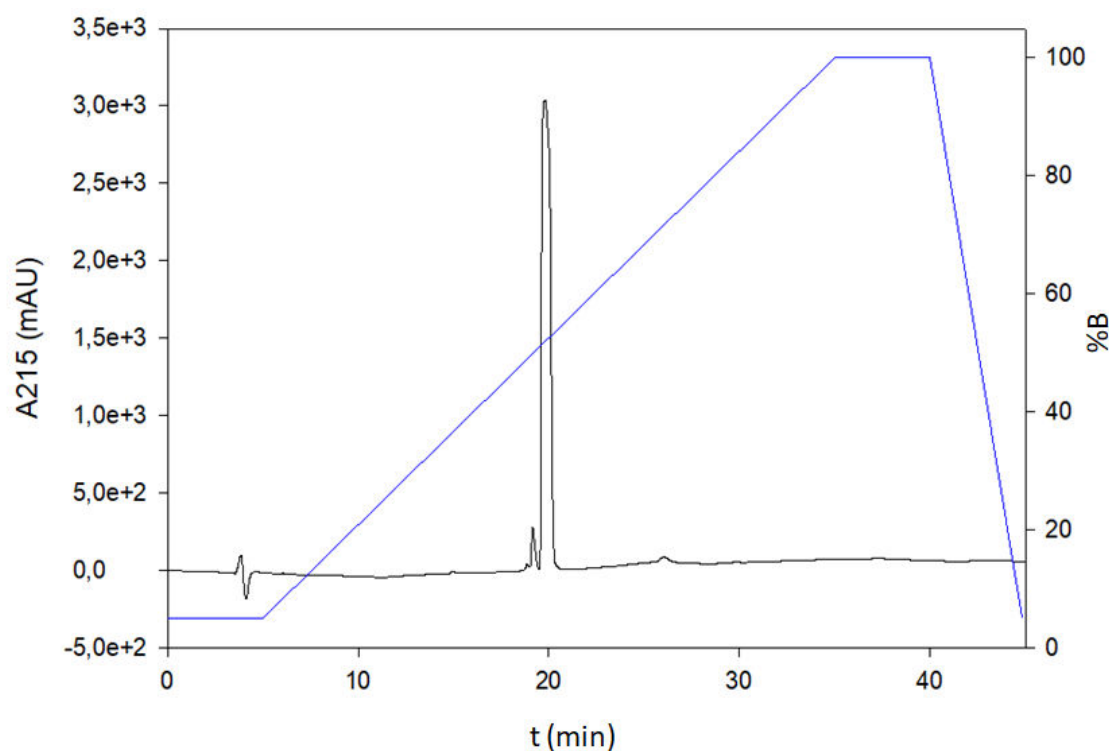


Figura 59: Cromatograma analítico do produto de purificação do peptídeo 1222. Em preto perfil das leituras (em A215 nm, eixo y) versus o tempo de eluição (eixo x), azul o gradiente de solução B.

Pela análise dos cromatogramas analíticos, após a integração dos picos, encontraram-se as seguintes porcentagens de pureza: peptídeo 705 - 96%, peptídeo 1221 - 95% e peptídeo 1222 - 93%.

5.5 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos, nas condições utilizadas, revelaram nenhuma atividade antibacteriana ou antifúngica dos peptídeos testados. Em todas as diluições testadas (de 256 µg/ml até 0,25 µg/ml) nenhuma redução na turbidez da cultura bacteriana foi observada, para todas as espécies analisadas: *E. coli*, *S. aureus*, e *C. albicans*.

5.6 Avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos

A citotoxicidade dos peptídeos 705, 1221 e 1222 foi avaliada contra as células MDA-MB-231, MCF-7, HCT 116 e HEK-293, sugerindo um aumento da proliferação celular, em especial os peptídeos 1221 e 1222, contudo este padrão não foi observado para a linhagem HEK-293, onde nenhum peptídeo apresentou indícios, seja de aumento ou redução da proliferação. A figura 60 apresenta os gráficos mostrando as respectivas atividades encontradas para as quatro linhagens dos três peptídeos testados.

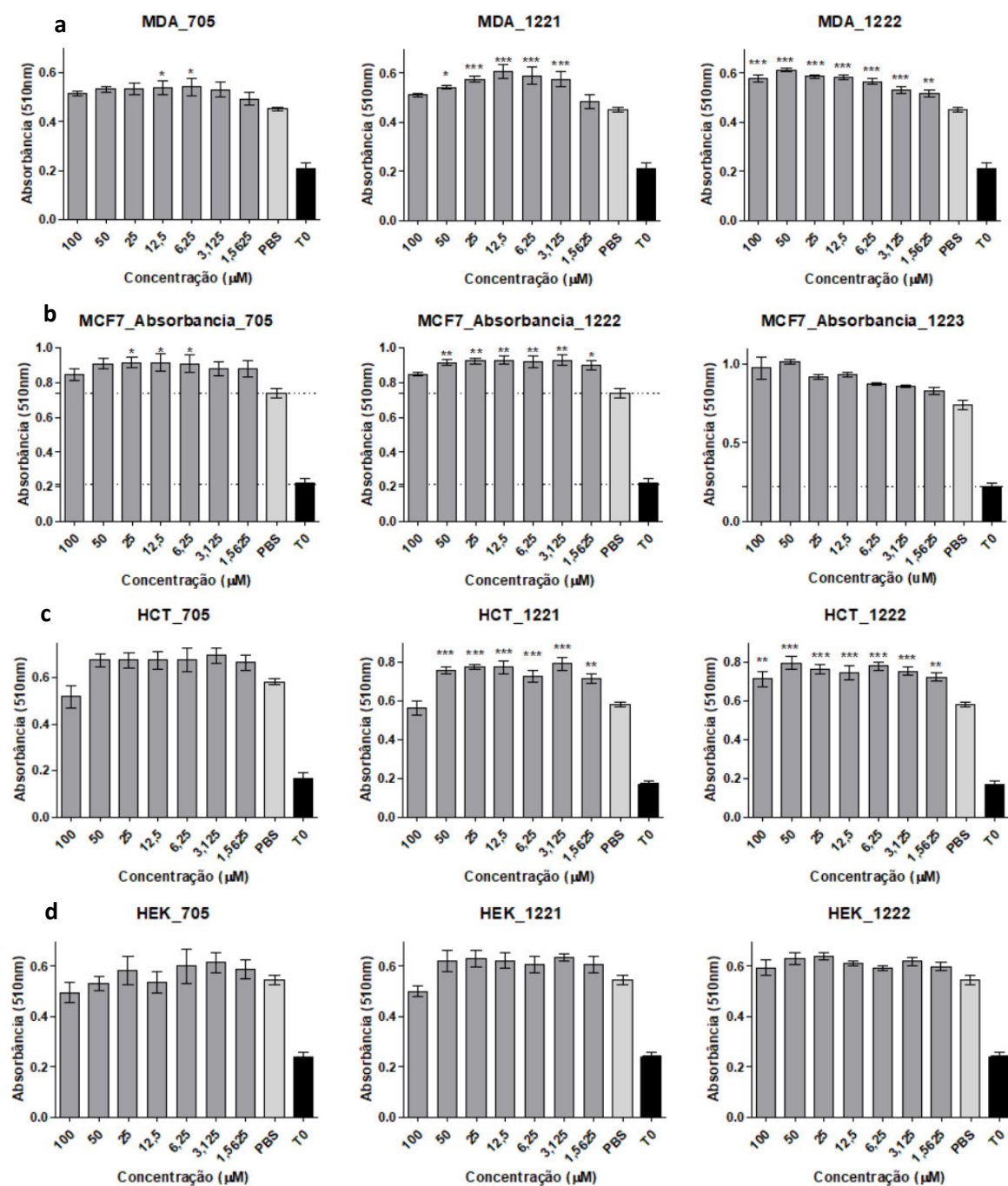


Figura 60: Avaliação de atividade biológica dos peptídeos 705, 1221 e 1222 em diferentes linhagens de células, através do ensaio de Sulforodamina B, após 48 h de incubação, com os tratamentos discriminados na figura. **a:** Atividade biológica dos peptídeos contra MDA-MB-231, **b:** contra MCF-7, **c:** contra HCT 116 e **d:** contra HEK-293. T0: tempo inicial de incubação (antes de 48 h) das células sem tratamento, PBS: controle sem tratamento com os compostos após 48 h, asteriscos indicam a significância estatística encontrada com relação ao PBS.

6. DISCUSSÃO CAPÍTULO I

As secreções de anuros são bem conhecidas por possuírem um grande número de compostos bioativos (Bevins & Zasloff, 1990; Daly *et al*, 2005; Azevedo Calderon *et al*, 2011; Sousa *et al*, 2017). O cromatograma observado no fracionamento da secreção de *Pithecopus megacephalus*, abordado neste trabalho, apresentou grande número de frações relacionadas a peptídeos, como observado pelas leituras nos comprimentos de onda de 214 e 280 nm. Estes perfis complexos são comuns em secreções de anfíbios (Brand *et al*, 2002; Brand *et al*, 2006; Conlon *et al*, 2007; Rates *et al*, 2011) que apresentam diversos peptídeos bioativos.

A identificação prévia das frações, utilizando-se dois comprimentos de onda - 214 e 280 nm, bem como as análises por espectrometria de massa, permitiram avaliar que as moléculas encontradas são de caráter polipeptídico. Isso deve-se ao fato de que ligações peptídicas têm absorbâncias significativas no comprimento de onda de 214 e anéis aromáticos, como aqueles das cadeias laterais de triptofano e tirosina, absorvem bem a 280 nm. Mostrou-se também que, essas moléculas possuem massas muito elevadas (acima de 1000 Da, com boa parte delas com massas entre 1500 e 3000 Da). Este é um típico padrão de peptídeos. Importante ressaltar ainda que, boa parte dos peptídeos bioativos, mostrados na literatura, estão nessa faixa de massa molecular (Brand *et al*, 2002; Brand *et al*, 2006; Conlon *et al*, 2007; Rates *et al*, 2011; UniProt, 2019).

Outras massas maiores também foram localizadas (faixa entre 5500 e 6500 Da) bem como, uma massa ainda maior, de cerca de 8500 Da foi detectada. As massas na faixa de 5500 e 6500 Da, possivelmente são formas precursoras dos peptídeos bioativos. Essa hipótese deve-se ao fato de que, trabalhos de transcriptoma mostram a presença de

transcritos que darão origem a polipeptídeos dentro desta faixa de massa, onde estes polipeptídeos são formas precursoras dos peptídeos bioativos já citados (Thompson *et al*, 2007a e 2007b; Wan *et al*, 2015).

Quanto a estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações, 14 deles foram eficazmente identificados, mostrando que nove deles pertencem à família das Phylloseptinas.

Destes nove peptídeos, mostramos que, os de massas 1901, 1699, 1787 e 2047 possuem similaridade com as Phylloseptina-8 de *Phyllomedusa tomopterna* (UniProt ID: P85447), Phylloseptina-7 de *Phyllomedusa nordestina* (UniProt ID: C0HKP9) ou a Phylloseptina-6 de *Phyllomedusa hypochondrialis* (UniProt ID: P84571). A diferença entre as Phylloseptinas 8 e 7 encontradas em bancos de dados reside apenas na posição 15 de suas cadeias, onde na Phylloseptina-8 existe uma leucina e na Phylloseptina-7 há uma isoleucina. Já a Phylloseptina-6 possui a posição 13 (correspondente à posição 15 nas outras duas já citadas) idêntica a Phylloseptina-7 com a diferença de não possuir os dois primeiros resíduos, a saber "FL". O peptídeo 2047, muito provavelmente, trata-se ou da Phylloseptina-7 ou da Phylloseptina-8, contudo não é possível essa certeza visto que, o tipo de sequenciamento de novo realizado não discrimina entre aminoácidos isóbaros (L e I no caso). O peptídeo 1901 pode ser interpretado como uma variante do peptídeo 2047 com a perda da fenilalanina no C-terminal. Isto porque aquele peptídeo não possui amidação, logo a hipótese é tratar-se de um produto de processamento do peptídeo 2047. O peptídeo 1787, muito possivelmente, possui identidade com a Phylloseptina-6 descrita na literatura e, da mesma forma que, para o peptídeo 2047, não é possível uma afirmação mais precisa devido a possibilidade de diferenças nas posições das leucinas e isoleucinas que são ambíguas. Por fim, o peptídeo 1699 possui grande semelhança com a Phylloseptina-6, e consequentemente com o 1787 também, diferindo

pela ausência da serina 1. A figura 61 apresenta estas comparações feitas no Clustal Omega.

Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
1901Pm	FJSJJPHAJNAVSAJAKH-	18
1699Pm	---JJPHAJNAVSAJAKHF	16
2047Pm	FJSJJPHAJNAVSAJAKHF	19
1787Pm	--SJJPHAJNAVSAJAKHF	17
Phylloseptin-8	FLSLIPHAINAVSALAKHF	19
Phylloseptin-6	--SLIPHAINAVSAIAKHF	17
Phylloseptin-7	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	19

Figura 61: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) dos peptídeos 1901, 1699, 2047 e 1787, obtidos neste trabalho, com três Phylloseptinas da literatura. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile, típica neste tipo de sequenciamento de novo.

O peptídeo de massa 2114 possui possível identidade com a Phylloseptina-2 (UniProt ID: P84567e Leite *et al*, 2005), novamente com ambiguidades nos resíduos isóbaros (figura 62). Os peptídeos de massa 2056 e 1909 (figura 63) possuem homologia com a Phylloseptina-12 e 3 (UniProt IDs: P84904 e P85447, respectivamente). O peptídeo 1909 pode ser hipotetizado como resultado do processamento do peptídeo 2056, pela perda da fenilalanina terminal considerando-se a possível existência de um C-terminal carboxilado e não amidado, como ocorre com a maioria das Phylloseptinas.

Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
2114	FJSJJPHAJNAVSTJVVHFF	19
Phylloseptin-2	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	19

Figura 62: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) do peptídeo 2114 com a Phylloseptina-2 da literatura. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile típica neste tipo de sequenciamento de novo.

Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
1909	FLSLLPHALNAVSALAHH-	18
2056	FLSLLPHALNAVSALAHHF	19
Phylloseptin-3	FLSLIPHAINAVSALANHG	19
Phylloseptin-12	FLSLIPHAINAVSALVHFF	19

Figura 63: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) dos peptídeos 1909 e 2056 com duas Phylloseptinas da literatura. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile típica neste tipo de sequenciamento de novo.

O composto 1853 alinhou-se com as Phylloseptinas 2, 4 e 12 (UniProt IDs: P84567, P84569 e P84904; respectivamente), embora os primeiros quatro resíduos característicos das Phylloseptinas nos alinhamentos não tenham possuído identidade com a parte N-terminal (figura 64).

Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
1853	--JSJPHAJNAVSTJVVHFF-	17
Phylloseptin-4	FLSLIPHAINAVSTLVHHS	20
Phylloseptin-12	FLSLIPHAINAVSALVHFF-	19
Phylloseptin-2	FLSLIPHAINAVSTLVHFF-	19

Figura 64: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) do peptídeo 1853 com três Phylloseptinas da literatura. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile típica neste tipo de sequenciamento de novo.

Por fim o peptídeo 1929 (figura 65) alinhou-se com as Phylloseptinas 1, 2, 4, 5, 12 e PBa (UniProt IDs: P84566, P84567, P84569, P84570 e Wan *et al*, 2015; respectivamente), com as maiores homologias de 1929 com as Phylloseptinas 4 e 12. Importante ressaltar que o peptídeo 1929 é o segundo caso de Phylloseptina com a presença de uma metionina em sua estrutura, com a Phylloseptina-PBa sendo o outro exemplo do tipo já descrita (Wan *et al*, 2015).

Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
Phylloseptin-PBa	FFSMIPK I AGG I ASLVK N LG	20
1929	FJSJJ P HAJNAVSM--HHS G	18
Phylloseptin-12	FLSLIPHA I NAVSA L VHHF-	19
Phylloseptin-4	FLSLIPHA I NAVSTLVHHS G	20
Phylloseptin-2	FLSLIPHA I NAVSTLVHHF-	19
Phylloseptin-5	FLSLIPHA I NAVSA I AKHS-	19
Phylloseptin-1	FLSLIPHA I NAVSA I AKHN-	19

Figura 65: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) do peptídeo 1929 com Phylloseptinas da literatura. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile típica neste tipo de sequenciamento de novo.

Outros dois peptídeos bioativos também foram encontrados com similaridades a peptídeos bioativos de anfíbios. O de massa 1554 possui similaridade com a hyposina de *Phasmahyla jandaia* e com sauvatide de *Phyllomedusa sauvagei* (UniProt IDs: P86613 e C5J8E3, respectivamente) (Figura 66a). A hyposina, com a qual a sequência encontrada se alinhou, é um peptídeo com possível atividade antimicrobiana, o que é sugerido, por similaridade com outras "hyposinas" (Rates *et al*, 2011; UniProt IDs: P86613 e P84524). Outros peptídeos dessa família já foram relatados com essa atividade, como p. ex. a Hyposin HA-6 (Brand *et al*, 2012). Já o sauvatide é um peptídeo que induz a contração de musculatura lisa (Wang *et al*, 2009). O peptídeo de massa 705 (66b) alinhou-se com o "Bioactive peptide 1" de *Phyllomedusa hypochondrialis* (UniProt ID: P84521). Embora esteja relatado como peptídeo bioativo,

buscas pelo tipo de atividade biológica deste peptídeo da literatura, não mostraram resultados satisfatórios no UniProt e a literatura somente descreve sua estrutura primária e sua relativa abundância na secreção de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Thompson *et al*, 2007).

a	Peptídeo	sequência	nº. de aminoácidos
	1554	RFPAJJVRTKGAGGJ	15
	Hyposin-J1	FRPALIVRTKGK---	12
	sauvatide	LRPAILVRTK-----	10
		** *****	
b			
	Bioactive	QQGEGGPYGGLSPLRFS	17
	705	-----SPJRF	6

Figura 66: Alinhamento Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) dos peptídeos (a) 1554 e (b) 705 com os respectivos alinhamentos encontrados através do BLAST. O uso da letra não usual "J" está sendo empregado para salientar a ambiguidade entre Leu e Ile típica neste tipo de sequenciamento de novo.

Por fim os peptídeos 1221, 1222 e 1239 não se alinham com nenhum peptídeo bioativo de anfíbios, em buscas de similaridade, através do BLAST. Este fato resultou interessante pois, tratam-se, portanto, de novos peptídeos bioativos encontrados em secreções de anuros. Estes foram reanalisados por BLAST buscando-se similaridades com proteínas de *Homo sapiens*.

O peptídeo 1221 alinhou-se com proteínas BAK1 -antagonista de Bcl-2- (UniProt ID: Q16611) e LRP1B (Liu *et al*, 2000). BAK 1 é uma proteína envolvida em eventos apoptóticos (Tong *et al*, 2004; Cartron *et al*, 2014), onde a sua liberação pela mitocôndria, gerando aumento da concentração citosólica, está relacionada à apoptose. O peptídeo alinhou-se também com a proteína LRP1B, que é um receptor para reconhecimento de LDL. Esta proteína possui correlação com câncer, pela observação

de que diversos cânceres possuem a expressão inativada desta proteína (Liu *et al*, 2000). Portanto, o peptídeo se alinhou com proteínas envolvidas na supressão tumoral.

O composto 1222 alinhou-se com proteínas RasGAP (UniProt ID: O95294), Ras GTPase IQGAP2 (UniProt ID: Q13576) e PI-3 cinases (UniProt ID: O00750). Proteínas Ras GTPases estão envolvidas em oncogênese. Este tipo de proteína quando mutada, permanece em estado permanentemente ativo, levando ao contínuo estímulo de proteínas reguladas por ela, o que resulta no crescimento desordenado de células (Goodsell, 1999). PI-3 cinases estão envolvidas na conversão de PIP2 a PIP3, onde esta fosforilação é um sinal estimulatório para crescimento celular, sobrevivência e proliferação por ativar várias proteínas cinases (Yamaguchi *et al*, 2010; Donato *et al*, 2017; UniProt ID P42336, 2019). Portanto, tais proteínas estão envolvidas em eventos proliferativos e, quando desreguladas, podem estar envolvidas com câncer.

Já o peptídeo 1239 alinhou-se com proteínas como "liprin-alpha-2" (UniProt ID: O75334), "zinc finger 334" (UniProt ID: Q9HCZ1) e com alguns canais para potássio. Essas proteínas citadas são envolvidas com funções diversas como localização celular, regulação transcricional e transporte de potássio pela membrana, respectivamente.

Logo, nos chamou atenção os peptídeos 1221 e 1222 por mostrarem alinhamentos com proteínas envolvidas em processos de morte e sobrevivência celular, bem como o peptídeo 705 por alinhar-se com parte de um peptídeo bioativo já descrito, porém, sem função definida. Estes três peptídeos foram selecionados para serem sintetizados, sendo dado preferência ao uso do aminoácido leucina por mero critério de padronização da síntese, onde a sequência resultasse ambígua entre L e I. Após purificação dos produtos de síntese, os mesmos foram analisados, com indicação de alto grau de pureza, todos acima de 90%.

Os três peptídeos sintetizados, nas condições por nós utilizadas, não mostraram atividade antimicrobiana. Este teste de atividade antimicrobiana foi realizado pois a grande maioria dos peptídeos sequenciados possuem alinhamentos com outros peptídeos antimicrobianos. Contudo, a triagem para esta atividade, resultou negativa.

Em seguida, a atividade anticâncer dos peptídeos foi testada contra células de linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e câncer de colón retal (HCT-116). Um ensaio de citotoxicidade contra células não tumorais (HEK-293) foi também realizado como controle.

De forma inesperada, não foi observado morte celular, mas sim uma provável proliferação celular induzida pelo peptídeo 1221 sobre todas as células de câncer. O peptídeo 1222 exibiu comportamento semelhante sobre as células de câncer MDA-MB-231 e HCT-116. Além do mais, nem o peptídeo 1221 e nem o 1222, exibiram qualquer efeito sobre a célula HEK-293, seja proliferativo ou citotóxico, o que demonstra que este efeito se dá sobre algum alvo que está presente nas células de câncer, mas ausente ou pelo menos muito pouco expresso, na linhagem não tumoral. Por outro lado, o peptídeo 705 não possuiu qualquer tipo de atividade sobre as células testadas, seja estimulatório ou inibitório.

A hipótese a respeito das atividades diferenciais de proliferação do peptídeo 1221 seria de que ele mimetize algum motivo regulatório negativo de Bcl-2 ou LRP1B, seja sobre a própria proteína (autorregulação) ou sobre outras proteínas que interajam com elas. Já o peptídeo 1222 como alinhou-se com proteínas envolvidas com estímulos mitóticos pode estimular positivamente ligantes que interajam com essas proteínas. É importante, também, ressaltar que os possíveis alvos destes peptídeos são expressos de forma diferentes em células tumorais e não tumorais, levando a possibilidade de uso dos peptídeos 1221 e 1222 como sondas na investigação de vias de crescimento e

sobrevivência, diferencialmente expressas em células tumorais comparadas as não tumorais, como já descrito pelo nosso grupo (Huth, 2015)

Resumo do capítulo I

1. A secreção de *Pithecopus megacephalus*, assim como as de outros membros da família Phyllomedusinae, apresenta uma rica gama de peptídeos, encontrados tanto na forma madura, como possivelmente na forma imatura.
2. Entre os peptídeos isolados, quatorze foram sequenciados, onde nove deles mostraram pertencerem à família das phylloseptinas, comumente encontradas na secreção dessa família de anuros. Entre esses nove, os peptídeos de massa 1699, 1853, 2056, 1909 e 1929 tratam se de novas phylloseptinas, com ênfase na de massa 1929 que é o segundo caso de phylloseptina com metionina em sua estrutura primária.
3. Quatro peptídeos sequenciados, quando analisados *in silico*, não mostraram atividade a eles relacionados nos bancos de dados. Três deles foram sintetizados e testados contra micro-organismos, resultando não possuírem esse tipo de atividade.
4. Dos três peptídeos sintetizados os de massa 1221 e 1222 apresentaram estímulo em células de câncer e este efeito não foi observado em células não tumorais

7. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I:

A secreção de *P.megacephalus* é bastante complexa, como as secreções de outras espécies desta família. Com relação aos peptídeos caracterizados neste trabalho, não verificamos atividade antimicrobiana e nem anticâncer, mas sim uma atividade proliferativa para alguns destes peptídeos, nas células tumorais. Tal atividade poderá servir para o estudo de vias envolvidas no processo de câncer.

Acreditamos que, devido a riqueza de peptídeos encontrados, esta secreção representa um material em potencial para se explorar diversas atividades biológicas e que este estudo representa somente um começo para novas investigações.

CAPÍTULO II

8. OBJETIVOS CAPÍTULO II

Hipótese: Combinação entre LyeTx I-Des-His e cisplatina reduzem a viabilidade celular em linhagens de células de câncer de mama triplo negativo, em comparação com cisplatina somente.

8.1. OBJETIVO GERAL CAPÍTULO II

Estudar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos de LyeTx1-Des-His e da combinação entre LyeTx I-Des-His e Cisplatina com vistas ao desenvolvimento de novas terapias para tratamento do cancer de mama triplo-negativo.

8.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO II

- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo LyeTx I-Des-His isolado e de cisplatina, em células de cancer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e em células não tumorais HEK-293
- Avaliar o efeito citotóxico da associação do LyeTx I-Des-His e Cisplatina contra células MDA-MB-231.
- Estudar os efeitos citotóxicos combinados de LyeTx I-Des-His e Cisplatina em diferentes proporções contra as linhagens MDA-MB-231 e HEK-293, valendo-se de análises isobolográficas.
- Investigar o mecanismo citotóxico para células MDA-MB-231 de LyeTx I-Des-His e de Cisplatina e da associação entre LyeTx I-Des-His e Cisplatina nas concentrações de maior atividade identificadas nas análises isobolográficas.

9. MÉTODOS CAPÍTULO II

Os materiais utilizados estão especificados no anexo "14.4".

9.1. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

Todos os experimentos de viabilidade celular a seguir foram realizados pelo ensaio de MTT, que mensura atividade mitocondrial pela conversão do reagente MTT em cristais de formazan (Mosmann, 1983). Uma solução de MTT a 5 mg/ml foi adicionada a cada poço das placas, contendo as células nas diferentes condições experimentais, com auxílio de uma pipeta multicanal para uma concentração final de 450 µg/ml e as placas foram incubadas por 4 h, a 37 °C, em estufa de CO₂. Após esta etapa o meio foi cuidadosamente aspirado, restando os cristais de formazan formados pelo metabolismo mitocondrial sobre o MTT. Em seguida os cristais foram solubilizados em 100 µl de uma solução de isopropanol e 0,04 M de HCl para leitura das placas em equipamento Varioskan Lux, no comprimento de onda de 595 nm.

Após as leituras experimentais os dados foram expressos em curvas sigmóides no *software* "Graphpad Prism 5.0" fazendo-se regressões não lineares com os dados obtidos, usando-se o modelo "dose-response (variable slope)", onde as concentrações inibitórias para 50% das células (IC₅₀) foram obtidas. Os pontos usados foram exibidos com seus respectivos desvios padrões.

9.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA DE LYETX I- DES-HIS E CISPLATINA

A prospecção inicial dos compostos, quanto às suas citotoxicidades, foi realizada pela avaliação de viabilidade celular. Estes compostos foram avaliados contra células MDA-MB-231. Os compostos testados, LyeTx I Des-His (Pep-B) e cisplatina foram avaliados separadamente contra as células em estudo, sendo testadas as concentrações máximas de 12,5 μM e 300 μM de Pep-B e cisplatina, respectivamente, como especificado na tabela 20, baseadas nos dados prévios de Abdel-Salam, 2018.

Tabela 20: Concentrações usadas no experimento de triagem inicial dos compostos a serem testados.

LyeTx I Des-His	Cisplatina
12,5 μM	300 μM
6,25 μM	150 μM
3,12 μM	75 μM
1,56 μM	37,5 μM
0,78 μM	18,75 μM
0,39 μM	9,37 μM
	4,68 μM
	2,34 μM
	1,17 μM

Placas de 96 poços contendo 10.000 células de cada linhagem por poço foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ para estabilização. Após este tempo as células foram tratadas com as diferentes concentrações de cada um dos compostos, nas faixas de concentração acima apresentadas e incubadas por mais 48 h. A avaliação da viabilidade celular através do ensaio de viabilidade celular por MTT, conforme descrito anteriormente. Foram realizados oito experimentos independentes em triplicata.

