

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

KAMILA DE SOUSA GOMES

**Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na
citotoxicidade de diferentes linhagens celulares**

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

KAMILA DE SOUSA GOMES

Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares

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 Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia, os ensaios de cultura celular foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ambos localizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no *Center for Alternatives to Animal Testing in Europe* (CAAT-EU), pertencente à *Universität Konstanz*, Alemanha. A aquisição de imagens por microscopia confocal foi realizada no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI, vinculado ao ICB-UFMG. A síntese dos peptídeos foi realizada no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Órgãos financiadores: CNPq, CAPES, FAPEMIG e INCTTOX.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, por esta oportunidade e por conseguir concluí-la.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Pimenta pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação e orientação que muito contribuíram para meu crescimento profissional.

À minha coorientadora Profa. Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes pela amizade, confiança depositada e por compartilhar seu conhecimento em cultivo celular.

À Profa. Dra. Maria Elena Lima pela colaboração e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes pela colaboração nos experimentos de microscopia.

Ao Prof. Dr. Marcel Leist por ter me recebido em seu laboratório e pela colaboração nos experimentos de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Frederic Frezard pela colaboração nos experimentos de lipossomas.

Ao Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende pela colaboração na síntese dos peptídeos.

Ao Jamil pela amizade e boa vontade de sempre ajudar quando precisava.

Ao Anderson pela paciência, amizade e pelas inúmeras ajudas.

Ao Henrique Santana por ter dado início ao estudo das Lunatins, abrindo caminho para meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, em especial, Amanda, Natália e Edleusa, pela amizade, colaboração e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular pela amizade e aprendizado.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

Aos meus queridos pais e irmãos pelo apoio, incentivo e palavras de carinho, sempre tornando mais fáceis e seguras minhas escolhas.

À banca examinadora pela disponibilidade e sugestões.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lunatinas.....	1
1.2 Peptídeos biologicamente ativos e peptídeos anticâncer (ACPs)	3
1.3 Morte celular induzida por ACPs	7
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO GERAL	13

CAPÍTULO 1

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. HIPÓTESE.....	14
5. METODOLOGIA	14
5.1 Síntese dos peptídeos	14
5.2 Purificação dos peptídeos	15
5.3 Confirmação da síntese e da purificação	16
5.4 Linhagens celulares e manutenção da cultura.....	16
5.5 Plaqueamento e tratamento das células para os ensaios de triagem, determinação da IC ₅₀ e de caracterização de morte celular	16
5.6 Determinação do conteúdo de DNA e análise de ciclo celular.....	17
5.7 Microscopia confocal utilizando os fluoróforos Hoechst 33342 e PI.....	18
5.8 Ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase.....	18
5.9 Detecção de exposição de fosfatidilserina por Anexina-V e marcação de DNA com iodeto de propídeo	19
5.10 Detecção de caspase-3 ativa	19
5.11 Detecção da atividade das caspases 8 e 9	20
5.12 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	20
5.13 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	20

5.14 Ensaio de internalização do peptídeo FITC-Lunatina-1 por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	21
5.15 Alanina Scan	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1 Obtenção do peptídeo sintético Lunatina-1	22
6.2 Avaliação da atividade antitumoral da Lunatina-1	25
6.3 Efeito da Lunatina-1 sobre a fragmentação do DNA	26
6.4 Efeito da Lunatina-1 na morfologia celular	27
6.5 Efeito da Lunatina-1 na ativação de caspases	31
6.6 Efeito da Lunatina-1 na produção de ROS	33
6.7 Efeito da Lunatina-1 no potencial de membrana mitocondrial.....	35
6.8 Ensaio de internalização do peptídeo Lunatina-1-FITC por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	36
6.9 Alanina Scan	39

CAPÍTULO 2

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. HIPÓTESE	41
5. METODOLOGIA.....	41
5.1 Linhagens celulares e manutenção da cultura.....	41
5.2 Plaqueamento e tratamento das células para determinação da IC ₅₀ e de caracterização de morte celular.....	42
5.3 Ensaio de neurotoxicidade em células LUHMES.....	42
5.4 Ensaio de clonogenicidade.....	43
5.5 Ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase.....	44
5.6 Microscopia de campo claro e de fluorescência	44
5.7 Avaliação de morte celular por necroptose utilizando Nec-1 como inibidor	45
5.8 Atividade hemolítica da Lunatina-1.....	45
5.9 Preparo de lipossomas e ensaio de liberação de Calceína-AM.....	45

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO 3	
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4. HIPÓTESE	59
5. METODOLOGIA.....	59
5.1 Obtenção dos peptídeos L1C3 e L1C3M.....	59
5.2 Caracterização estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	61
5.3 Ensaio para avaliação de atividade citotóxica/antimoral e de caracterização de morte celular para os peptídeos L1C3 e L1C3M.....	61
5.4 Ensaio de internalização de diversos peptídeos marcados por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	62
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1 Obtenção dos peptídeos sintéticos L1C3 e L1C3M.....	63
6.2 Caracterização estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	67
6.3 Ensaio para avaliação de atividade citotóxica/antitumoral e de caracterização de morte celular para os peptídeos L1C3 e L1C3M.....	68
6.4 Ensaio de internalização de diversos peptídeos marcados por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	76
7. DISCUSSÃO GERAL	80
8. CONCLUSÕES.....	88
9. PERSPECTIVAS	89
10. REFERÊNCIAS	90
11. ANEXOS.....	101
11.1 Lista de aminoácidos	101
11.2 Artigo	102
11.3 Certificado de premiação.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas tridimensionais resolvidas por RMN para os peptídeos Lunatina-1 e Lunatina-2.....	2
Figura 2: Descoberta de drogas peptídicas.....	4
Figura 3: Mecanismos de morte celular desencadeados por ACPs.	8
Figura 4: Ativação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose.....	9
Figura 5: Necrose programada: Necroptose... ..	11
Figura 6: Perfil cromatográfico do peptídeo Lunatina-1	22
Figura 7: Espectro de massas do peptídeo sintético Lunatina-1 obtido com sistema MALDI-TOF/MS.. ..	23
Figura 8: Sequenciamento do peptídeo Lunatina-1 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF.	24
Figura 9: A) Triagem da atividade antitumoral da Lunatina-1. B) Determinação da IC ₅₀ da Lunatina-1 em células HL60.....	25
Figura 10: Perfil de fragmentação de DNA em células HL60	27
Figura 11: Porcentagem de lise observada em células HL60.....	28
Figura 12: Microscopia nuclear de células HL60 tratadas com Lunatina-1 usando Hoechst 33342 e PI como marcadores.. ..	29
Figura 13: Exposição de fosfatidilserina e marcação com PI em células HL60	31
Figura 14: Efeito da Lunatina-1 na ativação de caspases	32
Figura 15: Efeito da Lunatina-1 na produção de ROS.. ..	34
Figura 16: Efeito da Lunatina-1 no potencial de membrana mitocondrial.....	36

Figura 17: Internalização do peptídeo Lunatina-1-FITC por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	38
Figura 18: Alanina Scan para o peptídeo Lunatina-1.....	40
Figura 19: Ensaio clonogênico em células MCF-7 e MDA-MB-231..	48
Figura 20: Morte celular na linhagem MDA-MB-231. A) Microscopia de campo claro B) Curva dose-resposta liberação de LDH e metabolização de Resazurina.....	50
Figura 21: Morte celular na linhagem MDA-MB-231 induzida por Lunatina-1.	51
Figura 22: Avaliação de morte celular por Necroptose na linhagem MDA-MB-231 utilizando Nec-1 como inibidor de RIPK-1.....	52
Figura 23: Liberação de Calceína-AM a partir de lipossomas de fosfatidilcolina.....	54
Figura 24: Atividade hemolítica da Lunatina-1.....	55
Figura 25: Neurotoxicidade em células LUHMES.	58
Figura 26: Obtenção de novas sequências peptídicas a partir do alinhamento entre Lunatina-1 e caspase-3.	60
Figura 27: Purificação do peptídeo sintético L1C3. A) Perfil cromatográfico o B) Espectro de massa obtido com sistema MALDI-TOF/MS.....	63
Figura 28: Purificação do peptídeo sintético L1C3M. A) Perfil cromatográfico. B) Espectro de massa obtido com sistema MALDI-TOF/MS.....	64
Figura 29: Sequenciamento do peptídeo L1C3 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF.	65
Figura 30: Sequenciamento do peptídeo L1C3M por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF..	66
Figura 31: Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos Lunatina-1 e L1C3.....	67
Figura 32: Ensaio clonogênico em células MCF-7 e MDA-MB-231.	70

Figura 33: Avaliação de morte celular na linhagem MCF-7.....	72
Figura 34: Avaliação de morte celular na linhagem MDA-MB-231.	73
Figura 35: A) Microscopia confocal em células MDA-MB-231 utilizando Hoechst, Calceína-AM e PI como marcadores B) Avaliação de morte celular por Necroptose na linhagem MDA-MB-231 utilizando Nec-1 como inibidor de RIPK-1.....	74
Figura 36: A) Atividade hemolítica para L1C3. B) Liberação de Calceína-AM a partir de lipossomas de fosfatidilcolina.....	75
Figura 37: Internalização dos peptídeos FITC-FIGLL-NH ₂ , TAMRA-LKTLTSFF-NH ₂ e TAMRA-LKKITNFF-NH ₂ por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	77
Figura 38: Internalização dos peptídeos FITC-FIGLL-NH ₂ e TAMRA-LKTLTSFF-NH ₂ por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	78
Figura 39: Internalização do peptídeo FITC-L1C3 por microscopia confocal em <i>Time-Lapse-Imaging</i>	79
Figura 40: Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da Lunatina-1 em células leucêmicas, HL60, por apoptose.....	80
Figura 41: Alinhamento obtido entre os peptídeos Lunatina-1 e L1C3 com proteínas do BLASTp.	83
Figura 42: : Mecanismo de inibição de caspases por IAPs e sua prevenção pelo antagonista DIABLO/Smac.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo Lunatina-1	24
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ para a Lunatina-1 em células MDA-MB-231 e MCF-7	47
Tabela 3: Citotoxicidade da Lunatina-1, Etoposídeo e Taxol sobre as linhagens HEK-293 e HepG2.....	56
Tabela 4: Neurotoxicidade da Lunatina-1 e Etoposídeo sobre células LUHMES	58
Tabela 5: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo L1C3	65
Tabela 6: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo L1C3M.....	66
Tabela 7: Porcentagem das principais estruturas secundárias encontradas para os peptídeos L1e L1C3	68
Tabela 8: Valores de IC ₅₀ ± DP (em µM) para os peptídeos L1C3 e L1C3M em diferentes linhagens celulares.....	69

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
α -KGDH	α -Cetoglutarato desidrogenase
α -GPDH	α - Glicerol-3-fosfato desidrogenase
BSA	Albumina sérica bovina
CTL	Controle
CD	Dicroísmo circular
DCM	Diclorometano
DCF	2',7'-dicloro-fluoresceína
DCFH ₂	2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína
DCFH-DA	2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	N,N- Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETO	Etoposídeo
Fmoc	Fluorenil-metil-oxicarbonila
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentração mínima inibitória de 50%

IPA	Álcool isopropílico
L1	Lunatina-1
LDH	Lactato Desidrogenase
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight
MS	Espectrometria de massa
Nec-1	Necrostatina-1
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Iodeto de Propídeo
PS	Fosfatidilserina
PSA	Persulfato de Amônia
ROS	Espécie reativa do oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano

RESUMO

GOMES, K.S **Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares.** 2018. 133 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

Lunatina-1 é um peptídeo composto por 13 resíduos de aminoácidos que foi isolado a partir do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus*. Neste estudo, o peptídeo sintético apresentou atividade frente a diferentes linhagens celulares tumorais, como HL60, MDA-MB-231 e MCF-7. Para as células HL60, uma linhagem de leucemia humana pró-mielocítica, foi observado que Lunatina-1 induziu apoptose pela ativação das vias extrínseca e intrínseca, observado pela ativação das caspases 3, 8 e 9. Também foi observado um aumento significativo na produção de ROS e perda parcial do potencial de membrana mitocondrial. Alterações morfológicas como condensação e fragmentação nuclear, fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina também foram constatadas. Além disso, foi verificada a internalização do peptídeo Lunatina-1 e a identificação de resíduos importantes para a atividade da Lunatina-1 por meio de Alanina-Scan. Lunatina-1 também foi avaliada em células de adeno carcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-231, assim como a toxicidade para células HepG2, HEK-293 e LUHMES. Ao contrário do observado para a linhagem HL60, Lunatina-1 induziu morte celular por alteração na permeabilidade da membrana plasmática na linhagem MDA-MB-231. Um novo peptídeo desenhado a partir da similaridade entre as sequências da Lunatina-1 e da caspase-3, denominado L1C3, também apresentou atividade citotóxica frente a diversas linhagens. Estudos de internalização relacionados ao novo peptídeo também foram realizados. Em conclusão, foram identificados dois peptídeos, Lunatina-1 e L1C3, com potencial antitumoral contra leucemia e câncer de mama, servindo como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

ABSTRACT

GOMES, K.S. **Structure-activity relationship of the synthetic peptide Lunatin-1 and analogues in the cytotoxicity of different cell lines.** 2018. p.1-133. Doctoral thesis – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

Lunatin-1 is a 13mer peptide isolated from the peruvian scorpion *Hadruroides lunatus* venom. In this study, the synthetic peptide exhibited activity against different tumor cell lines, such as HL60, MDA-MB-231 e MCF-7. In HL60 cells, a promyelocytic leukemia cell line, was observed that Lunatin-1 induced apoptosis by extrinsic and intrinsic pathways, due to activation of caspases 3, 8 and 9. We also observed a significant increase in ROS production and mitochondrial membrane potential loss. Morphological changes such as nuclear condensation and fragmentation, DNA fragmentation, and phosphatidylserine exposure were also observed. In addition, Lunatin-1 peptide was internalized and important amino acids residues were identified by Alanine-Scan. Lunatin-1 also was evaluated in human mammary adenocarcinoma cells, MDA-MB-231 and MCF-7, and your cytotoxicity in the HepG2, HEK-293 and LUHMES cells. In contrast to the HL60 cells, Lunatin-1 induced cell death by permeability changes of plasma membrane in the MDA-MB-231 cells. A new peptide designed from the similarity between the sequences of Lunatin-1 and caspase-3, denominated L1C3, also showed antitumor /cytotoxic activity against several cell lines. Internalization studies related to the new peptide were also performed. In conclusion, two peptides were identified, Lunatin-1 and L1C3, with antitumor potential against leukemia and breast cancer, as prototypes for the development of new drugs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lunatinas

Lunatinas são uma família de peptídeos, descritos por Santana (2012), que foram isolados a partir do veneno do escorpião *Hadruidoidea lunatus*.

O gênero *Hadruidoidea* (Pocock, 1893) pertence à família Iuridae e a subfamília Caraboctoninae, sendo um dos principais gêneros de escorpiões encontrados no Peru. Até o momento, 16 espécies do gênero *Hadruidoidea* foram registradas, das quais 13 são encontradas no Peru (OCHOA; PRENDINI, 2010). *H. lunatus* é a espécie predominante ao longo da costa do pacífico peruano, e sua picada não é considerada letal aos humanos, causando, principalmente, dor aguda e ardor (OCHOA, 2005).

A composição do veneno do escorpião *H. lunatus* ainda é pouca conhecida, sendo o primeiro estudo realizado por Zavaleta, Navarro e Castro de la Mata (1981), que descreveram alguns efeitos farmacológicos causados pelo veneno bruto em cobaias.

Escobar e colaboradores (2002) reportaram a presença de três proteínas básicas denominadas HI1, HI2 e HI3 no veneno do escorpião *H. lunatus*, estando estas relacionadas à paralisia de insetos, crustáceos e de extremidades de camundongos albinos, respectivamente. Escobar, Rivera e Tincopa (2003) ainda demonstraram que a injeção de HI3 em músculo estriado esquelético de camundongos aumentou a liberação de creatina cinase, lactato desidrogenase e de outras proteínas musculares.

Costal-Oliveira e colaboradores (2012) relataram a atividade proteolítica, hialuronidásica, fosfolipásica e cardiotoxica, além de propriedades imunoterapêuticas, após a injeção intracraniana e intraperitoneal do veneno bruto em camundongos. Em estudos mais recentes, alterações hematológicas e imunológicas foram observadas após a injeção da peçonha bruta em tecido subcutâneo de roedores (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2015). Também foram observadas modificações cardiorrespiratórias e pulmonares em camundongos tratados com o veneno bruto, além de interferência na contração de cardiomiócitos, devido alterações no transiente de cálcio (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2017).

Santana (2012) realizou o primeiro estudo sobre a diversidade peptídica encontrada no veneno do escorpião *H. lunatus*. Em seu trabalho, ele encontrou e sequenciou dois peptídeos biologicamente ativos, denominados Lunatina-1 e Lunatina-2. Lunatina-1 possui 13 resíduos de aminoácidos (FIGLLKTLTSFF-NH₂) e massa de 1441

Da, já Lunatina-2 (FLSTIANIVGGILGGGAL-NH₂) possui 18 resíduos e massa de 1670 Da (**Figura 1**).

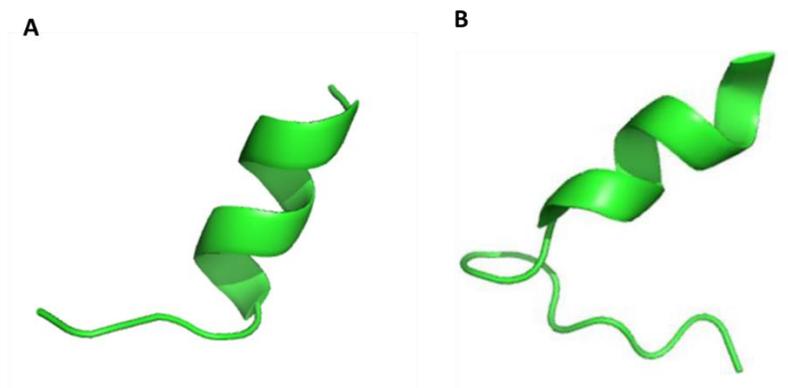


Figura 1: Estruturas tridimensionais resolvidas por RMN para os peptídeos **A)** Lunatina-1 e **B)** Lunatina-2 (Dados não publicados).

Lunatina-1 foi descrita como um peptídeo antimicrobiano por Santana (2012). O peptídeo sintético apresentou atividade contra bactérias gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus*), com valores de MIC entre 1,49 e 5,95 $\mu\text{mol/L}$; e contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*), com valores de MIC de 23,8 e 47,6 $\mu\text{mol/L}$; respectivamente.

Lunatina-2 não apresentou atividade antimicrobiana nas condições testadas. Entretanto, Costa (2016) e Motta (2017) descreveram a atividade inibitória de proteínas tirosina fosfatase (PTPs) pelos peptídeos sintéticos Lunatina-2 e análogos.

Costa (2016) descreveu uma potente atividade inibitória de Lunatina-2 contra uma tirosina fosfatase de *Yersinia enterocolitica* (YopH). Em seu trabalho, foi encontrado um valor de IC₅₀ de 1,37 μM para inibição de YopH, sendo o peptídeo um inibidor reversível do tipo misto, apresentando $K_i = 1,41 \mu\text{M}$ e $K_i' = 6,16 \mu\text{M}$. Lunatina-2 ainda apresentou seletividade à YopH em relação a outras fosfatases humanas, sendo um inibidor promissor de fosfatases bacterianas.

Motta (2017) testou oito peptídeos, dos quais Lunatina 2.1K apresentou melhor efeito inibidor para todas as PTPs testadas (PTP1B, LYP, PEST, PtpA, PtpB e YopH). Os valores de IC₅₀ para as PTPs bacterianas foram de 2,91 μM para YopH; 3,86 μM para PtpB e 3,85 μM para PtpA. Para as PTPs humanas, os valores observados foram de 3,95 μM para a PTP1B; 7,05 μM para PEST e 8,1 μM para LYP. Desta forma, Lunatina-2 e

Lunatina 2.1K podem servir de ponto de partida para o desenho de novos inibidores para esta classe de enzimas.

Lunatina-2 ainda parece estar relacionada à proliferação celular. Em seu trabalho, Lima-Batista (2018) observou um aumento do número de células HCT-116 quando tratadas com Lunatina-2 e seus análogos, Lunatina-2.1K e Lunatina-2.3K. Também foi observado que Lunatina-2 ativou AKT, proteína que está envolvida em vias de sinalização de sobrevivência e/ou proliferação celular, corroborando os achados de Costa (2016) e Motta (2017).

Tendo em vista os cenários e resultados acima expostos, neste trabalho iremos investigar o mecanismo de ação em diversos modelos celulares do peptídeo sintético Lunatina-1, assim como alguns peptídeos derivados, buscando ampliar o conhecimento acerca desta família de peptídeos descrita por nosso grupo de pesquisa.

1.2 Peptídeos biologicamente ativos e peptídeos anticâncer (ACPs)

A terapêutica peptídica tem desempenhado um papel notável na prática médica desde o advento da terapia de insulina na década de 1920, seguida da descoberta dos hormônios ACTH (Adrenocorticotrófico) em 1950, oxitocina e vasopressina em 1962 e calcitonina em 1971 (LAU; DUNN, 2018). Entretanto, recentemente, uma gama de peptídeos que interagem com outros alvos ultrapassou o número de peptídeos que interagem com receptores hormonais, interferindo em interações proteína-proteína, inibindo alvos moleculares e interagindo com receptores tirosina-cinase (LAU; DUNN, 2018).

Até o momento, mais de 60 drogas peptídicas foram aprovadas nos Estados Unidos, Europa e Japão; mais de 150 encontram-se em desenvolvimento clínico ativo e aproximadamente 260 já foram testadas em humanos. As áreas de maior interesse da indústria farmacêutica (**Figura 2**) para o uso de peptídeos são as de doenças metabólicas, oncologia e doenças cardiovasculares (LAU; DUNN, 2018). ByettaTM (exenatide), BydureonTM (exenatide), VictozaTM (liraglutide), LyxumiaTM (lixisenatide) e TanzeumTM (albiglutide) são alguns exemplos de drogas peptídicas que foram introduzidas no mercado com grande sucesso comercial (FOSGERAU K.; HOFFMANN, 2015).

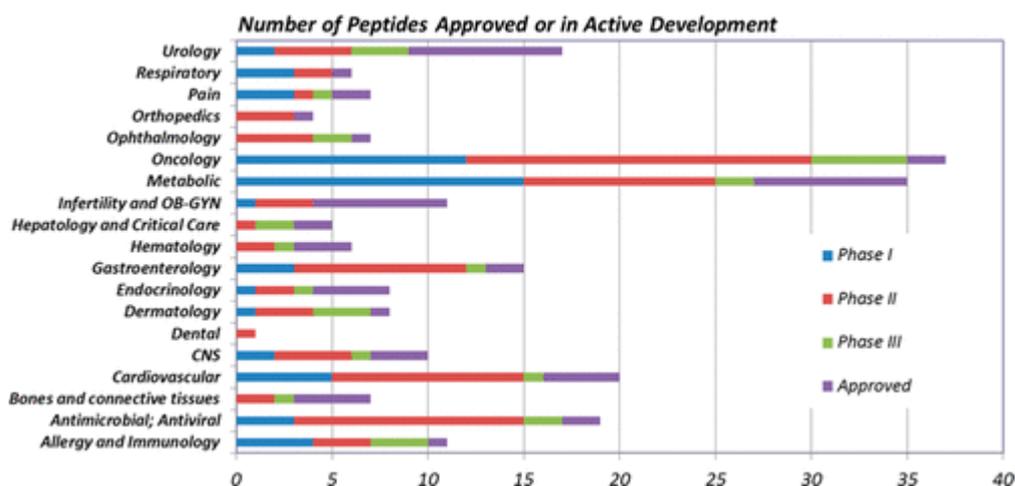


Figura 2: Descoberta de drogas peptídicas. Fonte: HENNINOT, COLLINS, NUSS, 2018.

Peptídeos são uma das principais opções para o desenvolvimento de novos fármacos por serem de tamanho pequeno, relativamente fáceis de serem sintetizados, e por terem boa eficácia, segurança e tolerabilidade, alta seletividade e potência além de metabolismo previsível (FOSGERAU K.; HOFFMANN, 2015; HENNINOT, COLLINS, NUSS, 2018).

Venenos animais são uma fonte em diversidade peptídica (AILI et al., 2014). Peptídeos com atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, inseticida, antitumoral, entre outras, têm sido descritos em diversas espécies, incluindo insetos, peixes, sapos, aranhas e escorpiões (BEA; PETRAGLIA; JOHNSON, 2015; RODRIGUES et al., 2009; LIU et al., 2012).

Fármacos de origem peptídica isolados a partir de venenos animais têm sido descritos na literatura. O Captopril[®], por exemplo, teve sua origem a partir de peptídeos potenciadores de bradicinina, isolados do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, sendo hoje um dos anti-hipertensivos mais vendidos pela indústria farmacêutica (PIMENTA; DE LIMA, 2005; ROBINSON et al., 2017; HENNINOT, COLLINS, NUSS, 2018).

Eptifibatide[®] e Tirofiban[®] são outros exemplos de fármacos derivados de peptídeos isolados do veneno das serpentes *Echis carinatus* e *Sistrurus miliariu*, respectivamente. Ambos foram desenhados a partir de peptídeos ricos em ligações dissulfeto, denominados Desintegrinas, e apresentam atividade antiplaquetária, sendo utilizados no tratamento de síndromes coronárias. Bivaluridin[®] é outro fármaco com ação anticoagulante obtido a partir do peptídeo Hirudina, isolado da sanguessuga *Hirudo*

medicinalis. (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2017; ROBINSON et al., 2017).

Outros peptídeos biologicamente ativos e isolados a partir de venenos animais também são fortes candidatos a protótipos de novo fármacos, como os peptídeos da família TsHpt, isolados do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, e o peptídeo PnPP-19, desenhado a partir da estrutura primária da toxina PnTx2-6 da aranha *Phoneutria nigriventer* (VERANO-BRAGA et al., 2008, 2010; FREITAS et al., 2017; SILVA et al., 2015).