9.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA ASSOCIAÇÃO DE LYETX I DES-HIS COM CISPLATINA

A avaliação da citotoxicidade do peptídeo, em combinação com cisplatina, contra células MDA-MB-231, foi realizada com o peptídeo LyeTx I Des-His diluído seriadamente na razão 1:2, partindo-se da concentração máxima de 12,5 μM , sendo em seguida combinado com diferentes tratamentos de cisplatina, nas concentrações de 300; 150; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68 e 0,58 μM , conforme especificado na tabela 21. Estes tratamentos foram avaliados em células MDA-MB-231 plaqueadas na densidade de 10.000 células/poço em placas de 96 poços por 24 h. Após o tratamento as células foram incubadas por 48 h, a 37 °C, em estufa de CO₂, sendo em seguida, avaliada a viabilidade celular, pelo ensaio de MTT. Oito experimentos independentes foram realizados em quadruplicata para cada combinação avaliada.

Tabela 21: Combinações de diferentes concentrações utilizadas de LyeTx I Des-His e Cisplatina, conforme indicado na tabela abaixo.

Concentrações de Cisplatina	Concentrações de LyeTx I Des-His					
	12,5 μM	6,25 μM	3,12 μM	1,56 μM	0,78 μM	0,39 μM
300 μM						
150 μM						
37,5 μM						
18,75 μM						
9,37 μM						
4,68 μM						
0,58 μM						

As médias dos IC₅₀s encontradas em cada grupo foram também expressas na forma de gráficos de barra e comparados com essa média do IC₅₀ do experimento de LyeTx I Des-His em separado. A comparação foi feita pelo teste One way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, para verificação da significância estatística das diferenças de valores dos IC₅₀s, sendo considerado um p-valor igual ou menor que 0,05.

9.4. CITOTOXICIDADE DE LYETX I DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS

A citotoxicidade dos compostos LyeTx I Des-His e Cisplatina foi avaliada utilizando-se a linhagem celular HEK-293, proveniente de rim embrionário humano. Os compostos foram separadamente testados (n=3, em triplicata cada um) começando-se nas concentrações de 50 μ M e 300 μ M de LyeTx I Des-His e cisplatina, respectivamente, sendo cada um deles diluído nas concentrações especificadas na tabela 22.

Tabela 22: Concentrações usadas no experimento de citotoxicidade dos compostos a serem testados

LyeTx I Des-His	Cisplatina
50,00 μ M	300,00 μ M
25,00 μ M	150,00 μ M
12,50 μ M	75,00 μ M
6,25 μ M	37,50 μ M
3,12 μ M	18,75 μ M
1,56 μ M	9,37 μ M
0,78 μ M	4,68 μ M
0,39 μ M	2,34 μ M
0,19 μ M	1,17 μ M
0,09 μ M	0,58 μ M
0,04 μ M	0,29 μ M
0,02 μ M	0,14 μ M

10.000 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C, em estufa de CO₂, para estabilização. Após este tempo as células foram tratadas com cada um dos compostos nas faixas de concentração já apresentadas e incubadas por mais 48 h para avaliação da viabilidade celular, pelo ensaio com MTT.

9.5. ANÁLISE ISOBOLOGRÁFICA DAS COMBINAÇÕES DE LYETX I DES-HIS E CISPLATINA

A avaliação dos efeitos observados no item anterior foi feita por análise isobolográfica, técnica que possibilita inferir se dois compostos combinados possuem efeitos aditivo, sinérgico ou subaditivo (Tallarida, 2000).

Nesta análise escolhe-se uma porcentagem de atividade a ser analisada (normalmente o IC_{50} , embora possam ser feitos com outras percentagens de atividade), coloca-se em um gráfico de dispersão os valores de concentrações dos compostos individuais (compostos X e Y por exemplo). A seguir, traçam-se os intervalos de confiança, da reta que liga cada uma das concentrações. A reta mencionada é a linha de aditividade e os intervalos de confiança -superior e inferior- definem o lugar geométrico denominado faixa de aditividade. Por fim indicam-se os pontos que representam os resultados experimentais nos quais foram feitos experimentos concentração dependente usando-se combinações com proporções fixas dos compostos combinados. A figura 67 exemplifica como se dá esta análise.

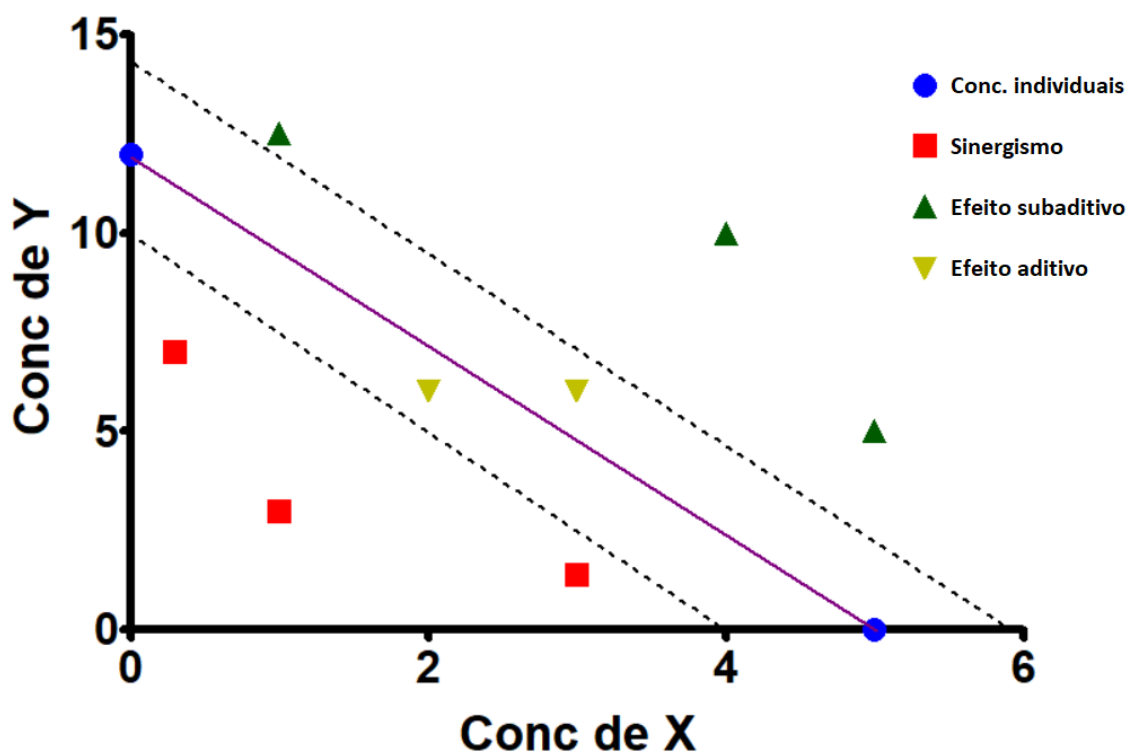


Figura 67: Exemplo de um isoblograma onde são analisados dois compostos hipotéticos "X" e "Y". Os círculos azuis representam as concentrações efetivas de cada uma das drogas "X" e "Y". A linha roxa representa a linha de aditividade teórica onde qualquer combinação de concentrações, teoricamente, apresentariam efeito aditivo. Em preto pontilhado os intervalos de confiança da linha roxa que representam os limites de efeito aditivo. Os quadrados vermelhos representariam um caso de experimentos onde as concentrações combinadas de "X" e "Y" apresentariam efeito sinérgico. Os triângulos verdes casos de experimentos onde as combinações de "X" e "Y" possuiriam efeitos subaditivos. Por fim os triângulos amarelos invertidos representariam concentrações de combinações de "X" e "Y" onde os compostos teriam efeito aditivo somente. (Figura feita pelo autor)

Efeito aditivo é o efeito de dois compostos onde suas atividades somente somam-se. Já o sinergismo é definido como a combinação de dois compostos onde observa-se um efeito superior à soma dos efeitos em separado. Por fim, subaditividade é o caso onde dois compostos são combinados e o valor do efeito final é inferior ao dos compostos em separado. Um caso clássico de subaditividade é o antagonismo, porém pode envolver outros mecanismos, como p. exemplo, inibição alostérica, competição, inibição não competitiva, entre outros.

Foram usadas para os ensaios de combinação doses crescentes de LyeTx I Des-His e Cisplatina nas proporções fixas de 1:1, 3:1 e 1:3. A tabela 23 apresenta as concentrações usadas em cada uma dessas proporções.

Tabela 23: Concentrações de cada um dos compostos usados para cada uma das proporções estudadas

Proporção 1:1		Proporção 3:1		Proporção 1:3	
LyeTx I Des-His	Cisplatina	LyeTx I Des-His	Cisplatina	LyeTx I Des-His	Cisplatina
12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM	4,16 µM	12,5 µM	37,5 µM
6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM	2,08 µM	6,25 µM	18,75 µM
3,12 µM	3,12 µM	3,12 µM	1,04 µM	3,12 µM	9,37 µM
1,56 µM	1,56 µM	1,56 µM	0,52 µM	1,56 µM	4,68 µM
0,78 µM	0,78 µM	0,78 µM	0,26 µM	0,78 µM	2,34 µM
0,39 µM	0,39 µM	0,39 µM	0,13 µM	0,39 µM	1,17 µM

Os compostos, nas concentrações explicitadas na tabela 23, foram testados contra as células MDA-MB-231 (n=6 em triplicata) e HEK-293 (n=5 em triplicata). A viabilidade celular foi avaliada nas mesmas condições dos testes dos itens 9.2 e 9.4.

A determinação dos valores de IC₅₀ foi feita por regressão linear (método dos mínimos quadrados) das curvas dose resposta das drogas isoladas ou em combinação. O valor IC₅₀ teórico aditivo (Z_{add}) foi calculado com base nos valores de IC₅₀ da LyeTx I Des-His e Cisplatina obtidas isoladamente (Tallarida, 2000). Os valores de IC₅₀ obtidos experimentalmente dos ensaios com as combinações de drogas (Z_{mix}) foram comparados por teste t (p-valor igual ou menor que 0,05) preparado em script no Microsoft Excel para distinção final entre aditividade ou sinergismo entre as drogas

9.6. ANÁLISES DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os efeitos do peptídeo e da cisplatina em suas formas livres, ou da associação dos dois compostos nas proporções testadas na análise isobolográfica (1:1; 3:1 e 1:3) sobre o ciclo celular, foram avaliados pelo método descrito por Nicoletti e colaboradores (1991) e Riccardi e Nicoletti (2006), com modificações. Este método permite avaliar as diferentes fases do ciclo celular (figura 68) e quantificar o conteúdo de DNA subdiploide (sub-2n ou subG0/G1) que é associado à fragmentação do DNA. A quantificação de DNA é feita pelo uso de uma solução hipotônica fluorocrômica (HFS) que contém o iodeto de propídio que marca o DNA.

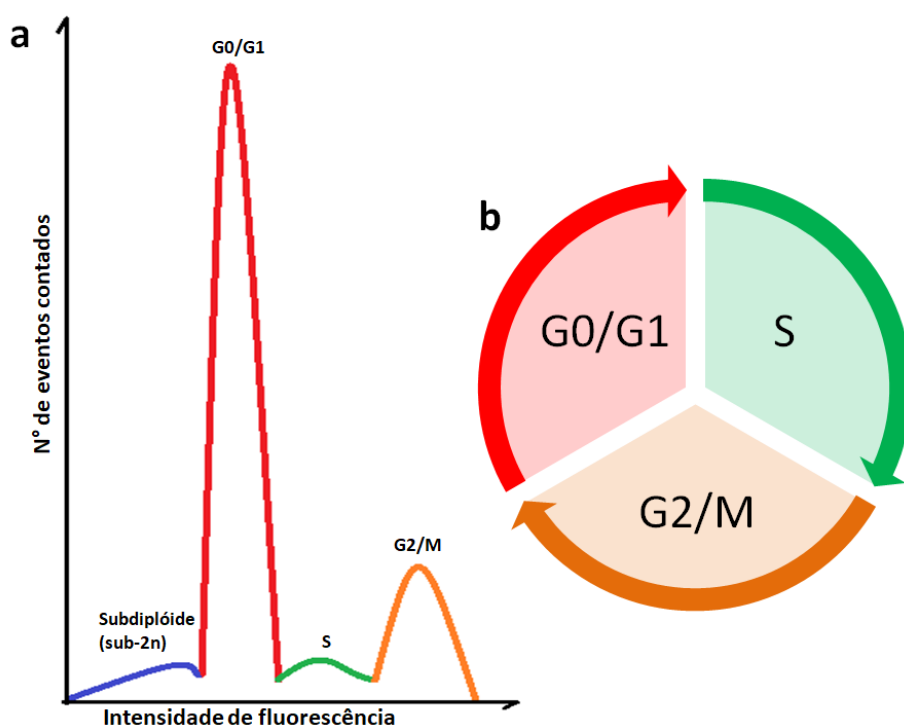


Figura 68: **a:** Histograma representativo da análise do ciclo celular utilizando o protocolo descrito por Nicoletti, 1991 e Riccardi e Nicoletti, 2006. Em Azul as células com DNA subdiploide que é um indício de fragmentação (por apoptose p. ex.), em vermelho fase G0/G1 onde estão as células não estão em processo de divisão celular, em verde fase S onde as células estão duplicando seu DNA a fim de entrarem em divisão celular e em laranja, a fase G2/M com células já prontas para a divisão celular. **b.** representação das diferentes fases do ciclo celular. (Figura feita pelo autor)

As células de MDA-MB-231 (300.000 células/poço em placas de 6 poços) foram incubadas por 24 e 48 h na presença dos compostos, na concentração dos IC_{50s} encontrados para cada uma das combinações do item 9.5. Os experimentos foram realizados com n=4 em duplicata cada um. Em seguida, as células foram tripsinizadas e lavadas. Os meios recuperados foram transferidos para tubos de 1,5 ml. Em seguida as células foram centrifugadas a 2000 x g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado recuperado tratado com 300 µl de solução HFS, que contém citrato de sódio a 0,1% (p/v); Triton X-100 a 0,1% (v/v) e iodeto de propídio a 50 µg/ml e incubado por 1 hora. A seguir a preparação foi misturada vigorosamente em vórtex e 20.000 eventos foram lidos em um FACScan, usando se o filtro 585/42 (leitura entre 564 a 606 nm) para leitura da fluorescência emitida pelo corante usado.

Os dados obtidos foram tratados com o software FlowJo 10.0 para análise. As porcentagens foram expressas em gráficos de barra no software Graphpad Prism 5.0. Foi feita uma análise por teste One way ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo considerado um p-valor igual ou menor que 0,05.

9.7. ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DE LARANJA DE ACRIDINA

O corante Laranja de acridina é comumente usado para o estudo de autofagia (Han & Burgess, 2010; Murugan & Amaravadi, 2016; Sigma Aldrich, 2019). Este corante em pH neutro apresenta fluorescência verde, porém, em pH mais ácido sofre metacromasia ao ser protonado, e emite fluorescência no vermelho, o que está associado à formação de organelas vesiculares ácidas (AVOs), indicativas do processo de morte celular por autofagia (AVOs) (Sigma Aldrich, 2019).

Células MDA-MB-231 foram tratadas conforme descrito no item 9.6. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e lavadas com o meio recuperado sendo transferidos para tubos de 1,5 ml. Em seguida elas foram centrifugadas a 2000 x g por 5 min. O meio foi descartado e foi adicionado 1 ml de PBS aos tubos e uma nova etapa de centrifugação foi executada. Após isso a solução foi novamente descartada e 300 µl de uma solução contendo 5 µg/ml de laranja de acridina em PBS foi adicionada às células, que foram avaliadas por citometria de fluxo FACScan (20.000 eventos lidos), utilizando-se os filtros 530/30 (leitura entre 515 a 545 nm) e 670LP (leituras acima de 670 nm).

9.7.1. Avaliação do envolvimento de morte celular por autofagia usando o inibidor Bafilomicina A1

Para investigação do envolvimento de autofagia, foi utilizado o inibidor Bafilomicina-A1. Este macrolídio é um inibidor de autofagia agindo através da inibição da ATPase vacuolar (V-ATPase) que é importante para formação dos autofagolisossomos ácidos que são característicos de morte celular por autofagia (Yamamoto *et al*, 1988). Ao ser inibida, a V-ATPase não bombeará prótons para dentro do autofagossomo (Bowman *et al*, 1988), impedindo assim a fusão dos lisossomos com esses, agindo portanto como um potente inibidor da autofagia (Vinod *et al*, 2014). Antes do tratamento com cada um dos compostos e cada uma das combinações, as células foram pré-tratadas por uma hora com 10 nM da Bafilomicina-A1 e, posteriormente, marcadas com o laranja de acridina, conforme descrito anteriormente, seguindo-se a análise por citometria de fluxo. Vinte mil eventos foram avaliados. Foram realizados quatro experimentos independentes, em duplicata cada.

Os dados foram tratados com o software FlowJo 10.0. Após a etapa de análise dos dados as porcentagens foram expressas em gráficos de barra no software Graphpad Prism 5.0 seguidos de uma análise por teste One way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, sendo considerado um p-valor igual ou menor que 0,05.

9.8. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Experimentos de western blot foram realizados para detecção e quantificação da presença das proteínas, relacionadas na tabela 24. Meio milhão de células foram plaqueadas em placas de 6 poços e depois de 24 h tratadas com os compostos combinados nas concentrações dos IC_{50s} (item 9.5). Depois de 24 h as células foram lisadas com solução de RIPA (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 140 mM de NaCl 1% de P-40, 1% de desóxicolato de sódio, e 0,1% de SDS) e a mistura resultante centrifugada a 15.000 x g por 20 minutos, recuperando-se o sobrenadante. A concentração de proteínas do produto foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

Tabela 24: Proteínas pesquisadas, suas respectivas massas aproximadas, bem como os grupos de anticorpos usados para marcar cada uma dessas proteínas.

Proteína	Mw aproximada	Anticorpo usado
ERK	44 KDa e 42 KDa	Anti ERK1/ 2
pERK	44 KDa e 42 KDa	Anti ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
AKT1	64 KDa	Anti AKT1
pAKT	64 KDa	Anti AKT1 (Ser473)
P53	53 KDa	Anti P53
P21	21 KDa	Anti P21
Actina	42 KDa	Anti Actina

O produto da lise celular (100 µg por corrida) dos tratamentos (n=4) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), tipo SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970, com modificações), sob tensão de 200 V. Após a etapa de eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, através da

técnica do *electroblotting* em aparelho tipo semisseco. Terminada a transferência, as membranas foram cortadas para isolar as posições onde estavam presentes as proteínas de interesse e essas incubadas com 1% (p/v) de BSA em solução de Tris-base salina (TBS); contendo 150 mM NaCl em 50 mM Tris-Cl, pH 7.5; por 2 h. A seguir as membranas foram incubadas, overnight, com 10 ml de solução TBS do anticorpo primário em diluição conforme especificada pelo fabricante. Completada a etapa de ligação dos anticorpos as membranas foram lavadas três vezes por 20 min com solução de TBS. Após a etapa de lavagem as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário em TBS por 1 h e depois disso lavadas, novamente 3 vezes. Para revelação as membranas foram tratadas com 500 µl de solução do kit ECL e lidas no aparelho ImageQuant.

As fotos obtidas foram analisadas através do software ImageJ 1.8 e os dados resultantes usados para realização da quantificação da intensidade das bandas. As intensidades foram expressas em gráficos de barra e procedido teste One way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, sendo considerado um p-valor igual ou menor que 0,05; para verificação da significância estatística comparado com o controle tratado somente com veículo (PBS).

10. RESULTADOS

10.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO PEPTÍDEO LYETX I DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS MDA-MB-231

Cisplatina e o peptídeo LyeTx I Des-His foram avaliados quanto às suas citotoxicidades para células MDA-MB-231 (figura 69). As curvas concentração-dependentes estão apresentadas a seguir. A cisplatina na concentração de 300uM (no máximo de sua solubilidade), apresentou somente 60% de redução da viabilidade celular. As IC_{50s} obtidas, foram de 94,69 µM para a Cisplatina e de 2,47 µM para LyeTx I Des-His.

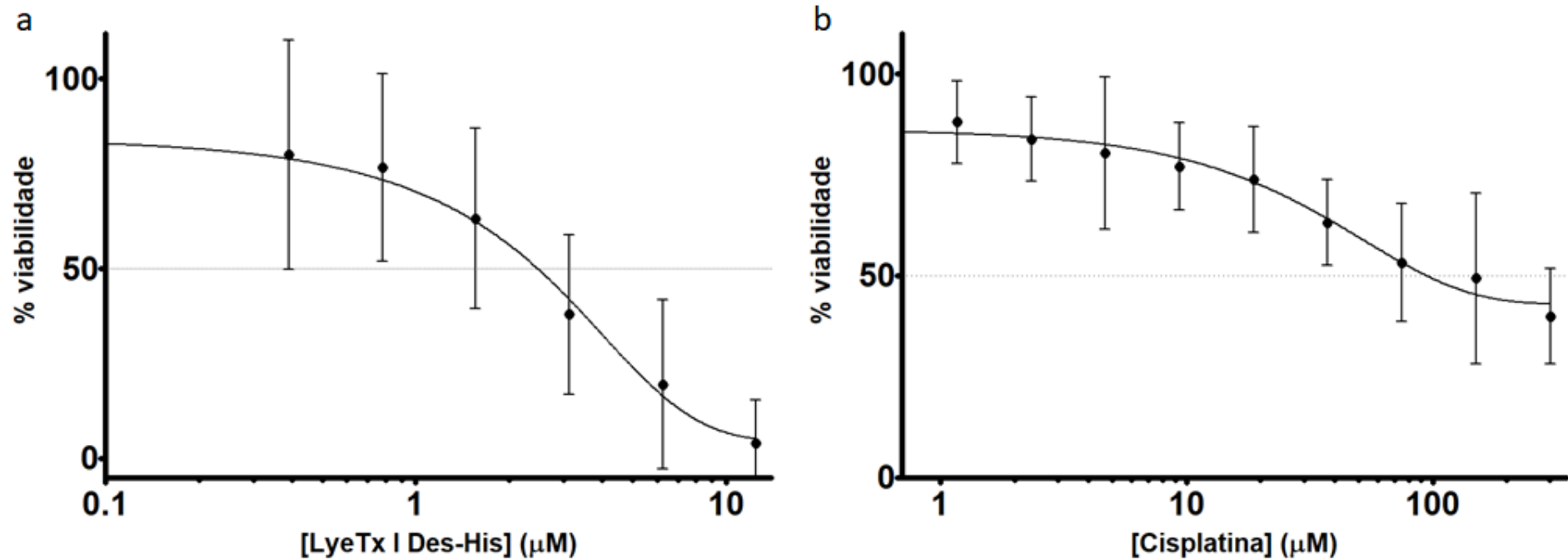


Figura 69: Viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com LyeTx I Des-His (a) e cisplatina (b), em diferentes concentrações. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (vide Métodos) com $n=8$ em triplicata cada um, com cada ponto apresentando seu respectivo desvio padrão. IC_{50} s de $2,47 \mu\text{M}$ e de $94,69 \mu\text{M}$, foram calculados para LyeTx I Des-His e para cisplatina, respectivamente.

10.2. EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE LYETX I DES-HIS COM CISPLATINA NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MDA-MB-231

As curvas de viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de peptídeo e de cisplatina, estão apresentados na figura 70. O teste estatístico mostrou que a partir da concentração de 18,75 μM de cisplatina, em combinação com o peptídeo, o IC_{50} deste tratamento combinado, foi significativamente menor com relação ao IC_{50} do peptídeo isolado (figura 71). A tabela 25 apresenta as IC_{50} s encontradas para cada um dos tratamentos isolados, bem como para os tratamentos combinados (LyeTx I Des-His + cisplatina)

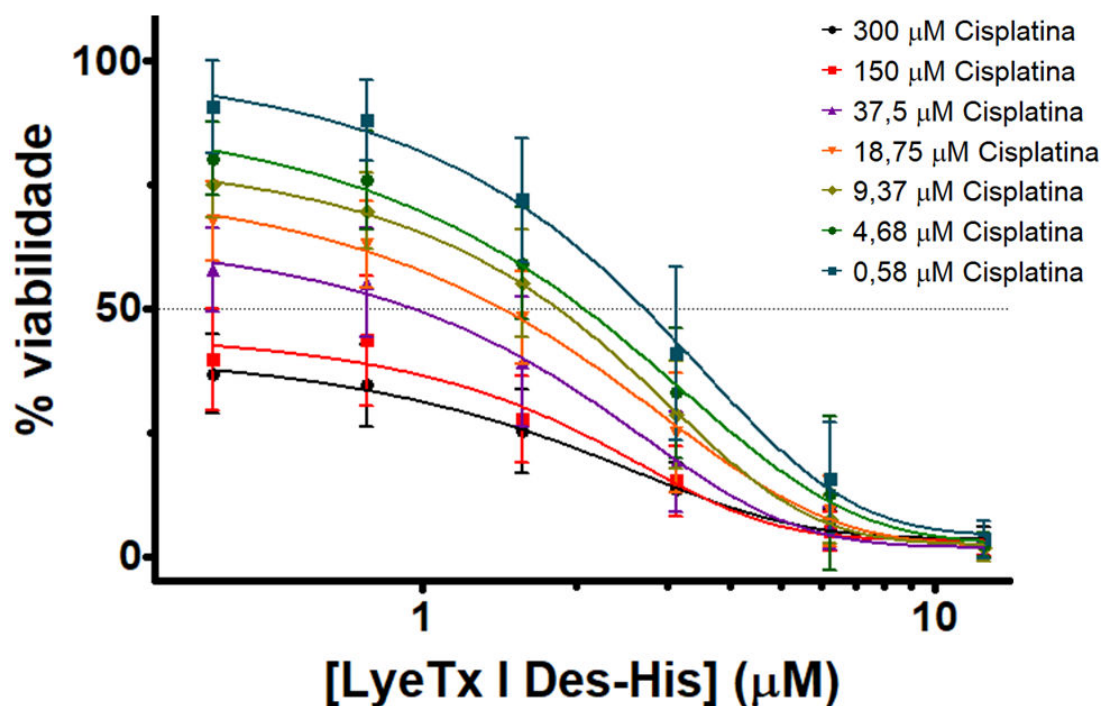


Figura 70: Viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo LyeTx I Des-His e cisplatina nas concentrações indicadas. Os dados foram tratados por regressões não lineares e os IC_{50} s obtidos estão representados na tabela 25. $n=8$ em quadruplicata cada.

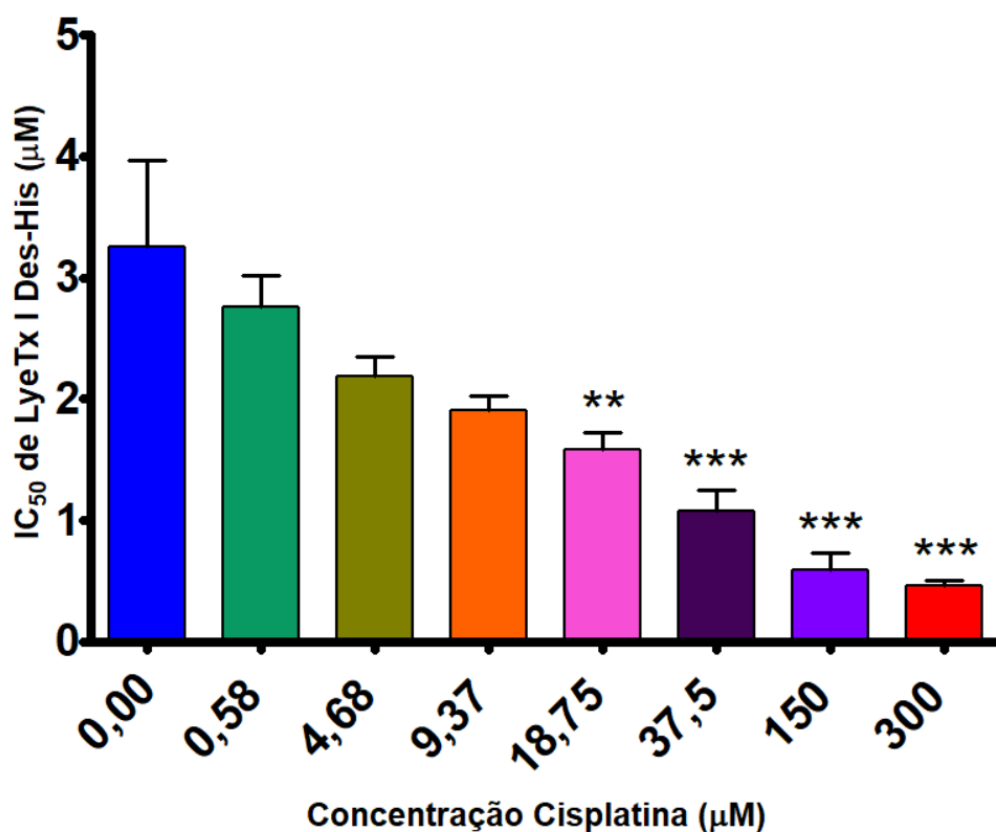


Figura 71: Variação do IC₅₀ para o peptídeo LyeTx I Des-His relativo à viabilidade das células MDA-MB-231, em função da variação de cisplatina, nas concentrações indicadas. PBS representa o controle, tratado apenas com o peptídeo. Os dados para o peptídeo foram obtidos da Figura 69 e os demais dados da Fig. 70. Os asteriscos indicam concentrações onde houve diferença estatisticamente significativas do peptídeo + cisplatina, com relação ao tratamento somente com o peptídeo (0,00 indicando 0 μM de cisplatina), onde ** = p-valor ≤ 0,01 e *** = p-valor ≤ 0,001. (n=8)

Tabela 25: Valores de IC₅₀ encontrados para os tratamentos isolados, ou combinados (peptídeo + cisplatina) pela análise das curvas relativas à figura 68 e 69.

Tratamento	IC ₅₀ encontrada
LyeTx I Des-His	2,47 μM
Cisplatina	94,69 μM
pepB + 0,57 μM Cisplatina	2,70 μM
pepB + 4,68 μM Cisplatina	2,07 μM
pepB + 9,37 μM Cisplatina	1,83 μM
pepB + 18,75 μM Cisplatina	1,42 μM
pepB + 37,5 μM Cisplatina	0,96 μM
pepB + 150 μM Cisplatina	<0,39 μM
pepB + 300 μM Cisplatina	<0,39 μM

10.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA DO LYETX I DES-HIS E CISPLATINA EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS HEK-293

Os efeitos citotóxicos dos compostos em estudo, contra as células HEK-293, foram avaliados e geraram as curvas da figura 72, das quais foram calculados os valores de IC₅₀ para LyeTx I Des-His e cisplatina de 7,88 µM e 3,96 µM, respectivamente.

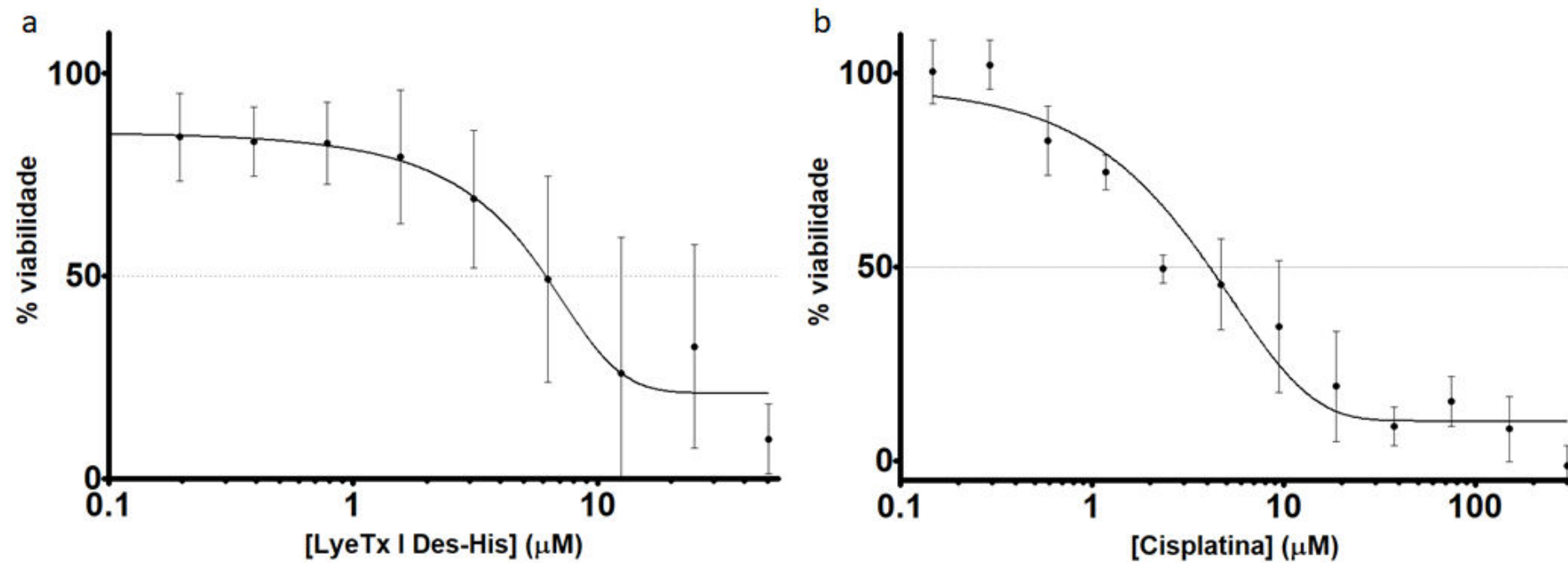


Figura 72: Curvas concentração dependentes resultantes dos ensaios de viabilidade por MTT dos dois compostos testados sobre células HEK-293. **a**: curva descrevendo o perfil de atividade citotóxica de LyeTx I Des-His e **b**: curva descrevendo o perfil de atividade citotóxica de cisplatina; onde obtiveram-se os IC_{50} s de 7,88 μM para LyeTx I Des-His e de 3,96 μM para a cisplatina. $n=3$ em triplicata cada.

10.4. ANÁLISE ISOBOLOGRÁFICA DAS COMBINAÇÕES DE LYETX I DES-HIS E CISPLATINA

Para as análises isobolográficas, diferente dos experimentos anteriores, os dados foram expressos em função da porcentagem de morte e não de viabilidade, onde as duas grandezas se relacionam pela igualdade:

$$\%morte = 100 - \%viabilidade$$

Logo, elas são interconvertíveis. Esta mudança deve-se ao interesse de se estabelecer estímulo máximo ou atividade máxima, que leve à morte celular, no caso das células de câncer. A figura 73 mostra as curvas geradas por essa conversão dos dados.

Contudo, para a análise isobolográfica é mais confiável utilizar os dados na forma de regressão linear, ao contrário da curva sigmoide que é uma regressão não linear. Para a análise de MDA-MB-231 foram usados 4 pontos, nos quais observou-se esse padrão de linearidade e para HEK-293 3 pontos. Os resultados dessa regressão para os compostos administrados conjuntamente, ou somente com LyeTx I Des-His ou cisplatina, em separado, também foram montados na figura 74.

A tabela 26 apresenta os valores de IC₅₀ encontrados, tanto para a regressão linear, como para não linear.

Tabela 26: IC₅₀s dos tratamentos das células MDA-MB-231 e HEK-293, em presença do peptídeo LyeTx I Des-His, de cisplatina, ou de ambos os compostos. Conforme indicado, os IC₅₀s foram calculados por regressão linear e não linear. P:C = proporção de peptídeo/cisplatina.

Tratamento	IC ₅₀ Regressão linear		IC ₅₀ Regressão não linear	
	MDA-MB-231	HEK-293	MDA-MB-231	HEK-293
LyeTx I Des-His	2,15 µM	5,86 µM	2,47 µM	7,88 µM
Cisplatina	109,84 µM	3,96 µM	94,69 µM	3,96 µM
P:C 1:1	3,62 µM	2,59 µM	3,97 µM	2,67 µM
P:C 3:1	3,03 µM	2,81 µM	3,37 µM	2,87 µM
P:C 1:3	8,67 µM	3,11 µM	9,57 µM	3,57 µM

Percebe-se que os valores para regressões lineares e não lineares são muito próximos, logo optou-se por usar a regressão linear para as análises isobolográficas. Estas análises estão apresentadas na figura 75. O teste estatístico das análises mostrou que somente a proporção P:C 1:1 foi sinérgica para as células MDA-MB-231. Já para as células HEK-293 todas as proporções P:C (1:1, 3:1 e 1:3) apresentaram efeito sinérgico.

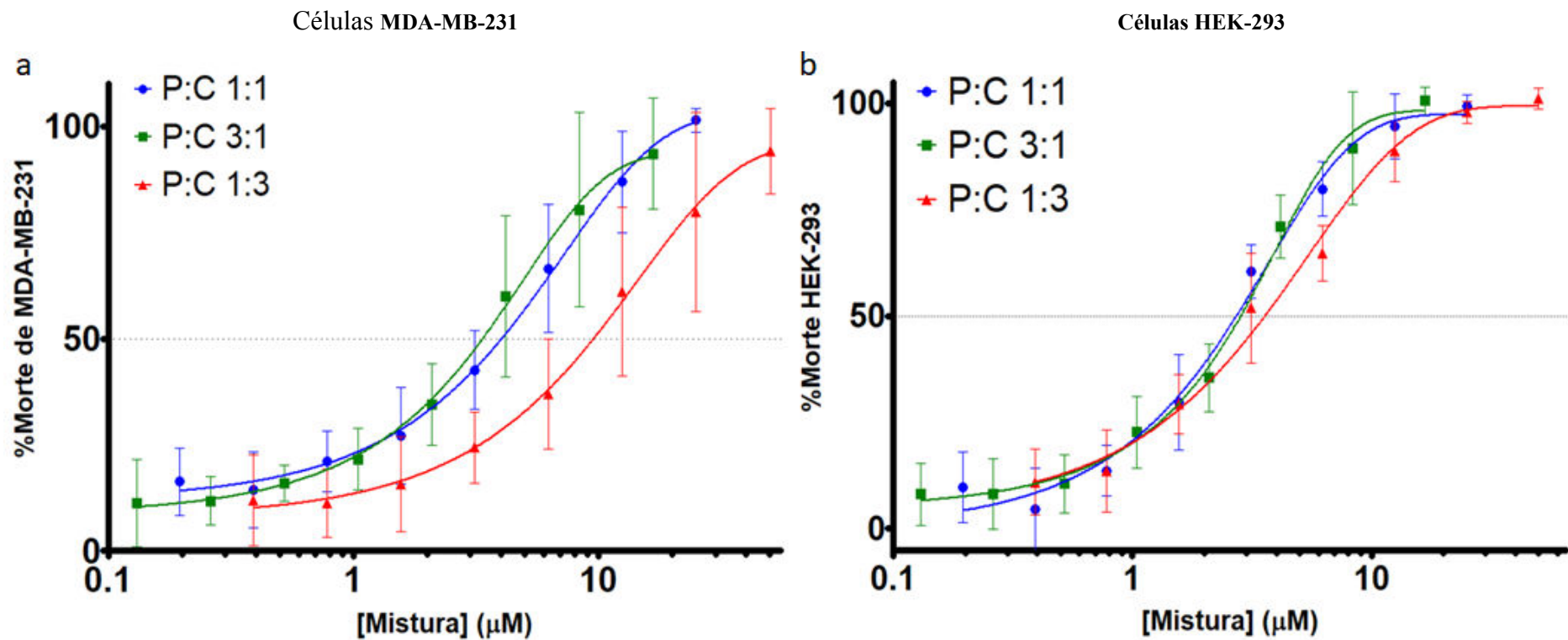


Figura 73: Curvas concentração dependentes geradas pelas diferentes proporções entre cisplatina e LyeTx I Des-His contra as células **a** MDA-MB-231 (n=6 em triplicata cada) **b** HEK-293 (n=5 em triplicata cada). Mistura indica a união em cada uma das proporções indicadas na figura, P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme código de cores já indicado na figura.

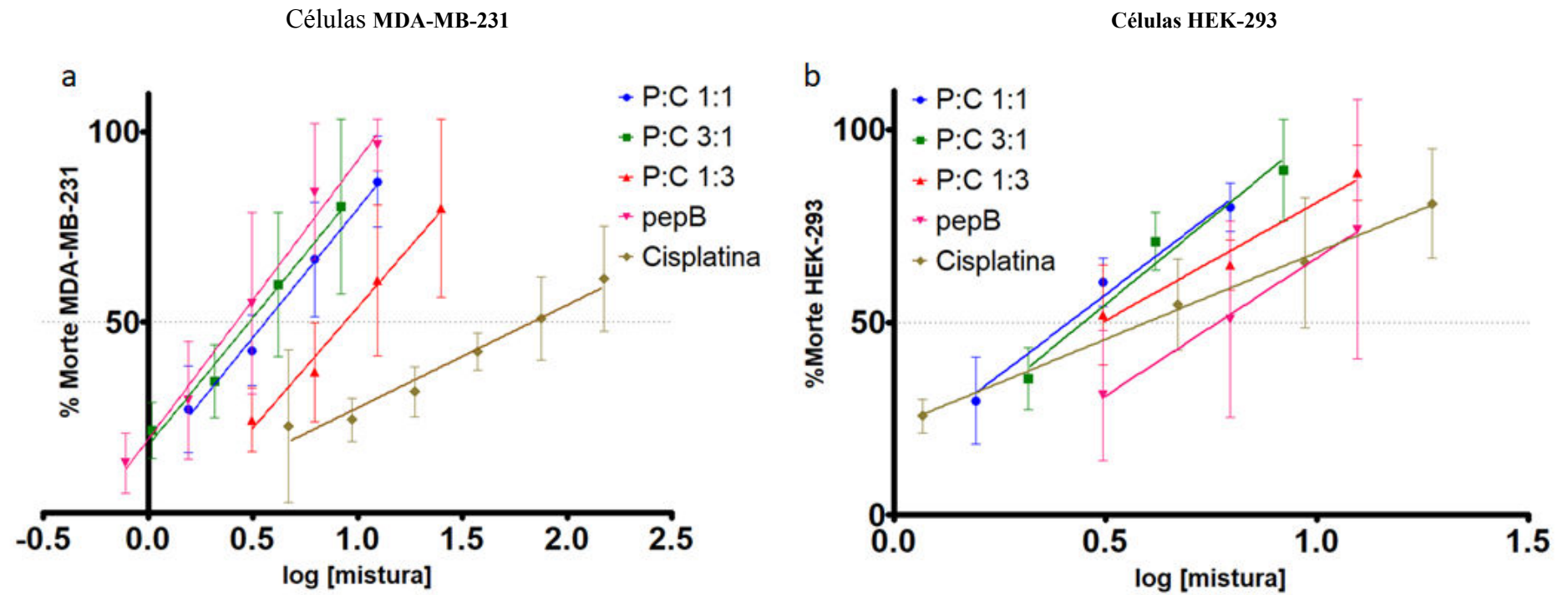
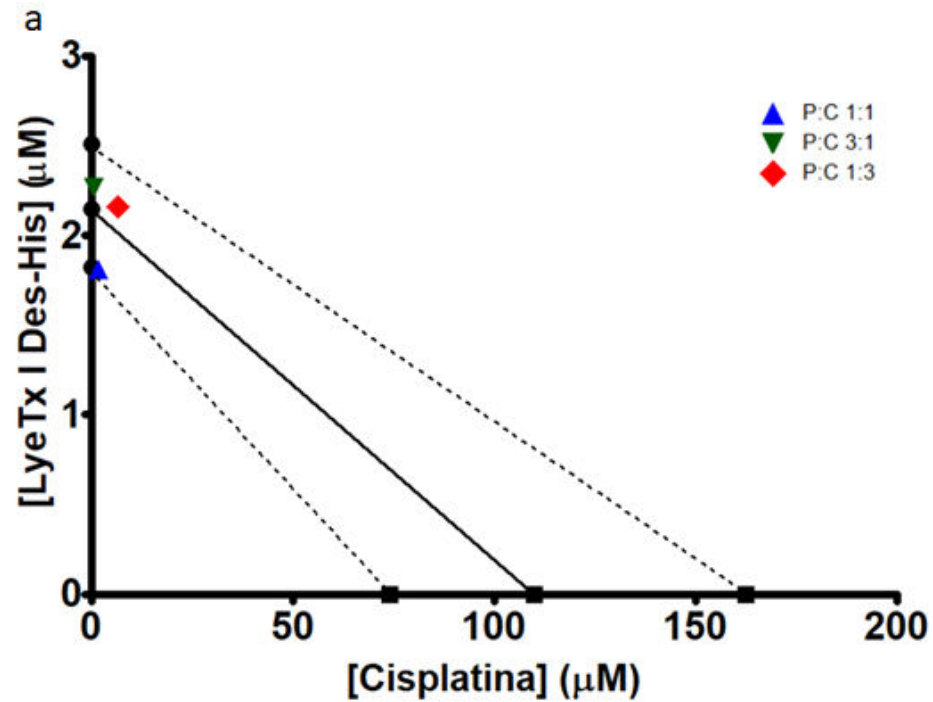


Figura 74: Regressões lineares geradas pelos dados obtidos nas figuras 63 (dados de cisplatina e LyeTx I Des-His contra células MDA-MB-231), 66 (dados de cisplatina e LyeTx I Des-His contra células HEK-293) e 67 considerando-se os pontos situados na fase linear das curvas sigmóides. **a** MDA-MB-231 **b** HEK-293. Mistura indica a aplicação das duas substâncias misturadas, nas proporções mostradas na figura. (P:C).

Células MDA-MB-231



Células HEK-293

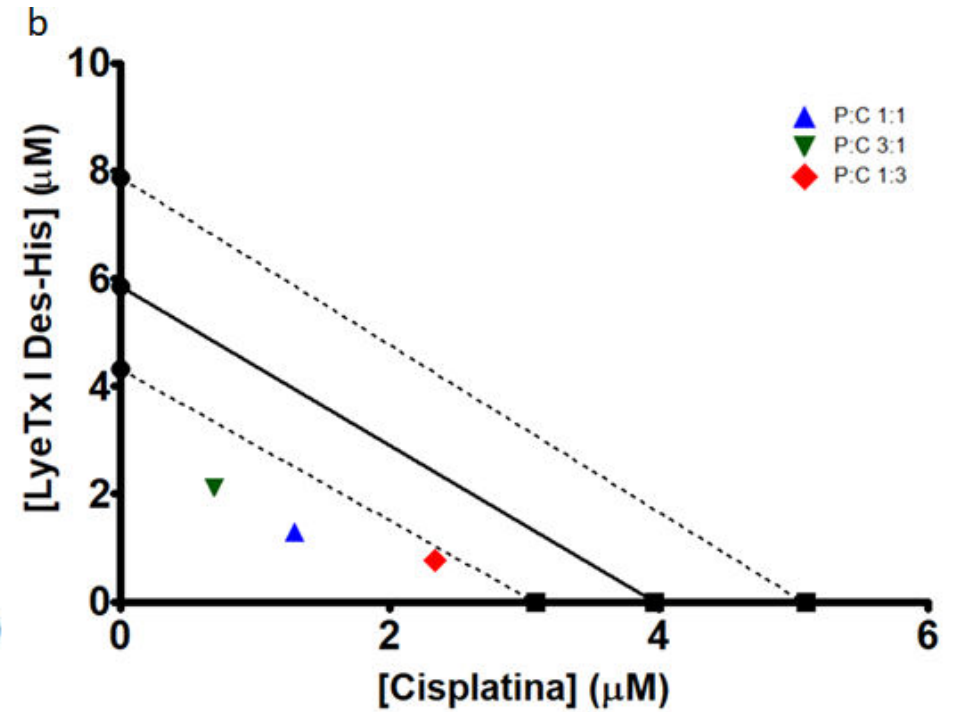


Figura 75: Isobogramas gerados na concentração da IC_{50} obtidos para as diferentes proporções de LyeTx I Des-His e cisplatina. P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme indicado na figura. : **a:** isobograma para MDA-MB-231 e **b:** isobograma para HEK-293.

10.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LYETX I DES-HIS E CISPLATINA NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MDA-MB-231

A análise do ciclo celular de células MDA-MB-231, após 24 h de tratamento com os compostos estudados, isolados ou em associação, demonstrou diferenças na progressão do ciclo celular. Observou-se que o grupo controle (tratamento somente com PBS) apresentou o perfil típico de um ciclo celular, sendo possível observar as diferentes fases como G0/G1, S e G2/M. Nos histogramas representativos (Figura 76a), observa-se um pico de fluorescência no eixo “x” maior em cerca de 200 (referente a fase G0/G1), seguindo-se uma região de intensidade de fluorescência intermediária (fase S) e um pico menor um pouco antes de 400 (fase G2/M). Marcação com menor intensidade de fluorescência (<200) corresponde à região de DNA subdiploide ou sub-G0/G1, sugerindo células com o DNA fragmentado. Com 24 horas de tratamento com cisplatina o ciclo celular mostrou um aumento na fase subdiploide (fluorescência abaixo de 200) e uma redução na fase G0/G1. O tratamento com LyeTx I Des-His não apresentou alterações na progressão do ciclo celular. Contudo, as combinações apresentaram mudanças no perfil do ciclo celular com relação ao controle demonstrando alterações na fase G0/G1. A figura 76b mostra a quantificação em gráficos de barra dos perfis encontrados bem como a figura apresenta os perfis encontrados no citômetro de fluxo.

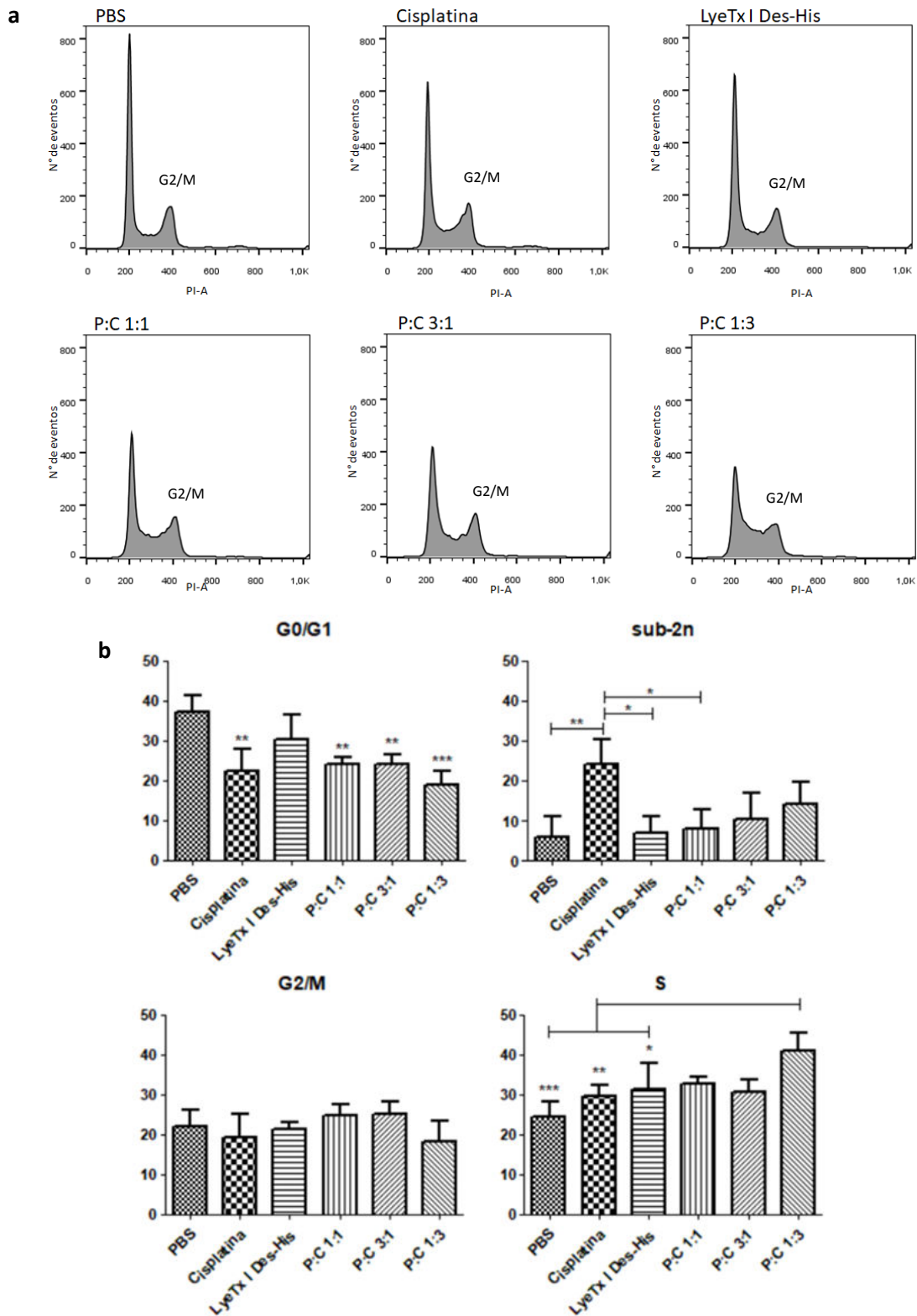


Figura 76: a Histogramas representativos dos ciclos celulares após análise por citometria de fluxo de células MDA-MB-231 tratadas por 24 h com os compostos indicados. P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme já indicado na figura. PI-A: área do sinal obtido para iodeto de propídio. **b** Quantificações percentuais das quatro populações encontradas nos ciclos celulares obtidos, 24 h pós tratamento (n=4 em duplicata cada), para cada uma das fases visualizadas no histograma, onde * = p-valor $\leq 0,05$; ** = p-valor $\leq 0,01$ e *** = p-valor $\leq 0,001$.

A análise de 48 h pós tratamento revelou que todos os tratamentos levaram a alteração na progressão do ciclo celular que foram significativamente diferentes, comparados com PBS. O conteúdo de DNA subdiploide foi maior nos tratamentos com cisplatina e proporção P:C 3:1, houve redução do pico G0/G1 para tratamentos com cisplatina e todas as combinações feitas, a fase S foi maior nos tratamentos cisplatina e proporção P:C 3:1 . Foi observada uma parada em G2/M para a associação P:C 1:1 e P:C 1:3 em relação ao controle. A figura 77a apresenta os histogramas representativos dos resultados observados e os gráficos de barra (figura 77b) apresentam as comparações, bem como as análises estatísticas estão nela indicadas.