TsHpt - *Tityus serrulatus* Hipotensinas - apresentam efeito potenciador da bradicinina, apresentando atividades hipotensoras e anti-hipertensiva. Esta família possui sequências primárias distintas de outros peptídeos já descritos com atividade hipotensora, tornando-se atrativos para o desenho de fármacos (VERANO-BRAGA et al., 2008, 2010). A TsHpt-I (também denominada Ts14) também possui atividades angiogênica e anti-inflamatória, que ocorre por meio da modulação da infiltração de leucócitos, além de atenuar a deposição de colágeno, como descrito recentemente por Cassini-Vieira e colaboradores (2017).

PnPP-19 vem sendo estudado como um fármaco para o tratamento da dor e da disfunção erétil (FREITAS et al., 2017; SILVA et al., 2015). PnPP-19 induz efeito antinociceptivo no sistema central e periférico via ativação de receptores canabinóides e opióides (FONSECA et al, 2016; FREITAS et al., 2016). PnPP-19 também foi capaz de induzir ereção em ratos através da ativação da via óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico, além disso apresentou baixa toxicidade e imunogenicidade em camundongos (SILVA et al., 2015). PnPP-19 foi patenteado por nosso grupo de pesquisa e a tecnologia licenciada para a empresa Biozeus, e se encontra atualmente em fase de testes pré-clínicos para o tratamento da disfunção erétil com resultados bastante promissores.

Outra classe de peptídeos amplamente estudada é a dos antimicrobianos (HARRISON et al., 2014). Peptídeos antimicrobianos (AMPs) possuem algumas características físico-químicas comuns, como tamanho pequeno e anfipaticidade, com regiões ricas em resíduos catiônicos e hidrofóbicos (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Estes AMPs podem ser agrupados, de acordo com suas características estruturais, em três principais grupos: 1) estrutura predominante em α -hélice; 2) conformação- β estabilizada por cisteína e 3) estrutura randômica (RODRIGUES et al., 2009).

Devido à algumas semelhanças estruturais, peptídeos antimicrobianos também apresentam atividade antitumoral (FELÍCIO et al., 2017). Peptídeos anticâncer (ACPs)

geralmente são descritos como peptídeos em α -hélice, conformação- β , randômica ou cíclica (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008) entretanto, ao contrário do observado para AMPs, para ACPs não é possível correlacionar estrutura e atividade antitumoral (RODRIGUES et al., 2009).

De acordo com o banco de dados APD (*The Antimicrobial Peptide Database*) dos 2981 peptídeos depositados, 215 tem apresentado alguma atividade antitumoral, correspondendo a 7,2% do total de entradas. (Disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Acessado em 05/06/2018).

ACPs podem ser classificados em dois grandes grupos, o primeiro inclui os ACPs que atuam apenas contra bactérias e células cancerígenas, como as Cecropinas e Magaininas; e o segundo grupo composto pelos ACPs que atuam em todos os tipos de células: bacterianas, tumorais e normais, como as Defensinas HNP-1 to 3 (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013).

ACPs podem atuar tanto em tumores hematológicos quanto em tumores sólidos, sendo que alguns peptídeos atuam nestes dois tipos de tumores, podendo, inclusive, induzir morte celular por mecanismos diferentes, como é o caso dos peptídeos MG2A (Magainina 2A) e derivados da Magainina que podem induzir tanto necrose quanto apoptose (LIU et al., 2013; CRUCIANI et al., 1991).

Segundo Kuo e colaboradores (2018), o peptídeo MSP-4, isolado da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), foi capaz de ativar as vias intrínseca e extrínseca de apoptose na linhagem MG63 (osteosarcoma). LaBelle e colaboradores (2012) sintetizaram um peptídeo grampeado de 21 resíduos, usando o domínio BH3 da proteína pró-apoptótica BIM como modelo. Este peptídeo apresentou atividade antitumoral contra linhagens leucêmicas, induzindo apoptose devido ao bloqueio de BCL-2 e ativação de BAX, favorecendo a liberação do citocromo C.

A Lactoferricina, outro peptídeo com atividade antitumoral, induz morte celular via alterações no potencial de membrana mitocondrial, liberando citocromo C e ativando a cascata apoptótica. Entretanto, também foi demonstrado que a Lactoferricina tem efeito antiangiogênico, devido interação com glicosaminoglicanos e heparan sulfato, impedindo a proliferação celular devido impedimento da ligação de fatores de crescimento a seus receptores (GASPAR et al., 2013; MULDER et al., 2013).

Recentemente, o peptídeo Daunorubicinina (que contém 10 resíduos de aminoácidos) bioconjugado com o hormônio GnRH-III (gonadotrofina) mostrou-se capaz de induzir apoptose em células de carcinoma colorretal (KAPUVÁRI et al., 2016).

Peptídeos como o WP1-Zn (isolado a partir da noz e complexado com zinco) mostraram efeito antiproliferativo e apoptótico em células de carcinoma mamário humano, linhagem MCF-7 (LIAU et al., 2016); outro peptídeo isolado a partir da *Brassica campestris L.*, o RSP-4-3-3, um tripeptídeo Trp-Thr-Pro de 408.2 Da, inibiu a proliferação de células da linhagem HepG2, células de hepatocarcinoma humano (WANG et al., 2016). Além disso, ACPs também têm sido objetos de estudo para o desenvolvimento de vacinas, de modo a estimular células T CD4⁺ e CD8⁺ contra células tumorais (WALKER et al., 2016).

ACPs podem ainda serem utilizados em combinação com quimioterápicos convencionais, objetivando-se um efeito sinérgico para o tratamento, devido à potencialização do efeito citotóxico (SIEDLAKOWSKI et al., 2008). Como exemplo, temos a Luteolina, que foi capaz de induzir apoptose em células de hepatocarcinoma quando em sinergia com o composto 5-fluorouracil (XU et al., 2016); os peptídeos HPRP A1 e A2 associados a Doxorubicina também foram capazes de induzir apoptose em células HeLa (adenocarcinoma da cérvix) *in vitro* e *in vivo* (ZHAO et al., 2014).

1.3 Morte celular induzida por ACPs

Os principais mecanismos de morte celular descritos para ACPs contra tumores sólidos e hematológicos são a indução de necrose e apoptose. Entretanto, ACPs podem inibir a síntese de DNA, interferir na angiogênese do tumor, promover atividades imunomodulatórias e associar-se a receptores de membrana (**Figura 3**) (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013).

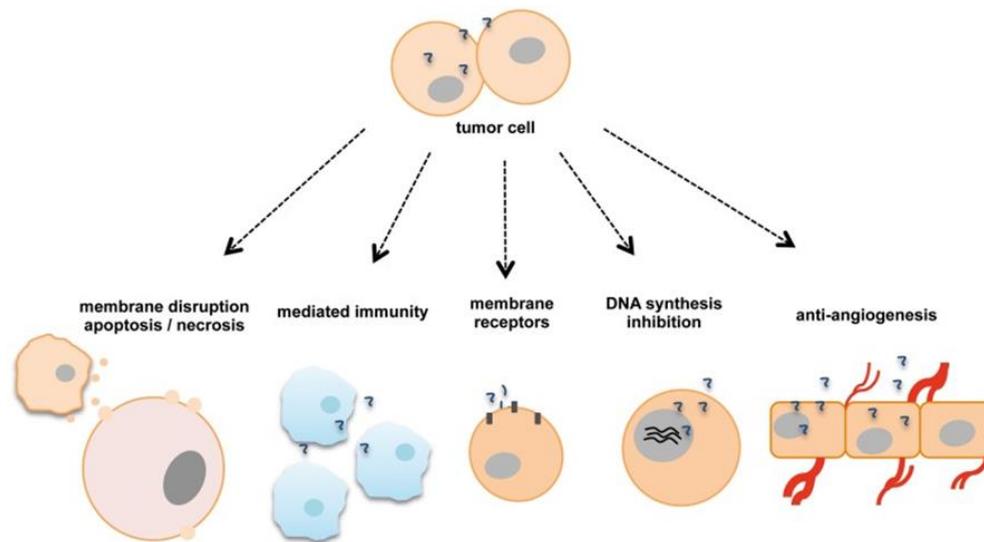


Figura 3: Tipos de mecanismos de morte celular desencadeados por ACPs. Adaptado de: GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013.

A apoptose, ou morte celular programada, foi descrita por Kerr e colaboradores em 1972, e é caracterizada morfológicamente pela condensação nuclear e citoplasmática, clivagem da cromatina, integridade da membrana plasmática e pela formação de corpos apoptóticos. É um processo de morte celular mais complexo que a necrose e que envolve a participação de vias de sinalização e ativação de caspases (FINK, COOKSON, 2005; KALKAVAN, GREEN, 2018).

Caspases são cisteíno-proteases produzidas na forma de zimogênios e podem ser divididas em dois grupos com base no papel desempenhado na morte celular. O primeiro compreende as caspases iniciadoras -2, -8, -9, e -10, responsáveis pela ativação da cascata de caspases; e o segundo grupo composto pelas caspases efetoras -3, -6, e -7, responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas nas células (FINK, COOKSON, 2005).

A via clássica de apoptose ou caspase-dependente pode ser dividida em extrínseca e intrínseca (ZHENG et al., 2011). A via extrínseca (**Figura 4**) inicia-se na membrana citoplasmática a partir de receptores de morte do tipo CD95 (APO-1/Fas), TRAILR e TNFR, sendo estes receptores ativados pelos seus ligantes (Fas-L, TRAIL ou TNF- α). A estimulação destes receptores ocasiona o recrutamento das moléculas citoplasmáticas adaptadores FADD (*Fas-associated death domain*) ou TRADD (*TNFR-associated death domain*) e dos monômeros de pró-caspase-8/10 ao DISC (*death-inducing signaling*

complex), seguidos da ativação das caspases -8 e -10, com subsequente ativação das caspases efetoras (MCLLWAIN et al., 2013).

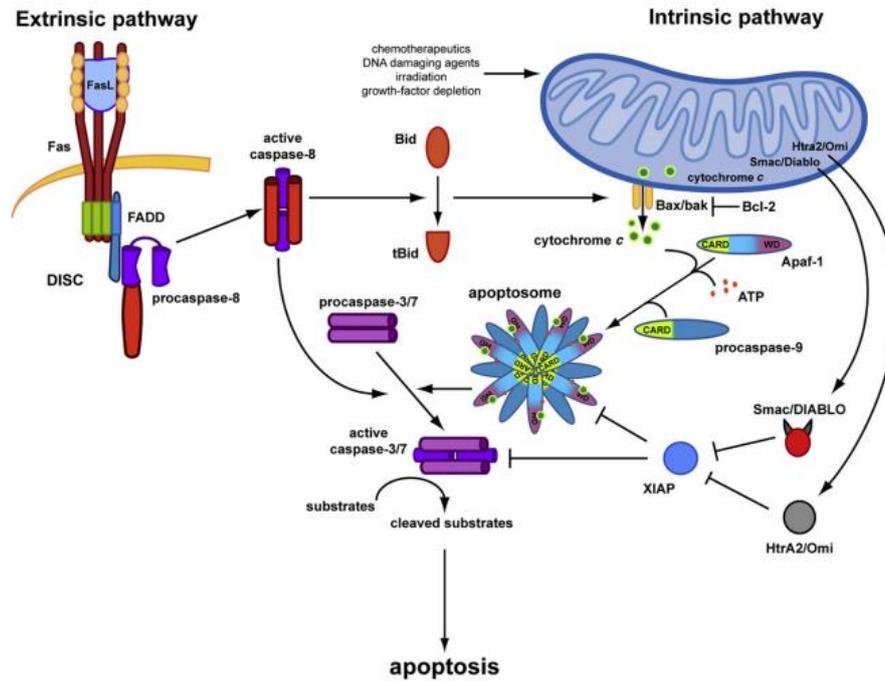


Figura 4: Ativação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose. Fonte: LAMKANFI; DIXIT, 2010.

Já na via intrínseca, ou mitocondrial, (**Figura 4**) é observada a participação e liberação de citocromo C, alterações no potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspase-9 e participação de proteínas na família Bcl-2 (pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk; e anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1), sendo o balanço entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas que determina o início da apoptose (D'SUZE et al., 2010).

A partir do estímulo para ativação da via intrínseca, como danos ao DNA, estresse oxidativo e proteínas da família Bcl-2, ocorrerá a formação de um poro de permeabilidade transitória na membrana externa da mitocôndria que favorecerá a liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo C, Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 (MCLLWAIN et al., 2013).

O citocromo C ao ser liberado se liga ao Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) e à pró-caspase-9, essa ligação, na presença do ATP, forma o apoptossomo, a partir do qual é liberada caspase-9 ativa. Citocromo C ainda pode ser liberado após

ativação da via extrínseca, via Bid, ativando também caspase-9 (KALKAVAN, GREEN, 2018; SARVOTHAMAN et al., 2015).

As caspases também podem ser ativadas pelas Smac/DIABLO ou Omi/HtrA2, elas ligam-se às proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), antagonizando os efeitos inibitórios sobre as pró-caspases -3 e -9, que são liberadas na sua forma ativa. Caspase-3/7 (RIEDL et al., 2001), por sua vez, são ativadas e como consequência, a morfologia da célula e o ciclo celular são alterados, por fim, os corpos apoptóticos são englobados por fagócitos que reconhecem a fosfatidilserina exposta. (WONG, 2011; PINTO et al., 2011).

Mecanismos de apoptose ativados por ACPs podem acontecer via interação com receptores de morte, como Fas-L, levando à ativação de caspase-8, ou via permeabilização da membrana mitocondrial após a internalização, com liberação de citocromo C e subsequente ativação de caspases (RODRIGUES et al., 2009).

Dois peptídeos, Neopladine 1 e 2, isolados a partir do veneno do escorpião *Tityus discrepans* apresentaram potencial apoptótico pela indução de FasL e Bcl-2 para a linhagem SKBR3 de carcinoma mamário humano (D'SUZE et al., 2010).

ACPs capazes de ativar a via mitocondrial já foram descritos (ZHENG et al., 2011) com liberação de citocromo C, diminuição da expressão de Bcl-2 e consequente ativação de caspase-3. Peptídeos que interferem na regulação da progressão do ciclo celular ativando diretamente as vias JNK e p38 MAPK também podem desencadear a liberação de citocromo C e subsequente ativação da cascata de caspases conforme descrito por Bhattacharya et al., (2013). ACPs que interferem na angiogênese do tumor e na estabilidade tubulina-microtúbulo tem mostrado citotoxicidade pela perda da ancoragem celular, ativando um mecanismo apoptótico conhecido como anoikis (NOWATZKI et al., 2012).

A necrose, outro mecanismo de morte comumente induzida por ACPs, é ativada por mecanismos ligados à membrana, como a ruptura, despolarização e formação de poros. A alta expressão de moléculas aniônicas (fosfatidilserina, mucinas-O-glicosiladas) por células tumorais podem favorecer a interação eletrostática entre os componentes da membrana e os ACPs, contribuindo para o surgimento de poros ou lise da membrana (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

São características morfológicas do processo de morte celular por necrose: picnose (condensação do DNA), cariólise (degradação do DNA) e perda da integridade da membrana (GALLUZZI et al., 2012). Além disso, é comum uma resposta inflamatória

em tecidos, devido ao extravasamento do conteúdo celular rico em proteases e outras substâncias tóxicas que atraem as células do sistema imune (FINK, COOKSON, 2005).

No final da década de 80, descobriu-se que a necrose também pode ser ativada de forma programada, sendo este mecanismo denominado necroptose (**Figura 5**). Os processos bioquímicos que caracterizam a necroptose são: ativação de receptor de proteína cinase (RIPK1 e RIPK3), explosão metabólica associada a superprodução de ROS bem como permeabilização da membrana lisossomal e mitocondrial (KEPP, 2011). A liberação de calpaínas e catepsinas, que são cisteíno-proteases dependentes de cálcio, a partir do retículo sarcoplasmático e dos lisossomos, respectivamente, favorece a proteólise e consequente morte celular (LAMKANFI; DIXIT, 2010).

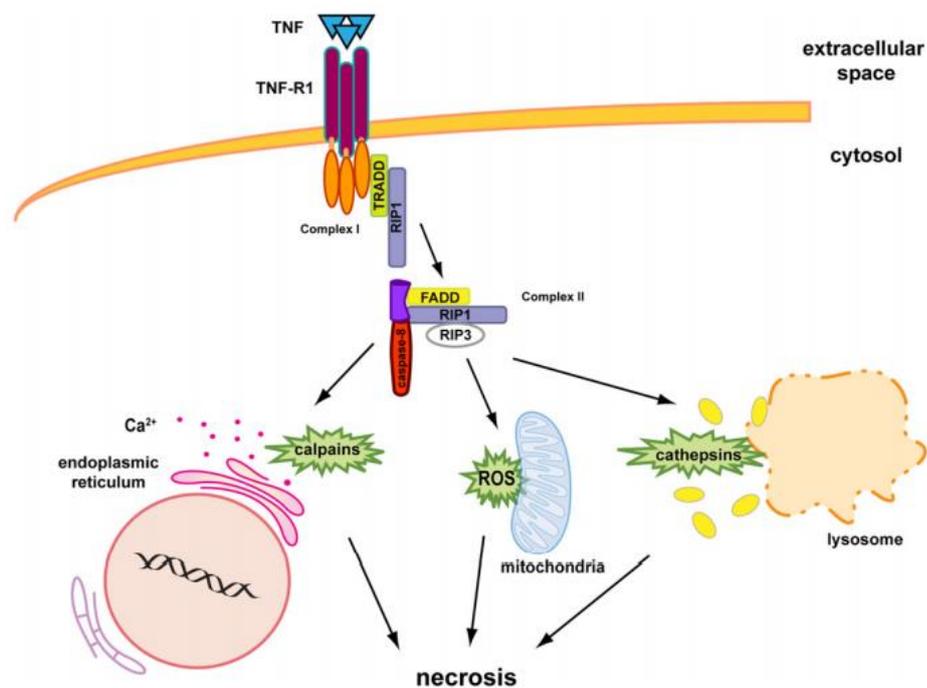


Figura 5: Necrose programada: Necroptose. Fonte: LAMKANFI; DIXIT, 2010.

2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos envolvendo a família das Lunatinas têm sido desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa. A busca por peptídeos protótipos com atividades biológicas, sobretudo atividade antitumoral, antimicrobiana e inibidora de proteínas tirosina fosfatases tornou-se nosso foco principal.

Dentro deste contexto, nosso grupo identificou o peptídeo Lunatina-1 que apresentou uma atividade citotóxica interessante para células tumorais humanas, como HL60, MDA-MB-231 e MCF-7 (dados não publicados). Assim, Lunatina-1 se caracterizou como um peptídeo promissor ao desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral, principalmente contra leucemia e tumores de mama. Tratamentos como a excisão do tumor por meio de cirurgia, o transplante de medula óssea, a radioterapia e a quimioterapia nem sempre são eficazes no combate ou controle da doença, sendo indispensável a busca por novos compostos com potencial farmacológico contra o câncer.

Nesta tese, apresentada em três capítulos, foi realizado um estudo de relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1, assim como dos peptídeos derivados, para avaliar a citotoxicidade dos mesmos usando como modelo preditivo, linhagens de células tumorais e não tumorais. No capítulo 1, foi descrita a atividade antitumoral e o mecanismo de morte celular desencadeado pela Lunatina-1 sobre a linhagem HL60, uma linhagem de leucemia humana pró-mielocítica. Além disso, foi verificada a internalização do peptídeo e a identificação de resíduos importantes para a atividade da Lunatina-1 por meio de Alanina-Scan. No capítulo 2, foi abordado o mecanismo de morte celular desencadeado pela Lunatina-1 em células de adecarcinoma mamário humano, MDA-MB-231 e MCF-7; assim como um estudo de citotoxicidade em diferentes modelos celulares (HEK-293, HepG2 e LUHMES). No capítulo 3, foi introduzido um novo peptídeo, L1C3, desenhado a partir da Lunatina-1. A atividade antitumoral/citotóxica foi descrita e estudos de internalização relacionados ao novo peptídeo também foram realizados.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar a relação entre a estrutura do peptídeo sintético Lunatina-1, e peptídeos derivados, e sua atividade citotóxica para células tumorais e não tumorais; e avaliar seu potencial como um protótipo útil para o desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Para o alcance deste objetivo, foram traçados alguns objetivos específicos para caracterização da atividade farmacológica e citotóxica da Lunatina-1 e seus derivados em modelos celulares. Células de leucemia humana (HL60) e de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF-7) foram os modelos escolhidos para investigação do mecanismo citotóxico. Os objetivos específicos serão descritos a seguir em três capítulos, bem como os respectivos resultados e discussão, como citado previamente.

Capítulo 1:

Mecanismo citotóxico da Lunatina-1 em células leucêmicas HL60

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obter o peptídeo sintético Lunatina-1;
- 2) Caracterizar o tipo de morte celular induzida pela Lunatina-1 no modelo celular escolhido: linhagem HL60;
- 3) Observar as alterações morfológicas causadas pela Lunatina-1 em células HL60;
- 4) Caracterizar as principais vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação da Lunatina-1 em células HL60;
- 5) Verificar a possível internalização da Lunatina-1 em células HL60, utilizando a marcação com FITC (FITC-Lunatina-1) em microscopia confocal;
- 6) Realizar o estudo da relação entre a estrutura da Lunatina-1 e sua atividade citotóxica por meio de Alanina Scan.

4 HIPÓTESE

Lunatina-1 é internalizado e atua como um peptídeo pró-apoptótico na linhagem HL60.

5 METODOLOGIA

5.1 Síntese dos peptídeos

A síntese foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Merrifield (1969), utilizando síntese manual em fase sólida.

O tubo de síntese contendo resina Rink-Amide® foi lavado três vezes com 2mL de DCM (diclorometano) durante 10 minutos, em seguida, foram adicionados 4 mL de

piperidina 20%, deixando sob agitação por 20 minutos. Em seguida, a resina foi lavada com 2 mL de DMF (dimetilformamida) e IPA (álcool isopropílico), um por vez, repetindo esta etapa 3 vezes. Posteriormente, foram feitas três lavagens consecutivas com 2 mL de DCM (diclorometano). Para dar início a etapa de acoplamento, o primeiro aminoácido a ser acoplado foi adicionado juntamente com os ativadores da sua função carboxila, o HOBt (hidroxibenzotriazol) e o DIC (diisopropilcarbodiimida), utilizando DMF e DCM (2:1) como solventes. A reação foi mantida sob agitação durante 3 horas.

Após acoplagem, três novas lavagens com DMF, IPA e DCM foram realizadas. Para dar início à etapa de desproteção, o grupamento FMOC do aminoácido acoplado foi removido com piperidina 20%, durante 20 minutos. Ao final desta etapa, três novas lavagens com DMF, IPA e DCM foram realizadas.

O segundo e demais aminoácidos da sequência peptídica foram acoplados seguindo este mesmo ciclo de acoplagem/desproteção, e após o acoplamento do último resíduo, o peptídeo foi clivado da resina. Nesta etapa, os grupos protetores da cadeia lateral também foram removidos, utilizando uma solução contendo 2.5% de TIS (triisopropilsilano), 2.5% de água destilada e 95% de TFA (ácido trifluoroacético), mantendo sob agitação durante 3 horas. Em seguida, esta solução foi centrifugada, por 5 minutos a $800 \times g$, com éter diisopropílico gelado, sendo este passo repetido por 4 vezes. O precipitado foi seco com fluxo controlado de nitrogênio gasoso, obtendo assim o peptídeo bruto.

5.2 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos foram purificados em sistema de *High-performance liquid chromatography* (HPLC) utilizando o equipamento Äkta Explorer 100 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e coluna semi-preparativa de fase reversa *Discovery® BIO Wide Pore* C18 (25 cm x 10 mm). A coluna foi previamente equilibrada com 20 mL de solução A (0,1% de TFA em água) e de solução B (0,1% de TFA em acetonitrila), de modo a iniciar com 25% de solução B. Em seguida, foram aplicados 10 mg do produto de síntese e o gradiente com a solução B foi aumentado gradativamente até 100%. A eluição foi acompanhada por monitoramento da absorvância a 214 e 280 nm. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 5 mL/min, pressão de 12 MPa e frações de 1,0 mL foram coletadas. As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas em sistema

MALDI-TOF, como descrita no item X. As frações puras foram agrupadas, liofilizadas e armazenadas para uso.

5.3 Confirmação da síntese e da purificação

A confirmação da síntese e da purificação foi realizada por meio de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF em aparelho AutoFlex IIITM (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) operando no modo refletido, polaridade positiva e utilizando calibração externa. Para validação da estrutura primária, as amostras foram analisadas no modo LIFT. Foram aplicados em cada *spot* 0,5µL de amostra em uma placa AnchorChipTM 600/384 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), seguidos de 0,5µL de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHCA). Os softwares Flex-ControlTM e Flex-AnalysisTM foram utilizados para execução e análise, respectivamente.

5.4 Linhagens celulares e manutenção da cultura

Células Jurkat (leucemia de células T humana), HL60 (leucemia pró-mielocítica humana), THP1 (leucemia monocítica aguda humana) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) foram cultivadas em meio RPMI, contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino, enquanto as células MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano estrógeno-dependente) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano) foram cultivadas em meio DMEM contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino. Ambos foram tratados com 1% de solução antibiótica (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Todas as linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo em estufa a 37°C com atmosfera úmida de CO₂ a 5% (v/v).

5.5 Plaqueamento e tratamento das células para os ensaios de triagem, determinação da IC₅₀ e de caracterização de morte celular

Para a triagem do efeito da Lunatina-1 sobre algumas linhagens celulares foram plaqueadas 50.000 células/poço (HL60) e 100.000 células/poço (Jurkat e THP-1). Para as células MDA-MB-231, MCF-7 e HCT-116 foram plaqueadas 10.000 células/poço, em placas de 96 poços. Lunatina-1 (50µM) foi testada durante 48h de incubação e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução mitocondrial do brometo de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), conforme descrito por Mosmann, (1983).