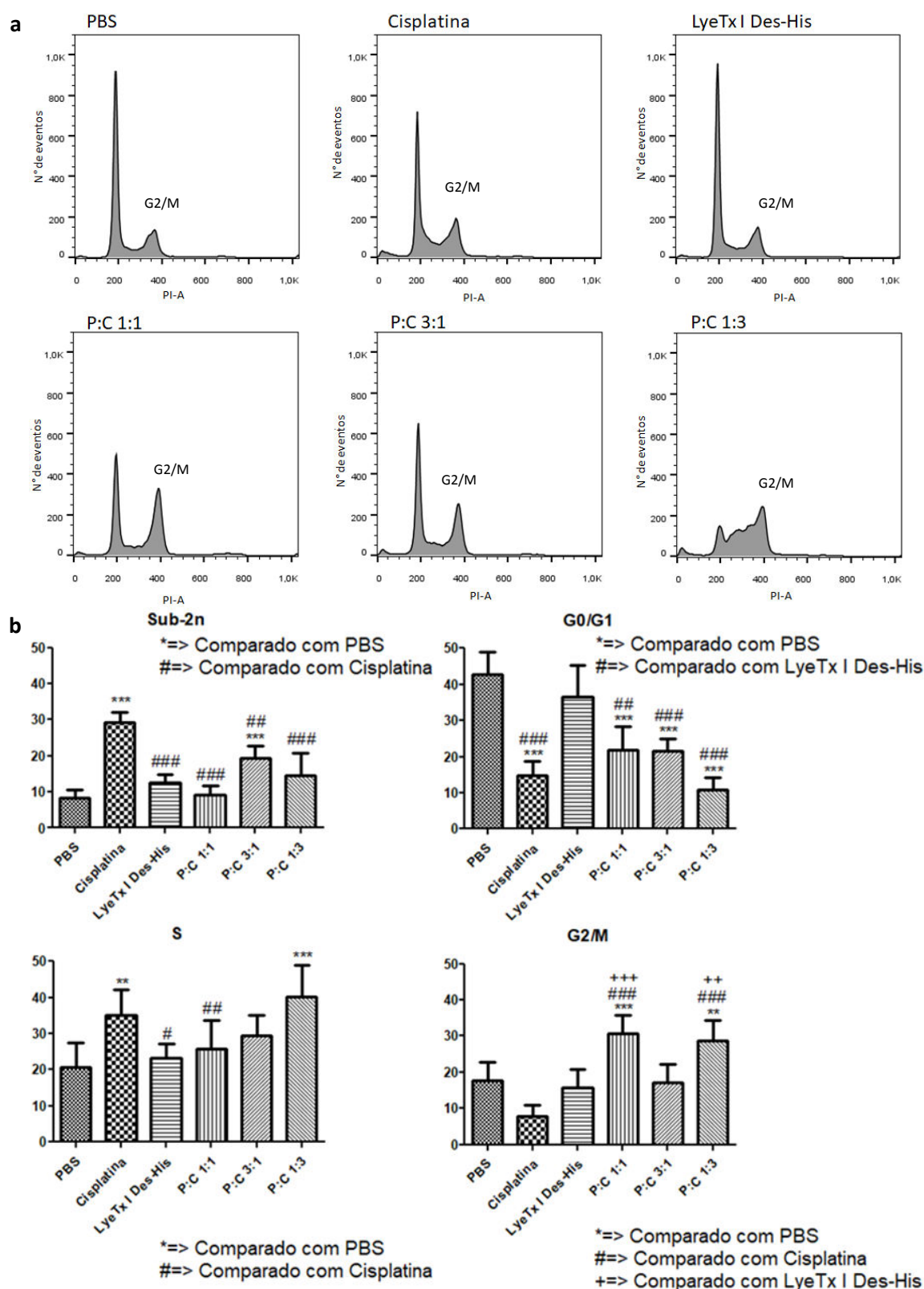


Figura 77: a: Histogramas representativos dos ciclos celulares após análise por citometria de fluxo de células MDA-MB-231 tratadas por 48h com os compostos indicados. P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme já indicado na figura. PI-A: área do sinal obtido para iodoeto de propídio. **b:** Quantificações percentuais das quatro populações encontradas nos ciclos celulares obtidos, 48 h pós tratamento (n=4 em duplicata cada), para cada uma das fases visualizadas no histograma, onde * ou # = p-valor $\leq 0,05$; ** ou ## = p-valor $\leq 0,01$ e *** ou ### ou +++ = p-valor $\leq 0,001$, sendo cada um dos símbolos explicados na figura.

10.6. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ORGANELAS VESICULARES ÁCIDAS (AVOS) EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS OU NÃO COM LYETX I DES-HIS, CISPLATINA OU COM ESTES COMPOSTOS EM ASSOCIAÇÃO

Uma vez que foi observada a parada do ciclo celular em G2/M com a associação 1:1 e 1:3, ensaios com laranja de acridina foram conduzidos uma vez que, parada em G2/M tem sido associada com mecanismo de morte por autofagia.(Dotiwala *et al*, 2012; Mathiassen *et al*, 2017; Azzopardi *et al*, 2017). Os experimentos de incorporação de laranja de acridina mostraram que, com 24 h de tratamento das células com LyeTx I Des-His, bem como com as combinações deste peptídeo com cisplatina, mostraram grande aumento na fluorescência vermelha, o que é associado com a presença de AVOS devido ao processo de morte por autofagia, quando comparados com o controle. Com 48 h de tratamento, o aumento de fluorescência vermelha também foi observado, porém em menor proporção quando comparado com o mesmo grupo após 24 h.

O tratamento com cisplatina não mostrou aumento tão grande de fluorescência vermelha, quanto ao dos outros grupos citados, embora tenha sido superior ao do controle (PBS). As figuras 78a e 79a apresentam os perfis mais representativos encontrados para 24 e 48 h, respectivamente.

O pré-tratamento das células com o inibidor de autofagia, Bafilomicina A1 mostrou que houve uma redução do sinal vermelho aos níveis do controle (PBS), em todas as amostras, conforme observado nos dotplots dos perfis representativos ilustrados nas figuras 78b e 79b (24 e 48 h, respectivamente) e na estatística apresentada na figura 80.

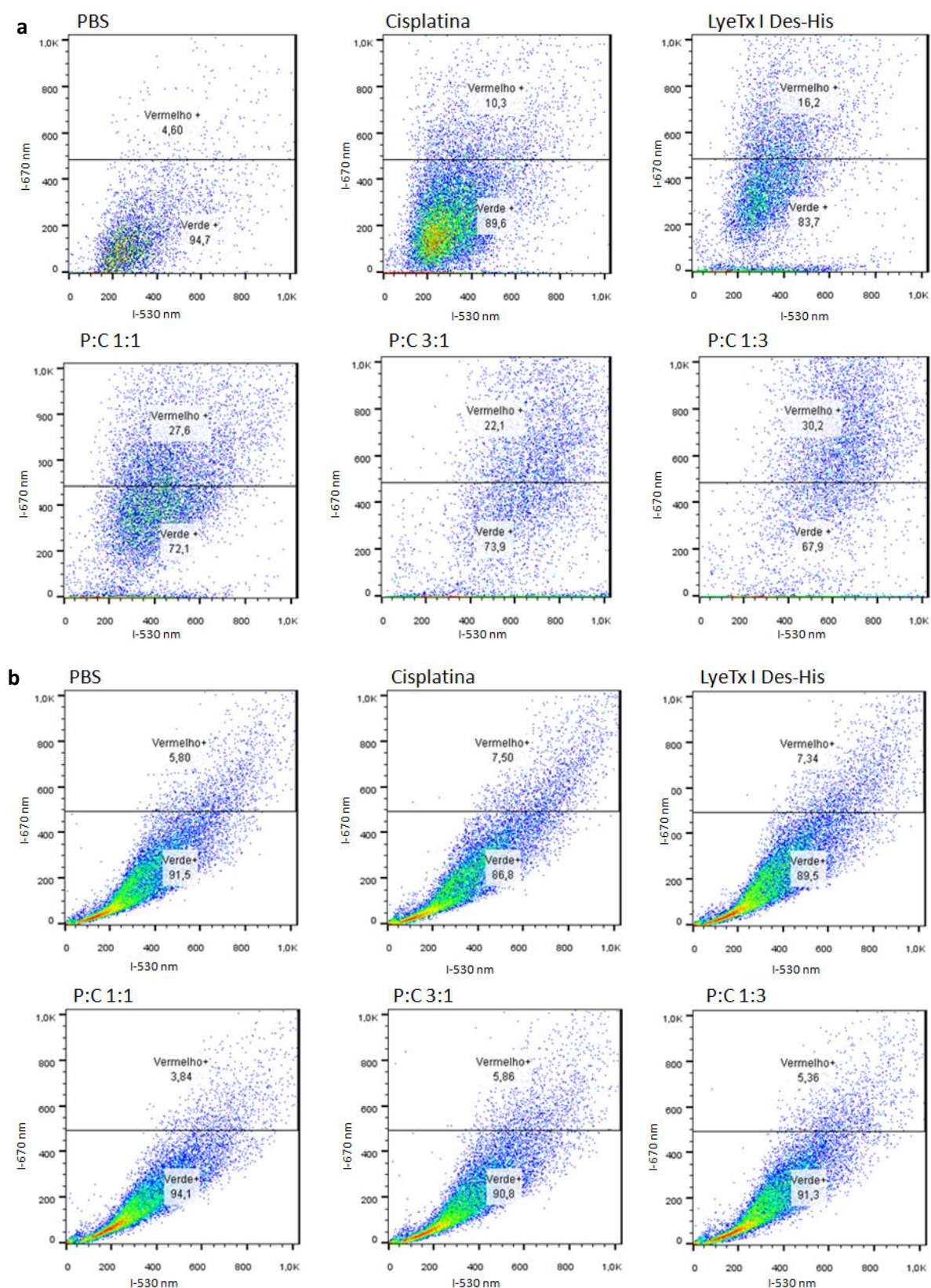


Figura 78: Dotplots representativos da análise de células MDA-MB-231 marcadas com laranja de acridina após tratamento por 24 horas. Em **a** é visualizado cada um dos tratamentos conforme indicado e em **b** os tratamentos indicados na presença do pré tratamento com o inibidor da V-ATPase Bafilomicina A1. I-530 nm representa o eixo de leitura do filtro verde e I-670 nm o eixo de leitura do filtro vermelho. P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme já indicado na figura.

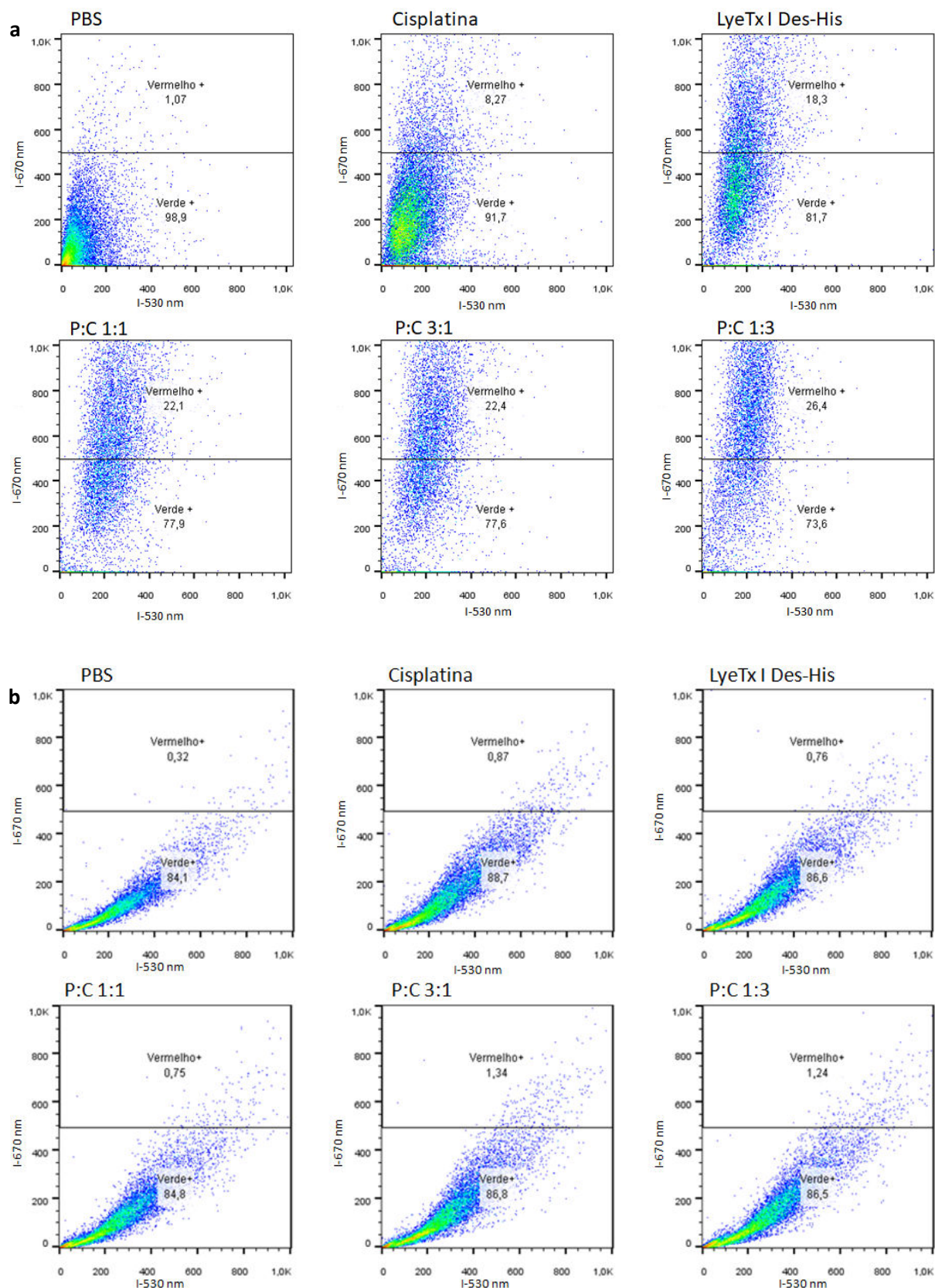


Figura 79: Dotplots representativos da análise de células MDA-MB-231 marcadas com laranja de acridina após tratamento por 48 horas. Em a é visualizado cada um dos tratamentos conforme indicado e em b os tratamentos indicados na presença do pré tratamento com o inibidor da V-ATPase Bafilomicina A1. I-530 nm representa o eixo de leitura do filtro verde e I-670 nm o eixo de leitura do filtro vermelho. P:C indica a proporção LyeTx I Des-His (P) e cisplatina (C), conforme já indicado na figura.

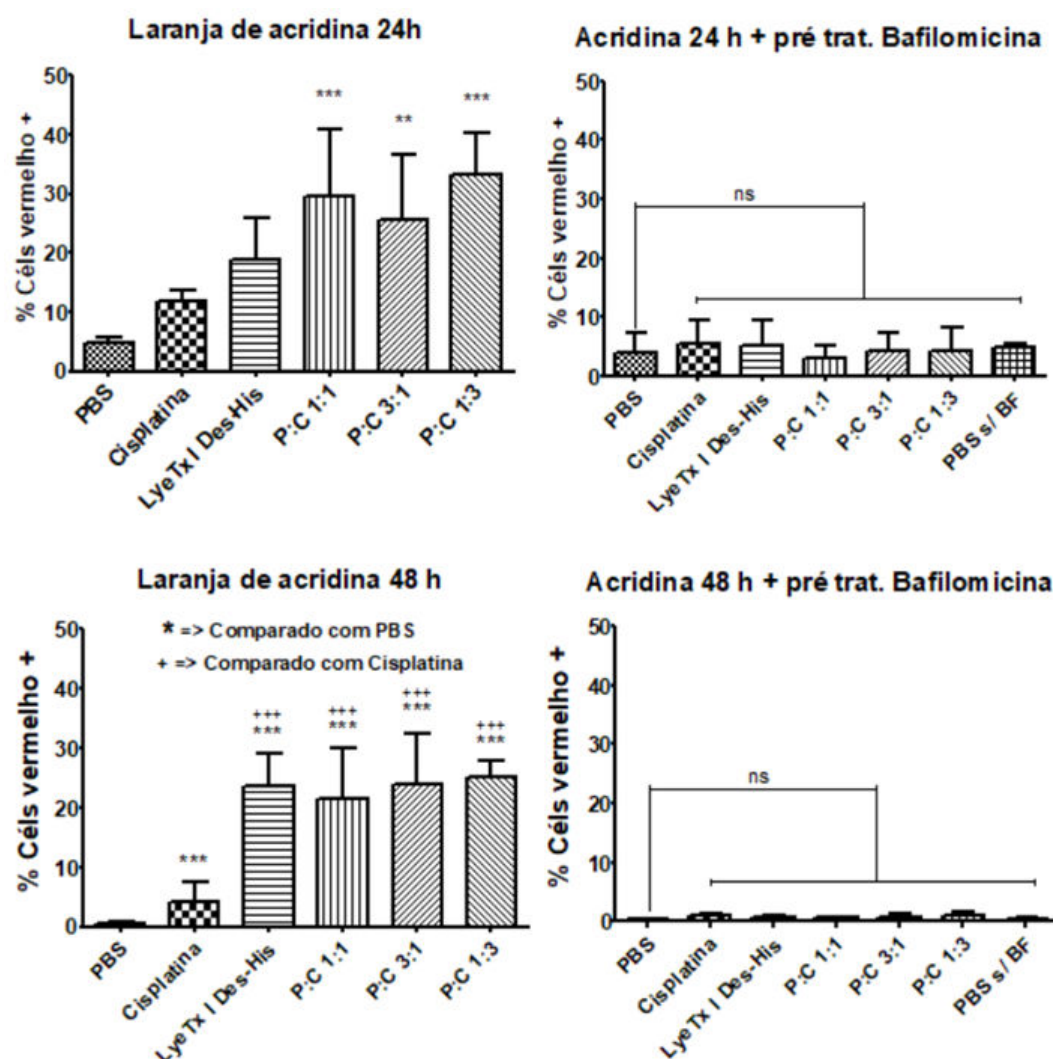


Figura 80: Análise quantitativa de células MDA-MB-231 tratadas ou não com o peptídeo, cisplatina ou a associação de ambos (para todos os experimentos n=4 em duplicata cada). **a:** Média das porcentagens obtidas na quantificação da fluorescência vermelha para as condições assinaladas após 24 h e com as respectivas significâncias estatísticas assinaladas. **b:** Média das porcentagens obtidas na quantificação da fluorescência vermelha para as condições assinaladas para o experimento de 24 h pré tratado com o inibidor da V-ATPase Bafilomicina A1 e com as respectivas significâncias estatísticas assinaladas. **c:** Média das porcentagens obtidas na quantificação da fluorescência vermelha para as condições assinaladas após 48 h e com as respectivas significâncias estatísticas. **d:** Média das porcentagens obtidas na quantificação da fluorescência vermelha para as condições assinaladas para o experimento de 48 h pré tratado com o inibidor da V-ATPase Bafilomicina A1 e com as respectivas significâncias estatísticas, onde * ou + = p-valor $\leq 0,05$; ** ou ++ = p-valor $\leq 0,01$; *** ou +++ = p-valor $\leq 0,001$ e ns = não significativo.

10.7. AVALIAÇÃO DA VIA AKT1, ERK, P53 E P21 EM CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS COM LYETX I DES-HIS, CISPLATINA E COM A ASSOCIAÇÃO DE AMBOS OS COMPOSTOS.

As análises de quatro western blots, revelaram que após 24 h houve redução na fosforilação de AKT1 para os grupos LyeTx I Des-His e para todas as três combinações de cisplatina e LyeTx I Des-His, visto que houve uma redução na razão AKT1 fosforilada pela AKT1 total (soma de AKT1 fosforilada com AKT1 não fosforilada). A figura 81a apresenta um dos “western blots” representativos gerados, bem como as quantificações com os respectivos resultados (teste ANOVA) representados conforme discriminado na figura 81b.

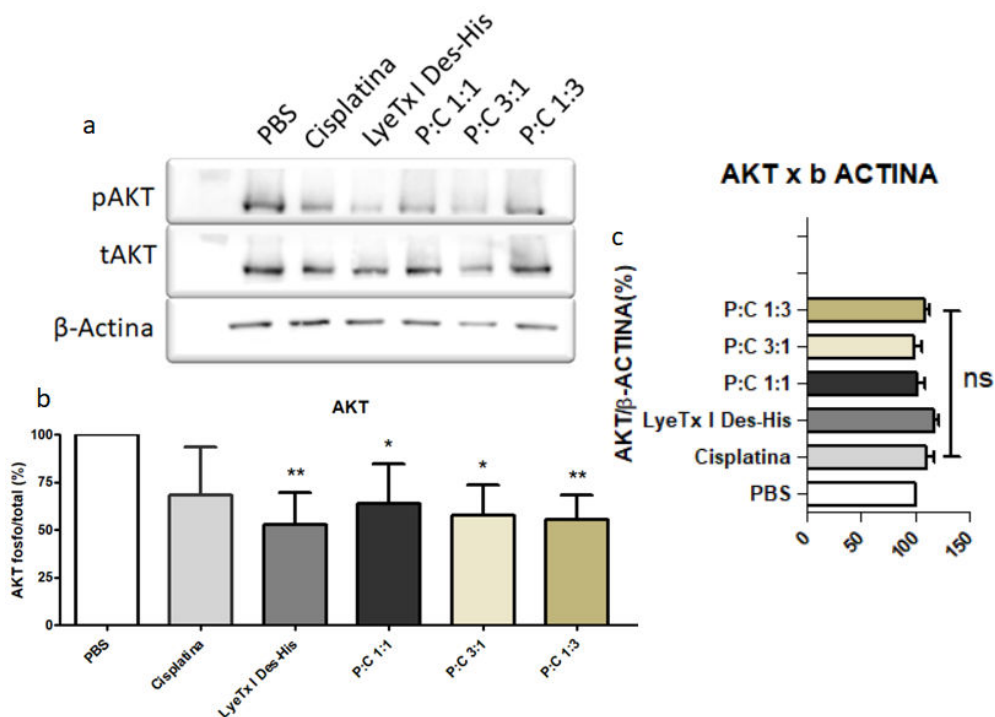


Figura 81: Análise da fosforilação de AKT1 por *western blot*, em células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo, cisplatina e nas diferentes combinações, como indicado. As concentrações utilizadas para cada composto foram as dos IC₅₀s correspondentes, obedecendo-se as proporções indicadas. **a:** figura representativa dos efeitos observados sobre a fosforilação de AKT1 após 24 h de tratamento indicados na parte superior da figura. **b:** Quantificação densitométrica das bandas dos *western blots* (n=4), onde * = p-valor ≤ 0,05 e ** = p-valor ≤ 0,01 **c:** Teste estatístico entre a proteína AKT1 e β-actina, mostrando não haver diferença entre os grupos, logo a quantidade de proteína total nas amostras é a mesma.

Para a proteína ERK houve redução na fosforilação, pela análise da razão ERK fosforilada e ERK total (ERK fosforilada + ERK não fosforilada) apenas para o tratamento com LyeTx I Des-His, sendo que os outros grupos tiveram fosforilação similar ao controle (PBS). A figura 82a apresenta um dos *western blots* gerados, bem como as quantificações por densitometria, com os respectivos resultados (teste ANOVA) representados conforme discriminado na figura 82b.

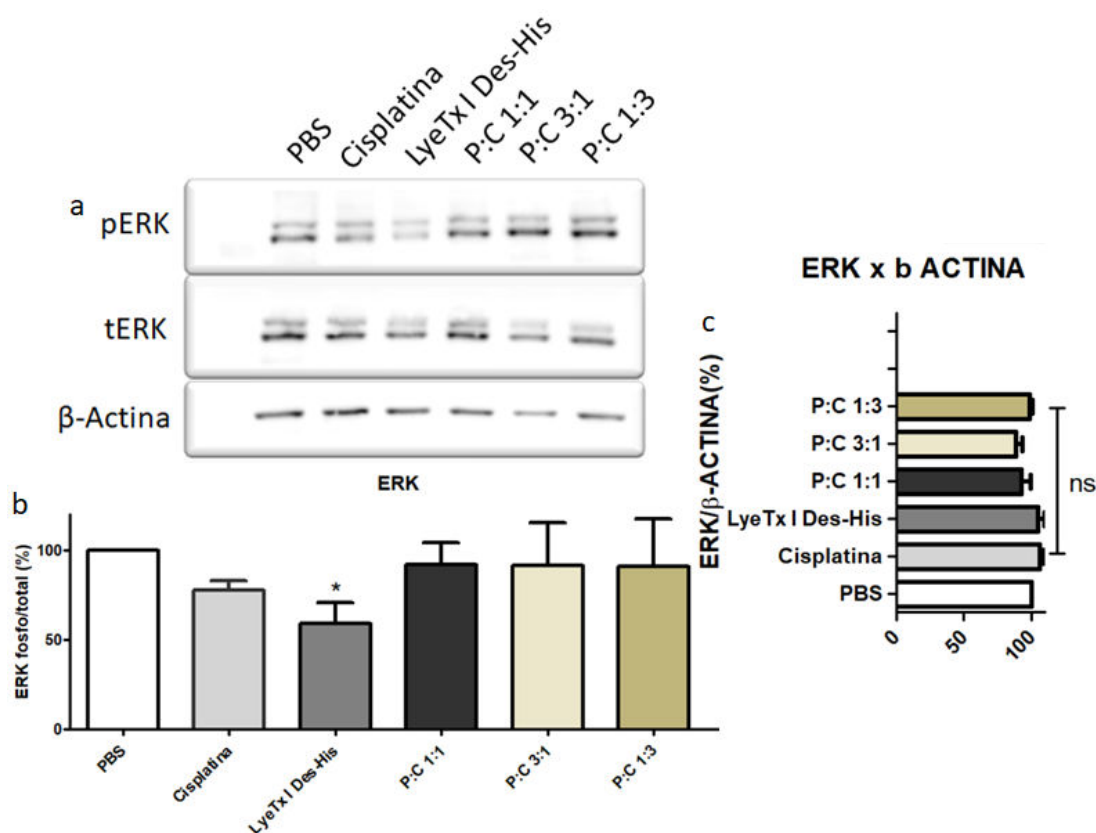


Figura 82: Análise da fosforilação de ERK por *western blot*, em células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo, cisplatina e nas diferentes combinações, como indicado. As concentrações utilizadas para cada composto foram as dos IC₅₀s correspondentes, obedecendo-se as proporções indicadas **a**: figura representativa dos efeitos dos tratamentos sobre a fosforilação de ERK, após 24 h de tratamento indicados na parte superior da figura. **b**: Quantificações densitométricas das bandas dos *western blots* (n=4), onde * = p-valor ≤ 0,05. **c**: Teste estatístico entre a proteína ERK e β-actina, mostrando não haver diferença entre os grupos, logo a quantidade de proteína total nas amostras é a mesma.

Já a proteína P53 apresentou aumento em sua expressão para o tratamento com cisplatina (mais de 3 vezes) bem como aumento da expressão para a combinação P:C 1:3 (cerca de 1,5 vezes). Os outros grupos foram semelhantes ao controle com relação à expressão desta proteína. A figura 83b apresenta com detalhes os resultados (análise do teste estatístico, ANOVA).

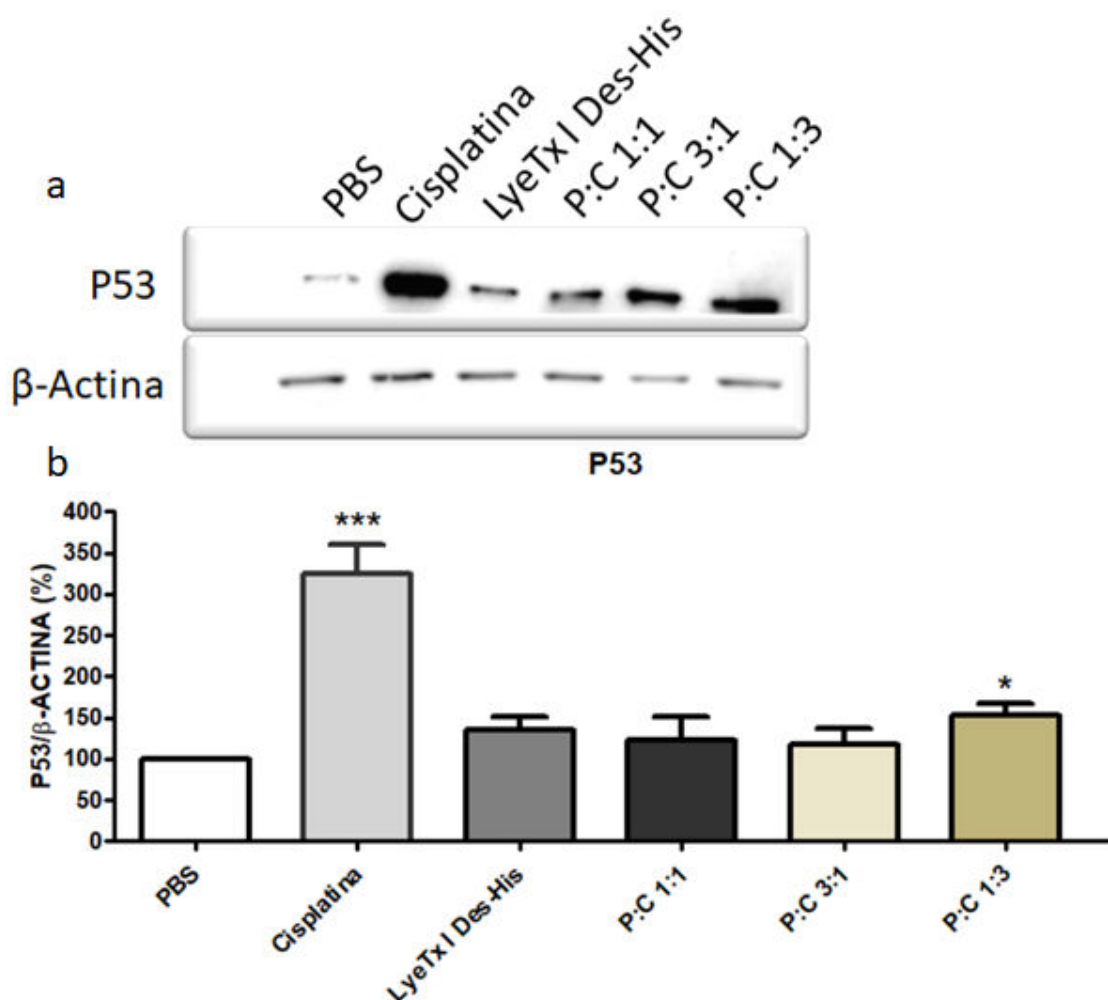


Figura 83: Análise da expressão de P53 por *western blot*, em células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo, cisplatina e nas diferentes combinações, como indicado. As concentrações utilizadas para cada composto foram as dos IC₅₀s correspondentes, obedecendo-se as proporções indicadas **a**: figura representativa de um dos *western blots* mostrando os efeitos dos compostos sobre a expressão de P53, após 24 h de tratamento indicados na parte superior da figura. **b**: Quantificações densitométricas das bandas dos *western blots* (n=4), onde * = p-valor ≤ 0,05 e *** = p-valor ≤ 0,001.

Por fim a análise da expressão da proteína P21 revelou que, exceto um dos grupos de combinação entre os compostos testados (P:C 1:3), todos os outros grupos tiveram diminuição na expressão dessa proteína. A figura 84 apresenta esta quantificação com o resultado do teste estatístico bem como uma das fotos de um dos *western blots*.

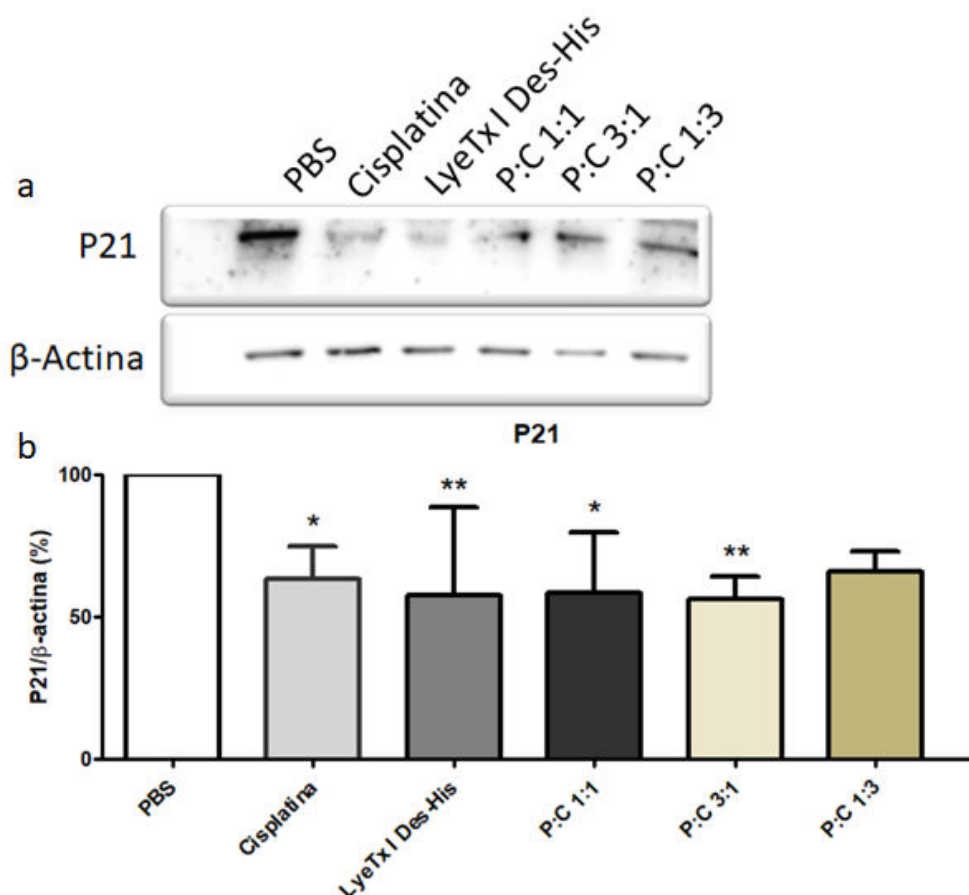


Figura 84: Análise da expressão de P21 por *western blot*, em células MDA-MB-231 tratadas com o peptídeo, cisplatina e nas diferentes combinações, como indicado. As concentrações utilizadas para cada composto foram as dos IC₅₀s correspondentes, obedecendo-se as proporções indicadas **a:** figura representativa de um dos *western blots* mostrando a expressão de P21 após 24 h de tratamento, como indicado na parte superior da figura. **b:** Quantificações densitométricas das bandas dos *western blots* (n=4), onde * = p-valor ≤ 0,05 e ** = p-valor ≤ 0,01.

11. DISCUSSÃO CAPÍTULO II

Abdel-Salam (2018) em trabalho prévio, demonstrou que o peptídeo LyeTx I Des-His apresenta citotoxicidade para células MDA-MB-231. No presente trabalho foi proposto o estudo da ação deste peptídeo, bem como de sua combinação com o fármaco cisplatina nestas mesmas células, visando-se avaliar o efeito de tais tratamentos na viabilidade destas células e também pesquisar algumas vias que possam estar envolvidas na ação destes compostos. Cisplatina é um fármaco utilizado no tratamento de câncer do trato biliar (Valle *et al*, 2014) e de endométrio (Fleming *et al*, 2004), por exemplo. Além disso, embora não seja o fármaco mais usual, cisplatina também é utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer de mama (Silver *et al*, 2010).

O peptídeo LyeTx I Des-His e cisplatina foram testados, inicialmente em separado, contra células de linhagem MDA-MB-231 - modelo de células de câncer de mama triplo-negativo e em HEK-293 - modelo de células não tumorais. As IC_{50} s encontradas (tabela 27) evidenciam que o peptídeo possui índice de seletividade (razão $IC_{50_{HEK}}/IC_{50_{MDA}}$) superior ao da Cisplatina, onde o índice de seletividade (IS) de LyeTx I Des-His foi de 3,19 e IS da Cisplatina foi de 0,041. LyeTx I Des-His mostrou-se 77 vezes mais seletivo que a Cisplatina e 38 vezes mais potente ao se comparar seus respectivos índices e razões de atividades anticâncer. Portanto o peptídeo mostrou-se menos citotóxico para células HEK-293 e mais citotóxico para MDA-MB-231 em comparação à Cisplatina.

Tabela 27: Relação dos IC₅₀s e índices de seletividade, obtidos para os compostos estudados contra as células MDA-MB-231 e HEK-293

Composto testado	IC ₅₀ para MDA-MB-231	IC ₅₀ para HEK-293	Índice de seletividade (IS)
LyeTx I Des-His	2,47 µM	7,88 µM	3,19
Cisplatina	94,69 µM	3,96 µM	0,041

Como o câncer é uma patologia que pode desenvolver resistência aos fármacos (Holohan et al, 2013), sendo o câncer de mama responsável por 15% das mortes de mulheres por essa patologia (Bray et al, 2018), é de grande importância o uso de terapias combinadas, que atuem em vias de citotoxicidade distintas, a fim de que, populações celulares não responsivas a determinado tratamento, se tornem susceptíveis a novas estratégias terapêuticas (Palmer & Sorger, 2017).

A combinação Cisplatina e LyeTx I Des-His parece atender bem a esse critério, visto que Cisplatina atua no DNA (Fuertes *et al*, 2003; Lind, 2007) enquanto que, LyeTx I Des-His, pelo que sabemos de nossos estudos até o presente, atua na membrana plasmática (Reis *et al*, 2018; Abdel-Salam, 2018; Abdel-Salam *et al*, 2019). Portanto, foram realizados ensaios com diluições de LyeTx I Des-His na presença de diferentes concentrações de cisplatina, contra células de câncer linhagem MDA-MB-231. Esta análise procurou validar a hipótese de que haveria um aumento da atividade citotóxica sobre estas células, ao combinar-se os dois compostos. Contudo, além de se observar o aumento da atividade citotóxica, é importante avaliar se tal aumento dá-se por um efeito aditivo ou sinérgico, o que poderia nos levar a inferir se vias iguais ou diferentes estariam envolvidas no mecanismo destes fármacos.

Com a finalidade de avaliar o tipo de atividade observada após a associação entre a cisplatina e o peptídeo, os dados obtidos foram submetidos a análise isobolográfica. Três proporções dos compostos LyeTx I Des-His e Cisplatina, foram testadas, a saber: 1:1; 3:1 e 1:3; contra as linhagens MDA-MB-231 e HEK-293. Um

princípio aplicado nessa situação estabelece que, quando dois fármacos são combinados, eles podem ser tratados na prática, como um único fármaco. A análise isobolográfica gerada dos tratamentos de MDA-MB-231 revelou que, somente na razão 1:1 (1,98 μ M de Cisplatina e 1,98 μ M de LyeTx I Des-His) houve efeito sinérgico destes compostos, o que mostra um ganho de atividade comparado à Cisplatina isolada (94,69 μ M). Contudo, a análise isobolográfica de HEK-293 mostrou que em todas as proporções utilizadas para estes fármacos, houve efeito sinérgico.

Embora todas as proporções LyeTx I Des-His e cisplatina tenham apresentado sinergismo no modelo de célula não tumoral testado (HEK-293) quando o índice seletividade (IS) foi calculado, considerando-se as proporções (razão $IC_{50_{HEK}}/IC_{50_{MDA}}$), observaram-se os seguintes valores de: 0,67 para a proporção 1:1 (LyeTx I Des-His:Cisplatina); 0,85 para 3:1 (LyeTx I Des-His:Cisplatina) e 0,37 para a 1:3 (LyeTx I Des-His:Cisplatina), comparado ao IS da cisplatina, de 0,041. Com isso observa-se que as proporções 1:1 e 3:1 são as mais efetivas, especialmente quando comparados com o valor de IS da cisplatina, isoladamente. Também é importante ressaltar que, essas proporções combinadas, de índices de seletividade maiores, parecem ser mais efetivas contra células MDA-MB-231, usa-se uma concentração menor de cisplatina, comparado ao que se observa em uma monoterapia, à base somente desse tratamento. A IC_{50} para proporção 1:1 (LyeTx I Des-His:Cisplatina) foi obtido com 1,98 μ M de cisplatina e a IC_{50} para a 3:1 (LyeTx I Des-His:Cisplatina) foi com 0,84 μ M de cisplatina. Estes são valores muito menores que o IC_{50} normal de 94,69 μ M para este fármaco, uma ordem de 47 a 112 vezes menor de concentração de cisplatina. Neste sentido, é de se esperar que os efeitos colaterais decorrentes do uso deste fármaco, poderiam ser minimizados ao se optar por uma combinação com o peptídeo, o que certamente resta ainda a ser comprovado. Possíveis efeitos colaterais do peptídeo

também ainda não foram estudados com profundidade, mas resultados de outros trabalhos de nosso Laboratório, indicam que nessas doses, o peptídeo não mostra toxicidade aparente quando injetado em camundongos (Abdel-Salam, 2019 – resultados não publicados),

Estudos de avaliação do ciclo celular após 24 h de tratamento com cada uma das preparações -no seus respectivos IC₅₀s- demonstraram que houve uma pequena redução da fase G0/G1 para quase todos os tratamentos, exceto para LyeTx I Des-His, bem como houve um aumento significativo da fase subdiploide (sub-2n) para o tratamento com cisplatina. Este aumento da fase sub-2n para cisplatina é uma evidência de fragmentação de DNA (Nicoletti *et al*, 1991; Ojeda *et al*, 1992), um indicativo de morte por apoptose, onde o DNA é clivado por nucleases (Hua & Xu, 2000), o que corrobora com mecanismos de morte por apoptose pela cisplatina (Fuertes *et al*, 2003) já descrito para linhagens de câncer de mama, tratadas com Cisplatina (Al-taweel *et al*, 2014).

Após 48 h de tratamento a cisplatina, bem como as combinações dos dois compostos (P:C), induziram a redução da população celular na fase G0/G1. As combinações P:C 1:1 e 1:3 induziram grande aumento na porcentagem de células na fase G2/M. Este aumento de G2/M é conhecido como uma parada nesta fase do ciclo, sendo um indício de morte celular autofágica (Dotiwala *et al*, 2012; Mathiassen *et al*, 2017; Azzopardi *et al*, 2017).

Existem diferentes mecanismos de morte tais como: apoptose, necroptose, necrose (figura 85), piroptose, morte celular NETótica e morte celular autofágica (Galluzzi *et al*, 2018). Estes mecanismos de morte podem ser caracterizados morfolologicamente, enzimaticamente e de forma funcional (Galluzzi *et al*, 2018). Na morte celular autofágica suas características incluem a formação de autofagossomos que "engolfam" organelas citoplasmáticas digerindo-as, processo que é bem distinguido de

outros fagossomos pela presença de duas membranas (Kroemer *et al*, 2009), ausência de condensação de cromatina bem como baixa ação de fagócitos *in vivo* (Kroemer *et al*, 2009). Algumas moléculas envolvidas são as ULK1 e ULK2, ATG (Parzych & Klionsky, 2014) Frequentemente morte celular autofágica está também ligada a paradas de ciclo celular em G2/M (Azzopardi *et al*, 2017). Além de ser um mecanismo de morte, a autofagia pode ainda acelerar outros mecanismos envolvidos em paralelo (apoptose p. ex.) ao degradar proteínas antiapoptóticas ou envolvidas em reparo de DNA (Robert *et al*, 2011; Azzopardi *et al*, 2017; Denton & Kumar, 2019).

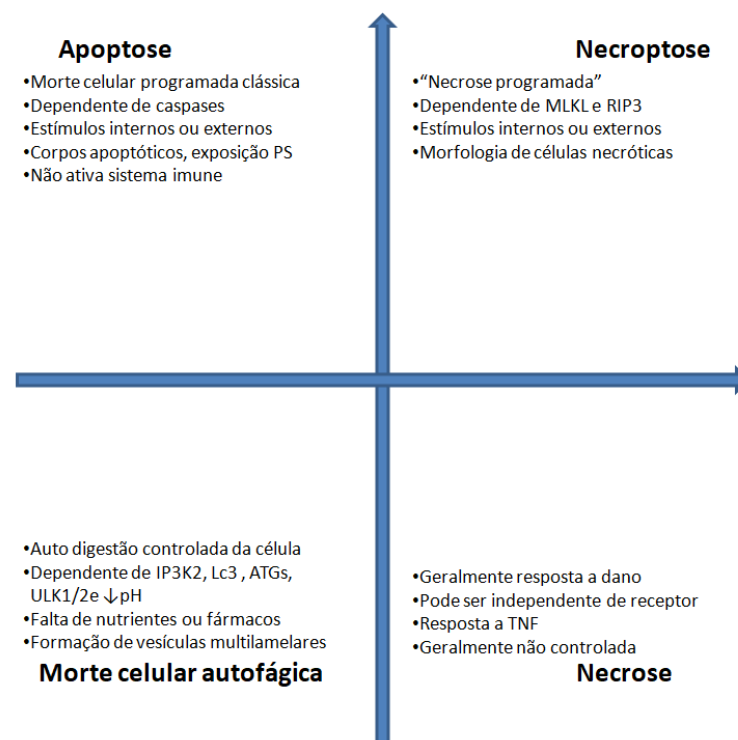


Figura 85: Exemplos dos quatro mecanismos de morte de maior relevância nos estudos padrão de morte celular (Figura montada pelo próprio autor).

A análise do ciclo celular das células tratadas com os respectivos compostos combinados, sugeriu morte celular por autofagia, visto que houve uma parada do ciclo em G2/M, o que tem sido associado à morte por autofagia (Capparelli *et al*, 2012; Dotiwala *et al*, 2012; Mathiassen *et al*, 2017; Azzopardi *et al*, 2017). Utilizando-se a

coloração laranja de acridina, verificou-se que, após 24 h de tratamento das células com tais combinações, houve aumento da fluorescência vermelha, sendo este aumento estatisticamente significativo quando comparado ao controle (somente PBS, ausência dos compostos). O aumento de quantidade de células marcadas positivamente em vermelho (indício de células nas quais o corante sofreu metacromasia do verde para o vermelho devido a redução de pH dos vacúolos autofagossomais) - submetidas aos tratamentos nas combinações 1:1; 3:1 e 1:3 foi de 6; 5,2 e 6,8 vezes, respectivamente, comparado ao controle (PBS). Efeito significativamente maior também foi observado para o tempo de 48 h onde observaram-se aumentos de células vermelho-positivas de 42,8; 48 e 50,2 vezes para os grupos 1:1; 3:1 e 1:3; respectivamente, bem como para os tratamentos individuais com LyeTx I Des-His e cisplatina, que foram 47,2 e 8,34 vezes, respectivamente, sugerindo o envolvimento de morte por autofagia (Nagelkerke *et al*, 2015; Klionsky *et al*, 2016; Galluzzi *et al*, 2018; Honorato *et al*, 2019).

Estes achados foram corroborados pelo pré-tratamento das células com o inibidor de autofagia, Bafilomicina A1, inibidor da V-ATPase envolvida na acidificação dos autofagolisossomos. Com o uso deste inibidor mostrou-se que a quantidade de células com vacúolos vermelhos positivos reduziu-se a níveis semelhantes ao do controle (tratamento com PBS somente) tanto nos tempos de 24, como de 48 h. Estes dados sugerem que o aumento da intensidade vermelha deve estar relacionado com a formação de vacúolos dos autofagolisossomos ativos, pela redução de pH (Yamamoto *et al*, 1988; Vinod *et al*, 2014). Vários estudos têm mostrado que eventos de autofagia exibem este padrão de compostos com fluorescência - pH dependente, que mudam de cor na presença de estimuladores de autofagia, sendo tais efeitos revertidos após administração do inibidor Bafilomicina A1 (Shacka *et al*, 2006; Wilson, *et al*, 2011; Klionsky *et al*, 2016; Thome *et al*, 2016)

Além destes achados os dados de *western blot* demonstraram um perfil de proteínas AKT1 fosforilada e P21 expressa que sofreram redução de suas respectivas fosforilações e expressões (figuras 81 e 84). A diminuição da fosforilação de AKT já foi descrita como relacionada com eventos de autofagia (Cao *et al*, 2014; Shao *et al*, 2016), visto que AKT (também conhecida como proteína cinase B - PKB) é uma proteína envolvida na sinalização estimulatória do metabolismo celular (em resposta a disponibilidade de nutrientes p. ex.), supressão de eventos de morte -pela inativação de BAD, Agonista de morte celular associado a BCL2 (Lodish *et al*, 2000) - e inibição da autofagia (Palmieri *et al*, 2017), através da fosforilação do fator TFEB (Fator de transcrição EB) que nessa forma é inativo e não estimula genes autofágicos (Settembre *et al*, 2013).

P21 é uma proteína supressora de tumores e, uma de suas funções, é a de separar os diferentes complexos ciclina/cinase dependente de ciclina (Cy/CDK) - figura 86, ligando-se à cinase dependente de ciclina para executar esta função, atuando em resposta a determinados estímulos como lesão de DNA ou pontos de controle do ciclo celular (Harper *et al*, 1993; Abbas & Dutta, 2010). Neste estudo, a diminuição de expressão de P21 nos grupos tratados com Cisplatina, LyeTx I Des-His e combinações 1:1 e 3:1 vão de encontro com a parada do ciclo celular em G2/M. Neste caso, apesar dos danos causados pelos tratamentos, as células passaram pelos *checkpoints* determinados pelos complexos CyE/CDK2 e CyA/CDK2 (Morgan, 1997) pois eles não foram inativados pela ação supressora da P21, um inibidor universal de ciclinas como descrito por Xiong *et al*, 1993. Contudo, as células que conseguiram passar pelas fases G0/G1, S não conseguiram progredir na fase G2/M possivelmente por uma inibição do complexo CyB/CDK1 por uma via independente de P21, que está diminuída como observado.

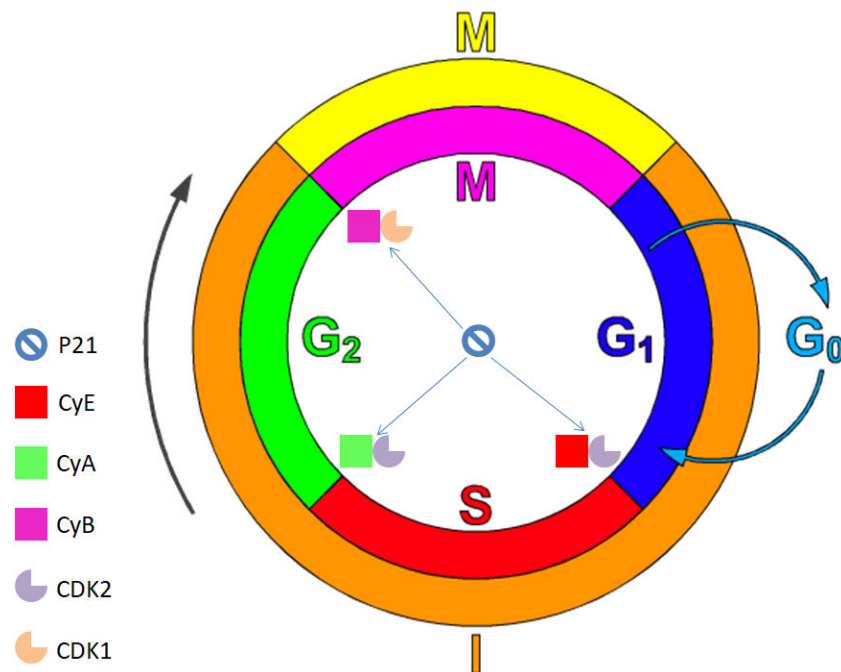


Figura 86: Algumas proteínas envolvidas nos *checkpoints* de diferentes fases do ciclo celular. CyE é a ciclina E, CyA é a ciclina A, CyB é a ciclina B CDK2 é a cinase dependente de ciclina 2 e CDK1 é a cinase dependente de ciclina 1. Está indicado também pelas setas as atividades de P21 atuando por fosforilação do complexo "ciclina- cinase dependente de ciclina", separando-o e assim desativando-o. (Figura feita pelo autor)

Possivelmente as paradas do ciclo celular em G2/M ocorreram pelo recrutamento da proteína P14^{ARF}, pois segundo Hemmati e colaboradores (2008) esta proteína pode induzir paradas em G2/M independente de P53 e P21. P14^{ARF} é produto do gene CDKN2A, o gene que codifica a proteína P16, onde ambos são codificados em diferentes janelas de leitura (Sherr, 2006). A proteína P14^{ARF} possui diversas atividades tais como: SUMO transferase, liga-se a P53, ao DNA e a proteínas da família MDM2 e 4 (Uniprot id Q8N726, 2019).

A proteína P53 é uma proteína envolvida em paradas do ciclo celular para possibilitar o reparo do DNA em diferentes fases (Pellegata *et al*, 1996; Agarwal *et al*, 1998). Neste estudo, somente os tratamentos com cisplatina e com a combinação (LyeTx I Des-His:Cisplatina) 1:3 apresentaram aumento na expressão dessa proteína

comparado ao controle. O dado de cisplatina corrobora o observado no experimento do ciclo celular onde se observou aumento significativo da população na fase S, o que vai ao encontro com o mecanismo de ação da cisplatina de dano ao DNA (Wang & Lippard, 2005; Lind, 2007). Contudo, este padrão não foi observado para o tratamento com LyeTx I Des-His, bem como para as combinações 1:1 e 3:1 de LyeTx I Des-His e cisplatina. Isto sugere que, em tratamentos na ausência de cisplatina ou com pequenas concentrações da mesma, P53 não parece ser uma proteína envolvida. Como as proporções 1:1 e 3:1 (peptídeo:cisplatina) são as mais eficientes, no caso de nossos experimentos, isso sugere a possibilidade do uso destas combinações de forma eficaz, em cânceres com mutações em P53, uma mutação frequente em células de câncer (Zifou & Lowe, 2009).

A proteína ERK não se mostrou alterada, indicando que esta via de sinalização não parece ter uma contribuição significativa em resposta aos tratamentos realizados nas células MDA-MB-231. Esta observação corrobora nossos achados sugerindo a morte celular induzida por autofagia, e não a um evento de autofagia como mecanismo de defesa, que envolveria aumento na fosforilação de ERK (Nagelkerke *et al* 2015).

É interessante observar que, nas células MDA-MB-231, o peptídeo LyeTx I Des-His, bem como suas combinações com cisplatina, podem induzir citotoxicidade por autofagia, diferente do observado no trabalho de Abdel-Salam *et al* (2019). Estes autores estudaram a citotoxicidade deste peptídeo em células de glioma humano U87-MG e não observaram formação de fluorescência vermelha como indício de morte celular autofágica nesta linhagem. Eles demonstraram evidências de morte celular por necroptose. Estes dados mostram que há diferenças nos mecanismos de morte por este peptídeo, que é dependente do tipo de linhagem celular.

II – Resumo dos resultados

LyeTx I-Des-His e cisplatina possuem IC_{50} s cerca de 39 vezes diferentes um do outro contra células MDA-MB-231, com valores de 2,47 μ M e 94,69 μ M, e contra células HEK-293 (modelo não tumoral) de 7,88 μ M e 3,96 μ M, respectivamente.

As combinações de LyeTx I-Des-His e Cisplatina em proporções 1:1 e 3:1 apresentaram bons índices terapêuticos, sendo que a proporção de 1:1 apresentou efeito sinérgico contra as células MDA-MB-231, como observado pela análise isobolográfica.

Os dados sugerem fortemente que o mecanismo de ação, sobre as células MDA-MB-231, do peptídeo e das combinações se dá por morte celular autofágica, contrastando com o observado em células U-87.

O evento de autofagia parece ser independente da proteína P21, comumente associada em paradas em G2/M.

A proteína P53 parece não estar envolvida nos tratamentos envolvendo a combinação P:C.

12. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO II

Nossos resultados sugerem que a combinação de LyeTx I-Des-His e Cisplatina é mais eficaz do que cada um dos tratamentos individuais, sendo os índices de seletividade das combinações P:C bastante superiores ao da Cisplatina isoladamente. Espera-se que tais combinações possam, após outros estudos, se tornarem alternativas, mais eficazes e menos tóxicas, para o tratamento de cânceres do tipo triplo negativo.

13. REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities Tarek. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2010.
- ABDEL-SALAM, M. A. L. et al. 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, 2019.
- ABDEL-SALAM, MOSTAFA ABDELLATIF. Avaliação do peptídeo sintético LyeTx I-b derivado do veneno de aranha como um potencial protótipo antitumoral: estudos toxicológicos e farmacológicos. 2018. 156 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- ADLER, M. J.; DIMITROV, D. S. Therapeutic antibodies against cancer. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 26, n. 3, p. 447–481, 2013.
- AGARWAL, M. L. et al. A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14775–14780, 1998.
- AL-TAWEEL, N. et al. Cisplatin (CDDP) triggers cell death of MCF-7 cells following disruption of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) homeostasis. **J. Toxicol. Sci**, v. 39, n. 5, p. 765–774, 2014.
- AMPHIBIAWEB Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/>> acessado em 10 mai 2019
- ANASTASI, A.; ERSPAMER, F. Occurrence of phyllomedusin, a physalaemin-like decapeptide, in the skin of *Phyllomedusa bicolor*. **Experientia**, v. 26, n. 8, p. 866–867, 1970.
- ANDERS, C. K. et al. The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer : From Biology to Novel Therapeutics. **Am Soc Clin Oncol Educ Book.**, p. 34–42, 2016.
- Aniszewski, T. Alkaloids - Secrets of Life. **Elsevier Science**. p. 1-2, 2007.
- APD Disponível em <<http://aps.unmc.edu/AP/>> acesso em 03 mai 2019.
- AZEVEDO CALDERON, L. DE et al. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 29–49, 2011.

AZEVEDO CALDERON, L. DE et al. Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 29–49, 2011.

AZZOPARDI, M.; FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Cell-cycle involvement in autophagy and apoptosis in yeast. **Mech. Ageing Dev.**, v. 161, p. 211–224, 2017.

AZZOPARDI, M.; FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Cell-cycle involvement in autophagy and apoptosis in yeast. **Mech. Ageing Dev.**, v. 161, p. 211–224, 2017.

BADIO, B.; DALY, J. W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 563–569, 1994.

BADIO, B.; DALY, J. W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 563–569, 1994.