Para a determinação da concentração mínima inibitória (IC₅₀) da Lunatina-1 sobre a linhagem HL60, foram plaqueadas 50.000 células/poço em placas de 96 poços. Diluições seriadas a partir de 100 µM foram testadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 µM). Após 48h de tratamento a viabilidade celular foi avaliada pelo método de Resazurina, conforme descrito por Gartlon et al. (2006).

Para os ensaios de caracterização de morte celular foram plaqueadas 200.000 células/360µL meio/poço da linhagem HL60 em placas de poliestireno de 24 poços.

Posteriormente, as células foram tratadas com Lunatina-1 na concentração de 50 µM, concentração escolhida por estar próxima ao valor de IC₅₀ encontrado, pelos tempos estabelecidos de acordo com cada ensaio. Etoposídeo (50 µM) foi utilizado como controle positivo e DMSO (0,05%) como controle negativo. O peptídeo foi solubilizado em DMSO e PBS mantendo a concentração final de 0,05% de DMSO.

5.6 Determinação do conteúdo de DNA e análise de ciclo celular

A quantificação de DNA subdiplóide e a análise do ciclo celular foram realizadas em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Nicoletti e colaboradores (1991).

As células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas com Lunatina-1 (50 e 25 µM), Etoposídeo (50 µM) e DMSO (0,5%) durante 24 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas a 300×g durante 5 min e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado, foram adicionados 300µL de uma Solução Fluorocrômica Hipotônica (HFS), contendo 50 µg/mL de Iodeto de Propídio (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e 0,1% de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA), e incubado por 4h a 8°C, ao abrigo de luz. A análise do conteúdo de DNA subdiplóide e do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo (FAScan, BD®). O canal FL2 foi ajustado de modo que as fases G0/G1 e G2/M formassem picos em 200 e 400, respectivamente. Os dados foram analisados com o auxílio do *software* FlowJo® versão 10.1, sendo que para isso, foram realizadas aquisições em FL2-A e FL2-W.

A fragmentação do DNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Grimberg et al. (1989). A

concentração de DNA foi determinada por leitura da absorvância a 260 nm em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific). A eletroforese foi conduzida em tampão TAE-1X a 100V e 500 mA. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado em transiluminador.

5.7 Microscopia confocal utilizando os fluoróforos Hoechst 33342 e PI

Células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas com o peptídeo Lunatina-1 a 50 µM por 3, 6 e 24 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 300×g durante 5 min. O sobrenadante foi retirado, o precipitado foi lavado uma vez com PBS e, posteriormente, submetido a mais uma etapa de centrifugação. O precipitado foi então ressuscitado com 300µL da solução (10µg/mL) de Hoechst 33342 (Sigma) e PI (Sigma) e mantido por 15 min em ambiente protegido de luz e, em seguida, foram aplicados 10 µL sobre uma lâmina de vidro recoberta por uma lamínula. A marcação foi visualizada em microscópio confocal 5 LIVE (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) utilizando os *lasers* diodo 405nm, 50mw e DPSS 488nm, 100mw. As imagens foram capturadas com o auxílio do *software* ZEM 2009 com um aumento de 40X.

5.8 Ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase

A dosagem da atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) foi feita conforme descrito por Holbrook e Gutfreund (1973), com algumas modificações.

Para este ensaio, foi preparado um tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, adicionado de piruvato de sódio a 0,6 mM. A solução de NADH 6,3 mM foi preparada na hora do uso e protegida de luz.

A reação da LDH foi acompanhada durante 30 minutos por leitura das absorvâncias a 340 nm em espectrofotômetro Varioskan™ Flash (Thermo Scientific). Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 (0,4%) e como controle negativo, DMSO (0,5%). Para o cálculo de porcentagem de lise, foi considerado como 100% de lise as células tratadas com Triton X-100. Para esse ensaio, as células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e avaliado o efeito da Lunatina-1 (50 µM) na liberação da enzima LDH por 1, 3, 6 e 24 horas de tratamento.

5.9 Detecção de exposição de fosfatidilserina por Anexina-V e marcação de DNA com iodeto de propídeo

A marcação das células com Anexina V-FITC e PI foi realizada conforme as instruções do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen®). Para isso, as células foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas com o peptídeo Lunatina-1 (50 µM), Etoposídeo (50 µM) e DMSO (0,5%) durante 3 horas. Após esse período, as células foram submetidas à centrifugação (300×g, 5 min) e lavadas duas vezes com 500 µL de PBS. O precipitado foi resuspenso em 100 µL de tampão de ligação (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7.4); 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) e adicionados 2 µL de Anexina V-FITC. A reação foi mantida em temperatura ambiente durante 15min ao abrigo de luz. Posteriormente, foram adicionados 300µL de tampão de ligação e 2 µL de solução de iodeto de propídeo. As fluorescências foram mensuradas por citometria de fluxo (FAScan, BD®) e os dados analisados com o auxílio do *software* FlowJo® versão 10.1. A intensidade de fluorescência foi analisada nos canais FL1-H e FL2-H, correspondendo às marcações com Anexina V-FITC e PI, respectivamente.

5.10 Detecção de caspase-3 ativa

Para o ensaio de atividade de caspase-3, células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas com o peptídeo Lunatina-1 (50 µM) por 3 horas. Após este período, o meio celular foi centrifugado a 300×g, a 4°C durante 5 min. O precipitado foi lavado duas vezes com PBS-W, resuspenso em 500µL de paraformaldeído 2% gelado, e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente duas vezes com PBS-W e ressuspensas em 100µL de PBS-P. Foram adicionados 10µL de anti-caspase 3-FITC (BD Pharmingen) e incubado em estufa a 37°C por 40 min, protegido de luz. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 300µL de PBS-W.

O ensaio foi avaliado em citômetro de fluxo modelo FAScan (Becton Dickson). A porcentagem de células com caspase-3 ativa foi determinada por meio do programa FlowJo® 10.1, onde foram representados em gráficos *dot plot* com SSC-H (granulosidade) em função de FL1-H-FITC (fluorescência).

5.11 Detecção da atividade das caspases 8 e 9

Os ensaios para verificar a atividade de caspase-8 foram realizados conforme descrito no protocolo do kit *Caspase-8 Colorimetric Protease Assay* (Invitrogen™).

Os ensaios de caspase-9 foram realizados conforme protocolo do kit – *ApoTarget™. Caspase-9/Mch6/Apaf-3 Colorimetric Protease Assay* (Invitrogen™).

Para os ensaios de atividade de caspases 8 e 9, as células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas com Lunatina-1 (50 µM), Etoposídeo (50 µM) e controle negativo (DMSO 0,05%) durante 3 horas. A concentração de proteína foi padronizada pelo método de Bradford, de modo a garantir 100µg de proteína do lisado celular em todos os ensaios. Foram utilizados os substratos IETD-*p*NA (200 µM) e LEHD-*p*NA (200 µM), na presença de DTT (10mM), para quantificar a atividade de caspase 8 e 9, respectivamente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 405 nm.

5.12 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A variação do potencial de membrana mitocondrial foi medida de acordo com o protocolo do kit *MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit for Flow Cytometry* (Invitrogen™).

As células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas, durante 3 horas, com Lunatina-1 (50 µM), Etoposídeo (50 µM), controle negativo (DMSO 0,05%) e controle positivo (carbonyl cyanide 3- chlorophenylhydrazone; CCCP a 500 µM).

As células foram marcadas com o fluoróforo DiIC₁(5) a 25 nM e visualizadas em citômetro de fluxo modelo BD LSRFotessa utilizando o filtro APC para DiIC₁(5) com λ Excitação/ Emissão: 638/658 nm.

5.13 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A detecção de espécies reativas de oxigênio foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Zhang et al. (2010), com algumas modificações.

As células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5 e tratadas, durante 1 e 6 horas, com Lunatina-1 (50 µM), Etoposídeo (50 µM) e controle negativo (DMSO 0,05%).

As células foram marcadas com o fluoróforo 2',7'- Dichlorofluorescein diacetate - (DCFH-DA) Sigma® a 1µM e visualizadas em citômetro de fluxo, modelo FAScan BD®, utilizando os comprimentos de onda de Excitação/ Emissão: 488/525 nm.

5.14 Ensaio de internalização do peptídeo FITC-Lunatina-1 por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*

O peptídeo marcado, FITC-Lunatina-1 (FITC-FIGGLLKTLSFF-NH₂) foi adquirido comercialmente da empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil), e sua sequência primária validada por MS2, conforme descrito no item 5.3.

Células HL60 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.5, e centrifugadas a 300×g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300 µL de tampão HBSS, preparado na presença ou ausência de Ca²⁺ (2,5 mM). Em uma placa de 6 poços, foi adicionada uma lâmina 22x22mm pré-tratada com Poli-L Ornitina (75µL/mL; 0,01% - Thermo) e 100 µL de células ressuspensas foram aplicados sobre esta lâmina. Delicadamente, a lâmina foi recoberta com 2 mL de tampão HBSS, garantindo assim a adesão das células. Após aproximadamente 30 minutos, a lâmina foi transferida para uma câmara de perfusão e recoberta por uma lamínula de 18x18mm, a fim de se manter um fluxo laminar. Uma solução de FITC-Lunatina-1 50 µM foi preparada em tampão HBSS, também na presença ou ausência de Ca²⁺. O *Time-lapse-Imaging* foi adquirido durante 80 minutos, seguindo a ordem: 2min de perfusão com tampão HBSS (com ou sem Ca²⁺), 4 min de perfusão com o peptídeo FITC-Lunatina-1 (50 µM), acrescidos de 6 min de incubação. Após este período, o peptídeo foi lavado e as células perfundidas com HBSS (com ou sem Ca²⁺) até completar 80 min. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal modelo LSM 880 Zeiss (Oberkochen, Alemanha), utilizando lente objetiva de aumento de 40X e imersão em óleo. O laser utilizado para detecção do FITC (verde) foi o 488, com excitação em 488 nm e emissão entre 505 -550 nm.

5.15 Alanina Scan

Os 13 peptídeos da Alanina Scan foram obtidos comercialmente da empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil). Para a avaliação da relação estrutura-atividade, a IC₅₀ para cada peptídeo foi determinada conforme descrito no item 5.5. A atividade de cada

peptídeo foi calculada em relação à atividade do peptídeo original, Lunatina-1, sendo sua IC_{50} considerada como 100% de atividade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção do peptídeo sintético Lunatina-1

A **Figura 6** representa o perfil cromatográfico obtido no processo de purificação do peptídeo sintético Lunatina-1. O peptídeo de interesse foi eluído quando o gradiente de ACN atingiu 48%, havendo uma separação eficiente dos outros produtos da síntese.

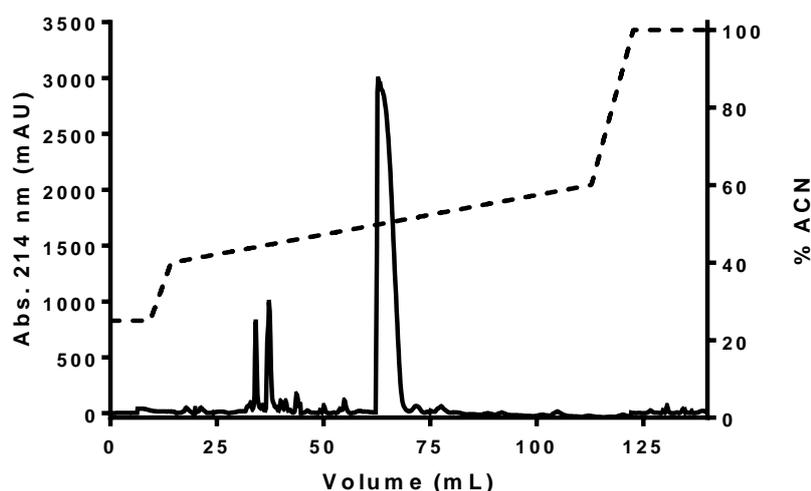


Figura 6: Perfil cromatográfico obtido após a aplicação de 10 mg do produto de síntese do peptídeo Lunatina-1 em coluna semi-preparativa de fase reversa *Discovery[®] BIO Wide Pore C18* (25 cm x 10 mm). Absorbância a 214 nm (—) e gradiente de ACN (---). Frações de 1mL foram coletadas.

Após a corrida cromatográfica, as frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF/MS. A confirmação da massa do peptídeo de interesse, assim como as frações que continham o peptídeo puro foram identificadas e estão representadas na **Figura 7**, onde são observados um pico de massa monoisotópica de 1442,87 Da referente à Lunatina-1, e outros dois picos referentes aos adutos de sódio (1464,88 Da) e potássio (1480,84 Da) desse peptídeo.

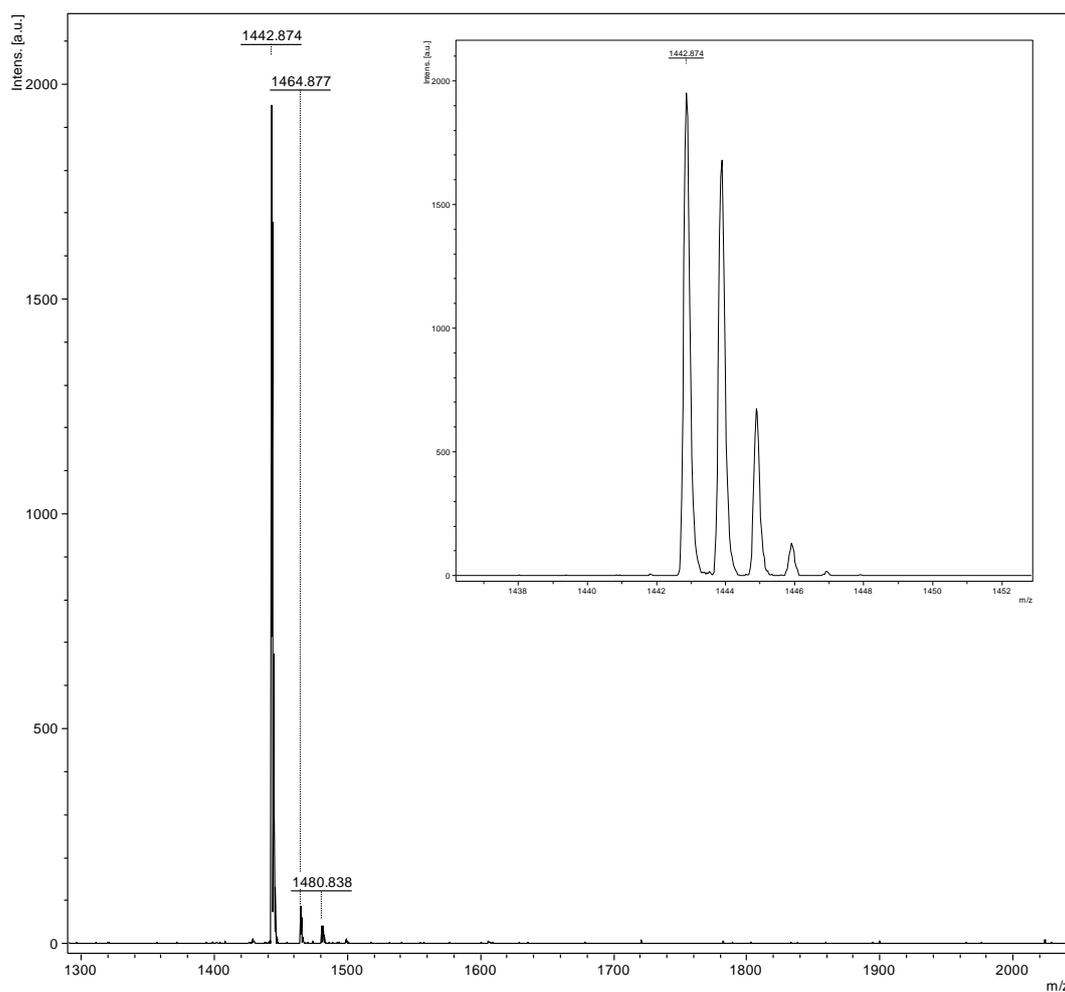


Figura 7: Espectro de massas do peptídeo sintético Lunatina-1 obtido com sistema MALDI-TOF/MS. Os picos correspondem às massas monoisotópicas monocarregadas $[M+H]^+ = 1442,87$ e aos adutos de sódio $[M+Na]^+ = 1464,88$ e potássio $[M+K]^+ = 1480,84$. O zoom representa o envelope monoisotópico da Lunatina-1.

A validação da sequência peptídica também foi realizada por espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF/TOF (**Figura 8/Tabela 1**). As séries b e y encontradas após a fragmentação do íon parental e obtidas através da fragmentação da ligação peptídica na direção N-terminal (íons b) ou C-terminal (íons y) confirmam a sequência do peptídeo Lunatina-1, FIGLLKTLTSFF-NH₂.

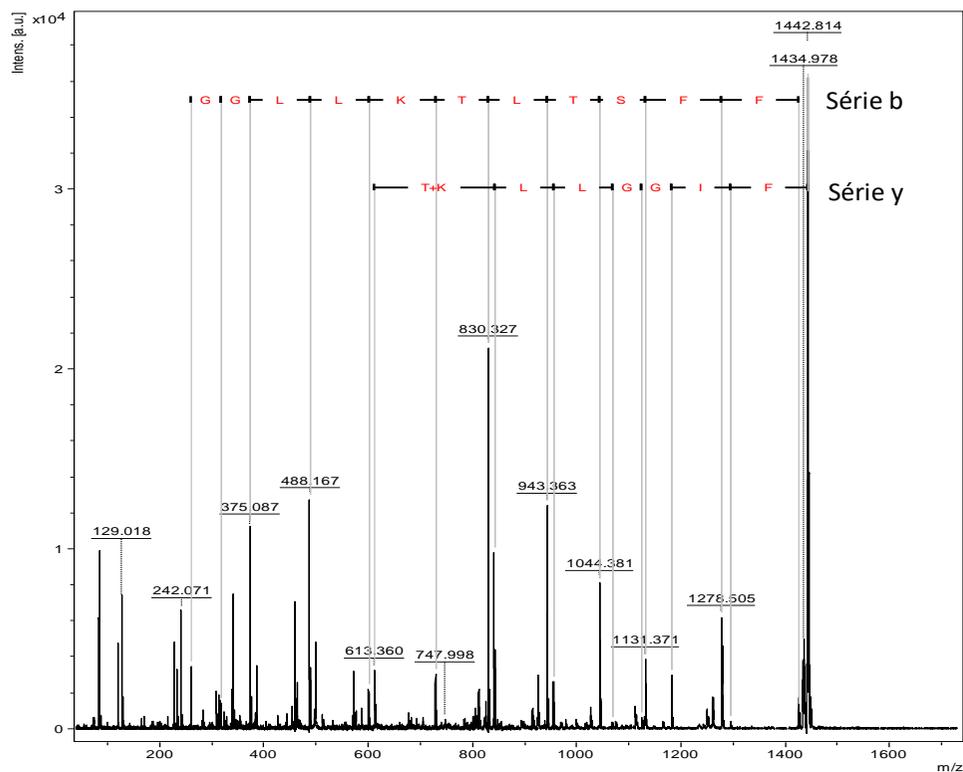


Figura 8: Sequenciamento do peptídeo Lunatina-1 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Espectro de massa da fragmentação do íon parental $m/z = 1442,8$ obtido pela série b e série y.

Tabela 1: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo Lunatina-1 (em preto os íons encontrados)

Massa monoisotópica resíduo	Íons série b	Íons série y
F 147,06	1 148,06	13 1442,74
I 113,08	2 261,14	12 1295,68
G 57,02	3 318,16	11 1182,60
G 57,02	4 375,18	10 1125,58
L 113,08	5 488,26	9 1068,56
L 113,08	6 601,34	8 955,48
K 128,09	7 729,43	7 842,40
T 101,04	8 830,47	6 714,31
L 113,08	9 943,55	5 613,27
T 101,04	10 1044,59	4 500,19
S 87,03	11 1131,62	3 399,15
F 147,06	12 1278,68	2 312,12
F 147,06	13 1425,74	1 165,06

6.2 Avaliação da atividade antitumoral da Lunatina-1

A atividade antitumoral da Lunatina-1 foi avaliada em uma triagem inicial realizada em 6 linhagens celulares, sendo HL60, Jurkat e THP-1 linhagens leucêmicas e MDA-MB-231, MCF-7 e HCT-116 linhagens de tumores sólidos. Os resultados apresentados na **Figura 9A** indicam que o peptídeo Lunatina-1 inibiu mais de 50% da proliferação celular nas linhagens HL60, MCF-7 e MDA-MB-231, e aproximadamente 50% nas linhagens Jurkat, THP-1 e HCT-116, na concentração de 50 μ M.

Sendo assim, neste capítulo, a linhagem HL60 foi escolhida para dar continuidade ao estudo de mecanismo de morte celular desencadeado pela Lunatina-1 e sua IC_{50} foi determinada, correspondendo a $45,79 \pm 4,85 \mu$ M (**Figura 9B**).

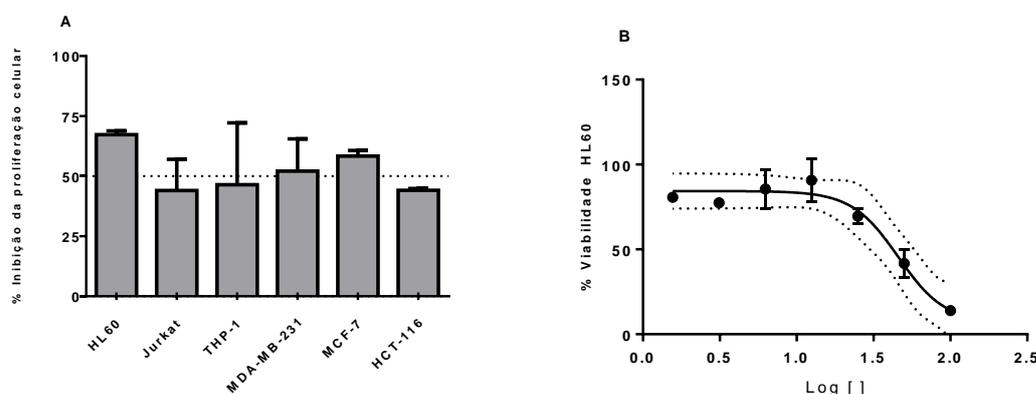


Figura 9: **A)** Triagem da atividade antitumoral da Lunatina-1. O gráfico representa as porcentagens de inibição da proliferação celular após 48 horas de tratamento com Lunatina-1 a 50 μ M. Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão. **B)** Determinação da IC_{50} ($IC_{50} = 45,79 \pm 4,85 \mu$ M) da Lunatina-1 em células HL60 após 48 horas de tratamento. Interpolação de log dose-resposta plotada com auxílio do *software* GraphPad Prism 7. O resultado é representativo de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

6.3 Efeito da Lunatina-1 sobre a fragmentação do DNA de células HL60

O mecanismo de morte celular foi inicialmente avaliado por meio de alterações no ciclo celular e indução de fragmentação do DNA, características observadas tanto no mecanismo apoptótico quanto no necrótico.

Para avaliar o efeito da Lunatina-1 sobre a fragmentação do DNA de células HL60, foi realizada a análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo. Em um histograma clássico, o primeiro pico (200) representa as células na fase G1 (conteúdo de DNA = 2N) e o segundo pico (400), as células em G2/M (conteúdo de DNA = 4N). Entre os picos de G1 e G2/M estão as células em fase de síntese (S). Já o conteúdo de DNA na região subG1, ou seja, subdiploide, é considerado o DNA fragmentado, característico de morte por apoptose (GONG; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994).

De acordo com os resultados (**Figura 10A e 10B**), Lunatina-1 (L1) na concentração de 50 μ M foi capaz de aumentar a porcentagem (73%) de DNA subdiploide, assim como o Etoposídeo 50 μ M (91%), controle positivo para apoptose. Um discreto aumento (10%) também foi observado para L1 a 25 μ M.

Para confirmar este resultado, o perfil de fragmentação do DNA também foi avaliado por gel de agarose 1,5% (**Figura 10C**). Foi possível confirmar a presença de bandas quando as células foram tratadas com Lunatina-1 durante 24 horas. A presença de bandas com repetições a cada 200 pb é um perfil de fragmentação conhecido como “padrão em escada, ou *ladder*”. Este padrão de fragmentação é característico da morte celular por apoptose (PERDIGÃO et. al., 2018). A fragmentação do DNA também foi observada quando as células foram tratadas com Etoposídeo, e ausente, conforme esperado, no controle negativo.

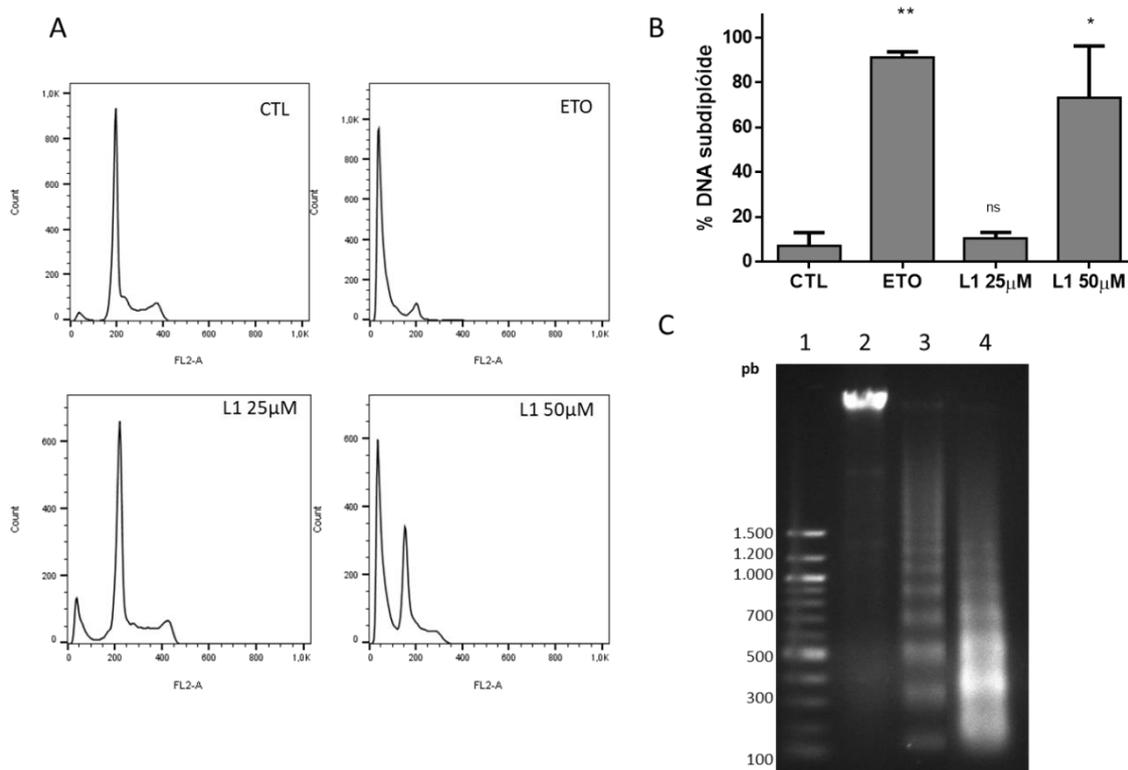


Figura 10: Perfil de fragmentação de DNA em células HL60 após 24h de tratamento. **A)** Células marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Quantificação do DNA fragmentado. **C)** Gel de agarose. 1-Padrão. 2-Controle. 3-Etoposídeo (50µM). 4-Lunatina-1 (50µM). Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. (*/**p<0,05; teste t de Student, não pareado).