BATISTA, C. V. F. et al. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog Phyllomedusa distincta. **FEBS Letters**, v. 494, n. 1–2, p. 85–89, 2001.

BATISTA, C. V. F. et al. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog Phyllomedusa distincta. **Peptides**, v. 20, n. 6, p. 679–686, 1999.

BAUER, K. R. et al. Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER) - and HER2-Negative Invasive Breast Cancer , the. **Cancer**, v. 109, n. 9, p. 1721–1728, 2007.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual review of biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 395–414, 1990.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual review of biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 395–414, 1990.

BILUSICH, D. et al. The host-defence skin peptide profiles of Peron ' s Tree Frog Litoria peronii in winter and summer . Sequence determination by electrospray mass spectrometry and activities of the peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 23, n. iii, p. 2628–2636, 2009.

BLANCO-MÍGUEZ, A. et al. From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. **Protein Science**, v. 25, p. 1084–1095, 2016.

BOWERSOX, S. S.; LUTHER, R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of Conus magus. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1651–1658, 1998.

BOWMAN, E. J.; SIEBERST, A.; ALTENDORFT, K. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms , animal cells , and plant cells. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, v. 85, n. November, p. 7972–7976, 1988.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAND, G. D. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2137–2146, 2006.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332–49340, 2002.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332–49340, 2002.

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45848, 2012.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BREASTCANCER.ORG Choosing a Chemotherapy Combination. Disponível em: <https://www.breastcancer.org/treatment/chemotherapy/your_chemo_combo> acessado em 25 mar 2020

CALMETTE, A. The Treatment of Animals Poisoned with Snake Venom by the Injection of Antivenomous Serum. **Br Med J**, v. 2, p. 399–400, 1896.

CAO, B. et al. Clioquinol induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by disrupting the mTOR signaling pathway. **Sci. Rep.**, v. 4, n. Mm, p. 8–10, 2014.

CAPPARELLI, C; et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, „fueling” tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo angiogenesis. **Cell Cycle** 11:3599–3610, 2012.

CARTRON, P. et al. Metaxins 1 and 2, two proteins of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery, are essential for Bak activation during TNF alpha triggered apoptosis. **Cellular Signalling**, 2014.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124–141, 2007.

CHAKRABARTI A., GANAPATHI T.R., MUKHERJEE P.K., BAPAT V. MSI-99 , a magainin analogue , imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 587–596, 2003.

CHAN, T. K. et al. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. **Toxicon**, v. 13, n. 1, p. 61–66, 1975.

CHILTON, W. S.; BIGWOOD, J.; JENSEN, R. E. Psilocin , Bufotenine and Serotonin : Historical and Biosynthetic Observations. **J. Psychedelic Drugs**, v. 11, p. 61–69, 1979.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. M27-A2, republicado pela ANVISA, 2001

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. (2013). M100-S23, 2013

CONCIN, N. et al. Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines. **Int J Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 51-57, 2003.

CONLON, J. M. et al. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog , *Ascaphus truei*. **Gen Comp Endocrinol.**, v. 143, n. 2, p. 193–199, 2005.

COSTA, TÚLIO DE ORLEANS GADELHA. Purificação e Determinação Estrutural de Substâncias Bioativas em Três Espécies de *Osteocephalus* (Amphibia:Anura:Hylidae) 2005 201p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005

DALY, J. W. et al. Batrachotoxin. The active principle of the Colombian arrow poison frog, *Phylllobates bicolor*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 1, p. 124–126, 1965.

DALY, J. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 10, p. 1556–1575, 2005.

De Lima, M. E. et al. Animal toxins: State of the art perspectives in health and biotechnology. Vol. 2. 2009. pp. 291–312.

DE LIMA, M. E. et al. Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1084–1091, 2010.

- DE SOUSA, L. Q. et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 127, 2017.
- DE SOUSA, L. Q. et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 127, 2017.
- DENTON, D.; KUMAR, S. Autophagy-dependent cell death. **Cell Death Differ**, v. 26, p. 605–616, 2019.
- DIAS-LOPES, C. et al. Venomous Arachnid Diagnostic Assays, Lessons from Past Attempts. **Toxins**, v. 10, n. 365, p. 1–26, 2018.
- DIMBERU, P. M.; LEONHARDT, R. M. cancer immunotherapy takes a Multi-Faceted Gear. **Yale J Biol Med.**, v. 84, p. 371–380, 2011.
- DONATO, N. DI et al. Identification and characterisation of a novel constitutional PIK3CA mutation in a child lacking the typical segmental overgrowth of “PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum” (PROS). **Hum Mutat**, v. 37, n. 3, p. 242–245, 2017.
- DOTIWALA, F. et al. DNA damage checkpoint triggers autophagy to regulate the initiation of anaphase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 110, n. 1, p. E41–E49, 2012.
- DRUGS.COM Find Drugs & Conditions. Disponível em: <<https://www.drugs.com/>> acessado em 05 fev 2020
- DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4104, n. 1, p. 1–109, 2016.
- EARLY, S. L.; MICHAELIS, E. K. Presence of proteins and glutamate as major constituents of the venom of the spider *Araneus gemma*. **Toxicon**, v. 25, n. 4, p. 433–442, 1987.
- EDGECOMBE, G. D. Arthropod Structure & Development Arthropod phylogeny : An overview from the perspectives of morphology , molecular data and the fossil record. **Arthropod Structure and Development**, v. 39, n. 2–3, p. 74–87, 2010.
- EDITORIAL NATURE NANOTECHNOLOGY. The dose makes the poison. **Nat. Nanotechnol.**, v. 6, n. June, p. 329, 2011.
- ERSPAMER, V. BERTACCINI, G. CEI, J. M. Occurrence of Bradykinin-Like Substances in the Amphibian Skin. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 563–564, 1962.

- ERSPAMER, V. BERTACCINI, G. CEI, J. M. Occurrence of Bradykinin-Like Substances in the Amphibian Skin. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 563–564, 1962.
- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, p. 893–907, 2000.
- FERRONI SCHWARTZ, E. N. et al. Indirect cardiotoxic activity of the caecilian *Siphonops paulensis* (Gymnophiona, Amphibia) skin secretion. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 47–54, 1999.
- FILCH, R. W. et al. Phantasniidine: An Epibatidine Congener from the Ecuadorian Poison Frog *Epipedobates antliwiyi*. **J Nat Prod**, n. 812, p. 331–337, 2010.
- FLEMING, G. F. et al. Phase III Trial of Doxorubicin Plus Cisplatin With or Without Paclitaxel Plus Filgrastim in Advanced Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 11, p. 2159–2166, 2004.
- Freitas A.C.N ; PACHECO, D. F. ; Duarte I.D.G ; De Lima, M.E. . Uso do peptídeo PnTx-19 para tratamento de dor. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140102680, título: "Uso do peptídeo PnTx-19 para tratamento de dor" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 29/04/2014
- FREITAS, A. C. N. et al. The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. **Nitric Oxide**, 2017.
- FREW, R.; HAMILTON, M. G.; LUNDY, P. M. Identification of noradrenaline in venom from the funnel-web spider *Hololena curta*. **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 511–515, 1994.
- FUERTES, M. A. et al. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 257–266, 2003.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.
- GASIÓN, F. B. et al. Toxinologia Clínica. Lesiones Por Picaduras Y Mordeduras De Animales. **Editorial Bubok**. v. 1, p. 31-41, 2013.

- GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides . A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. October, p. 1–16, 2013.
- GOMES, A. et al. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 7, p. 579–593, 2007.
- GOMES, KAMILA DE SOUSA. Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares 2018. 118 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- GONÇALVES JR, H. et al. Survival Study of Triple-Negative and Non – Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort. **Clin Med Insights Oncol.**, v. 12, p. 1–10, 2018.
- GOODSELL, D. The Molecular Perspective : The ras Oncogene. **Oncologist**, v. 4, n. 3, p. 263–264, 1999.
- HAN, J.; BURGESS, K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 2709–2728, 2010.
- HARPER, J. W. et al. The p21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G 1 Cyclin-Dependent Kinases. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 805–816, 1993.
- HARRIS & BASHFORD. Spectrophotometry & Spectrofluorimetry a practical approach. **IRL Press**.1987
- HAYES, R. A. et al. Microbial biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1790–1792, 2009.
- HAYES, R. A. et al. Microbial biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1790–1792, 2009.
- HEMMATI, P. G. et al. Cooperative effect of p21Cip1/WAF–1 and 14-3-3 σ on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14ARF. **Oncogene**, v. 27, p. 6707–6719, 2008.
- HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance : an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.

HONORATO, J. R. et al. Role of Sonic hedgehog signaling in cell cycle , oxidative stress , and autophagy of temozolomide resistant glioblastoma. **J. Cell. Physiol.**, p. 1–17, 2019.

HORNBY, P. J. Central Neurocircuitry Associated with Emesis. **Am J Med**, v. 111, p. 106S–112S, 2001.

HUA, Z. J.; XU, M. REVIEW DNA fragmentation in apoptosis. **Cell Res.**, v. 10, p. 205–211, 2000.

Hugo Werner Huth. Impacto diferencial do peptídeo sintético LyeTx II, derivado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, sobre a proliferação das linhagens celulares agressiva (MDA-MB-231) e não agressiva (MCF-7) de câncer de mama: correlação com a ativação de vias de sinalização. **Dissertação de mestrado** da UFMG.

HUNTER, A. et al. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. **Peptides**, v. 28, n. 7, p. 1331–1343, 2007.

HUTH, HUGO WERNER. Impacto diferencial do peptídeo sintético LyeTx II, derivado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, sobre a proliferação das linhagens celulares agressiva (MDA-MB-231) e não agressiva (MCF-7) de câncer de mama. 2015
Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015

INCA (Instituto Nacional do Câncer) Tipos de câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>> acessado em 05 fev 2020

JACKWAY, R. J. et al. Skin peptide and cDNA profiling of Australian anurans: Genus and species identification and evolutionary trends. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 161–172, 2011.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 1–22, 2014.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856–3893, 2011.

LEE, C. -Y. Snake Venoms. **Springer Science & Business Media** v.1, p. 6, 2012

LEHMANN, J. et al. Antitumor Activity of the Antimicrobial Peptide Magainin II against Bladder Cancer Cell Lines. **Eur Urol.**, v. 50, n. 1, p. 141–147, 2006.

LEITE, J. R. S. A. et al. Phylloseptins: A novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565–573, 2005.

LIND, M. J. Principles of cytotoxic chemotherapy. **Medicine**, v. 36, n. 1, p. 19–23, 2007.

LIPSKY, B. A.; HOLROYD, K. J.; ZASLOFF, M. Topical versus Systemic Antimicrobial Therapy for Treating Mildly Infected Diabetic Foot Ulcers: A Randomized , Controlled , Double-Blinded , Multicenter Trial of Pexiganan Cream. **Clin Infect Dis**, v. 1597, p. 1537–1545, 2008.

LIU, C. et al. Genomic Organization of a New Candidate Tumor Suppressor Gene , LRP1B. **Genomics**, v. 274, p. 271–274, 2000.

LODISH, H. et al. Molecular Cell Biology 4th edition. Cap. 23. W. H. Freeman and Company, 2000. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21716/figure/A6902/> >

LORIN, C. et al. The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**, v. 334, n. 2, p. 264–275, 2005.

MATHIASSEN, S. G.; ZIO, D. DE; CECCONI, F. Autophagy and the Cell Cycle : A Complex Landscape. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. March, p. 1–16, 2017.

MATHIASSEN, S. G.; ZIO, D. DE; CECCONI, F. Autophagy and the Cell Cycle : A Complex Landscape. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. March, p. 1–16, 2017.

MELCHIORRI, P.; NEGRI, L. The dermorphin peptide family. **General Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1099–1107, 1996.

MENG, P. et al. The first salamander defensin antimicrobial peptide. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–6, 2013.

MOKHTARI, R. B. et al. Combination therapy in combating cancer Review. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017.

MOKHTARI, R. B.; HOMAYOUNI, T. S.; BALUCH, N. Combination therapy in combating cancer Review. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017.

MOORE, A. The big and small of drug discovery. **EMBO Rep**, v. 4, n. 2, p. 4–7, 2003.

MOR, A.; NICOLAS, P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. **Eur J Biochem**, v. 219, p. 501–509, 1994.

MORGAN, D. O. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, v. 13, p. 261–291, 1997.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURUGAN, S.; AMARAVADI, R. K. Methods for Studying Autophagy Within the Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol**, v. 1, p. 145–166, 2017.

NAGELKERKE, A. et al. Seminars in Cancer Biology Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways controlling autophagy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 89–98, 2015.

Nature Definition of peptide Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/definition/peptide-317>> acessado em 31 mai 2019.

NCI (National Cancer Institute) Identifying Novel Drug Combinations to Overcome Treatment Resistance Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/drug-combo-resistance>> acessado em: 04 ago 2019

NCI (National Cancer Institute) Types of cancer treatment. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>> acessado em: 10 ago 2019

NELSON, L. D.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5. ed.: W. H. Freeman, 2011.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271–279, 1991.

NUNES, K. P. et al. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1197–1206, 2008.

NUNES, K. P. et al. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1197–1206, 2008.

OJEDA, F. et al. A flow-cytometric method to study DNA fragmentation in lymphocytes. **J Immunol Methods**, v. 152, p. 171–176, 1992.

ORTIZ, E. et al. Toxicon Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–135, 2015.

PALMER, A. C.; SORGER, P. K. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy Theory Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1678–1682.e13, 2017.

PALMIERI, M. et al. in neurodegenerative storage diseases. **Nat Commun**, v. 8, p. 1–19, 2017.

PATLAK, M. From viper ' s venom to drug design : treating hypertension 1. **FASEB J**, v. 18, n. 3, p. 421, 2004.

PELLEGATA, N. S. et al. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest : A reevaluation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 26, p. 15209–15214, 1996.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants ' usage. **Pharmacogn Rev.**, v. 6, n. 11, p. 1–6, 2012.

PIERRE, T. N. et al. Phylloxin , a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial / opioid peptide precursors. **Eur. J. Biochem**, v. 378, n. November 1999, p. 370–378, 2000.

PINTO, E. G. et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus* Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus*. v. 20, p. 1–8, 2014.

Plenum Press. p. XIII, 1978.

PROMMER, E. Ziconotide: A new option for refractory pain. **Drugs of today**, v. 42, n. 6. p. 369-378, 2006.

QIAO, G. et al. Granulin A Synergizes with Cisplatin to Inhibit the Growth of Human Hepatocellular Carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 3060, 2018.

RAAYMAKERS, C. et al. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1495, 2017.

RÄISÄNEN, M.; KÄRKKÄINEN, J. Mass fragmentographic quantification of urinary N,N-dimethyltryptamine and bufotenine. **J Chromatogr.**, v. 162, n. 4, p. 579–584, 1979.

RATES, B. et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 35–52, 2011.

REIS, P. V. M. et al. 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, n. April, p. 1–12, 2018.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Naure Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

ROBERT, T. et al. HDACs link the DNA damage response , processing of double-strand breaks and autophagy. **Nature**, v. 470, n. 7336, p. 74–79, 2011.

RODRÍGUEZ, C. et al. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n. July 2017, p. 235–254, 2016.

ROSEGHINI, M. et al. Biogenic amines and active peptides in extracts of the skin of thirty-two European amphibian species. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 94, n. 2, p. 455–460, 1989.

RUTA, M.; COATES, M. I. Dates, nodes and character conflict: addressing the Lissamphibian origin problem. **Journal of Systematic Palaeontology**, v. 5, n. 1, p. 69–122, 2007.

SANTOS, D. M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**, v. 39, n. 1, p. 135–144, 2010.

SETTEMBRE, C. et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. **Science**, v. 332, n. 6036, p. 1429–1433, 2013.

SHACKA, J. J.; KLOCKE, B. J.; ROTH, K. A. Autophagy, Bafilomycin and Cell Death The “A-B-Cs” of Plecomacrolide-Induced Neuroprotection. **Autophagy**, v. 2, n. 3, p. 228–230, 2006.

SHAO, X. et al. Induction of Autophagy and Apoptosis via PI3K / AKT / TOR Pathways by Azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 1–12, 2016.

SHERR, C. J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 9, p. 663–673, 2006.

SHI, D. et al. Baltikinin: A new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purple-sided leaf frog, *Phyllomedusa baltea*. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2016.

SIGMA ALDRICH Reagents For Analyzing Autophagy Disponível em:<<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=104899414>> acessado em 01 set 2019

Silva C.N ; ALMEIDA., F. M. ; LOMEIO, R. S. ; BEIRAO, P. S. L. ; Torres, F.S ; PIMENTA, A. M. C. ; DE LIMA, M. E. . Peptídeo sintético PnTx-19, composições farmacêuticas e uso. 2013, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: **BR1020120208008**, título: "Peptídeo sintético PnTx-19, composições farmacêuticas e uso" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/08/2013

SILVA, C. N. et al. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a Phoneutria nigriventer Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. **Journal of Urology**, v. 194, n. 5, p. 1481–1490, 2015.

SILVA, C. N. et al. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a Phoneutria nigriventer Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. **Journal of Urology**, v. 194, n. 5, p. 1481–1490, 2015.

SILVER, D. P. et al. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, n. 7, p. 1145–1153, 2010.

SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of captopril. **FASEB Journal**, v. 17, n. 8, p.788-789, 2003

TAKEDA, N. et al. Bufotenine reconsidered as a diagnostic indicator of psychiatric disorders. **Neuroreport.**, v. 6, n. 17, p. 2378–2380, 1995.

TALLARIDA, R. J. An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 319, n. 1, p. 1–7, 2006.

TALLARIDA, R. J. Drug Combinations : Tests and Analysis with Isoboles. **Curr Protoc Pharmacol.**, v. 18, n. 72, p. 1–32, 2017.

TALLARIDA, R. J. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. v. 1 264 pp. CRC Press, 2000

THOME, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **J. Cell Sci.**, v. 15, n. 129, p. 4622–4632, 2016.

THOMPSON, A. H. et al. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the

skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. **Peptides**, v. 28, n. 7, p. 1331–1343, 2007.

THOMPSON, A. H. et al. Amphibian Skin Secretomics : Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* : Discovery of a Novel Peptide. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 3604–3613, 2007.

THOMPSON, A. H. et al. Amphibian Skin Secretomics : Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* : Discovery of a Novel Peptide. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 3604–3613, 2007.

TOKUYAMA, T. et al. The structure of batrachotoxinin A, a novel steroidal alkaloid from the Colombian arrow poison frog, *Phylllobates aurotaenia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 7, p. 1917–1918, 1968.

TOLWEB. Explore the Tree of Life. Disponível em: <<http://tolweb.org/tree/>> acessado em 13 jun 2019

TONG, Q. et al. BAK overexpression mediates p53-independent apoptosis inducing effects on human gastric cancer cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1–8, 2004.

TSUNEKI, H. et al. Alkaloids indolizidine 235B', quinolizidine 1-epi-207I, and the tricyclic 205B are potent and selective noncompetitive inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 1061–1069, 2004.

TSUNEKI, H. et al. Alkaloids indolizidine 235B', quinolizidine 1-epi-207I, and the tricyclic 205B are potent and selective noncompetitive inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 1061–1069, 2004.

VALLE, J. W. et al. Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. **Ann. Onc.**, v. 25, n. 2, p. 391–398, 2013.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Naure Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VIGERELLI, H. et al. Bufotenine is able to block rabies virus infection in BHK-21 cells. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, n. 1, p. 45, 2014.

VINOD, V. et al. “ How can I halt thee?” The puzzles involved in autophagic inhibition. **Pharmacological Research**, v. 82, p. 1–8, 2014.

Waller, G. R. and Nowacki, E. K.. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants.

WAN, Y. et al. Phylloseptin-PBa???a novel broad-spectrum antimicrobial peptide from the skin secretion of the Peruvian purple-sided leaf frog (*Phyllomedusa baltea*) which exhibits cancer cell cytotoxicity. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5182–5193, 2015.

WAN, Y. et al. Phylloseptin-PBa???a novel broad-spectrum antimicrobial peptide from the skin secretion of the Peruvian purple-sided leaf frog (*Phyllomedusa baltea*) which exhibits cancer cell cytotoxicity. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5182–5193, 2015.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. March, p. 307–320, 2005.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3 : the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nuc Acids Res**, v. 44, n. November 2015, p. 1087–1093, 2016.

WANG, L. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Sauvateide – A novel amidated myotropic decapeptide from the skin secretion of the waxy monkey frog , *Phyllomedusa sauvagei*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 2, p. 240–244, 2009.

WANG, S.-Y. et al. How batrachotoxin modifies the sodium channel permeation pathway: computer modeling and site-directed mutagenesis. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 788–795, 2006.

WANG, X.; WANG, G. HHS Public Access. **Protein Pept Lett.**, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2017.

WELSH, J. H.; BATTY, C. S. 5-Hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. **Toxicon**, v. 1, n. 4, p. 165–170, 1963.

WHO The top 10 causes of death. disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>> acessado em: 29 set 2019

WILSON, E. N. et al. A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radio sensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D. **Horm Cancer.**, v. 2, n. 5, p. 272–285, 2011.

XIONG, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, v. 16, n. 366, p. 701–704, 1993.

- YAMAGUCHI, H. et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation. **J Cell Biol**, v. 193, n. 7, p. 1275–1288, 2010.
- YAMAMOTO, A. et al. Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line. **Cell Struct Funct.**, v. 42, p. 33–42, 1998.
- YOVANOVICH, C. A. M. et al. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 5, n. 372, 2017.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, 2002
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5449–53, 1987.
- ZHENG, L. et al. Antitumor Peptides from Marine Organisms. **Mar. Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1840–1859, 2011.
- ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. Tumor Suppressive Functions of p53. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 1, n. 5, p. 1–12, 2009.

14. ANEXOS

14.1. CERTIFICADOS DE CONGRESSOS

Resumo do capítulo 1 da tese publicado nos anais do " 20th World Congress of the International Society on Toxinology " ocorrido entre 08/09/2019 - 13/09/2019, Buenos Aires, Argentina e apresentado neste congresso. Resumo a ser publicado em edição da revista Toxicon. ISSN: 0041-0101

Submission Details

This paper is submitted to

Conference	20th World Congress of the International Society on Toxinology
Session	Topic B: Basic Toxinology

Submission details

Article ID	sciforum-026272
Status	submission accepted
Title	Partial proteomic characterization of the <i>Phyllomedusa megacephala</i> secretion and the differential activity of some peptides against tumor and non-tumor cell lines
Authors	Joaquim Teixeira Avelar Júnior *, Açucena De Souza, Juliana Martins Ribeiro, Juan Espanha, Natália Rocha Guimarães, Maya Belghazi, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Paula Eterovick, Jarbas Magalhães Resende, Márcia Helena Borges, Luiz M Farias, Paula P Magalhães, Marie-France Martin-Eauclaire, Pierre Edouard Bougis, Elaine Maria Souza-Fagundes, Maria Elena De Lima
Abstract	<i>Phyllomedusa megacephala</i> is a Brazilian frog from Minas Gerais' cerrado (tropical savanna), which skin secretion was never studied. In this work, we fractionated the skin secretion of <i>P. megacephala</i> by reverse phase HPLC chromatography, followed by a MALDI-TOF mass spectrometry and Edman degradation analyses. A total of 15 peptides had their primary structures determined by <i>de novo</i> sequencing, and were synthesized and tested against bacteria (according to CLSI norm with modifications) and four lineages, MDA-MB231, MCF-7, HCT-116 (solid tumor cells lines) and HEK-293 (normal cell line). Of these peptides, eight similar to phyloseptin family were found, being three complete and five truncated versions of them. In addition, we found one peptide similar to dermaseptin and a short orphan sequence similar to a peptide named "bioactive peptide 1" from <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> that has no activity described. Three novel orphan peptides were also described. These orphan peptides were tested against bacteria (<i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> strains), three cell cancer lines and one normal cell line. No antimicrobial activity was found, by using an agar trial assay. When tested against MDA-MB-231, MCF-7, HCT-116 lineages (by sulforhodamine B assay), two of the peptides (named peptide 1222 and peptide 1223) increased cell proliferation. No effect was observed against the HEK-293 (normal kidney line). These results suggest that these peptides could be used as tools to investigate the signaling pathways involved in cell survival and proliferation that contribute to carcinogenesis.
Keywords	Phyllomedusa megacephala; bioactive peptides; tumor cells; proteomics
Type	Poster / Talk (consider me for short talk)

Submission history

18/06/2019	Abstract submission
21/06/2019	Editor decision: Approve Editor comments:

Resumo do capítulo 2 da tese publicado nos anais do " 20th World Congress of the International Society on Toxinology " ocorrido entre 08/09/2019 - 13/09/2019, Buenos Aires, Argentina e apresentado neste congresso. Resumo a ser publicado em edição da revista Toxicon. ISSN: 0041-0101

Submission Details

This paper is submitted to

Conference	20th World Congress of the International Society on Toxinology
Session	Topic D: Toxinological Technologies

Submission details

Article ID	sciforum-026466
Status	submission accepted
Title	Synergistic effect between the peptide LyeTx1-b and cisplatin to kill triple negative breast cancer cells, MDA-MB-231
Authors	Joaquim Teixeira Avelar Júnior*, Edleusa Marques, Célio José Castro Junior, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Raquel Gouvêa Dos Santos, Elaine Maria Souza-Fagundes, Maria Elena De Lima *
Abstract	The breast cancer is the most common and the biggest cause of women cancer death, being responsible by 25% of total cancers in women. Among them, triple negative breast cancer type is the most difficult to treat, because it is less responsive to hormone- based treatments. In this research we propose a combination between a new synthetic antitumoral peptide we have studied, LyeTx I-b, derived from a natural peptide (LyeTx I) from the spider <i>Lycosa erythrognatha</i> , and cisplatin, a known anticancer drug, as an approach to kill the MDA-MB 231 cells. Firstly, a trial was performed to evaluate the compounds IC ₅₀ in separate, resulting in IC ₅₀ of 2.47 µM and 94.69 µM to LyeTx I-b and cisplatin, respectively. After that, isobolographic analysis was performed taking in account the IC ₅₀ obtained when three different proportions of LyeTx I-b and cisplatin were tested, 1:1, 3:1 and 1:3. It was shown that proportion 1:1 showed a synergistic effect. Cell cycle analysis was performed to each proportion used in isobolographic analysis showing a G2 stop in cell cycle that could be indicative of autophagy. Western blot analysis of AKT and ERK-proteins showed that in the proportion 1:1 of the compounds, there was a decrease of the AKT phosphorylation, although phosphorylated ERK did not exhibit any change, compared to untreated cells. These founds suggest that a combination between LyeTx I-b and cisplatin, in the proportion of 1:1, which exhibited a synergistic effect, could be a good candidate as a new therapy against breast cancer.
Keywords	Breast cancer, <i>Lycosa erythrognatha</i> , Drug combination, MDA-MB-231, isobolographic analysis
Type	Poster

Submission history

24/06/2019	Abstract submission
26/06/2019	Editor decision: Approve Editor comments:

Informações disponíveis em:

<https://ist2019.sciforum.net/conferences_files/269/customs/6f39f7b24fa69ecd83685d9a77cc826a.pdf>

14.2. PUBLICAÇÕES

Revisão escrita e já submetida em 2018:

CURRENT PROTEIN & PEPTIDE SCIENCE BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS www.bentham.org

Editor-in-Chief

Ben M. Dunn; University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Associate Editors

P. Cudic; Florida Atlantic University, Center for Molecular Biology and Biotechnology, Florida, USA

R. Hoffmann; Institute of Bioanalytical Chemistry Center for Biotechnology and Biomedicine, Leipzig University, Leipzig, German

V.N. Uversky; University of South Florida, College of Medicine, Tampa, Florida, USA

Aims and Scope	<i>Current Protein & Peptide Science</i> publishes review articles on specific aspects involving proteins, peptides, and interactions between the enzymes, the binding interactions of hormones and their receptors; the properties of transcription factors and other molecules that regulate gene expression; the reactions leading to the immune response; the process of signal transduction; the structure and function of proteins involved in the cytoskeleton and molecular motors; the properties of membrane channels and transporters; and the generation and storage of metabolic energy. In addition, reviews of experimental studies of protein folding and design are given special emphasis. Manuscripts submitted to Current Protein & Peptide Science should cover a field by discussing research from the leading laboratories in a field and should pose questions for future studies. Original papers, research articles and letter articles/short communications are not considered for publication in Current Protein & Peptide Science.
<u>PAPER TITLE</u>	Antimicrobial Peptides From Spiders Of The Family Lycosidae (Sundevall, 1833)
<u>AUTHOR(S) NAME</u>	Marcella Nunes Melo-Braga, Joaquim Teixeira de Avelar Júnior, Flávia De Marco Almeida, PabloVictor Mendes dos Reis, Daniel Moreira dos Santos, Maria Elena de Lima

Paper já escrito a ser submetido:

1 **Shortened LyeTx I derivatives: antimicrobial activity assessment by *in vitro* assay and *in vivo***
2 **experimental model of septic arthritis**

3
4 Leonardo Lima Fuscaldi^{a,*}, Joaquim Teixeira de Avelar Júnior^{b,a}, Daniel Moreira dos Santos^b, Daiane Boff^b, Vivian
5 Louise Soares de Oliveira^b, Karla Aparecida Guimarães Gusmão Gomes^c, Rosana de Carvalho Cruz^d, Patrícia Luciana
6 de Oliveira^d, Paula Prazeres Magalhães^d, Patrícia Silva Cisalpino^d, Luiz de Macêdo Farias^d, Elaine Maria de Souza-
7 Fagundes^e, Johannes Delp^{f,g}, Marcel Leist^f, Jarbas Magalhães Resende^e, Flávio Almeida Amaral^b, Adriano Monteiro de
8 Castro Pimenta^b, Simone Odília Antunes Fernandes^a, Valbert Nascimento Cardoso^a, Maria Elena de Lima^{b,g}

9
10
11 ^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,
12 Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil.