6.4 Efeito da Lunatina-1 na morfologia celular de células HL60

O ensaio de atividade da enzima lactato desidrogenase foi utilizado para quantificar as células com perda de integridade de membrana, característica comum de células em processo de morte por apoptose tardia ou necrose, sendo portanto, segundo Schildknecht et al. (2009) e Hajrezaie et al. (2015), um parâmetro de citotoxicidade.

É possível observar um aumento tempo-dependente na porcentagem de lise celular, devido à liberação de LDH (**Figura 11**). Com 1 hora de tratamento é observada pouca lise celular, já com 3 e 6 horas de tratamento, esse percentual corresponde a cerca de 14 e 36%, respectivamente. Com 24 horas de tratamento é observado 98% de lise celular, chegando próximo ao tratamento com Triton 0,5%, determinado como 100% de lise.

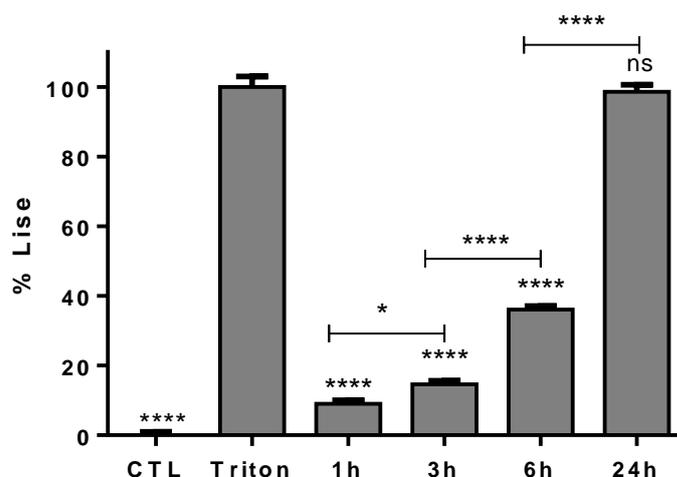


Figura 11: Porcentagem de lise observada em células HL60 tratadas com Lunatina-1 50 μ M, representada como média \pm desvio padrão. CTL- controle negativo. Triton 0,5% - controle positivo, considerado como 100% de lise. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; teste t de Student, não pareado. A diferença estatística foi comparada em relação ao Triton, porém outros grupos também foram analisados).

Alterações na morfologia nuclear também foram avaliadas por microscopia confocal utilizando os fluoróforos Hoechst 33342 e PI (**Figura 12**). Células HL60 foram tratadas com Lunatina-1 (50 μ M) por 3, 6 e 24 horas. Com 3 horas de tratamento é possível identificar células cujo tamanho do núcleo foi reduzido (setas verdes), caracterizando-se como células em processo de condensação nuclear. Com 6 horas de tratamento, foram identificadas células em processo de fragmentação nuclear em apoptose inicial (seta amarela) e apoptose tardia (setas vermelhas), com morfologia nuclear distinta do controle. Aspectos morfológicos semelhantes também foram observados por Pinto et al. (2011) em seu estudo sobre compostos BNDC (Tert-butyl-4-[(3-nitrophenoxy) methyl]-2,2-dimethyloxazolidine- 3-carboxylate) sobre a linhagem HL60.

A marcação com PI foi observada principalmente após 24 horas de tratamento (setas cinzas), correspondendo às células com perda de integridade da membrana, característica de células em processo de morte por apoptose tardia ou necrose, e que corrobora os resultados de liberação de lactato desidrogenase apresentados anteriormente.

Entretanto, células em necrose primária apresentam rápido colapso da membrana plasmática e altos níveis de liberação de LDH, o que não foi observado, pois ocorreu um aumento gradual. Além disso, células em cultura sempre acabam entrando em necrose secundária devido ausência de um sistema fagocitário (KEPP et al., 2011), o que justificaria a marcação com PI e a alta taxa de lise observada após 24h de tratamento com Lunatina-1.

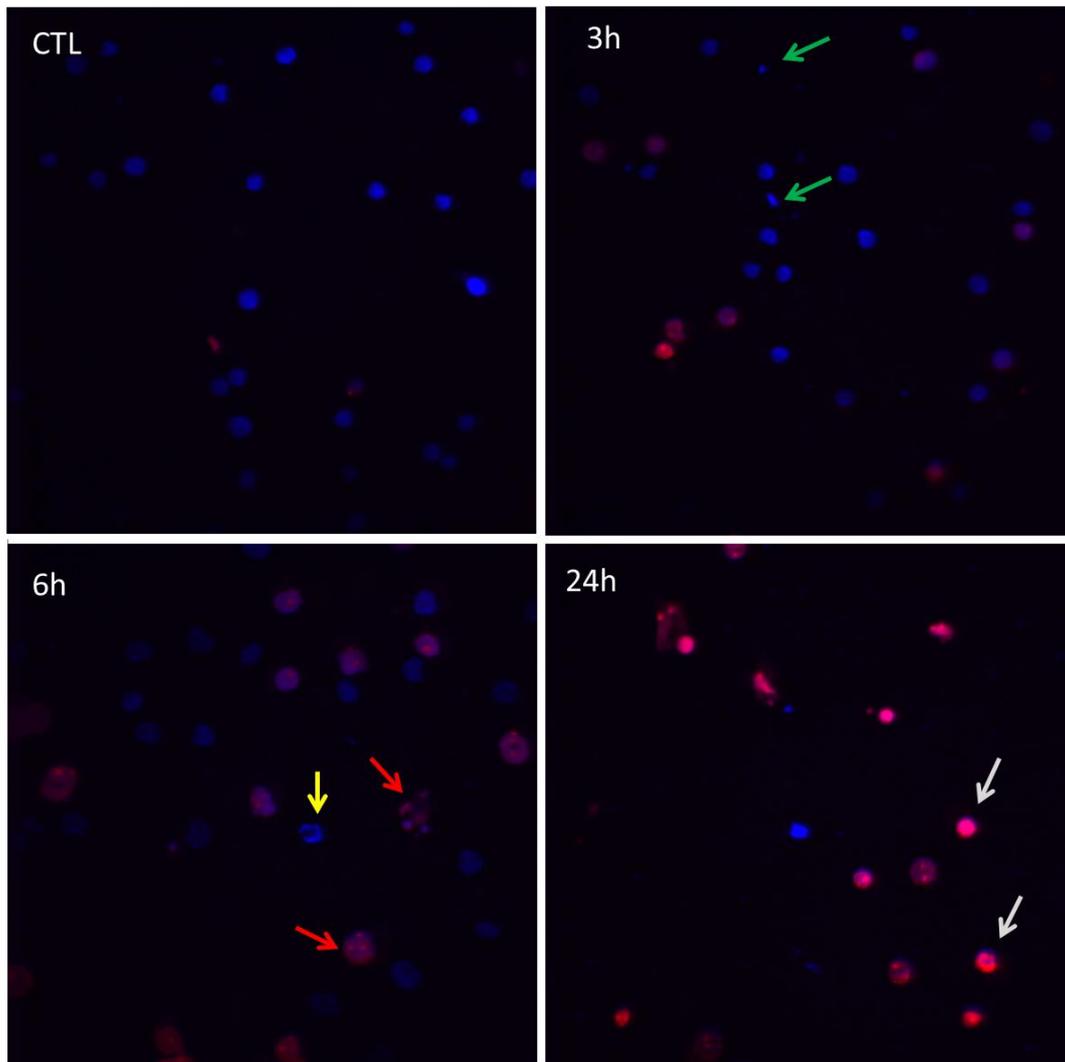


Figura 12: Microscopia nuclear de células HL60 tratadas com Lunatina-1 (50 μ M) usando Hoechst 33342 e PI como marcadores. CTL, 3, 6 e 24 horas de tratamento. As setas representam a condensação nuclear (verde), fragmentação nuclear/apoptose inicial (amarela), apoptose tardia (vermelha) e morte celular (cinza). Aumento de 400X.

A indução de apoptose também foi avaliada pela marcação da exposição de fosfatidilserina por Anexina V-FITC e pela marcação de DNA com iodeto de propídeo (**Figura 13**). De acordo com a **Figura 13A**, as células viáveis são duplo negativas (ANX-/PI-), as células em início de apoptose são positivas apenas para Anexina V (ANX+), as células em apoptose tardia são duplo marcadas (ANX+/PI+) e as células em processo de necrose são marcadas apenas com PI (PI+), conforme descrito por Vermes, et al. (1995).

Após o tratamento com Lunatina-1 (50 μ M) por 3 horas, foi observado um aumento no número de células duplo marcadas em relação ao controle negativo (células sem tratamento). O controle positivo, Etoposídeo (50 μ M) - fármaco antitumoral usado na clínica e sabidamente indutor de apoptose em células HL60 - também promoveu um aumento no número de células duplo marcadas (5,19%), porém em menor quantidade que a Lunatina-1 (56,1%), ambos na mesma concentração e tempo de tratamento. Observa-se também um aumento no número de células marcadas apenas com um dos marcadores, Anexina V-FITC ou PI, quando comparado ao controle (**Figura 13B**). Sendo assim, o tratamento das células HL60 com Lunatina-1 promoveu, principalmente, um aumento no número de células em apoptose tardia.

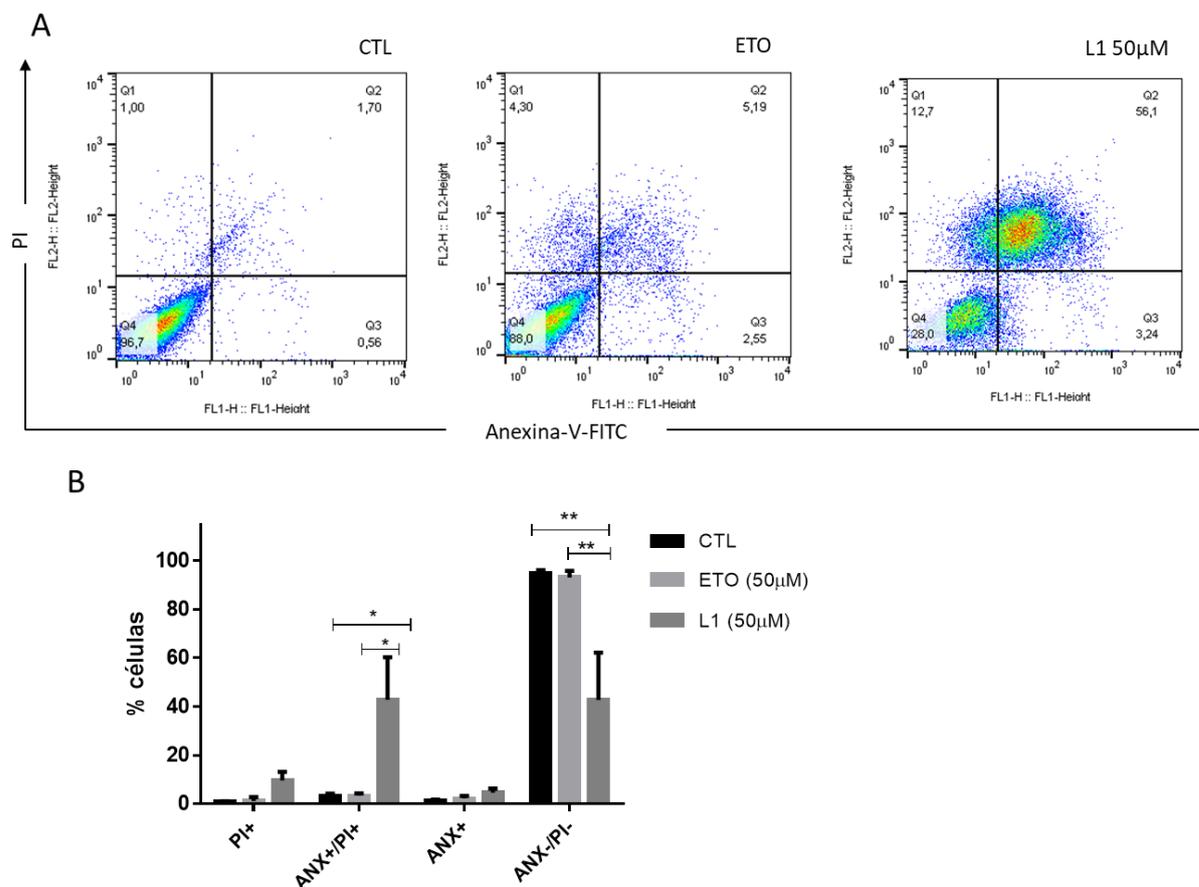


Figura 13: Análise da exposição de fosfatidilserina e marcação com PI em células HL60 tratadas durante 3h com Lunatina-1 (50µM). **A)** *Dot plot* (FL1-H-FITC x FL2-H-PI) obtido através de citometria de fluxo. Q1- PI+. Q2- ANX+/PI+. Q3- ANX+ e Q4- ANX-/PI-. **B)** Análise das porcentagens de células marcadas, representada como média ± desvio padrão. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. (*/**p<0,05; Two-way ANOVA, seguido de teste de Tukey).

6.5 Efeito da Lunatina-1 na ativação de caspases

Para avaliar o envolvimento da via clássica da apoptose no efeito tóxico da Lunatina-1 sobre células HL60, a ativação de caspase-3 foi quantificada com anti-caspase 3-FITC por citometria de fluxo, após 3 horas de tratamento. De acordo com a **Figura 14A**, Lunatina-1 e Etoposídeo, ambos na concentração de 50 µM, foram capazes de promover um aumento significativo na ativação de caspase-3 quando comparados ao controle.

As caspases são enzimas aspartato-específicas, que se encontram na forma de zimogênios inativos, sendo ativadas na ocorrência de morte celular apoptótica. Caspase-3, juntamente com caspase-7, são responsáveis pela regulação de alterações nucleares durante a apoptose, como fragmentação nuclear (cariorréxis) e condensação da cromatina (picnose) (MASANGO et al., 2015), características já observadas neste trabalho. Além disso, a ativação de caspases gera uma série de processos bioquímicos na célula que desencadeiam a ativação de nucleases responsáveis pela fragmentação do DNA (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008), característica também observada após o tratamento com Lunatina-1.

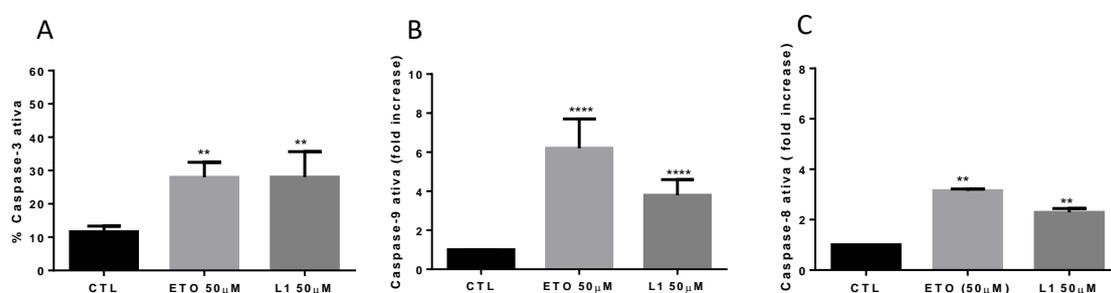


Figura 14: Efeito da Lunatina-1 na ativação de caspases após 3h de tratamento. **A)** Porcentagem de células HL60 com caspase-3 ativa. **B)** Quantificação de caspase-9 ativa. **C)** Quantificação de caspase-8 ativa. Células HL60 foram tratadas com Etoposídeo (50µM) e Lunatina-1 (50µM). Os resultados representam pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata, expressos como média \pm desvio padrão. (** $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; teste t de Student, não pareado).

O efeito da Lunatina-1 também foi avaliado na ativação das caspases iniciadoras da via de receptor de morte e da via intrínseca, caspases-8 e -9, respectivamente (**Figura 14B e C**). Células HL60 foram tratadas durante 3 horas com Etoposídeo (50µM) e Lunatina-1 (50µM). Ambos os tratamentos também foram capazes de promover um aumento significativo, quando comparados ao controle, tanto na ativação de caspase-8 quanto de caspase-9. A ativação foi aumentada em, aproximadamente, 4X para caspase-9 e em 2X para caspase-8 quando as células foram tratadas com Lunatina-1, sendo o aumento calculado em relação ao controle.

O aumento na atividade de caspase-8 e caspase-9 sugere a ativação tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca de apoptose. Além disso, ambas são capazes de ativar pró-caspase 3 em caspase-3 efetora (GOLDAR et al., 2015), corroborando os resultados de atividade de caspase-3. Sabe-se também que caspase-9 juntamente com citocromo c formam o apoptossomo, que por sua vez, ativa caspase-3, induzindo também a clivagem de pró-caspase-8 (GALLUZZI et al., 2011). Caspase-8 pode ainda induzir a translocação de Bid para a membrana mitocondrial ativando também a via intrínseca (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Entretanto, peptídeos antitumorais são caracterizados, principalmente, por ativarem a via intrínseca de apoptose, ativando fatores pró-apoptóticos e inibindo fatores anti-apoptóticos, sendo a via extrínseca ativada de forma indireta (LABELLE et al., 2012).

6.6 Efeito da Lunatina-1 na produção de ROS

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) está envolvida na sinalização apoptótica induzida por estresse oxidativo e foi avaliada em células HL60 após 1 e 6 horas de tratamento, utilizando Etoposídeo (20 μM) e Lunatina-1 (50 μM) (**Figura 15**). A DCFH-DA usada como sonda para produção de ROS é clivada em DCFH₂ por esterases, DCFH₂ é então oxidada a DCF (composto fluorescente) por peroxidases. Deste modo, DCFH-DA é utilizada para determinar a presença de ROS do tipo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂^{•-}). Superóxido é o ROS mitocondrial primário e quando formado, é convertido em H₂O₂ pela enzima superóxido dismutase. H₂O₂ é então oxidado a OH[•], produto final extremamente agressivo, por peroxidases (SKULACHEV, 2006).

Os resultados mostram que após 1h de tratamento já houve um aumento significativo na produção de ROS para as células HL60 tratadas com Lunatina-1 (**Figura 15A**), e que com 6h de tratamento esse percentual ainda foi mantido (**Figura 15B**).

Alterações no potencial redox estão diretamente relacionadas ao processo de morte celular por apoptose, seja pela ativação de caspases, por provocar alterações no potencial de membrana mitocondrial ou favorecer a exposição de fosfatidilserina na lâmina externa da membrana celular (XUE et al., 2014).

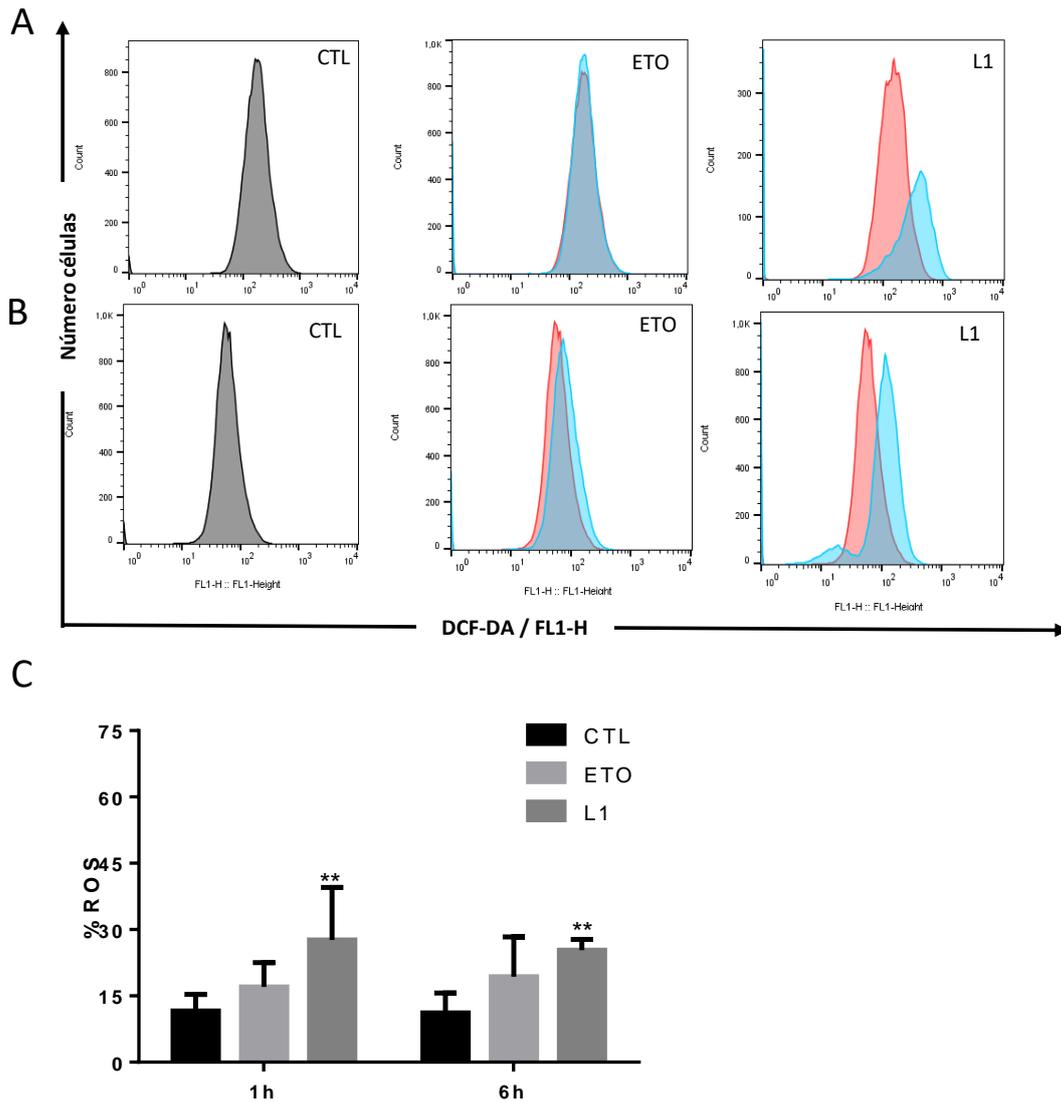


Figura 15: Efeito da Lunatina-1 na produção de ROS. (A) e (B) Perfil de intensidade de fluorescência obtido por citometria de fluxo, realizado com 1h (A) e 6h (B) de tratamento. Azul: tratamento; vermelho: controle. (C) Quantificação da fluorescência de ROS por DCF-DA. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. (** $p < 0,05$; two-way-ANOVA, seguido de teste de Tukey).

6.7 Efeito da Lunatina-1 no potencial de membrana mitocondrial

A variação do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada por citometria de fluxo (**Figura 16**). Células HL60 foram tratadas durante 3 horas com CCCP (500 μM), Etoposídeo (50 μM) e com Lunatina-1 (50 μM). O tratamento das células com ionóforos, tais como o CCCP, provoca a perda do potencial de membrana mitocondrial devido à destruição do gradiente de prótons na membrana interna (SILVA et al., 2004). Deste modo, foi observada a perda completa do potencial de membrana mitocondrial quando as células foram tratadas com CCCP. Para os demais tratamentos foram observadas perdas parciais de cerca de 60% para o tratamento com Etoposídeo e de aproximadamente 40% para as células tratadas com Lunatina-1.

Sabe-se que, no início do processo de morte por apoptose, as células requerem um aumento no potencial de membrana mitocondrial e [ATP], e que o processo final resulta no decréscimo de [ATP] e colapso do potencial de membrana mitocondrial (SKULACHEV, 2006).

Alterações no potencial de membrana mitocondrial também estão diretamente relacionadas à produção de ROS, principalmente $\text{O}_2^{\cdot-}$, pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, além disso, desidrogenases mitocondriais como α -KGDH e α -GPDH têm sido relacionadas à geração de estresse oxidativo (ADAM-VIZI, TRETTER, 2013).