13 ^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
14 Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil.

15 ^cDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos,
16 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil.

17 ^dDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio
18 Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil.

19 ^eDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av.
20 Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil.

21 ^fChair for *In Vitro* Toxicology and Biomedicine, inaugurated by the Doerenkamp-Zbinden Foundation, University of
22 Konstanz, Konstanz, Germany; ^gCooperative Doctorate College InViTe, University of Konstanz, Konstanz, Germany.

23 ^hInstituto de Ensino e Pesquisa - Santa Casa de Belo Horizonte, Rua Domingos Vieira, 590, Belo Horizonte, MG,
24 Brazil.

25
26 ^{*}These authors contributed equally to the performing of this work and to the writing of this article.

27
28
29 ^{*}Corresponding author:

30 Leonardo Lima Fuscaldi _ leonardo.fuscaldi@hotmail.com

31 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,
32 Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brasil.

33

34

40 **Abstract**

41

42 This research purposed to synthesize LyeTx I derivatives and to evaluate their toxicity and potential
43 as antibiotic candidates, by *in vitro* assays and *in vivo* experimental model of septic arthritis. The
44 original peptide LyeTx I and three derivatives (LyeTx I mn; LyeTx I mnΔK; LyeTx I mnΔKAc)
45 were synthesized, purified by reverse phase-high performance liquid chromatography, and
46 characterized by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer
47 analysis. All derivatives were analyzed by circular dichroism, which suggested that they probably
48 present membranolytic activity, like the original peptide. *In vitro* assays were performed and data
49 revealed that LyeTx I mnΔK presents the best score between antimicrobial and hemolytic activities,
50 among the three derivatives. Beyond that, NeuriTox assay demonstrated that LyeTx I mnΔK is less
51 neurotoxic than the original LyeTx I. Furthermore, *in vivo* data showed that LyeTx I mnΔK was
52 able to reduce infection, as demonstrated by bacterial recovery assay and scintigraphic imaging.
53 LyeTx I mnΔK also reduced the inflammatory process, leading to pain reduction, as suggested by
54 immune cells recruitment and by increment in the removal threshold hypernociception. Therefore,
55 our studies suggest that, among the three derivatives, LyeTx I mnΔK is the best potential candidate
56 as antimicrobial agent.

57

58 **Keywords:** Antimicrobial peptide; LyeTx I derivative; LyeTx I mnΔK; Septic arthritis.

59

60

LyeTx1-b is highly active in triple negative breast cancer cells and acts synergistically with cisplatin in these cells.

INTRODUCTION

Breast cancer is the mainly cause of cancer in women being responsible by almost 25% of all cases in this group and 15% of all cancer death in women [1]. The subtype triple-negative is responsible by 15 to 20% of all breast cancer cases [2], being more aggressive and more difficult to treat [3]. Owing to lack of estrogen, progesterone and HER2 receptors [4] and the BRCA1 gene is inactivated [2] one of the most common therapy to treat breast cancer, hormonal therapy [5, 6], is not available as treatment for this subset and the prognosis is worst than others types of breast cancer [7]. Actually the treatment is only based in chemotherapy and surgery [6], even though radiotherapy can be employed sometimes [6]. Since target signaling molecule is virtually difficult for triple negative breast cancer treatment, the discovery of new therapeutic drugs, or the combination between two or more of them, searching for synergistic benefits, may be especially valuable in triple negative breast cancer [23]. In this scenario it is fundamental to assess potential for combinatorial treatment[23].

Platinum compounds (cisplatin, carbopatin, for example) are some chemotherapies agents used to deal with triple negative breast cancers [6]. It is based in

DNA damages [8] by chemically bind to DNA and blocking replication and transcription events [8,9, 20,21]. Nonetheless these compounds (Cisplatin for example) have many side effects such as vomiting [10], nephrotoxicity [11] and it is frequent appears resistance against this drugs [23,24,25,26]. A solution to this issue would be combined therapy, where different anticancer agents are employed with different objectives, such as attain different populations, increasing therefore the probability of them being responsible [12], reduction of the resistance [13] and decrease the toxicity if a monotherapy would be employed [12]. Combination among regular chemotherapies compounds and anticancer peptides is well described in the literature [14, 15, 16].

LyeTx I-Des-His (LyeTx I-b) is a synthetic antimicrobial peptide derived of the LyeTx I peptide purified from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha* [17,18]. Recently, we demonstrated that LyeTx I-b has cytotoxic activity against glioblastoma cell model described [19]. It is believed that this peptide acts by a membranolytic mechanism [17,19], as already suggested to microorganisms, considering the cancer cell membrane is also negatively charged [22]. However, other mechanisms to this peptide in cancer cell, cannot be excluded and studies are being done to clarify it. A combination between a platinum compound and an antimicrobial peptide showing a cytotoxicity for tumoral cells is a choice that explore different mechanisms of action.

Therefore, the main goal of this work was to evaluate the activity of LyeTx I-b, as well as its combination with cisplatin, against the breast cancer cell line MDA-MB-231.

MATERIAL AND METHODS

MATERIALS

Cell lines used in this research were MDA-MB-231(ATCC#: HTB-26) and HEK-293 (ATCC#: CRL-1573) Culture medium used was Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented by fetal bovine serum (10%) from Invitrogen company (Carlsbad, California, USA) Peptide LyeTx I-b (sequence: CH₃CO-IWLTALKFLGKNLGKLAKQQLAKL-NH₂) was purchased from GenOne company (Rio de Janeiro, Brazil). Cisplatin, Propidium Iodide, Acridine orange and Hoechst dye were purchased from Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, USA). All reagents used in this research were of analytical grade.

METHODS:

Cell culture: Cell lines MDA-MB-231 and HEK-293 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (10%) and incubated at 37 ° C, upon an atmosphere of 5% CO₂.

Cell Viability Assay: Cytotoxicity was evaluated by tetrazolium dye MTT (MTT) assay [19, 27]. MTT 5 mg / mL was added to treated cells and incubated for 4h at 37 ° C and 5% CO₂. After this time, the supernatant was carefully removed and the formazan

crystals were solubilised in 100 µl of 2-propanol containing 0,04 M HCl and read at 595 nm in a Varioskan Lux apparatus . IC₅₀ values were calculated by GraphPad Prism v. 5.01 using nonlinear regression. Results were expressed as percentage of cell survival, or death.

Cell treatment: MDA-MB-231 or HEK-293 cells were plated 10,000 cells per well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37 ° C and 5% CO₂. Cells were divided into five groups of treatments: monotherapies with increasing concentrations (0.39 µM to 12.5 µM) of LyeTx I-b peptide or cisplatin (1.17 µM to 300 µM), combination of three different ratios of LyeTx I-b and Cisplatin (P:C). Molar ratios (P:C) were based on LyeTx I-b maximum concentration of 12.5 µM and twofold serial dilutions of 1:1, 3:1 and 1:3. The combined effect of both drugs was analyzed using isobologram analysis, as previously reported [28,29]. Graphic Isobolograms were created from these data in the IC₅₀ values and statistics performed (t-test, statistic significance of 95%) [28,29,30].

Cell Cycle: The DNA content of cells was evaluated by Nicoletti method, based in fluorescence that allows separate different populations in distinct cell cycle phases and evaluate DNA fragmentation [31]. Cells MDA-MB231 were plated (300,000/per well in 6-wells), incubated for 48 hours at the IC₅₀ concentration found for each of the combinations and for each of the separated compound studied. After each treatment, the cells were trypsinized and washed; the recovered medium was centrifuged at 2,000 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the recovered precipitate was treated with 300 µl of a HFS- solution, containing 0.1% (w / v) sodium citrate; 0.1% (v / v) Triton

X-100 and 50 µg / ml propidium iodide for 1 hour and then, read on a FACScan using the 585/42 filter to read the fluorescence emitted by the dye used.

Acridine Orange Incorporation Assay: The cells MDA-MB231 were plated (300,000/well in 96-wells), were incubated for 48 hours at the IC₅₀ concentration found for each of the combinations and for each separated compound studied, in the absence or in presence of 10 nM Bafilomycin-A1 1h pre-treatment. After each treatment the cells were trypsinized and washed with the recovered medium centrifuged at 2,000 g for 5 minutes. After that, the solution was discarded and 300 µl of a solution containing 5 µg / ml acridine orange in PBS was added to the cells [32]. The preparation obtained was read in the FACScan using the 530/30 and 670LP filters.

The data obtained were analysed with FlowJo 10.0 software.

Immunoblotting: Following drugs treatments, MDA-MB231 cells were lysed in RIPA buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.05 M EDTA, 1% nonidet P40, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1.0 mM AEBSF and 10.0 µg/ml of both leupeptin and aprotinin). 50 µg total cellular protein for each sample were subjected to SDS-PAGE (10%), followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% BSA in wash buffer (150.0 mM NaCl, 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1% Tween 20) for 2h and then incubated with rabbit either anti-phospho AKT1 (S473, DB Biotech # DB 127 0.1), (1:1000), rabbit anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Invitrogen S.812.9 #

MA5-15173), (1:1000), rabbit anti p21 (F-5, Santa Cruz # SC 6246), (1:300), mouse anti p53 (DO-1, Santa Cruz # SC 126), (1:1000), antibodies in wash buffer containing 5% BSA overnight for 4 °C. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Millipore, # AP307P) diluted 1:3000 or anti-mouse IgG (Invitrogen, # 626520), (1:2000) in wash buffer containing 5% BSA for 1 h. Membranes were rinsed three times with wash buffer, incubated with (Millipore, Luminata Forte Western HRP Substrate, # WBLUF0500) western blotting detection reagents and scanned and analysed by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Membranes were then stripped and incubated with either rabbit anti-AKT (DB Biotech, # DB 126 0.1), (1:1000), rabbit anti-ERK1/2 (Invitrogen K.913.4, # MA5-1534), (1:1000) or rabbit anti β actin (Sigma RM112, # MATB523), (1:3000), antibodies in wash buffer containing 5% BSA overnight for 4 °C. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Millipore, # AP307P) diluted 1:3000 or anti-mouse IgG (Invitrogen, # 626520), (1:2000) in wash buffer containing 5% BSA for 1 h. and probed with secondary antibody anti-rabbit IgG diluted 1:5000, to determine total AKT, ERK1/2, p21 and p53 expression. Non-saturated, immunoreactive AKT, ERK1/2, p21 and p53 bands were quantified by scanning densitometry. Immuno-band intensity was calculated using ImageJ software and the number of pixels of AKT and ERK1/2 phospho-bands was divided by the number of pixels of total AKT and ERK1/2 to normalize phosphorylation levels of kinases to total kinase expression and p21 and p53. Bands were divided by the number of pixels of β actin to normalize expression levels.

Statistics analysis: Data were analysed by statistic test One way ANOVA (Analysis of Variance), followed by Bonferroni *post-hoc* test. It was considered a statistic significance of 95% for all tests.

RESULTS

Cell viability evaluation:

LyeTx I-b and cisplatin treatments induced cytotoxicity in a concentration dependent manner (figure 1) against MDA-MB-231 (triple negative breast cancer cells) and HEK-293 (fetal kidney cells). The IC₅₀ values found to LyeTx I-b compound were 2.47 μ M to MDA-MB-231 and 7.88 μ M to HEK-293. The IC₅₀ values to cisplatin were 94.69 μ M to MDA-MB-231 and 3.96 μ M to HEK-293.

The SI - selectivity index value (ratio HEK[IC₅₀]/MDA[IC₅₀]) - provided evidences that the peptide (LyeTx I-b) exhibited a SI (3.19) higher than the cisplatin SI (0.041).

Isobolographic analysis of LyeTx I-b combined with cisplatin demonstrated synergism for one of the used doses:

Isobolographic analysis was performed in order to evaluate the effects of combined treatments against MDA-MB-231 and HEK-293

The proportions of LyeTx I-b and cisplatin (P:C = 1:1, 3:1 and 1:3) were evaluated against the cells MDA-MB-231 and HEK-293, resulting the concentration dependent curves (figure 2) to each proportion. These curves were made using the equation: %death = 100% - %viability. The IC₅₀ values found to each treatment against the cells, as well as the SI, are shown in table 1.

The Isobolographic statistics analysis taking as a reference the IC₅₀ of each treatment, revealed that to combinations LyeTx I-b and cisplatin (proportion 1:1) to MDA-MB-231 showed synergistic effect, while the others two combinations (3:1 and 1:3) showed additive effect. On the other hand, when testing against HEK-293 cells, the compounds in all the proportions (1:1, 3:1 and 1:3) showed synergistic effect, proved by statistics t-test. Figure 3 shows the isobolograms found to both cell lines. In other hand when made the SI -selectivity index (rate between HEK-293 IC₅₀ and MDA-MB-231 IC₅₀; HEK[IC₅₀]/MDA[IC₅₀])- it was found that the combinations proportions 1:1, 3:1 and 1:3 shown as SI the values 0.67; 0.85 and 0.37; respectively.

Cell cycle progression indicated arrest in cell cycle:

The cell cycle analysis indicated different progressions in the distinct groups (representative figure 4a). In quantification, sub-diploid DNA augment was observed in cisplatin monotreatment group, an increase in G2/M phase to groups 1:1 and 1:3 combined treatments. In addition, it was found an augment in S phase to cisplatin and 1:3 combined treatment, a decrease in G0/G1 phase to the monotreatment cisplatin and to combined treatments (P:C) to all the proportions investigated. The increase in G2/M phase was interpreted as an indicative that a considerable population was arrested in this cell cycle phase.

Acridine orange assay indicated acid vacuoles organelles formation:

Evaluation of autophagy by acid vacuoles organelles was performed using the metachromatic dye acridine orange. This dye displays green fluorescence in neutral pH, and red, in acid pH. The assay demonstrated that in all treatments there was an increasing of red organelles (figure 5a) and this was higher in LyeTx I-b and in combined treatments, when compared to cisplatin group, as stated by statistics test (figure 6a).

Pretreatments with bafilomicyn A1 have displayed that all red increasing were ablated, decreasing to control levels as observed in representative figure 5b and quantifications in figure 6b, suggesting a vacuolar pH influence to the red shift.

AKT, ERK, P53 and P21 Immunoblotting patterns post treatment:

Immunoblots showed (figure 7) a decrease of AKT phosphorylation to groups LyeTx I-b and the combined treatments as well as a decrement of P21 expression to all treatments. In other hand, ERK phosphorylation decreased to LyeTx I-b treatment and P53 was increased to groups treated with cisplatin and combination of P:C (1:3).

DISCUSSION

Cisplatin is a well based therapy in clinics [6,33,34,35] despite its strong side effects such as nephrotoxicity, vomiting, ototoxicity, myelotoxicity and neuropathy [10,11,36]. For these reasons, a combined therapy could be useful to prevent or decrease these clinical side effects, process that have been previously studied in basic research

and clinical trials [14,15,35]. The peptide LyeTx I-b has been shown to have a good anticancer activity in glioblastoma cells (Abdel Salam et al., 2018) and in the present work, we confirmed it in breast cancer cell model (MDA-MB-231). The IC_{50} values found to this peptide in MDA-MB-231 and HEK-293 cells were 2.47 μ M and 7.88 μ M, respectively, which shows an apparent lower toxicity of the peptide in the control cells (HEK-293), compared to cancer cells. However, it should be more explored and also assayed in other noncancer cells. In addition, our proposition, of a combined treatment with this peptide and cisplatin in the MDA-MB-231 cells, resulted in better selectivity index (SI) values to combinations of 1:1 and 3:1 (peptide : cisplatin), being 0.67 and 0.85, respectively. These values were higher, 16 and 20 times, respectively, than that of cisplatin (SI = 0.041). Moreover, the proportion 1:1 presented a synergistic effect, as observed in isobolographic analysis, another indicative that this combination seems to be a good candidate to advanced trials *in vivo*.

As one of the worst side effects of cisplatin is the nephrotoxicity [36], the SI value increments to the combinations 1:1 and 1:3 suggest that our combination could be less nephrotoxic than that caused by cisplatin monotherapy treatment. It is also based in the nontumoral cell model (HEK-293), originated from a fetal kidney, used as our toxicity control. Nephrotoxicity occurs in 20-30% of patients treated with cisplatin [37] and this phenomenon is increased by aging [38], being consequently, a big issue to the majority of patients on treatment of breast cancer, a common pathology in aged women. Our results showed on the isobolographic analyses, that the best combination seems to be 1:1, with synergistic effect among the drugs, good SI and using about 48 times less cisplatin, than that used in monotherapy. Furthermore, LyeTx I-b did not present histopathological alterations in organs such as spleen, heart, brain, lung and kidney in studies from Abdel-Salam (unpublished data), indicating that an *in vivo* trial for the

combination between LyeTx I-b and cisplatin probably, would not present great damages, suggesting also, less side effects, when using this combination.

The synergistic effects of this combined treatment could be explained, considering that each compound acts by different mechanism of action, *i.e.* LyeTx I-b mostly by a membranolytic mechanism [18,19] and cisplatin by damaging DNA [8]. So, the combination of both compounds targeting distinct sites, could increase the efficacy of the treatment.

Our evaluation of a possible mechanism of action for combinations between the peptide and cisplatin, suggested autophagic cell death (ACD) [39]. This mechanism acts by autophagosome vesicles, which engulf the cell organelles leading to an autodigestion process and, in some cases, this process can also digest antiapoptotic proteins facilitating cell death cascade such as apoptosis [39,40,41].

Cell cycle revealed a G2/M arrest to combinations 1:1 and 1:3 between LyeTx I-b and cisplatin. Increasing in G2/M phase is an evidence of G2/M arrest, a well known indicative of ACD [40,42,43]. Our ACD hypothesis is corroborated by assays with acridine orange that suffers metachromasia in lower pH emitting fluorescence in 670 nm range (red). As the autophagosome activity is dependent of pH's decrease, inside the vesicle, it is expected a shift from green to red, in cells compromised with autophagic events [44,45]. Therefore, as observed in our experiments all combined treatments and the monotreatment with LyeTx I-b exhibited a great cell population shift toward red positive marked area in the analysis. To combinations of LyeTx I-b and cisplatin, in the ranges of 1:1, 3:1 and 1:3, the cell population move toward red positive marked cells were, respectively 42.8, 48 and 50.2 times, compared to control. This cell population shift was already described as due the active acid autophagosomes [46,47,48]. Additionally, we tested the cells pretreated with bafilomicyn A1, a well-known

autophagic inhibitor and we observed a reversion in the effects to control levels, indicating that red fluorescence is autophagosome-dependent [47,49,50].

Using the protein markers AKT1, ERK and P21 we found that the profile of AKT1 and P21 were modified. The AKT1 phosphorylation diminished is an indicative of catabolic state, and it is related with autophagic activity [51,52,53] and in some conditions, when AKT is active it regulates autophagy suppression [53,54]. The decrease of P21, which activity is related to separate cyclin CDK complexes [55], could explain the arrest in G2/M cell cycle. Due this activity, P21 expression decrease is, probably, related to allow cells pass through G1 and S phases with no problem, and to be arrested in G2/M by other mechanism P21- independent. As ERK phosphorylation remains in control level, except to a modest LyeTx I-b decrease, this protein appears to not be involved in the response to combined treatment. The importance of this finding is due to the fact that ERK activity increase is involved in autophagy related to survival and not to autophagic cell death events [46].

In summary we found out that the combination of LyeTx I-b and cisplatin has a better SI value when compared to cisplatin alone, the combination in the proportion 1:1 is synergistic and the mechanistic studies suggest autophagic cell death (ACD) as the major cell death mechanism involved. In other hand, Abdel-Salam and collaborators found in neuroblastoma cell line necroptotic cell death mechanism, when these cells were treated with LyeTx I-b peptide [19], suggesting that the peptide can stimulate different cell death mechanisms, depending on the cell lines. In addition, we can suppose that the combination of the peptide LyeTx-I-b with other anticancer drugs could give good results, able to improve the treatment of other cancer types.

Experiments *in vivo* will be done to try to validate the efficacy of the combined treatment (peptide : cisplatin) in a model of triple negative cancer.

TABLES AND FIGURES:

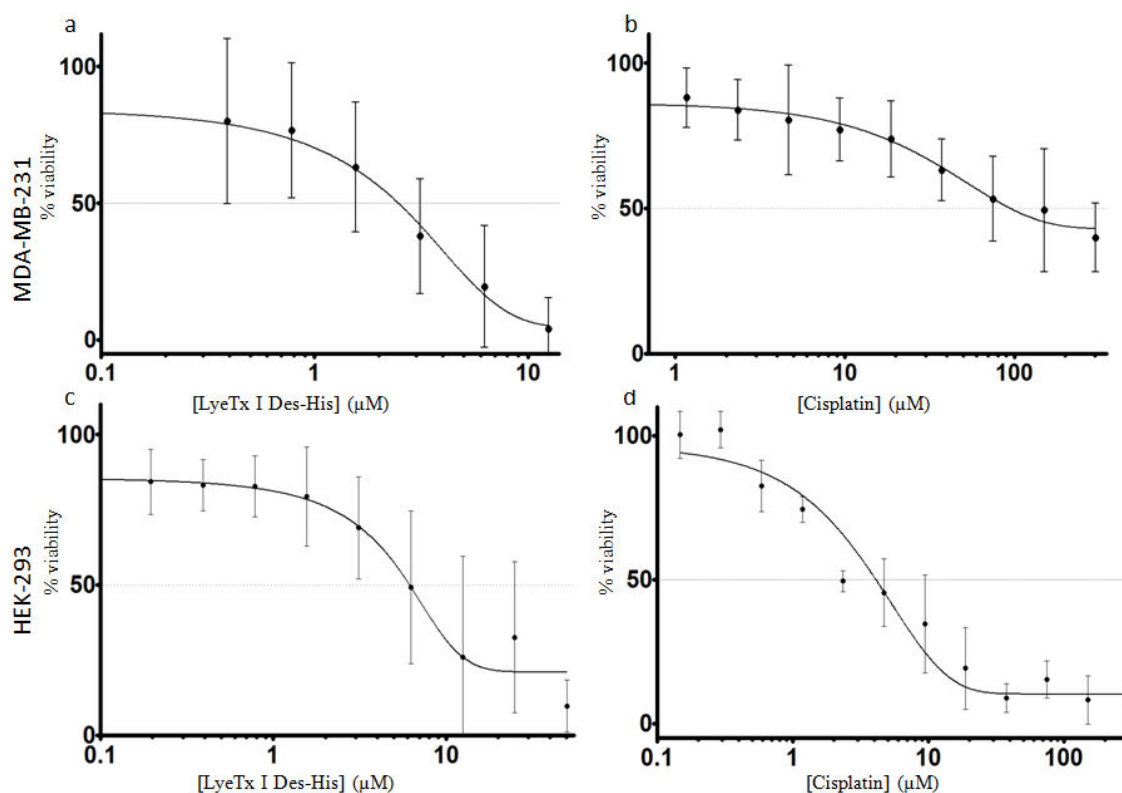


Figure 1: Comparison of cytotoxicity of LyeTx I-b or cisplatin, as indicated in x-axis, in MDA-MB-231 (a, b, $n=8$) and in HEK-293 cells (c, d, $n=3$). Experiments were performed after 48 h of treatment and evaluated by MTT assay.

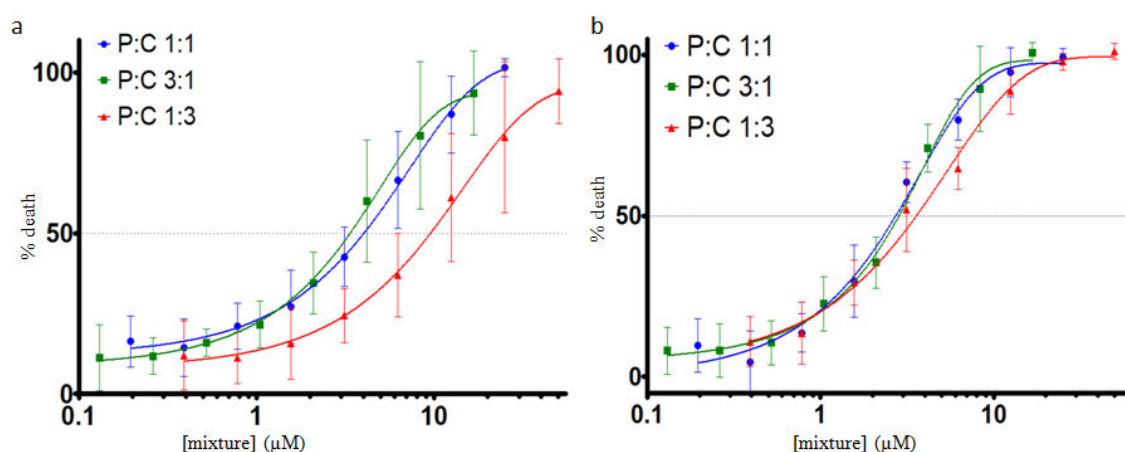


Figure 2: Cell death evaluation (%) by combined treatments of LyeTx I-b and cisplatin, in different proportions as indicated, against MDA-MB-231, $n=6$ (a) and HEK-293 cells, $n=5$ (b). Cell death was evaluated by MTT assay, after 48 h of treatments with the compounds.