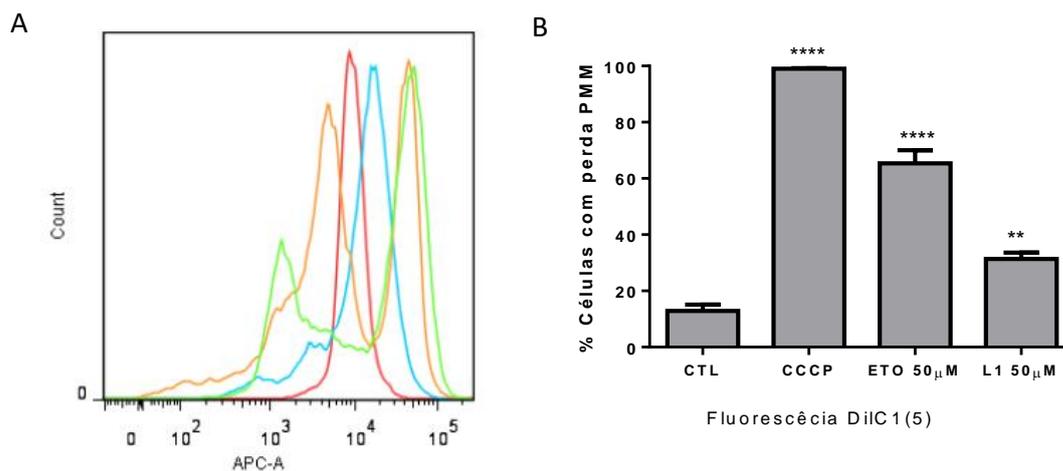


Figura 16: Efeito da Lunatina-1 no potencial de membrana mitocondrial. (A) Perfil de fluorescência de DilC1(5) obtido por citometria de fluxo utilizando o filtro APC-A. Azul: CTL; vermelho: CCCP; laranja: ETO e verde: L1. (B) Quantificação da fluorescência de DilC1(5). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. (** $p < 0,05$; two-way-ANOVA, seguido de teste de Tukey).

6.8 Ensaio de internalização do peptídeo Lunatina-1-FITC por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*

O ensaio de internalização do peptídeo Lunatina-1-FITC (FITC-FIGLLKTLTSFF-NH₂) foi acompanhado em tempo real durante 80 minutos. Na ausência de cálcio, não houve internalização do peptídeo (**Figura 17A**). No entanto, quando o peptídeo foi perfundido na presença de cálcio, a internalização foi observada, iniciando-se 20 minutos após a estimulação (**Figura 17C**).

É possível visualizar ainda, um acúmulo do peptídeo Lunatina-1-FITC no citoplasma das células HL60 (**Figura 17B**). Na imagem 3D (**Figura 17D**) podemos visualizar o peptídeo marcado dentro das células.

Peptídeos que podem penetrar células, *Cell-penetrating peptides* (CPPs), são, em geral, peptídeos curtos, com menos de 30 resíduos de aminoácidos e altamente enriquecidos com resíduos básicos (LI et. al., 2015). CPPs podem ser internalizados por translocação direta ou endocitose, a escolha da via depende de fatores como sequência peptídica, concentração extracelular do peptídeo e dos componentes da membrana (JIAO et al, 2009).

A translocação direta ocorre em situações de alta concentração de CPPs (LI et. al., 2015) e opera em uma janela estreita de tempo, o que implica uma co-importação lipídica/peptídica específica nas células (JIAO et al, 2009). Além disso, peptídeos ricos em arginina e lisina são capazes de se translocarem mais facilmente através da membrana (FRANK et al., 2014), devido à interação entre a carga positiva destes aminoácidos e os fosfolípidios de membrana carregados negativamente.

Já a internalização dependente de cálcio, como é o caso da Lunatina-1, está envolvida principalmente na endocitose (KHOSRAVI-DARANI et al. 2010), sendo esta a via de captação celular para a maioria dos CPPs já descritos (GRÄSLUND et al. 2011), além disso, Lunatina-1, possui apenas um resíduo de aminoácido positivo, o que aparentemente, pode não favorecer a translocação direta.

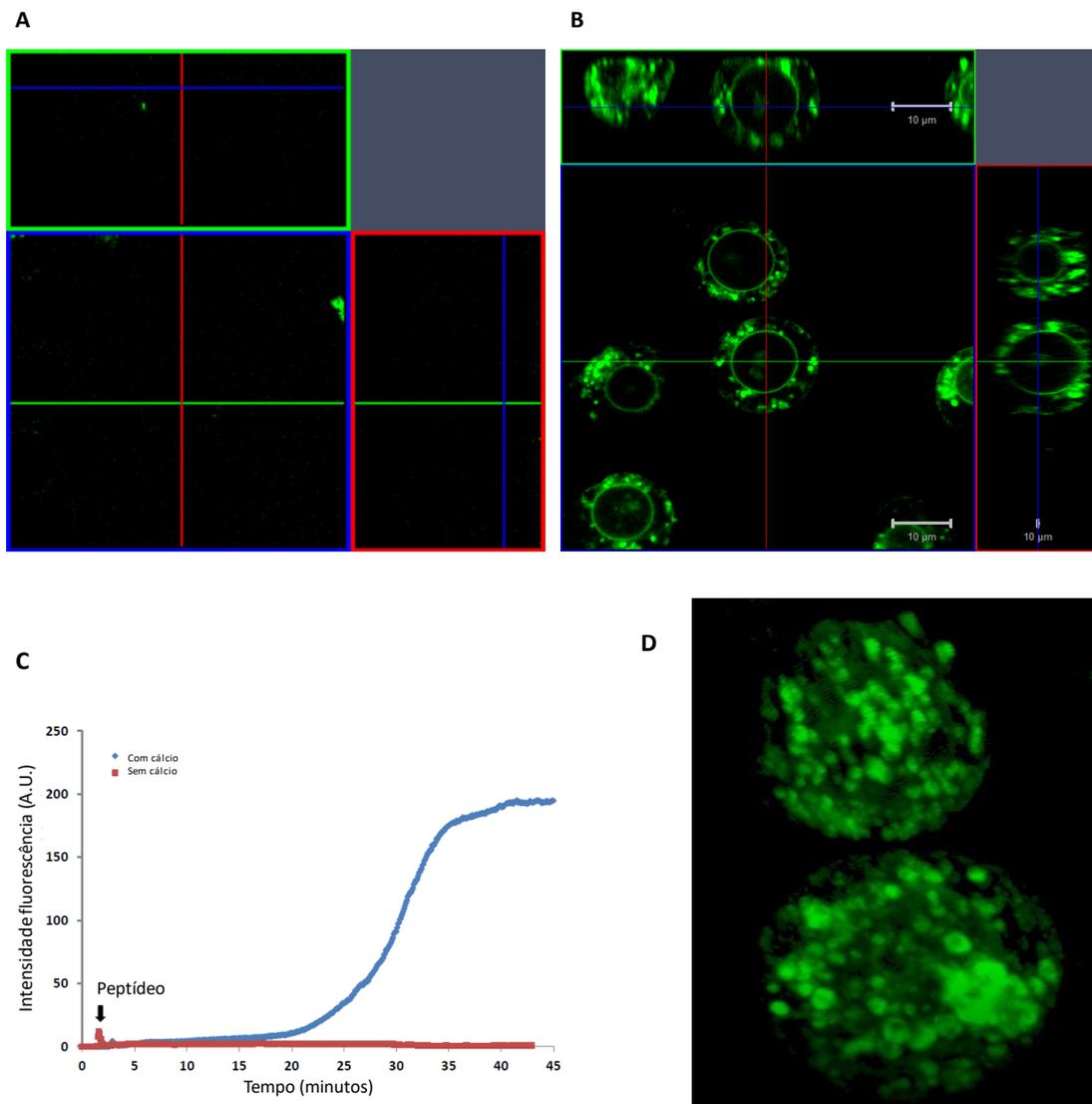


Figura 17: Internalização do peptídeo Lunatina-1-FITC por microscopia confocal em Time-Lapse-Imaging. **A)** e **B)** Imagens representativas das células HL60 em plano ortogonal. **A)** Ensaio realizado na ausência de cálcio e **B)** Ensaio realizado na presença de cálcio. **C)** Gráfico representativo da intensidade de fluorescência de células internalizadas com Lunatina-1-FITC na presença e ausência de cálcio. **D)** Imagem representativa em 3D de células HL60 internalizadas com Lunatina-1-FITC. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição testada.

6.9 Alanina Scan

A substituição de cada resíduo de aminoácido na sequência da Lunatina-1 por um resíduo de Alanina foi utilizada para verificar a importância de cada um destes resíduos para a atividade do peptídeo.

A preferência pela Alanina se justifica pelo fato de ser um aminoácido que pode ocorrer tanto em alfa-hélices quanto folhas-beta, além de ter uma cadeia lateral simples e que mantém o carbono beta, importante para a formação dos ângulos diédricos da cadeia polipeptídica, não provocando alterações na conformação do peptídeo, sendo a mudança acarretada apenas pela química da cadeia lateral, o que de fato, facilita a interpretação dos resultados (NELSON; COX, 2014).

Em geral, podemos observar (**Figura 18**) uma perda de atividade de aproximadamente 50% para os resíduos nas posições F1, I2, G3, L5, L6, T8, L9, T10 e S11. Com exceção da Glicina, todos estes aminoácidos possuem uma cadeia lateral maior e mais complexa que a Alanina, o que poderia justificar a perda de atividade, favorecida pela perda de interações hidrofóbicas no caso dos resíduos de F, I e L, e pela perda do grupo polar -OH, importante para a formação de ligações de hidrogênio, dos resíduos de T e S.

Para o resíduo de Glicina na posição 04, quando substituído por Alanina, foi observado um ganho de atividade, provavelmente, a substituição por um resíduo de cadeia lateral maior estaria favorecendo a interação com outras proteínas, porém numa posição específica, já que o mesmo não foi observado para o resíduo de Glicina na posição 03.

Já a substituição de Lisina, na posição 07, por Alanina provocou a perda total de atividade do peptídeo, provavelmente, devido à perda da carga positiva, necessária para a interação com alvos de membrana ou citoplasmáticos. Além disso, a carga positiva também pode ser importante para a entrada do peptídeo na célula.

Para a Fenilalanina na posição 12 também foi observada uma perda significativa de atividade, porém na posição 13, a troca de Fenilalanina por Alanina não afetou tanto a atividade do peptídeo em comparação à Lunatina-1, talvez por estar na extremidade e ter maior liberdade conformacional, além de ter ao lado outro resíduo de Fenilalanina que pode estar participando das interações hidrofóbicas necessárias para a atividade do peptídeo.

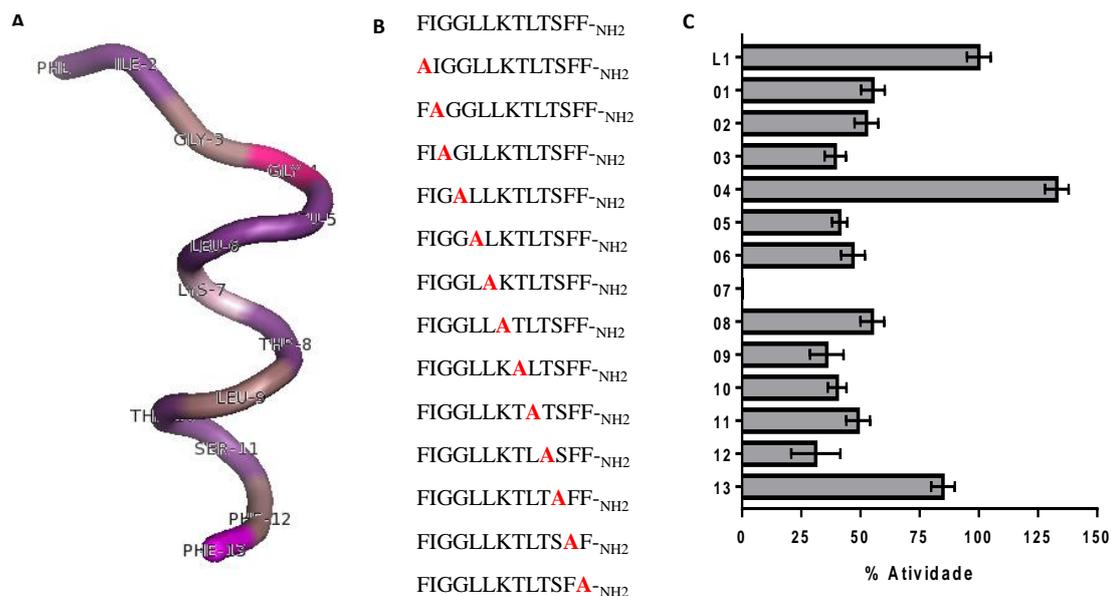


Figura 18: Alanina Scan para o peptídeo Lunatina-1. **A)** Estrutura 3D da Lunatina-1 obtida por RMN (Dados não publicados). As cores representam cada resíduo e sua importância com base na intensidade da cor (cores mais fortes representam os resíduos com maiores atividades quando substituídos por Alanina). **B)** Representação das substituições realizadas na sequência da Lunatina-1 por Alanina. **C)** Atividade de cada peptídeo modificado (01 a 13 - número corresponde à posição de cada resíduo na sequência peptídica) determinada por IC₅₀ e comparada à atividade da Lunatina-1 (L1), considerada como 100% de atividade. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata.

Capítulo 2:

Citotoxicidade da Lunatina-1 em células de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231 e MCF-7

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito antitumoral da Lunatina-1 sobre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7;
- 2) Avaliar o efeito da Lunatina-1 na sobrevivência e proliferação das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7;
- 3) Caracterizar o tipo de morte celular induzida pela Lunatina-1 na linhagem MDA-MB-231;
- 4) Avaliar a toxicidade da Lunatina-1 para células renais (HEK-293) e de hepatócitos (HepG2);
- 5) Avaliar a citotoxicidade da Lunatina-1 para células neuronais LUHMES.

4 HIPÓTESE

Lunatina-1 induz citotoxicidade para células de adenocarcinoma mamário humano.

5 METODOLOGIA

5.1 Linhagens celulares e manutenção da cultura

Células MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) foram mantidas em meio RPMI-1640 GlutaMAX™ (Gibco®, Karlsruhe, Alemanha), suplementadas com 10 e 5% de soro fetal bovino, respectivamente.

Células MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano estrógeno-dependente) e HEK-293 (células embrionárias de rim humano) foram mantidas em meio DMEM

GlutaMAX™ (Gibco®, Karlsruhe, Alemanha) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino.

Todas as linhagens foram tratadas com 1% de solução antibiótica (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e mantidas em garrafas de cultivo em incubadora HeraCell® a 37°C com atmosfera de 5% (v/v) de CO₂.

5.2 Plaqueamento e tratamento das células para determinação da IC₅₀ e de caracterização de morte celular

Para a determinação da IC₅₀ da Lunatina-1 sobre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, foram plaqueadas 5.000 células/poço em placas de 96 poços. Diluições seriadas a partir de 100 µM foram testadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 µM) durante 48h de incubação.

Para as linhagens HEK-293 e HepG2 foram plaqueadas 10.000 células/poço em placas de 96 poços. Diluições seriadas a partir de 100 µM foram testadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 µM) durante 24h de incubação.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Resazurina, conforme descrito por Gartlon et al. (2006). A intensidade de fluorescência foi medida usando excitação de 530 nm e emissão de 590 nm em leitor de placas modelo TECAN Infinite®200PRO (Life Sciences, Tecan Trading AG, Switzerland). A IC₅₀ foi calculada usando uma curva sigmoide dose-resposta plotada com auxílio do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Os dados correspondem a dois/três experimentos realizados em triplicata.

Para os ensaios de caracterização de morte celular da linhagem MDA-MB-231, foram plaqueadas 5.000 células/poço em placas de 96 poços. Posteriormente, as células foram tratadas com Lunatina-1 a 25µM. Como controles, foram utilizados DMSO 0,05% (controle negativo), Triton 0,1% e Taxol 1µM.

5.3 Ensaio de neurotoxicidade em células LUHMES

Células LUHMES (*Lund Human Mesencephalic neurons*) foram utilizadas como modelo preditivo para atividade neurotóxica, conforme descrito por Schildknecht et al. (2009). As células foram mantidas em meio AdvDMEM/F12 (Gibco, Invitrogen,

Germany), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 40 ng/mL de bFGF - fator de crescimento de fibroblastos recombinante (R+D Systems, Minneapolis, MN). Após as células atingirem uma densidade de 40-50%, o processo de diferenciação foi iniciado pela adição de 2 mM de L-glutamina, 1 mM de dbcAMP (Sigma), 1 µg/mL de tetraciclina (Sigma) e 2 ng/mL de GDNF- fator neurotrófico derivado de células gliais humanas recombinante - (R+D Systems) em meio AdvDMEM/F12. Após 24h de incubação, as células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas com densidade de 100.000 cells/cm² em placas de 96 poços, Nunclon™ PLO/revestida com fibronectina, com meio de diferenciação. Após o plaqueamento, as células foram incubadas durante 3 dias e em seguida tratadas com as drogas de interesse. Foram realizadas diluições seriadas 1:4 a partir de 20 µM a 0,08 nM para Lunatina-1 e Etoposídeo, em seguida as células foram incubadas por 24h.

Para a avaliação da degeneração neurítica, as células foram coradas com Hoechst-33342 (1µg/mL) e Calceína-AM (1 µM), e analisadas por epifluorescência em microscópio com leitor de placas (Array-Scan II® HCS Reader, Cellomics, Pittsburgh, PA). As imagens foram coletadas usando objetiva de 20X e os canais com excitação/emissão de 365±50/525±15 nm para H-33342 e de 475±40/525±15 nm para Calceína. As imagens foram analisadas por um algoritmo que considera a intensidade de fluorescência, o tamanho, a área e a forma dos neuritos.

5.4 Ensaio de clonogenicidade

O ensaio de clonogenicidade foi avaliado conforme descrito por Herrmann et al., (2012), com algumas alterações. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas com densidade de 400 e 200 células/poço, respectivamente, em placas de 6 poços e incubadas a 37°C durante 6 horas. Após este período, as células foram tratadas com Lunatina-1 a 25 e 10µM, Taxol 1µM e Triton 0,1% e incubadas por 24h em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído e as placas incubadas durante 14 dias.

Após os 14 dias, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS. As colônias foram fixadas com ácido acético e metanol (1:7 v/v) por 30 minutos, e coradas com solução de cristal violeta 0,5% (p/v) em álcool 70% (v/v) por 30 minutos.

A capacidade das células originarem colônias foi expressa como fração de sobrevivência, considerando o controle como 100% de sobrevivência.

5.5 Ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase

A atividade de LDH foi dosada conforme descrito por Schildknecht et al. (2009). A quantificação foi realizada separadamente no sobrenadante e no homogeneizado celular. A liberação foi expressa em porcentagem como LDH sobrenadante / LDH total.

Células MDA-MB-231 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.2 e tratadas em diferentes concentrações e tempos, de acordo com cada experimento. Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo para liberação de LDH. As células foram lisadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS, durante 20 min. Para cada fração analisada (sobrenadante/homogeneizado celular), 20µL de amostra foi adicionada a 180µL de tampão de reação contendo NADH (100µM) e piruvato de sódio (600µM) em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; ajustado por 40,24 mM de K₂HPO₄ e 9,7 mM de KH₂PO₄).

A absorção foi detectada em leitor de placas TECAN Infinite®200PRO (Life Sciences, Tecan Trading AG, Switzerland) a 340 nm, 37°C e leituras a cada 2 minutos durante 20 minutos.

5.6 Microscopia de campo claro e de fluorescência

Células MDA-MB-231 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.2 e tratadas com Lunatina-1 25µM, Triton X-100 (0,1%) e Taxol 1µM, por diferentes tempos, de acordo com cada experimento.

Para a microscopia confocal de campo claro, as imagens foram adquiridas após 24h de tratamento, com as células vivas na própria placa de poliestireno. As imagens foram capturadas no modo luz transmitida em microscópio Olympus IX 81 (Hamburg, Alemanha), aumento de 40X.

Para a microscopia de fluorescência, as imagens foram adquiridas após 1 e 3h de tratamento. Com 1h de tratamento, as células foram marcadas com PI (1 µg/mL), Hoechst 33342 (1 µg/mL) e Calceína-AM (1 µM), as imagens foram capturadas em microscópio confocal Olympus IX 81 (Hamburg, Alemanha), aumento de 10X. Para as imagens obtidas após 3h de tratamento, as células foram marcadas com Hoechst 33342 (1 µg/mL) e Calceína-AM (1 µM), e as imagens adquiridas em leitor Array-Scan II® HCS Reader, Cellomics™ (Pittsburgh, PA, EUA), aumento de 20X e comprimento de onda de excitação/emissão de 365± 50/525± 15 nm para Hoechst 33342 e de 475± 40/525± 15 nm para Calceína-AM.

5.7 Avaliação de morte celular por necroptose utilizando Necrostatina-1 como inibidor

Células MDA-MB-231 foram plaqueadas conforme descrito no item 5.2 e pré-tratadas, durante 1 hora, com 10 μ L de Necrostatina-1 a 100 μ M (Enzo, Farmingdale, NY, EUA). As células que não foram pré-tratadas com Necrostatina-1 tiveram o volume acrescido de 10 μ L de meio, de forma a igualar o volume final. Posteriormente, as células foram tratadas com Lunatina-1 25 μ M, Triton X-100 (0,1%) e Taxol 1 μ M.

Após 24h de tratamento, a liberação de LDH foi quantificada, conforme descrito no item 5.5. Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

5.8 Atividade hemolítica da Lunatina-1

A atividade hemolítica da Lunatina-1 foi determinada utilizando-se eritrócitos de cordeiro obtidos comercialmente da empresa Cecon (São Paulo, Brasil). Foram preparadas uma solução de eritrócitos 1% (v/v) em tampão HBSS, pH 7,4; e uma curva de diluição a partir de 100 μ M (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,10; 1,60 e 0,8 μ M) da Lunatina-1. Para cada concentração testada, foram adicionados 99 μ L de solução com o peptídeo e 1 μ L da solução de eritrócitos em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C durante 1 hora. Em seguida, a placa foi centrifugada durante 5 min a 300 \times g e o sobrenadante transferido para outra placa.

A hemoglobina liberada no sobrenadante foi quantificada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 405 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata, Triton X-100 a 0,1% foi considerado como 100% de hemólise (SANTOS et al., 2010).

5.9 Preparo de lipossomas e ensaio de liberação de Calceína-AM

Os lipossomas de EPC 50mM (Fosfatidilcolina de ovos) foram preparados conforme descrito por Frezard et al. (1994) utilizando ultrasonicação de filme unilamelar na presença de Calceína-AM (75 mM, pH 7,2).

A Calceína-AM não encapsulada foi removida por cromatografia de exclusão molecular utilizando-se a resina Sephadex G-50. A coluna foi equilibrada com tampão HBSS, pH 7,2. O tamanho dos lipossomas após a purificação e após o tratamento foram

mensurados em aparelho Zetasizer™ Systems. Os lipossomas foram utilizados dentro de 48 horas após purificação.

A porcentagem de Calceína-AM liberada após incubação dos lipossomas (4 μ L) com Lunatina-1 (96 μ L) nas concentrações de 25; 10; 5; 1 e 0,5 μ M foi avaliada cineticamente durante 15 min com leituras a cada 1min. O ensaio foi realizado a 37°C e a fluorescência da Calceína-AM liberada foi medida a 490nm excitação /515 nm emissão em fluorímetro Varioskan® Flash. Triton 100-X (0,1% v/v) foi utilizado como controle positivo (100% de liberação de Calceína-AM). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade citotóxica da Lunatina-1 foi avaliada sobre as linhagens de tumor mamário MDA-MB-231 e MCF-7. A IC_{50} foi determinada, correspondendo a $21,7 \pm 3,5$ μ M para a linhagem MDA-MB-231 e $31,6 \pm 8,8$ μ M para a linhagem MCF-7 (**Tabela 2**).

Tabela 2: Valores de IC_{50} para a Lunatina-1, após 48h de tratamento, expressos em μ M \pm DP (desvio padrão). Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

MDA-MB-231	MCF-7
$IC_{50} \pm DP$ (μ M)	$IC_{50} \pm DP$ (μ M)
$21,7 \pm 3,5$	$31,6 \pm 8,8$

Após a determinação da IC_{50} , as concentrações de 25 e de 10 μ M foram escolhidas para a realização do ensaio de clonogenicidade.

O ensaio de clonogenicidade permite avaliar a capacidade das células de gerarem novas colônias após o tratamento com a droga de interesse (MORDANT et al., 2010). Este ensaio é importante para avaliar se o tratamento com um composto citotóxico além de induzir morte, reduz a sobrevivência de células clonogênicas que podem sobreviver ao tratamento e proliferar. Este ensaio prediz a eficácia de um composto, pois o objetivo final de uma terapia antitumoral é obter a cura do tumor e evitar a reicidiva do mesmo (ZIPS et al, 2005).

Este ensaio foi avaliado nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (**Figura 19A**). Os resultados indicam que na concentração de 25 μ M, concentração próxima à IC_{50} , Lunatina-1 é capaz de impedir quase que totalmente a formação de novas colônias para ambas as células. Já na concentração de 10 μ M, ambas as células foram capazes de gerar novas colônias, mantendo aproximadamente 75% de sua sobrevivência clonogênica (**Figura 19B**). Taxol na concentração de 1 μ M e Triton 0,1% impediram a formação de novas colônias, Triton por ser um agente lítico e Taxol por interferir no processo de divisão e proliferação das células neoplásicas, sendo um fármaco amplamente

administrado para o tratamento de tumores de mama em estado avançado ou metastático (WEAVER, 2014).

Deste modo, Lunatina-1 a 25 μM é capaz de bloquear a progressão do adenocarcinoma mamário humano nas linhagens MCF-7 (ER+) e MDA-MB-231 (ER-), células geneticamente distintas e que apresentam potencial proliferativo diferente.

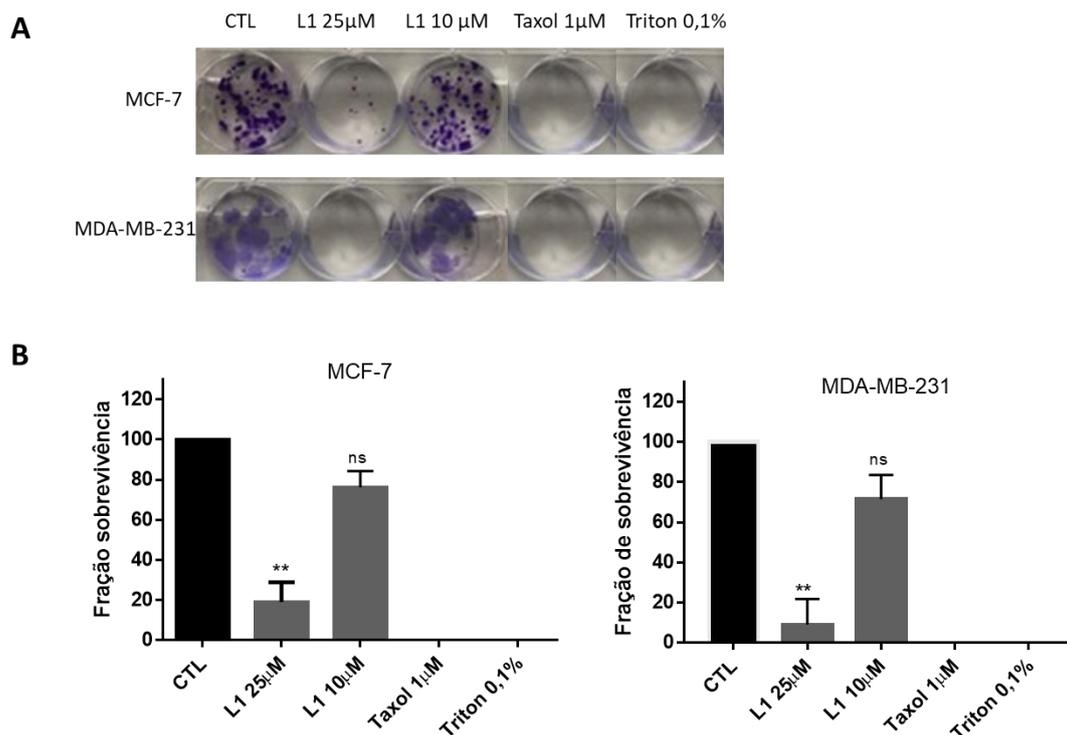


Figura 19: Ensaio clonogênico em células MCF-7 e MDA-MB-231. **A)** Células foram tratadas com L1 25 e 10 μM , Taxol 1 μM e Triton 0,1%. **B)** Quantificação das colônias após 14 dias de incubação. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. (** $p < 0,05$; teste t de Student, não pareado).

Para dar continuidade ao estudo de mecanismo de morte celular envolvido na citotoxicidade da Lunatina-1, a linhagem MDA-MB-231 foi escolhida por se tratar de um carcinoma mamário mais agressivo, com opções limitadas de tratamento, sendo, portanto, de maior interesse para a indústria farmacêutica (DAMPIER et al., 2001).

A linhagem MDA-MB-231 é de origem epitelial, isolada a partir de um derrame pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos de idade com adenocarcinoma mamário

metastático. É uma linhagem altamente agressiva, invasiva e pouco diferenciada de tumor mamário triplo negativa, uma vez que não expressa os receptores para estrogênio (ER-), progesterona (PR-) e para o fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2-) (ECACC®, 2017).

Iniciando os estudos de mecanismo de morte celular, na **Figura 20A** podemos observar que após 24h de tratamento é possível visualizar alterações na morfologia celular para ambos os tratamentos em relação ao controle. Após o tratamento com Triton 0,1%, sabidamente indutor de morte por necrose, pode-se observar a presença de *debris* celulares, assim como perda de conteúdo citoplasmático e redução no tamanho das células, características do processo de morte celular por perda de integridade de membrana, como ocorre na necrose. Para as células tratadas com Taxol 1 µM, não foi observado extravasamento de conteúdo citoplasmático, nem redução no tamanho das células, visto que se trata de um fármaco pró-apoptótico amplamente descrito (WEAVER, 2014). Para as células tratadas com Lunatina-1 25 µM, observa-se perda de integridade de membrana e extravasamento de conteúdo citoplasmático para algumas células, assim como a presença de inúmeros vacúolos e aspecto corroído do citoplasma, características comumente encontradas em células necróticas.

Na **Figura 20B** foi realizada uma curva dose-resposta da Lunatina-1, após 24h de tratamento. O ensaio foi avaliado tanto por resazurina, quanto pela liberação de LDH, que avalia permeabilização de membrana celular. Com este ensaio, é possível observar que a liberação de LDH é inversamente proporcional à metabolização de resazurina em resorufina, ou seja, a morte das células MDA-MB-231 é acompanhada pela liberação de LDH, o que dá indícios de um possível mecanismo de morte celular relacionado à permeabilidade da membrana.

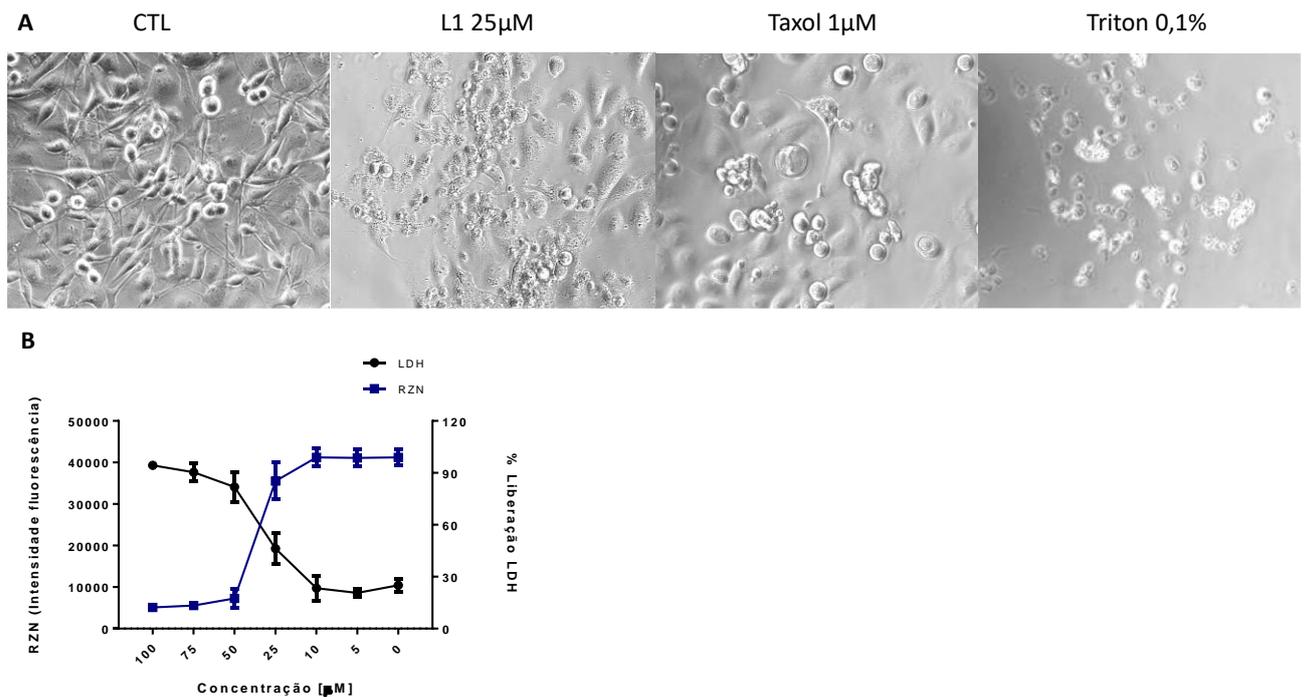


Figura 20: Avaliação de morte celular na linhagem MDA-MB-231. **A)** Microscopia de campo claro de células MDA-MB-231 após 24h de tratamento com Lunatina-1 (25 µM), Taxol (1 µM) e Triton X-100 (0,1%). **B)** Curva dose-resposta de Lunatina-1 em diferentes concentrações avaliada por liberação de LDH e metabolização de Resazurina. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Como mecanismos de morte que envolvem a membrana são relativamente mais rápidos que mecanismos que dependem de sinalização intracelular, avaliamos a liberação de LDH em diferentes concentrações de Lunatina-1 após 3 horas de tratamento. Triton 0,1% foi utilizado como controle positivo para lise celular (**Figura 21A**). Podemos observar que nas concentrações de L1 100, 75 e 50 µM a liberação de LDH foi equivalente ao Triton. Já nas concentrações de L1 25, 10 e 5 µM houve uma diferença significativa em relação ao Triton, sendo que na concentração de L1 25 µM a taxa de liberação foi em torno de 50%.

Após 3 horas de tratamento, células MDA-MB-231 foram coradas com Hoechst 33342 e Calceína-AM a fim de se avaliar alterações na morfologia nuclear e na viabilidade celular, respectivamente (**Figura 21B**). Para a Lunatina-1, foi observado que os núcleos estavam mais condensados, entretanto não foi observada fragmentação nuclear. A perda da viabilidade celular também pode ser observada em relação ao

controle, onde menos células foram marcadas com Calceína-AM. Já o Triton 0,1% exibe um perfil diferente, os núcleos parecem agrupar-se e todo o conteúdo citoplasmático foi disperso.

Devido à redução na viabilidade celular após 3h de tratamento com Lunatina-1, avaliamos por 1 hora seu efeito sobre a integridade da membrana celular e sobre a viabilidade celular, utilizando Hoechst 33342, Calceína-AM e PI como marcadores (**Figura 21C**), e surpreendentemente, grande parte das células foram coradas com PI, reforçando novamente, algum mecanismo de morte celular relacionado à membrana.

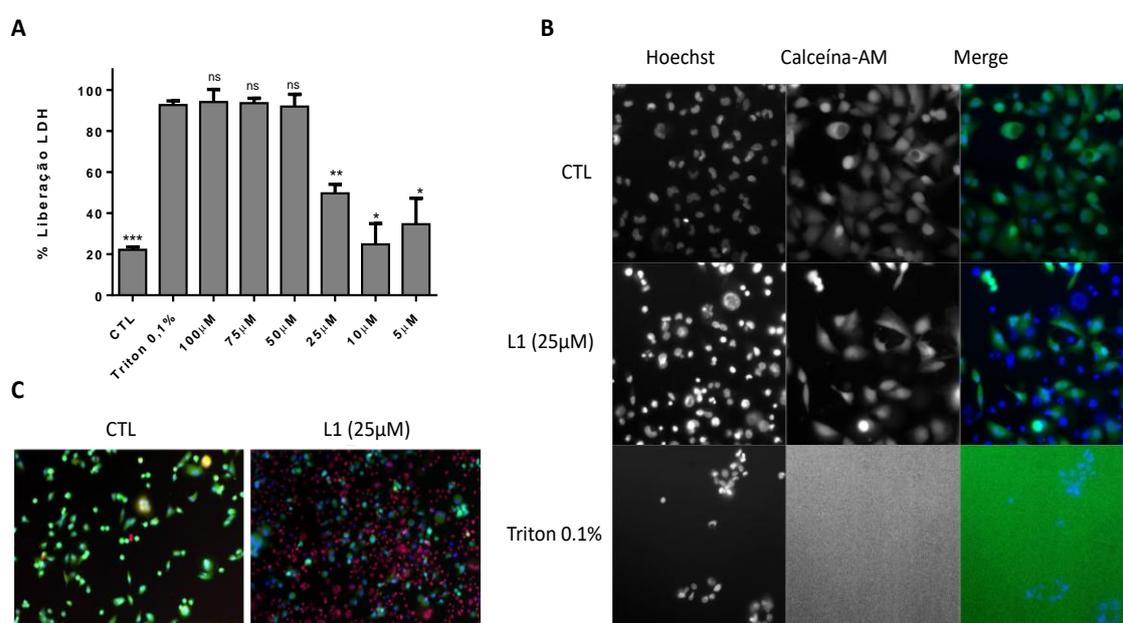


Figura 21: Perfil de morte celular na linhagem MDA-MB-231 induzida por Lunatina-1. **A)** Liberação de LDH após 3h de tratamento com Lunatina-1 em diferentes concentrações e Triton X-100 (0,1%). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. (**/* $p < 0,05$; teste t de Student, não pareado, em relação ao Triton). **B)** Microscopia confocal utilizando Hoechst e Calceína-AM como marcadores após 3h de tratamento com L1 25 μM e Triton x-100 (0,1%). Aumento de 20X. **C)** Microscopia confocal utilizando Hoechst, Calceína-AM e PI como marcadores após 1h de tratamento com L1 25 μM. Aumento de 10X.

Com os resultados apresentados até o momento, descartamos a possibilidade de morte celular programada por apoptose em células MDA-MB-231, e decidimos investigar um mecanismo mais simples, a necroptose, um tipo de morte celular com características morfológicas que se assemelham à necrose (SU et al., 2015). A necroptose é uma forma de necrose programada, e ao contrário da apoptose, não envolve a ativação de caspases (XU et al., 2007). Sendo assim, utilizamos como marcador para necroptose o inibidor de RIPK1, a Necrostatina-1 (Nec-1).

Entretanto, de acordo com os dados apresentados na **Figura 22**, podemos observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem Nec-1, sendo assim, Lunatina-1 não induz morte celular por necroptose em células MDA-MB-231. Para os demais tratamentos, este resultado era esperado, devido à capacidade lítica do Triton X-100 na membrana plasmática e de indução de apoptose pelo Taxol.

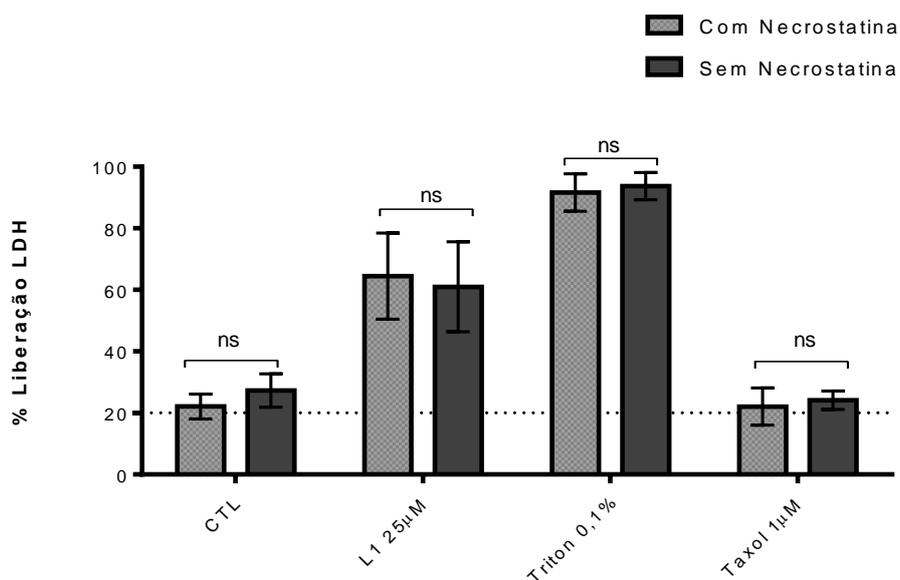


Figura 22: Avaliação de morte celular por Necroptose na linhagem MDA-MB-231 utilizando Nec-1 como inibidor de RIPK-1. As células foram tratadas com L1 25µM, Triton 0,1% e Taxol 1µM durante 24h. O resultado é apresentado em porcentagem de liberação de LDH. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. ($p < 0,05$; teste t de Student, não pareado, comparando cada tratamento individual com e sem Nec-1).

Diante dos resultados obtidos, resolvemos investigar a interação do peptídeo sintético Lunatina-1 com um modelo mimético de membrana (lipossomas) e em eritrócitos.

Lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina foram preparados contendo Calceína-AM em seu interior. Este experimento permite avaliar a capacidade lítica dos peptídeos, de modo que quando a vesícula é rompida, Calceína-AM é liberada e sua fluorescência pode ser detectada (FREZARD et al.,1994).

Na **Figura 23A** podemos observar que os lipossomas de fosfatidilcolina não foram rompidos, ou discretamente rompidos a 25 μM , na presença de Lunatina-1, diferente do resultado observado para o Triton, onde a Calceína foi liberada. Na **Figura 23B** o tamanho dos lipossomas foi medido após o tratamento. Para os lipossomas do grupo controle, foram observados 2 picos referentes a lipossomas com tamanhos de 34,51 nm (99,7%) e 4894 nm (0,3%). Para a Lunatina-1 25 μM os picos foram de 32,68 nm (96,7%) e 149,1 nm (3,3%), não alterando o tamanho dos lipossomas em comparação ao controle. No entanto, para o grupo tratado com Triton, os picos observados foram de 12,6 nm (99,5%) e de 145,5 nm (0,5%), desta forma, podemos observar uma mudança no perfil dos lipossomas, levando a uma diminuição no tamanho dos mesmos, o que pode ter ocorrido em decorrência do rompimento e reorganização dos fosfolipídios da bicamada lipídica.

Com estes resultados, não podemos deixar de considerar que proteínas ou mesmo outros lipídeos de membrana possam ser importantes para a ação da Lunatina-1, uma vez que este modelo é bem menos complexo que as membranas biológicas.

Entretanto, em seu estudo sobre o peptídeo LyeTx1, isolado a partir do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, Santos e colaboradores (2010) observaram lise em lipossomas de fosfatidilcolina em baixas concentrações, ED_{50} $2,7 \times 10^{-10}\text{M}$, que corresponde a 0,27 nM. LyeTx1, é um peptídeo de 25 resíduos de aminoácidos que apresenta atividade antimicrobiana, com provável atividade membranolítica.

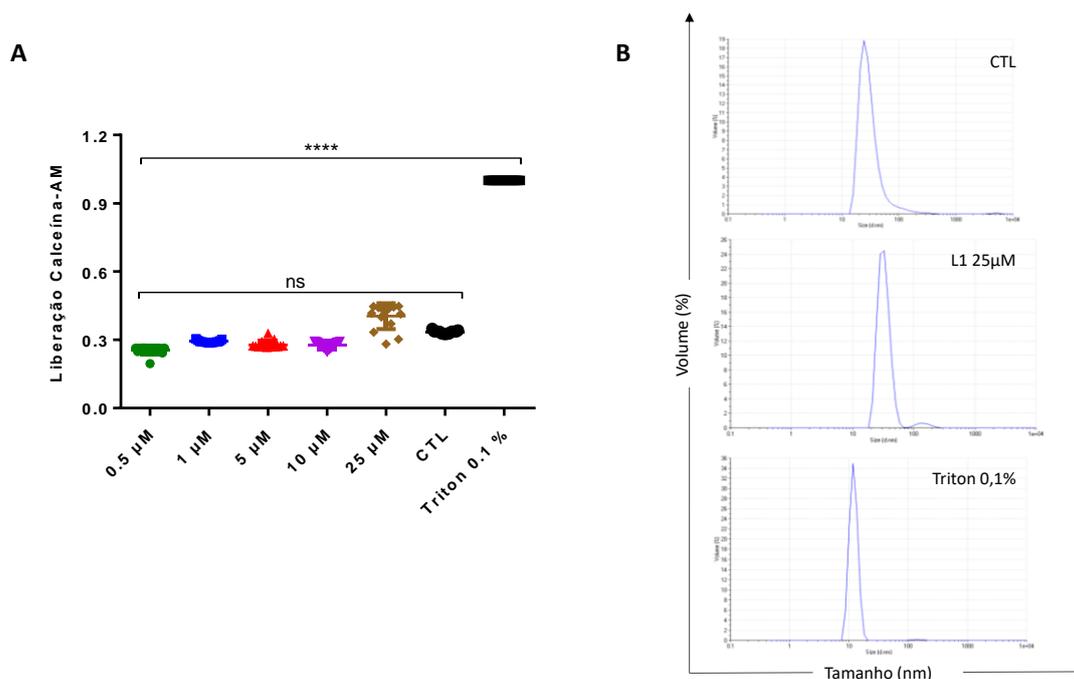


Figura 23: Liberação de Calceína-AM a partir de lipossomas de fosfatidilcolina. **A)** Ensaio de liberação de Calceína-AM após tratamento com Lunatina-1 (L1) em diferentes concentrações. Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo para lise. **B)** Análise do tamanho dos lipossomas após 15 min de tratamento com Lunatina-1 (25 μ M) e Triton X-100 (0,1%). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (**** $p < 0,0001$; two-way-ANOVA, seguido de teste de Tukey).

Considerando o potencial citotóxico da Lunatina-1 como um peptídeo antitumoral promissor, este também foi avaliado em outros modelos celulares preditivos de toxicidade como eritrócitos, células renais (HEK-293), hepatócitos (HepG2) e neurônios (LUHMES).

A atividade hemolítica da Lunatina-1 foi realizada utilizando eritrócitos de cordeiro. A membrana de eritrócitos é utilizada como modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal por ser desprovida de núcleo e organelas. A membrana eritrocitária, assim como as demais células do organismo humano, é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas, sendo que os fosfolipídios representam cerca de 50% de sua massa total (MURADOR et al., 2007). Fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiéline e fosfatidilserina são os principais fosfolipídios encontrados na membrana eritrocitária, correspondendo a 30, 27, 23 e 15% do total dos fosfolipídios, respectivamente. Além disso, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina

encontram-se, predominantemente, na monocamada interna da membrana celular, enquanto fosfatidilcolina e esfingomiélnina são encontrados preferencialmente na monocamada externa (NELSON; COX, 2014).

De acordo com o resultado apresentado na **Figura 24**, que avalia a capacidade hemolítica da Lunatina-1, não foi observado lise significativa de hemácias, nem na maior concentração testada (100 μ M). O fato de fosfolipídios neutros, como fosfatidilcolina e esfingomiélnina, serem os principais fosfolipídios encontrados na monocamada externa, pode interferir na interação entre o peptídeo Lunatina-1, que possui um resíduo positivo, e a membrana eritrocitária, visto que, em células tumorais, a disposição de lipídeos nas monocamadas não segue este padrão (HE; GUO; LI, 2015).

Santos e colaboradores (2010) encontraram um valor alto de ED₅₀ (1,3 \times 10⁻⁴M) para a atividade hemolítica de LyeTx1 em eritrócitos de coelho. LyeTx1 é um peptídeo anfipático, assim como a Lunatina-1 (SANTANA, 2012), e segundo Chen et al. (2005) e Martins et al. (2006), peptídeos mais hidrofóbicos são mais propensos a causar lise de eritrócitos, enquanto um aumento na carga positiva e anfipaticidade seja essencial para atividade lítica, entretanto, outros fatores como o tamanho dos peptídeos também devem ser levados em consideração.

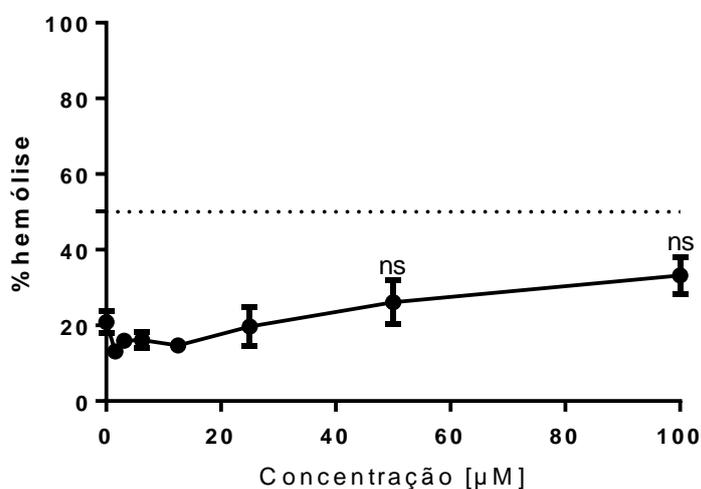


Figura 24: Atividade hemolítica da Lunatina-1. Eritrócitos foram tratados durante 1h com Lunatina-1 em diferentes concentrações. Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo para hemólise e considerado 100% de lise. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. ($p < 0,05$; teste t de Student, não pareado).

O efeito da Lunatina-1 em células HEK-293 e HepG2 está apresentada na **Tabela 3**. Embora as linhagens HepG2 e HEK-293 sejam utilizadas como modelos preditivos para citotoxicidade, não podemos deixar de considerar que células HepG2, mesmo não sendo uma linhagem tumorigênica, são provenientes de uma linhagem derivada de um hepatocarcinoma. Já HEK-293, apesar de ser de origem de rim embrionário humano, possui capacidade tumorigênica (Fonte: ATCC®), portanto, tratam-se de células que também carregam alterações genéticas e que compartilham de algumas características de células tumorais (LIN et al., 2014) (ZHAO et al., 2017).

Tabela 3: Citotoxicidade da Lunatina-1, Etoposídeo e Taxol sobre as linhagens HEK-293 e HepG2, após 24h de tratamento, IC₅₀ expressa em µM e em intervalo de confiança de 95%. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

	HEK-293	HepG2
L1	20,13 µM (14,26 a 28,40 µM)	47,42 µM (25,62 a 62,06 µM)
ETO	> 100 µM*	>100 µM
Taxol	>10 µM *	>10 µM

*maior concentração testada.

O resultado de IC₅₀ para Lunatina-1 obtido para a linhagem HEK-293 foi de 20,13 µM e para a linhagem HepG2 a IC₅₀ foi de 47,42 µM. Nas nossas condições experimentais, Etoposídeo e Taxol apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 100 µM e 10 µM, respectivamente, para as duas linhagens. Observa-se que nos modelos estudados de toxicidade em rins e fígado, a toxicidade da Lunatina-1 foi similar às linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, em igual faixa de IC₅₀. Entretanto, em estudos futuros, podemos propor mudanças na sequência peptídica da Lunatina-1, buscando otimizar sua especificidade e também reduzir sua toxicidade.

Contudo, também foi demonstrado que Taxol induz efeito nefrotóxico em rim de camundongos, foram encontradas alterações necróticas e apoptóticas nos túbulos renais, assim como degenerações nos vasos sanguíneos renais, na membrana glomerular e nos

túbulos distais, mesmo quando a dose mínima tolerada (0,6 mg/kg) foi administrada (RABAH, 2010).

Gagandeep e colaboradores (1999), estudando mecanismos de citotoxicidade em células HepG2, encontraram uma LD₅₀ de 0,1 µM para Taxol, muito embora a IC₅₀ descrita na literatura para o Taxol sobre a linhagem MDA-MB-231 está na faixa de nM (LI et al., 2014; TOMMASI et al., 2007; GEORGE et al., 2015), exibindo portanto, uma certa especificidade. Porém, em estudos clínicos, um dos efeitos adversos do Taxol são alterações hepáticas, entretanto, são raros os casos de necrose hepática em decorrência do uso de Taxol (KING; PERRY, 2001).