Table 28: IC_{50} s values found to the compounds in different proportions. The SI (selective index) represents the ratio between the IC_{50} s of compounds to the cells (HEK-293/MDA-MB 231)

Proportion used	MDA-MB-231 IC ₅₀	HEK-293 IC ₅₀	SI
LyeTx I Des-His: Cisplatin 1:1	3.97	2.67 μ M	0.67
LyeTx I Des-His: Cisplatin 3:1	3.37 μ M	2.87 μ M	0.85
LyeTx I Des-His: Cisplatin 1:3	9.57 μ M	3.57 μ M	0.37

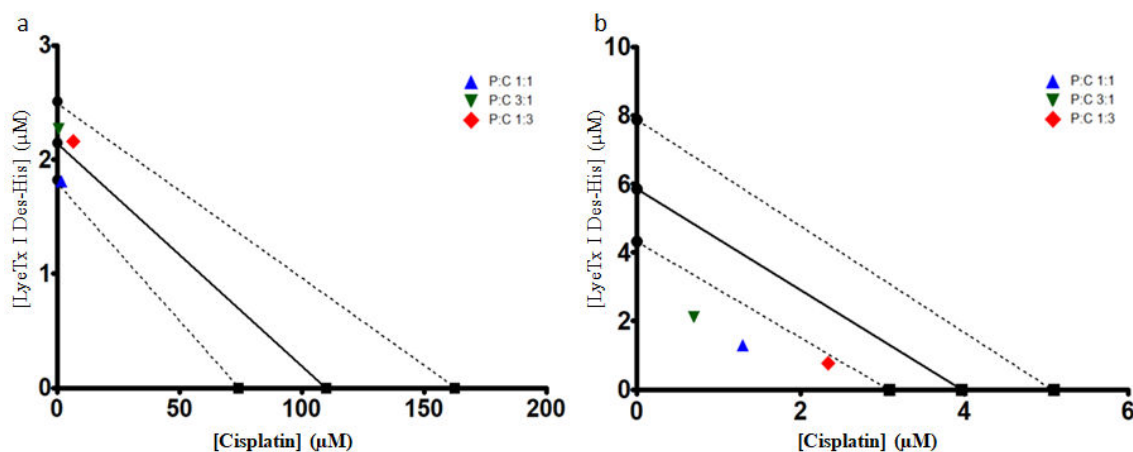
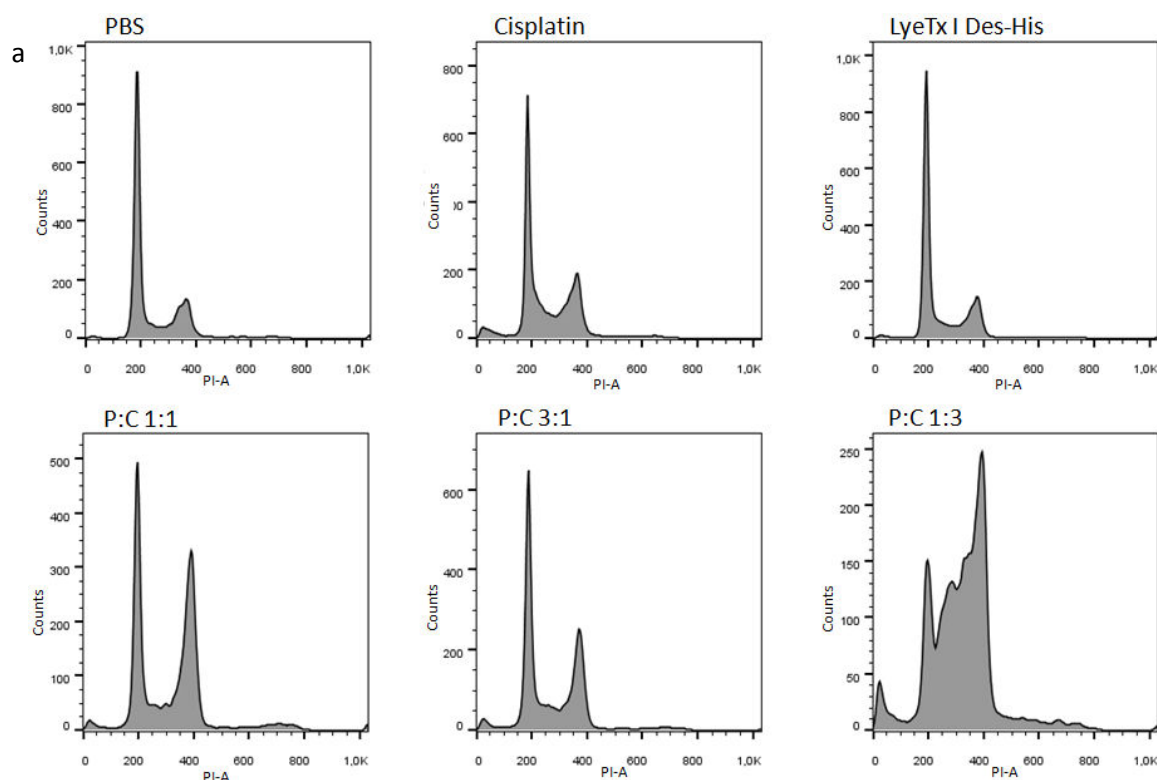


Figure 3: IC₅₀ isobolograms to each combined treatment of LyeTx I-b and Cisplatin, in the different proportions (as indicated.), against MDA-MB-231 (a) and HEK-293 cells (b). t-test was performed between each experimental IC₅₀ and the theoretical IC₅₀, showing that against MDA-MB-231 combined treatment 1:1 (P:C) is statistically different from theoretical value. To HEK-293 all combined treatment was statistically different from their respective theoretical value.



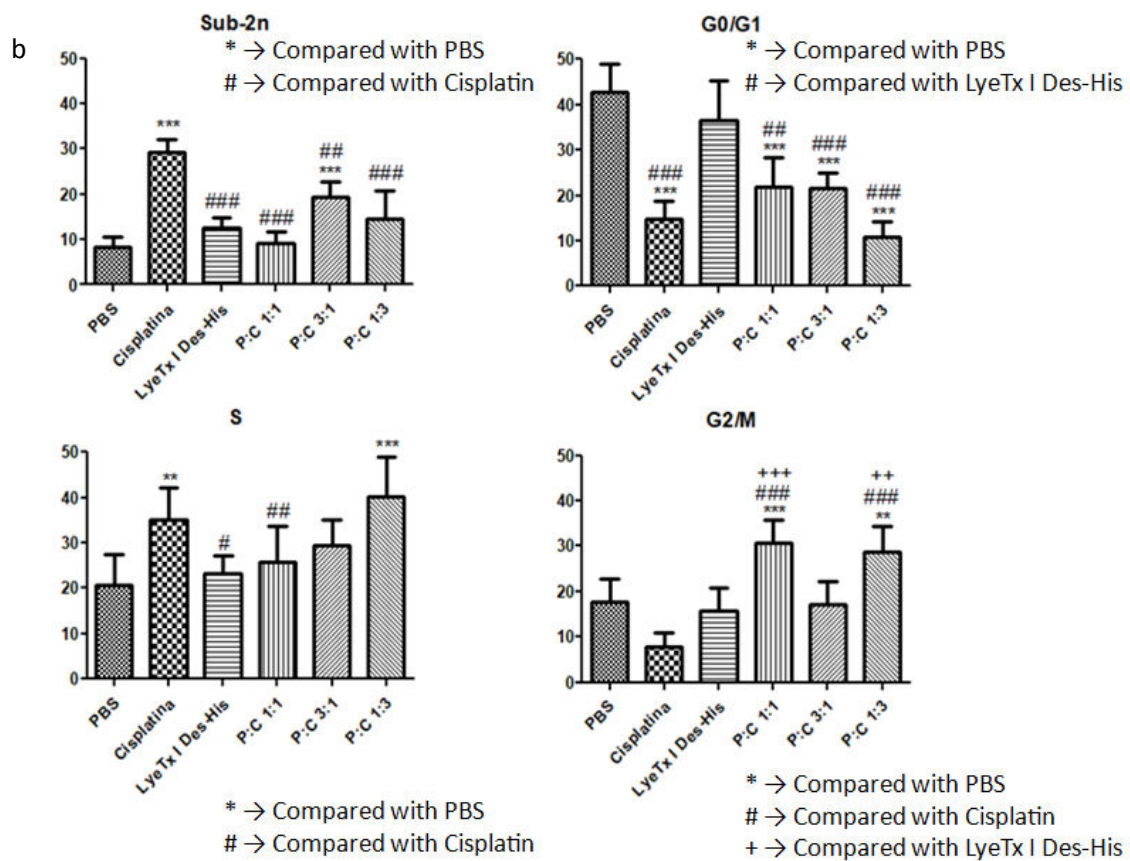


Figure 4: Cell cycle evaluation by DNA content marked by propidium iodide after 48 h of treatment against MDA-MB-231 cells. **a:** A representative histogram showing the results to each treatment in their respective IC_{50} . **b:** Phases quantification (n=4) to each treatment in their respective IC_{50} s. Statistics performed by one way ANOVA displayed by the codes in figure. # means $p < 0,05$; * or + or ## means $p < 0,01$ and *** or +++ or #### means $p < 0,001$.

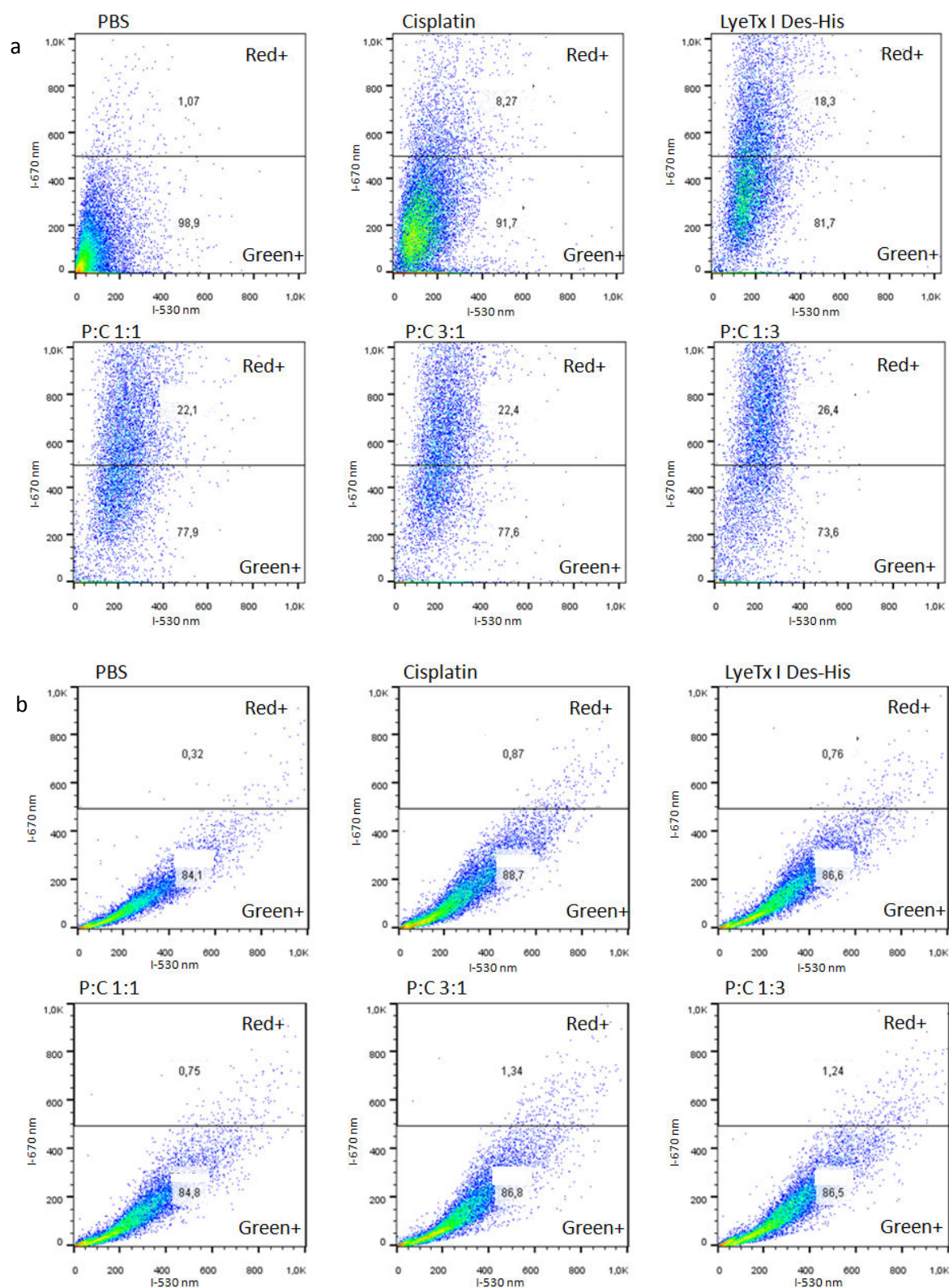


Figure 5: Flow cytometry acid vacuolar organelles representative profiles after 48 h of each treatment in their respective IC_{50} s against MDA-MB-231 cells analyzed by acridine orange fluorescent stain. **a:** Results obtained showing the population shift of all treatments, specially to LyeTx I-b and the combined treatments. **b:** Representative results showing the population shift ablation with previous pretreatment with Bafilomycin A1, an ATPase proton pump inhibitor.

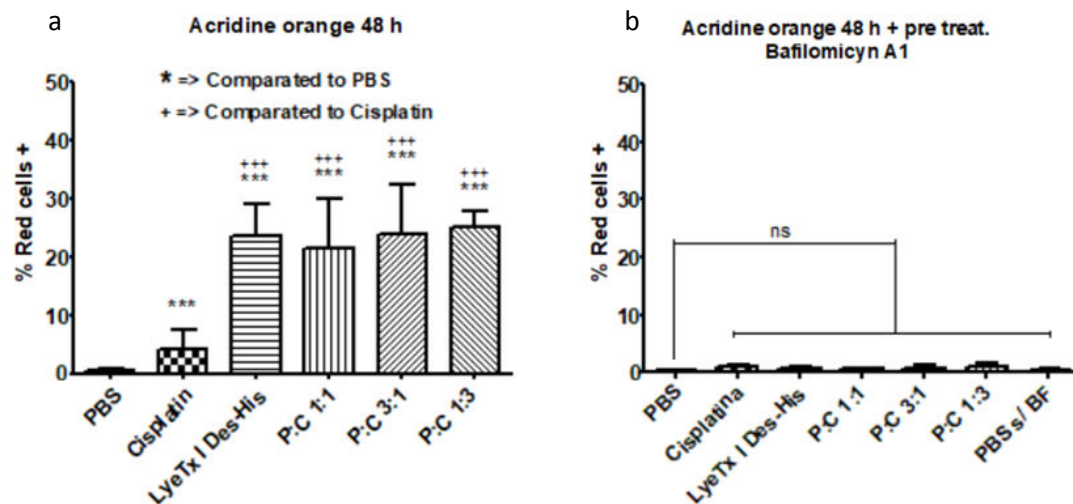


Figure 6: Acridine orange fluorescent stain quantification (n=4) of red cells (MDA-MB-231) marked by this dye after 48 h of each treatment in their respective IC₅₀. **a:** Quantification results to each treatment with the statistics as specified in the figure. **b:** Quantification results to each treatment with previous pretreatment with Bafilomycin A1 an ATPase proton pump inhibitor. *** or +++ means p<0,001 and "ns" means not significant.

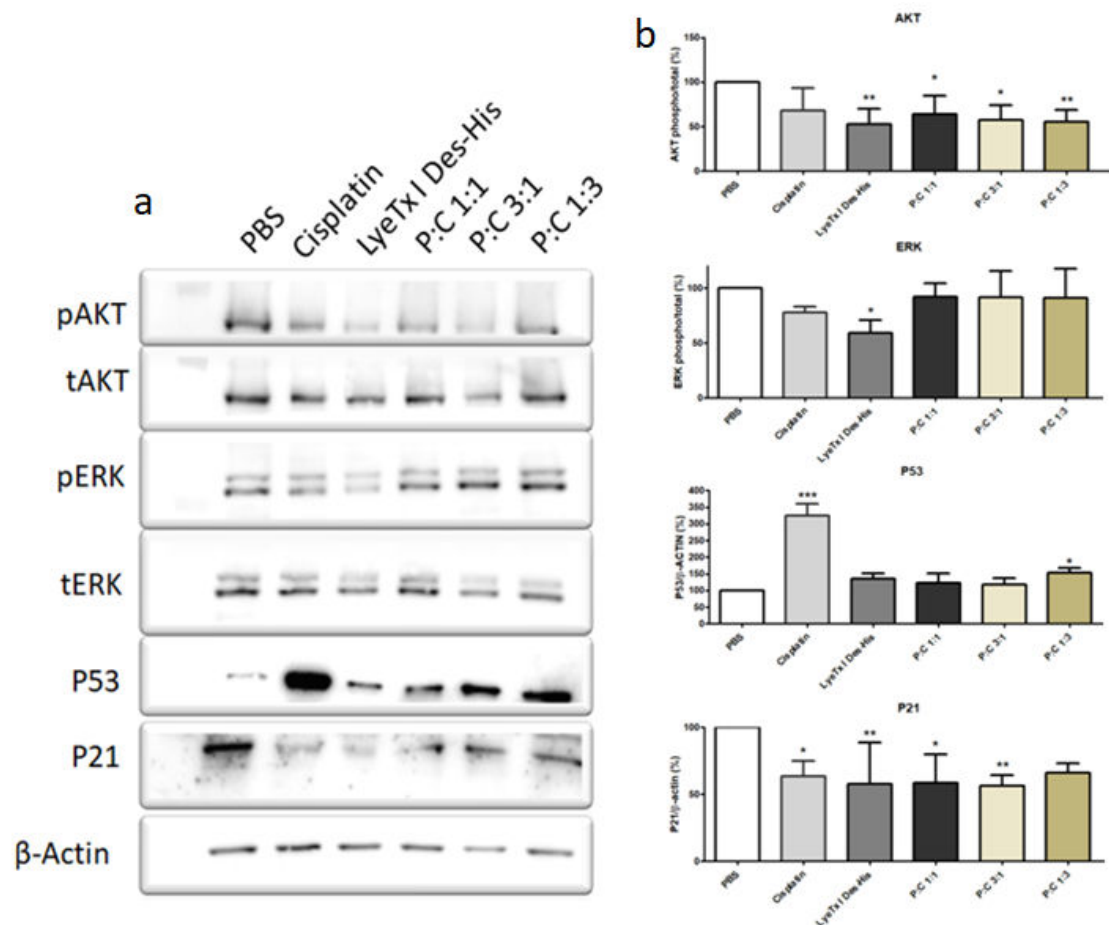


Figure 7: Effects of each treatment (in their respective IC₅₀ values) against MDA-MB-231 cells analyzed after 24 h by Western blot. AKT and ERK - the results show the phosphorylation pattern of these proteins

to each treatment. To P53 and P21 – the results show the expression pattern of these proteins. **a:** A representative Western blot showing the pattern found. **b:** Quantification of the proteins investigated (n=4). * means $p<0,05$; ** means $p<0,01$ and *** means $p<0,001$.

REFERENCES

- [1] Bray, F. et al doi: 10.3322/caac.21492
- [2] Anders, C. K. et al. doi: 10.1200/EDBK_159135
- [3] Gonçalves Jr., H. et al. doi: 10.1177/1179554918790563
- [4] Bauer, K. R. et al. doi: 10.1002/cncr.22618
- [5] Puhalla, S. et al. doi: 10.1016/j.molonc.2012.02.003
- [6] Wahba, H. & El-Hadaad, H. A. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030
- [7] Ismail-Khan, R. & Bui, M. M. doi: 10.1177/107327481001700305
- [8] Dasari, S. & Tchounwou, P. B. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- [9] Melnikov S. V. et al. doi: 10.1093/nar/gkw246
- [10] Kottschade, L. et al. doi: 10.1007/s00520-016-3080-y
- [11] Manohar, S. & Leung, N. doi: 10.1007/s40620-017-0392-z
- [12] Mokhtari, R. B. et al. doi: 10.18632/oncotarget.16723
- [13] Hanahan, D. et al. doi: 10.1172/JCI9872
- [14] Qiao, G. et al. doi:10.3390/ijms19103060

- [15] Su, X. et al. doi: 10.1186/2045-3701-4-7
- [16] Hazama, S. et al. doi: 10.1186/1479-5876-12-108
- [17] Reis, P. V. M. et al. doi: 10.3389/fmicb.2018.00667
- [18] Santos, D. M. et al. doi: 10.1007/s00726-009-0385-x
- [19] Abdel-Salam, M. A. L. et al. doi: 10.1007/s00726-018-2678-4
- [20] Fuertes, M. A. et al. doi: 10.2174/0929867033368484
- [21] Wang D. & Lippard S.J. doi: 10.1038/nrd1691
- [22] Chen, B. et al. doi: 10.7150/thno.16358
- [23] Jhan, J-R. and Andrechek, E. R. doi: 10.2217/pgs-2017-0117
- [24] De Luca, A. et al. doi: 10.1073/pnas.1903297116
- [25] Rocha, C. R. R. et al. doi: 10.6061/clinics/2018/e478s
- [26] Gomes, L. R. doi: 10.1038/s41419-019-1689-8
- [27] Mosmann, T. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [28] Tallarida, R. J. doi:10.1002/0471141755.ph0919s72
- [29] Tallarida, R. J. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. ISBN 9781584880455 - CAT# C0457
- [30] Chou, T. C. doi: 10.1124/pr.58.3.10
- [31] Nicoletti, I. et al. doi: 10.1016/0022-1759(91)90198-o
- [32] Murugan, S. et al. 10.1007/978-3-319-26666-4

- [33] Silver, D. P. et al. doi: 10.1200/JCO.2009.22.4725.
- [34] Valle, J. W. et al. doi: 10.1093/annonc/mdt540
- [35] Fleming, G. F. et al. doi: 10.1200/JCO.2004.07.184
- [36] Starobova¹, H. and Vetter, I. doi: 10.3389/fnmol.2017.00174
- [37] Miller, R. P. et al. doi: 10.3390/toxins2112490
- [38] Liu, J-q. et al. doi: 10.2147/TCRM.S165531
- [39] Kroemer, G. et al. doi: 10.1038/cdd.2008.150
- [40] Azzopardi, M. et al. doi: 10.1016/j.mad.2016.07.006
- [41] Denton, D. and Kumar, S. doi: 10.1038/s41418-018-0252-y
- [42] Dotiwala, F. et al. doi: 10.1073/pnas.1218065109
- [43] Mathiassen, S. G. et al. doi: 10.3389/fonc.2017.00051
- [44] Han, J. and Burgess, K. doi: 10.1021/cr900249z
- [45] Murugan, S. and Amaravadi, R. K. doi: 10.1007/978-3-319-26666-4_9
- [46] Nagelkerke, A. et al. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.05.004
- [47] Klionsky, D. et al. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
- [48] Honorato, J. et al. doi: 10.1002/jcp.29274
- [49] Shacka, J. J. et al. doi: 10.4161/auto.2703
- [50] Thome, M. P. et al. doi: 10.1242/jcs.195057
- [51] Cao, B. et al. doi: 10.1038/srep05749
- [52] Shao, X. et al. doi: 10.1038/srep35482
- [53] Palmieri, M. et al. doi: 10.1038/ncomms14338
- [54] Settembre, C. et al. doi: 10.1126/science.1204592.TFEB
- [55] Abbas, T. and Dutta, A. doi: 10.1038/nrc2657.p21

14.4. MATERIAIS UTILIZADOS NESTE PROJETO

REAGENTES

Água deionizada tipo Milli-Q

Ácido 2,2,2-Trifluoroacético (TFA) -
Vetec, grau espectroscopia

Acetonitrila (ACN) -J.T.Baker, grau
HPLC

Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -
ciano) - Sigma-Aldrich

Ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB)

Ácido 2-hidróxi-5-metoxibenzóico
(HMB) - Sigma-Aldrich

Resina Wang® de 0,75 mmol/g -
Sigma-Aldrich

Resina Rink Amide -Iris Biotech GmbH

N,N-dimetilformamida (DMF) - Synth

Diclorometano (DCM) - Synth

Metanol - Synth

Piperidina

2,2-diidroxí-hidrindeno-1,3-diona
(ninidrina) - Sigma-Aldrich

Piridina - Sigma-Aldrich

Hidroxibenzotriazol (HOBt) -Iris
Biotech GmbH

2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-
tetrametilurônio hexafluorofosfato
(HBTU) -Iris Biotech GmbH

N,N'- diisopropiletanolamina (DIPEA) -
Aldrich

N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC) -
Sigma-Aldrich

Leu *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-L-
leucina -Iris Biotech GmbH

Asn *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-
N- β -tritol-L-asparagina -Iris Biotech
GmbH

Phe *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-L-
fenilalanina -Iris Biotech GmbH

Ala *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-L-
alanina -Iris Biotech GmbH

Thr *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-O-
t-butil-L-treonina -Iris Biotech GmbH

Gln *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-
N- δ -tritol-L-glutamina -Iris Biotech
GmbH

Tyr *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-O-
t-butil-L-tirosina -Iris Biotech GmbH

Ser *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-O-
t-butil-L-serina -Iris Biotech GmbH

Met *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-
L-metionina -Iris Biotech GmbH

Val *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-L-
valina -Iris Biotech GmbH

His *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-*N*-
im-tritol-L-histidina -Iris Biotech GmbH

Pro *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-L-
prolina -Iris Biotech GmbH

Arg *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-
N-2,2,4,6,7-pentametil-
diidrobenzofurano-5-sulfonil-L-arginina
-Iris Biotech GmbH

Lys *N*- α -(9fluorenilmetiloxycarbonil)-
N- ϵ -t-butil-oxycarbonil-L-lisina -Iris
Biotech GmbH

4-Dimetilaminopiridina (DMAP) - Sigma-Aldrich	Tampão fosfato salino pH 7,3 (PBS) - Gibco (Invitrogen)
Triisopropilsilano (TIS) - Sigma-Aldrich	Diiodeto de 3,8-Diamino-5-[3-(dietilmetilamonio)propil]-6-fenilfenantridínio (Iodeto de propídio) - Sigma-Aldrich
1,2-etanoditiol (EDT) - Sigma-Aldrich	4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)phenil-poliethileno glicol (Triton X-100) - Sigma-Aldrich
Ágar Miller Hinton (ágar MH) - Difco	Citrato de sódio - Synth
Meio Miller Hinton (meio MH) - Difco	Hoechst dye - Sigma-Aldrich
Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) com L-glutamina e cloridrato de pirodoxina - Gibco (Invitrogen)	3,6-di-(dimetilamino) acridina (Laranja de acridina) - Sigma-Aldrich
Soro fetal bovino (SFB) -Gibco (Invitrogen)	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico (HEPES)
Solução de antibiótico e antimicótico 100X A5955 -Sigma-Aldrich	D (+) glicose (glicose) - Sigma-Aldrich
Tripsina-EDTA 10X (solução de tripsina) -Gibco (Invitrogen)	Sulfato de magnésio (MgSO ₄) - Synth
Sulforodamina B -Sigma-Aldrich	Cloreto de cálcio (CaCl ₂) - Synth
Ácido 2,2,2-Tricloroacético (TCA)	Sulforodamina B - Sigma-Aldrich
Ácido etanóico - Synth	Isopropanol - Synth
Tris-Base - Sigma-Aldrich	Ácido clorídrico (HCl) - Synth
Peptídeo LyeTx I Des-His (PepB) sintetizado pela GenOne	Soroalbumina bovina (BSA) - Sigma-Aldrich
Cis-diaminodicloroplatina (II) (Cisplatina) - Sigma-Aldrich	Anticorpo anti AKT1 DB Biotech, # DB 126 0.1
Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) - Sigma-Aldrich	Anticorpo anti ERK1/2 Invitrogen K.913.4, # MA5-1534
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) - Synth	Anticorpo anti fosfoAKT1 DB Biotech # DB 127 0.1
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) - Synth	Anticorpo anti fosfoERK1/2 Invitrogen S.812.9 # MA5-15173
Cloreto de sódio (NaCl) - Synth	Anticorpo anti β-actina Sigma RM112, # MATB523
Cloreto de potássio (KCl) - Synth	

APARELHOS UTILIZADOS

Estimulador elétrico com regulação de voltagem e amperagem -fabricação própria do grupo da FUNED

Cromatógrafo ÄKTA Explorer -GE Healthcare Life Sciences

Discovery® BIO WidePore C8 especificações: 250mm x 10 mm, 5 µm, (Coluna C8 semiprep) -Supelco™ (Sigma-Aldrich)

Discovery® BIO WidePore C8 especificações: 250mm x 4,6 mm, 5 µm, (Coluna C8 analítica) -Supelco™ (Sigma-Aldrich)

Espectrofotômetro BioMate 3S - Thermo Scientific

MALDI-TOF AutoflexIII - BrukerDaltonics

MALDI-TOF UltraflexII - BrukerDaltonics

Liofilizador

Cromatógrafo Shimadzu equipado com uma bomba, uma unidade de controle, um leitor de UV (munido de dois filtros) e um degaseador (HPLC Shimadzu).-Shimadzu Corporation

Estufa de incubação BOD

Estufa de incubação com CO₂ Series II Water Jacket -Thermo Scientific

Leitor multimodal de microplacas Varioskan Lux - Thermo Scientific

Citômetro de fluxo FACScan munido de filtros 530/30, 585/42, 670LP e laser

de excitação 488nm (FACScan) -BD Biosciences

Microscópio de fluorescência EVOS FL Cell Imaging System -Thermo Scientific

Aparelho de imagiologia ImageQuant LAS 4000 -GE Healthcare

AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS

Escherichia coli ATCC: 25922

Staphylococcus aureus ATCC: 33591

Candida albicans ATCC: 18804

Células MDA-MB-231 ATCC: HTB-26

Células MCF-7 ATCC: HTB-22

Células HCT 116 ATCC: CCL-247

Células HEK-293 ATCC: CRL-1573