Outro modelo utilizando em nossos estudos foi com células LUHMES. Estas células são sensíveis a vários compostos tóxicos, incluindo fármacos antitumorais, que na prática médica possuem neurotoxicidade. Este modelo tem sido utilizado como preditivo para atividade neurotóxica.

Células LUHMES são derivadas do mesencéfalo embrionário humano e imortalizadas pelo gene v-myc, responsivo à tetraciclina. Após a diferenciação, induzida por tetraciclina, AMP cíclico (cAMP) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), essas células saem do ciclo celular tornando-se neurônios dopaminérgicos (LEIST et al., 2012). Deste modo, células LUHMES diferenciadas exibem atividade elétrica espontânea e são capazes de liberar/captar dopamina, assemelhando-se a neurônios dopaminérgicos humanos (ZHANG et al., 2014), sendo, portanto, um bom modelo para o estudo *in vitro* de neurotoxicidade (LEIST et al., 2012).

Na **Figura 25**, Hoechst e Calceína-AM foram utilizados como marcadores para o núcleo e viabilidade celular, respectivamente. Podemos observar que Lunatina-1 induziu condensação nuclear e perda de viabilidade celular. Etoposídeo, fármaco atitumoral para comparação, foi capaz de induzir condensação e fragmentação nuclear, e também perda de viabilidade celular

A **Tabela 4** traz um resumo dos valores de IC₅₀ encontrados para Lunatina-1, Etoposídeo e Taxol sobre células LUHMES. Podemos observar que Lunatina-1 e Etoposídeo apresentam mesma faixa de neurotoxicidade.

Tabela 4: Neurotoxicidade da Lunatina-1 e Etoposídeo sobre células LUHMES após 24h de tratamento. IC₅₀ expressa em μM e em intervalo de confiança de 95%. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

	Área neurito	Viabilidade
L1	2,7 (1,7 a 4,2) μM	3,8 (3,0 a 4,9) μM
ETO	2,4 (1,2 a 4,9) μM	2,3 (1,6 a 3,2) μM

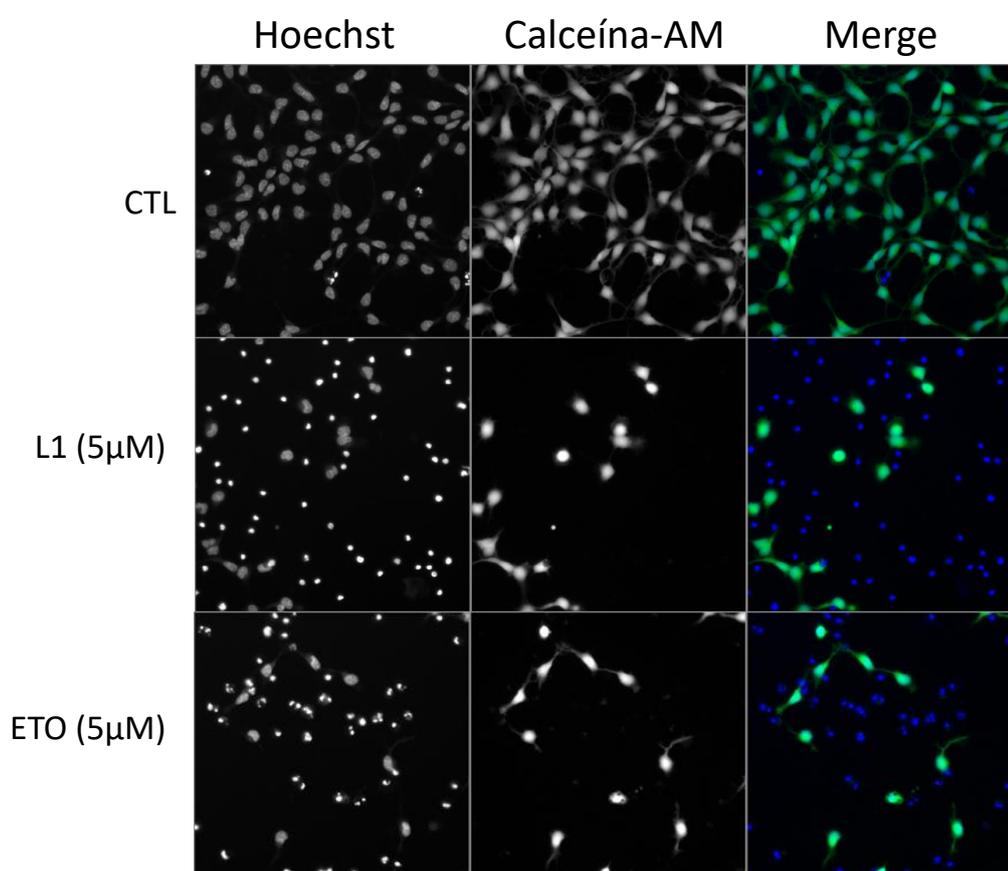


Figura 25: Neurotoxicidade em células LUHMES. Células LUHMES foram coradas com Hoechst e Calceína-AM após 24h de tratamento com Lunatina-1 (L1) e Etoposídeo (ETO) em diferentes concentrações. A figura representa L1 e ETO na concentração de 5 μM . Aumento de 20X.

Capítulo 3:

L1C3 como um novo peptídeo derivado da Lunatina-1 com atividade citotóxica/antitumoral

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sintetizar o peptídeo quimera entre Lunatina-1 e caspase-3 (L1C3), desenhado com base na similaridade de estrutura primária das duas sequências;
- 2) Avaliar o efeito citotóxico/antitumoral do peptídeo L1C3 e de sua isoforma minimizada L1C3M sobre diferentes linhagens celulares;
- 3) Avaliar o efeito do peptídeo L1C3 na sobrevivência e proliferação das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7;
- 4) Caracterizar o tipo de morte celular induzida pelo peptídeo L1C3;
- 5) Estudar a relação entre as sequências peptídicas da Lunatina-1 e L1C3 com a internalização celular e atividade antitumoral.

4 HIPÓTESE

O peptídeo desenhado a partir das sequências da Lunatina-1 e caspase-3, denominado L1C3, apresenta atividade antitumoral/citotóxica.

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção dos peptídeos L1C3 e L1C3M

Os peptídeos L1C3 e L1C3M foram desenhados a partir de análises de bioinformática utilizando como ferramenta o programa BioAssay do BLASTp que busca possíveis alvos para um sequência proteica (Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=BioassayBlast&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp).

Lunatina-1 foi utilizada como molde e as sequências peptídicas obtidas foram FIGGLLKKITNFF-NH₂, que corresponde ao peptídeo L1C3, e LKKITNFF-NH₂, uma versão minimizada de L1C3, denominada L1C3M. A **Figura 26A**, traz um esquema explicativo do alinhamento entre as sequências peptídicas de Lunatina-1 e caspase-3, assim como os novos peptídeos obtidos. Na **Figura 26B e C**, podemos observar a superposição entre as estruturas de Lunatina-1 e caspase-3.

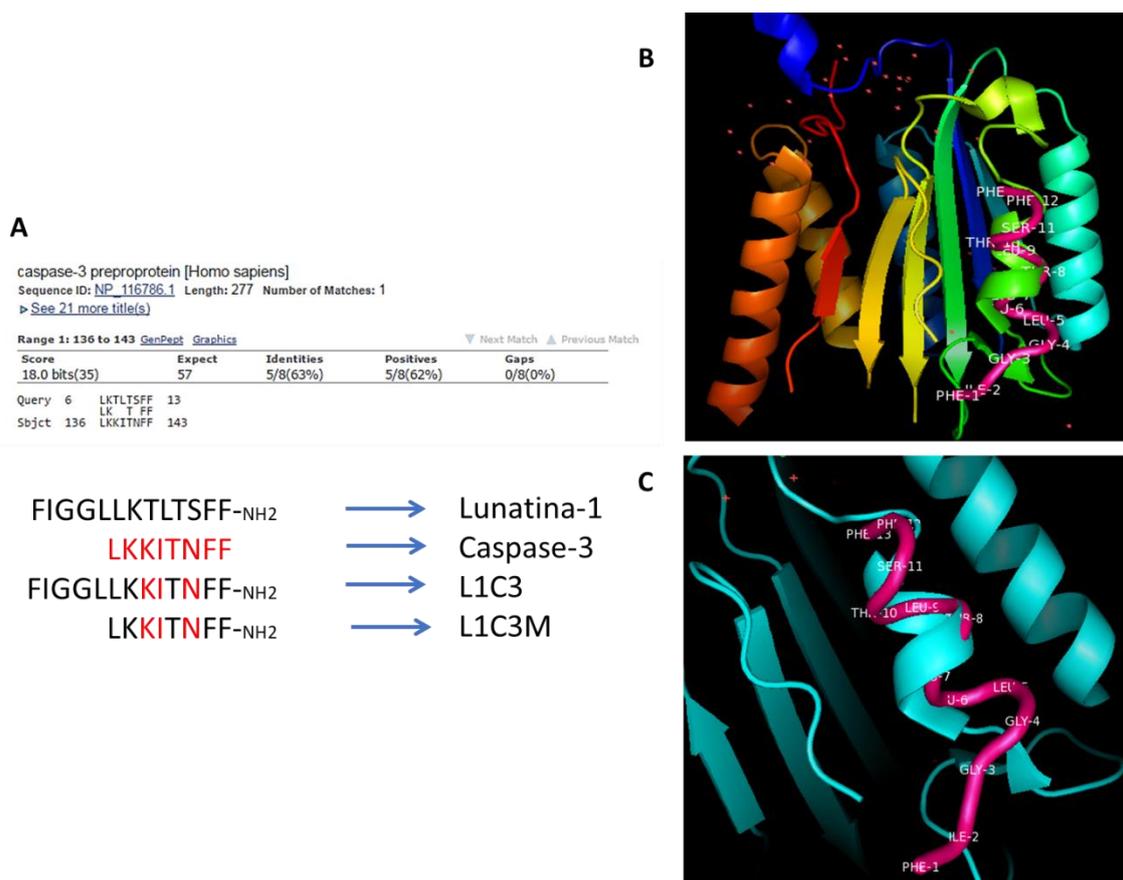


Figura 26: Obtenção de novas sequências peptídicas a partir do alinhamento entre Lunatina-1 e caspase-3. **A)** Alinhamento entre as sequências primárias. **B)** Superposição entre as estruturas 3D da caspase-3 e Lunatina-1 (em magenta). **C)** Zoom que corresponde à superposição entre as alfa-hélices da caspase-3 e Lunatina-1 (em magenta). As figuras em 3D foram obtidas com auxílio do programa PyMOL.

Após a predição das novas sequências quimera, os peptídeos L1C3 e L1C3M foram sintetizados, purificados e suas sequências primárias conferidas por espectrometria de massa, conforme descrito nos itens 5.1, 5.2 e 5.3 do Capítulo 1, respectivamente.

5.2 Caracterização estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As análises de dicroísmo circular foram realizadas em espectropolarímetro JASCO J-815, acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco modelo PTC-423L. Os espectros foram coletados a 20°C, utilizando-se cubeta de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico, na faixa λ de 190 a 260 nm, velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹ e tempo de resposta de 1 s. A largura de banda variou de 0,01 a 15 nm, com acumulação de três varreduras consecutivas por amostra.

As preferências conformacionais dos peptídeos Lunatina-1 e L1C3 foram determinadas em solução de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) a 50% em água Milli-Q, ambos na concentração de 0,35 mg/mL.

As deconvoluções foram realizadas com auxílio do programa CDNN 2.1, a fim de estimar o percentual de estruturas secundárias de cada peptídeo.

5.3 Ensaios para avaliação de atividade citotóxica/antitumoral e de caracterização de morte celular para os peptídeos L1C3 e L1C3M

O plaqueamento e tratamento das células para determinação da IC₅₀ foi realizado conforme descrito no item 5.2 do Capítulo 2.

O ensaio preditivo de neurotoxicidade em células LUHMES foi realizado conforme descrito no item 5.3 do Capítulo 2.

O ensaio de clonogenicidade foi realizado conforme descrito no item 5.4 do Capítulo 2.

O ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase foi realizado conforme descrito no item 5.5 do Capítulo 2.

As microscopias de campo claro e de fluorescência foram realizadas conforme descrito no item 5.6 do Capítulo 2.

A avaliação de morte celular por necroptose utilizando Necrostatina-1 como inibidor foi realizado conforme descrito no item 5.7 do Capítulo 2.

A atividade hemolítica do peptídeo L1C3 foi realizado conforme descrito no item 5.8 do Capítulo 2.

O preparo de lipossomas e ensaio de liberação de Calceína-AM foi realizado conforme descrito no item 5.9 do Capítulo 2.

5.4 Ensaio de internalização de diversos peptídeos marcados por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*

Os peptídeos marcados foram adquiridos comercialmente da empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil), abaixo seguem as construções:

FITC- FIGGLLKKITNFF-NH₂, denominado FITC-L1C3

FITC-FIGGLL-NH₂, denominado FITC-n-terminal, comum à L1 e L1C3

TAMRA-LKKITNFF-NH₂, denominado TAMRA-c-terminal-L1C3

TAMRA-LKTLTSFF-NH₂, denominado TAMRA-c-terminal-L1

Para os experimentos de internalização, células HL60 foram utilizadas como modelo e as lâminas preparadas conforme descrito no item 5.14 do Capítulo 1. Soluções de todos os peptídeos na concentração de 50µM foram preparadas em tampão HBSS na presença de Ca²⁺ (2,5 mM).

O *Time-lapse-Imaging* foi adquirido durante 80 minutos para os peptídeos FITC-L1C3, FITC-n-terminal e TAMRA-c-terminal-L1C3. Para o peptídeo TAMRA-c-terminal-L1 o tempo de aquisição foi de 30 minutos.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal modelo LSM 880 Zeiss (Oberkochen, Alemanha), utilizando lente objetiva de aumento de 40X e imersão em óleo. Os lasers utilizados foram o Ar-488nm, com excitação em 488 nm e emissão entre 505-550 nm, para detecção do FITC (verde) e o HeNe1-543nm, com excitação em 543 nm e observação entre 560-610 nm, para detecção do TAMRA (vermelho).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção dos peptídeos sintéticos L1C3 e L1C3M

Os peptídeos L1C3 e L1C3M foram purificados por cromatografia em fase reversa e os perfis cromatográficos estão representados nas **Figuras 27A** e **28A**, respectivamente. L1C3 foi eluído quando o gradiente de ACN atingiu 59%, e L1C3M com 43% de ACN. Em ambas as corridas, houve uma separação eficiente dos outros produtos de síntese, as frações coletadas foram analisadas por MALDI-TOF/MS e as massas dos peptídeos de interesse confirmadas. Na **Figura 27B** são observados um pico de massa monoisotópica de 1496,64 Da referente ao L1C3, e outros dois picos referentes aos adutos de sódio (1518,57 Da) e potássio (1534,56 Da) desse peptídeo. Na **Figura 28B** são observados um pico de massa monoisotópica de 1009,80 Da referente ao L1C3M, e outros dois picos referentes aos adutos de sódio (1031,82 Da) e potássio (1047,82 Da) desse peptídeo.

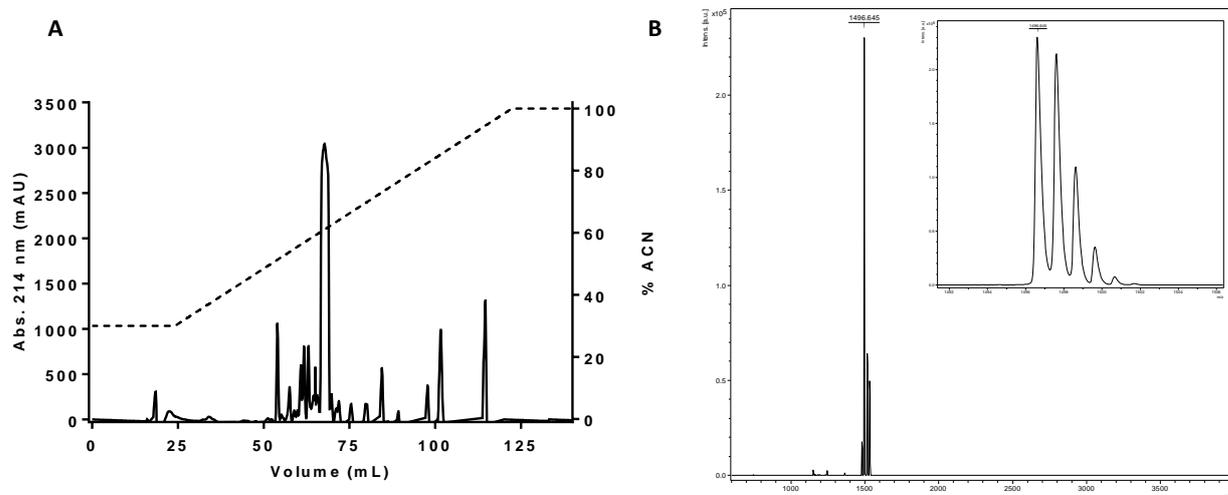


Figura 27: Purificação do peptídeo sintético L1C3. **A)** Perfil cromatográfico obtido após aplicação de 10 mg do produto de síntese em coluna semi-preparativa de fase reversa Discovery® BIO Wide Pore C18 (25 cm x 10 mm). Absorbância a 214 nm (—) e gradiente de ACN (---). Frações de 1mL foram coletadas. **B)** Espectro de massa obtido com sistema MALDI-TOF/MS. Os picos correspondem à massa monoisotópica monocarregada $[M+H]^+ = 1496,64$ e aos adutos de sódio $[M+Na]^+ = 1518,57$ e potássio $[M+K]^+ = 1534,56$. O zoom representa os envelopes monoisotópicos do pico $m/z = 1496,64$.

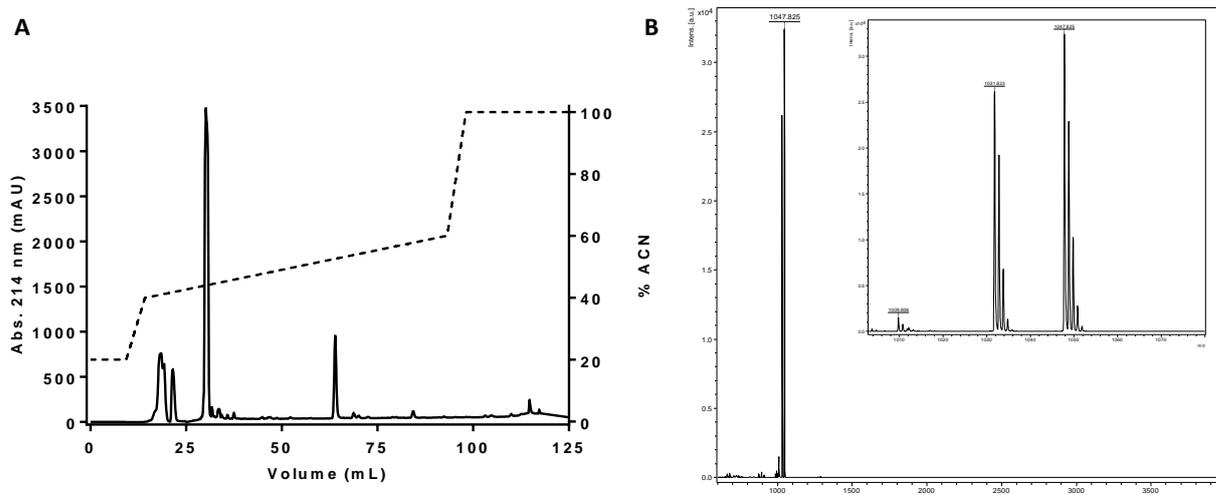


Figura 28: Purificação do peptídeo sintético L1C3M. **A)** Perfil cromatográfico obtido após aplicação de 10 mg do produto de síntese em coluna semi-preparativa de fase reversa *Discovery® BIO Wide Pore C18* (25 cm x 10 mm). Absorbância a 214 nm (—) e gradiente de ACN (---). Frações de 1mL foram coletadas. **B)** Espectro de massa obtido com sistema MALDI-TOF/MS. Os picos correspondem à massa monoisotópica monocarregada $[M+H]^+ = 1009,80$ e aos adutos de sódio $[M+Na]^+ = 1031,82$ e potássio $[M+K]^+ = 1047,82$. O zoom representa os envelopes monoisotópicos de todos os picos.

A validação da sequência peptídica também foi realizada por espectrometria de massa (MS/MS) em sistema MALDI-TOF/TOF. As séries b e y encontradas após a fragmentação do íon parental e obtidas através da fragmentação da ligação peptídica na direção N-terminal (íons b) ou C-terminal (íons y) confirmam a sequência dos peptídeos L1C3 (FIGLLKKITNFF-NH₂) e L1C3M (LKKITNFF-NH₂), **Figuras 29 e 30**, respectivamente.

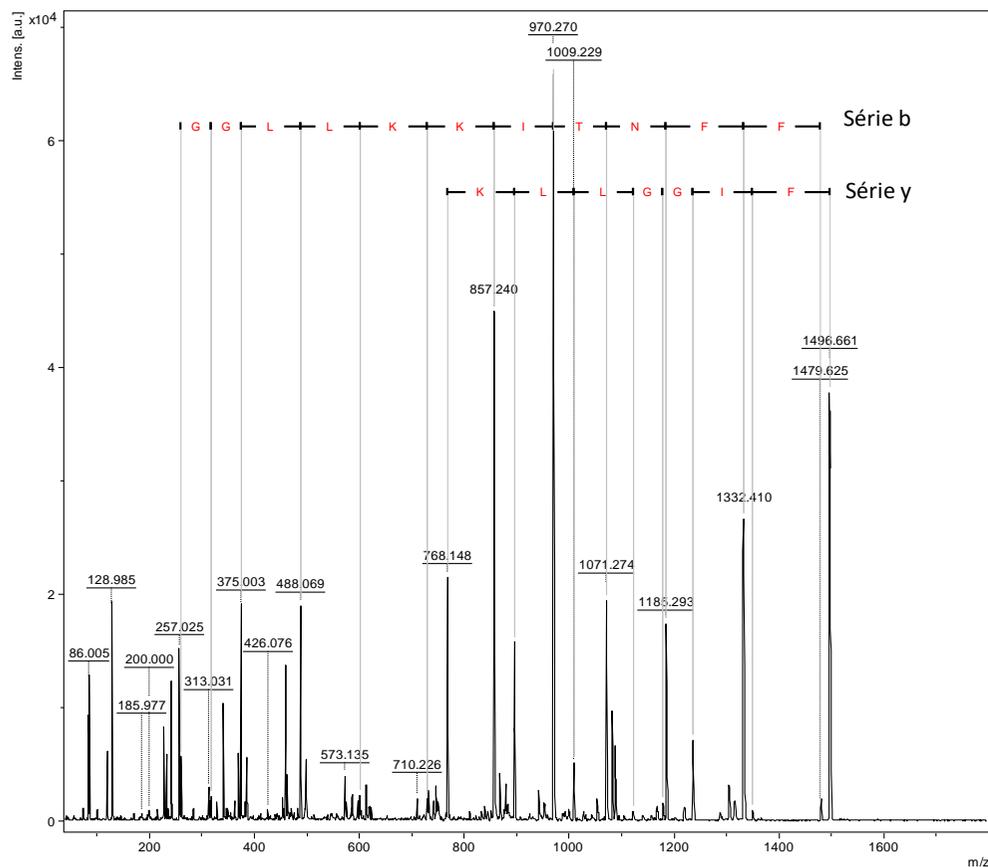


Figura 29: Sequenciamento do peptídeo L1C3 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Espectro de massa da fragmentação do íon parental $m/z = 1496,66$ obtido pela série b e série y.

Tabela 5: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo L1C3 (em preto os íons encontrados)

Massa monoisotópica resíduo		Íons série b		Íons série y	
F	147,06	1	148,06	13	1496,80
I	113,08	2	261,14	12	1349,74
G	57,02	3	318,16	11	1236,66
G	57,02	4	375,18	10	1179,64
L	113,08	5	488,26	9	1122,62
L	113,08	6	601,34	8	1009,54
K	128,09	7	729,43	7	896,46
K	128,09	8	857,52	6	768,37
I	113,08	9	970,60	5	640,28
T	101,04	10	1071,64	4	527,20
N	114,04	11	1185,68	3	426,16
F	147,06	12	1332,74	2	312,12
F	147,06	13	1479,80	1	165,06

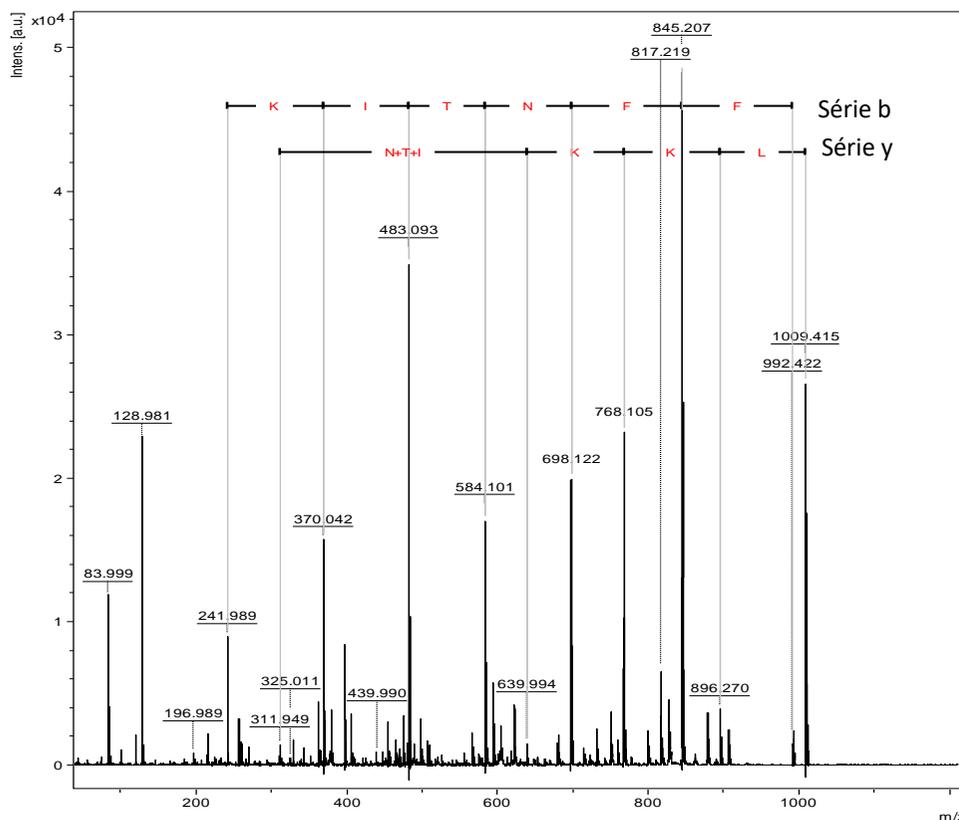


Figura 30: Sequenciamento do peptídeo L1C3M por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Espectro de massa da fragmentação do íon parental $m/z = 1009,41$ obtido pela série b e série y.

Tabela 6: Massas monoisotópicas teóricas dos íons das séries b e y obtidos a partir da fragmentação do peptídeo L1C3M (em preto os íons encontrados)

Massa monoisotópica resíduo	Íons série b	Íons série y
L 113,08	1 114,08	8 1009,54
K 128,09	2 242,17	7 896,46
K 128,09	3 370,26	6 768,37
I 113,08	4 483,34	5 640,28
T 101,04	5 584,38	4 527,20
N 114,04	6 698,42	3 426,16
F 147,06	7 845,48	2 312,12
F 147,06	8 992,54	1 165,06

6.2 Caracterização estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O conteúdo de estruturas secundárias do peptídeo L1C3 foi avaliada em relação ao de Lunatina-1. O espectro de CD para ambos os peptídeos exibe um perfil típico de α -hélice com picos mínimos em 210 nm e 222 nm (**Figura 31**). O espectro deconvoluído obtido pela análise do *software* CDNN 2.1, sugere uma proximidade conformacional entre Lunatina-1 e L1C3, sendo a preferência conformacional em α -hélice predominante. A **Tabela 7** resume as porcentagens de cada estrutura secundária encontrada para os peptídeos nas condições testadas.

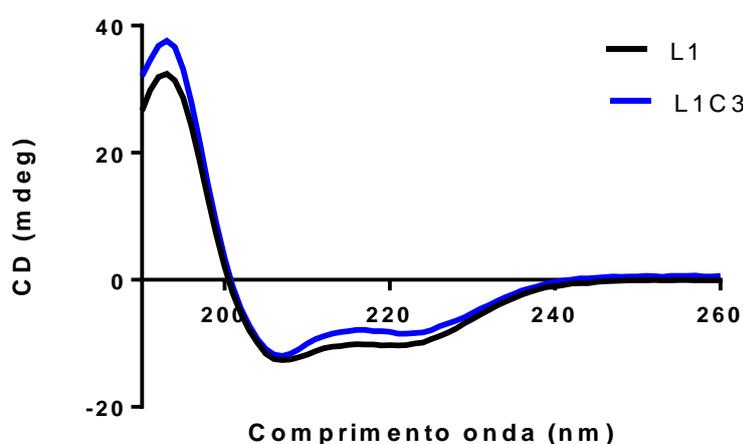


Figura 31: Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos Lunatina-1 e L1C3. Os espectros de CD foram obtidos a 20°C em solução de TFE:H₂O (1:1 v/v), ambos na concentração de 0,35 mg/mL.

Tabela 7: Porcentagem das principais estruturas secundárias encontradas para os peptídeos L1e L1C3 em solução de TFE:H₂O (1:1 v/v), ambos na concentração de 0,35 mg/mL.

Estrutura	Lunatina-1	L1C3
α-hélice	41,6%	34,6%
Antiparalela	4,8%	8,5%
Paralela	6,7%	7,9%
Curvas β	15,9%	17,0%
Randômica	24,8%	29,2%
Total	93,8%	97,3%

6.3 Ensaio para avaliação de atividade citotóxica/antitumoral e de caracterização de morte celular para os peptídeos L1C3 e L1C3M

A atividade antitumoral para os peptídeos L1C3 e L1C3M foi avaliada nas três linhagens susceptíveis à Lunatina-1: HL60, MDA-MB-231 e MCF-7 e a citotoxicidade em outras três linhagens: HepG2, HEK-293 e LUHMES. A **Tabela 8** resume os valores de IC₅₀ encontrados para cada linhagem testada.

Tabela 8: Valores de $IC_{50} \pm DP$ (em μM) para os peptídeos L1C3 e L1C3M em diferentes linhagens celulares. NA – peptídeo não ativo. ND – atividade não determinada.

Linhagens	L1C3	L1C3M
HL60	$45,42 \pm 3,06 \mu M$	NA
MDA-MB-231	$55,81 \pm 11,79 \mu M$	NA
MCF-7	$50,81 \pm 9,41 \mu M$	NA
HepG2	$>100 \mu M$	ND
HEK-293	$96,29 \pm 9,10 \mu M$	ND
LUHMES	$>20\mu M$ *	ND
	$8,6 \mu M^{\ddagger}$	

*área neurito \ddagger viabilidade

Podemos observar que o peptídeo L1C3 apresentou a mesma faixa de atividade antitumoral contra a linhagem HL60 quando comparado à Lunatina-1 ($IC_{50} = 45,79 \pm 4,85 \mu M$). Para as linhagens de tumor mamário MCF-7 e MDA-MB-231, L1C3 mostrou-se menos ativo, exibindo uma IC_{50} em concentrações maiores que as encontradas para Lunatina-1 ($IC_{50} = 21,7 \pm 3,5 \mu M$ para MDA-MB-231 e $31,6 \pm 8,8 \mu M$ para MCF-7).

Quanto à citotoxicidade frente às linhagens HepG2 (Fígado humano), HEK-293 (Rim humano) e LUHMES (Neuronal humano), L1C3 exibiu menor toxicidade em relação a Lunatina-1. Por sua vez, L1C3M não apresentou atividade contra nenhuma das linhagens testadas.

Para dar continuidade ao estudo de morte celular, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram selecionadas, considerando que as IC_{50} encontradas para o peptídeo L1C3 frente as linhagens tumorais são próximas. Entretanto, estudos envolvendo a linhagem HL60 se encontram em andamento.

A capacidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 originarem novas colônias após tratamento com peptídeo L1C3 também foi avaliada (**Figura 32A**).

Diferente do observado para Lunatina-1, L1C3 25 μ M, foi capaz de impedir a formação de novas colônias, principalmente para a linhagem MCF-7. A 10 μ M novas colônias são observadas para ambas linhagens, mantendo aproximadamente 80% de sua sobrevivência clonogênica (**Figura 32B**).

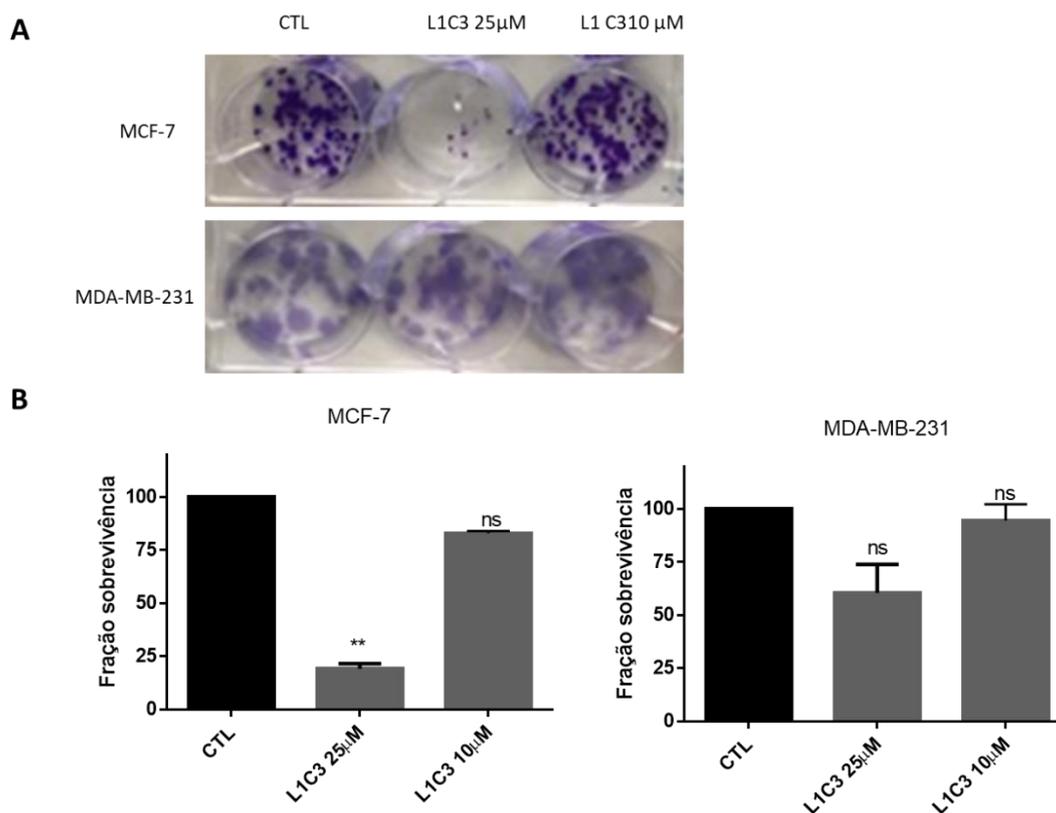


Figura 32: Ensaio clonogênico em células MCF-7 e MDA-MB-231. **A)** Células foram tratadas com L1C3 25 e 10 μ M. **B)** Quantificação das colônias. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. (** $p < 0,05$; teste t de Student, não pareado).

A linhagem MCF-7, diferentemente da linhagem MDA-MB-231, expressa os receptores para estrogênio (ER+), progesterona (PR+) e glicocorticóide (GR+), já o receptor para HER2 também não é expresso. Trata-se de uma linhagem de origem epitelial, isolada a partir de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade com adenocarcinoma mamário. Apesar de sua origem metastática, é uma linhagem celular não

invasiva e amplamente utilizada como modelo de doença em estágio inicial, devido à presença de ER funcional e dependência de estrogênio para crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, aproximadamente 70% dos tumores de mama são do tipo ER+ (ARIF et. al., 2015).

Na **figura 33A**, células MCF-7 foram tratadas durante 12h com o peptídeo L1C3, podemos observar a presença de *debris* celulares, assim como extravasamento de conteúdo citoplasmático, principalmente na concentração de 50 μ M. Na **figura 33B**, foi realizada uma curva dose-resposta de L1C3, durante 24h de tratamento, e assim como observado para Lunatina-1, a morte das células MCF-7 foi acompanhada pela liberação de LDH, indicando também alteração na permeabilidade da membrana.

Após 5 horas de tratamento, células MCF-7 também foram coradas com Hoechst 33342 e Calceína-AM (**Figura 33C**), e observou-se, principalmente, perda de viabilidade celular em relação ao controle. Alguns núcleos condensados também podem ser visualizados, muito embora não tenha sido verificada fragmentação nuclear.

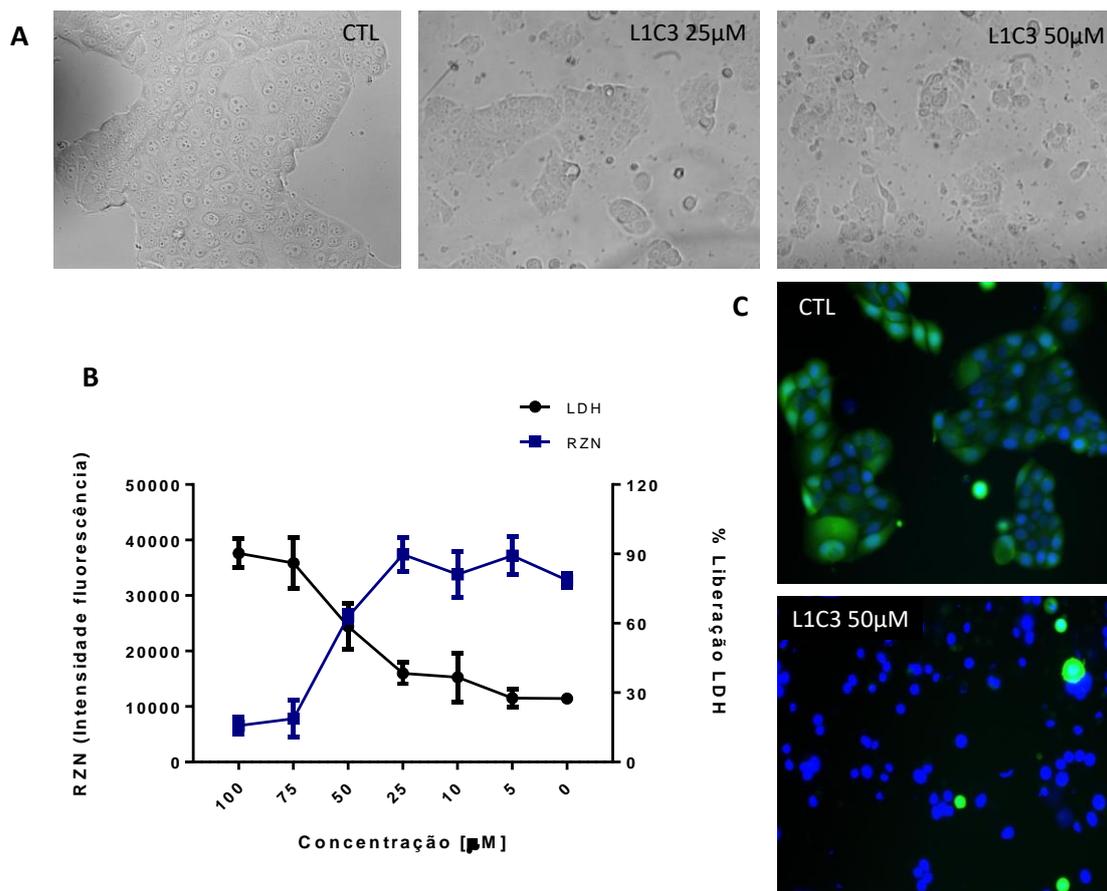


Figura 33: Avaliação de morte celular na linhagem MCF-7. **A)** Microscopia confocal de campo claro em células MCF-7 após 12h de tratamento com L1C3 25 e 50μM. Aumento de 20X. **B)** Curva dose-resposta após 24h de tratamento com L1C3 em diferentes concentrações e avaliada pela liberação de LDH e metabolização de Resazurina. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. **C)** Microscopia confocal utilizando Hoechst e Calceína-AM como marcadores após 5h de tratamento com L1C3 50μM. Aumento de 20X.

Para avaliar o tipo de morte na linhagem MDA-MB-231, as células foram tratadas durante 24h com o peptídeo L1C3. Na **Figura 34A**, podemos observar a presença de *debris* celulares na concentração de 50 μM quando comparada ao controle. A concentração de 25 μM, durante 24h de tratamento, não provocou alterações significativas na morfologia celular. Na **figura 34B**, assim como observado na linhagem MCF-7, a morte das células MDA-MB-231 foi acompanhada pela liberação de LDH, indicando também alteração na permeabilidade da membrana.

Após 5 horas de tratamento, células MDA-MB-231 também foram coradas com Hoechst 33342 e Calceína-AM (**Figura 34C**), e da mesma forma, observou-se perda de

viabilidade celular, porém em menor escala que na linhagem MCF-7. Células MCF-7 também foram mais sensíveis ao ensaio clonogênico para o peptídeo L1C3, apesar dos valores de IC_{50} para as duas linhagens, MDA-MB-231 e MCF-7, estarem próximos.

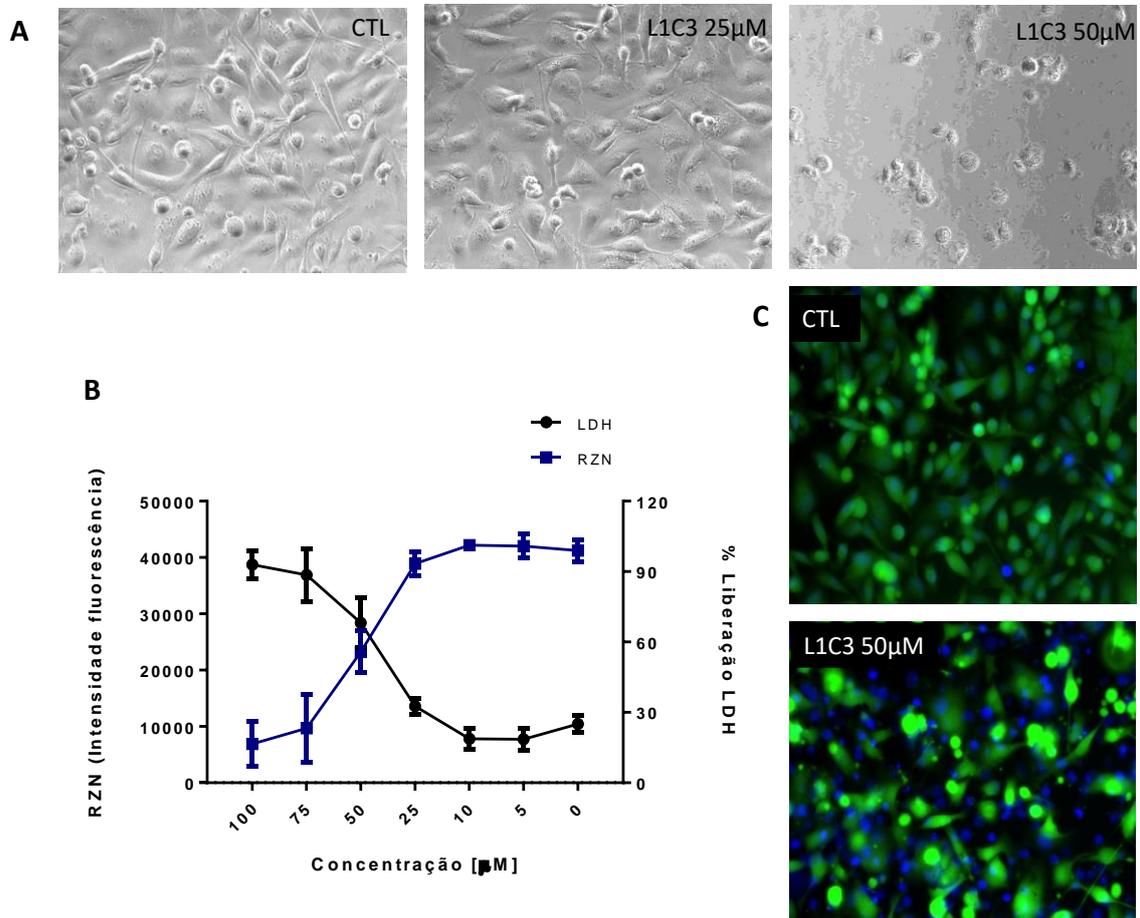


Figura 34: Avaliação de morte celular na linhagem MDA-MB-231. **A)** Microscopia confocal de campo claro em células MDA-MB-231 após 24h de tratamento com L1C3 25 e 50 μ M. Aumento de 20X. **B)** Curva dose-resposta após 24h de tratamento com L1C3 em diferentes concentrações avaliada pela liberação de LDH e metabolização de Resazurina. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. **C)** Microscopia confocal utilizando Hoechst e Calceína-AM como marcadores após 5h de tratamento com L1C3 50 μ M. Aumento de 20X.

Devido à redução na viabilidade celular após 5h de tratamento com L1C3, também avaliamos por 1 hora seu efeito sobre a alteração da permeabilidade da membrana celular e sobre a viabilidade na linhagem MDA-MB-231, utilizando Hoechst 33342, Calceína-AM e PI como marcadores. Diante dos resultados apresentados, **Figura 35A**, podemos observar que mesmo a 25 μM algumas células já apresentavam alteração da permeabilidade de membrana.

Sendo a ruptura precoce da membrana plasmática uma das características de morte por necroptose, este mecanismo também foi avaliado para o peptídeo L1C3 em células MDA-MB-231. De acordo com os dados apresentados na **Figura 35B**, podemos observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem Nec-1, sendo assim, L1C3 também não induz morte celular por necroptose em células MDA-MB-231.

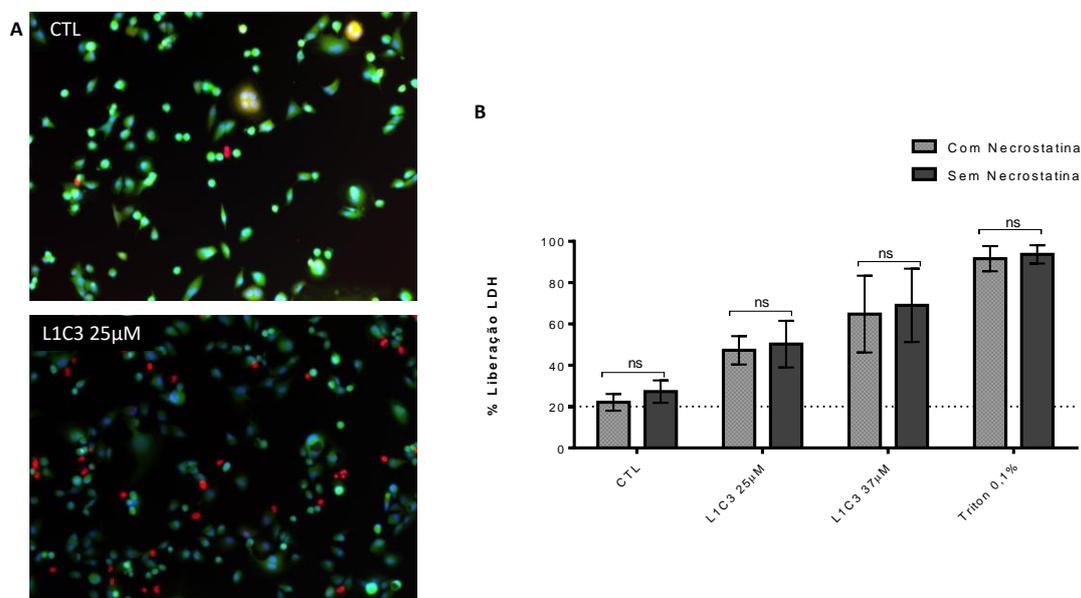


Figura 35: **A)** Microscopia confocal em células MDA-MB-231 utilizando Hoechst, Calceína-AM e PI como marcadores após 1h de tratamento com L1C3 25 μM . Aumento de 10X. **B)** Avaliação de morte celular por Necroptose na linhagem MDA-MB-231 utilizando Nec-1 como inibidor de RIPK-1. As células foram tratadas com L1C3 25 e 37 μM e com Triton 0,1% durante 24h. O resultado é apresentado em porcentagem de liberação de LDH. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. ($p < 0,05$; teste t de Student, não pareado, comparando cada tratamento individual com e sem Nec-1).

Mecanismos que envolvem interação com membranas também foram avaliados para o peptídeo L1C3. A atividade hemolítica (**Figura 36A**) e a interação com lipossomas de fosfatidilcolina (**Figura 36B**) foram determinadas. Assim como observado para Lunatina-1, L1C3 não apresentou atividade hemolítica e nem foi capaz de provocar o extravasamento de Calceína-AM dos lipossomas.

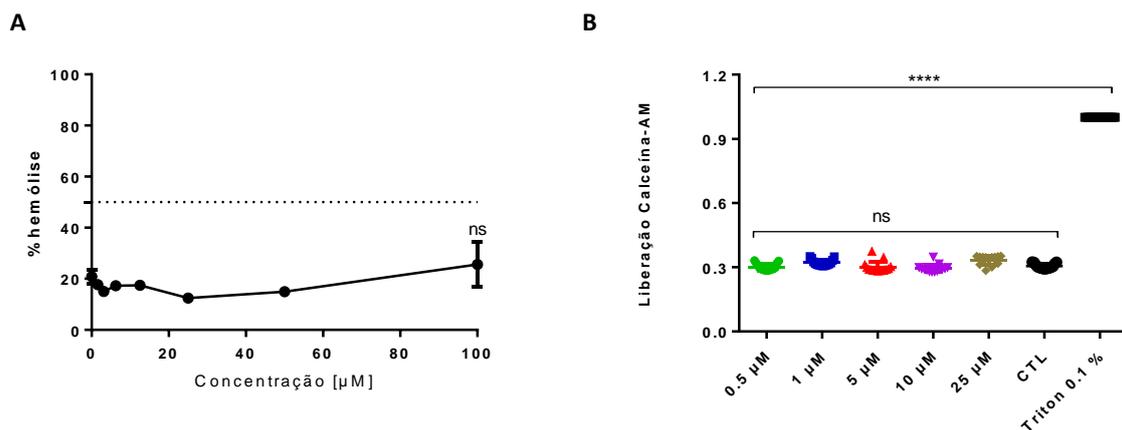


Figura 36: **A)** Atividade hemolítica para L1C3. Eritrócitos foram tratados durante 1h com L1C3 em diferentes concentrações. Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo para hemólise e considerado 100% de lise. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. ($p < 0,05$; teste t de Student, não pareado). **B)** Liberação de Calceína-AM a partir de lipossomas de fosfatidilcolina após tratamento com L1C3 em diferentes concentrações. Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo para lise. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. ($****p < 0,0001$; two-way-ANOVA, seguido de teste de Tukey).

6.4 Ensaio de internalização de diversos peptídeos marcados por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*

Os ensaios de internalização para os peptídeos FITC-n-terminal (FITC-FIGGLL-NH₂), TAMRA-c-terminal-L1C3 (TAMRA-LKKITNFF-NH₂), TAMRA-c-terminal-L1 (TAMRA-LKTLTSFF-NH₂) e FITC-L1C3 (FITC-FIGGLLKKITNFF-NH₂) foram realizados somente na presença de cálcio. Células HL60 foram utilizadas como modelo a fim de se estabelecer uma correlação com os resultados obtidos para o peptídeo FITC-Lunatina-1 no Capítulo 1.

Podemos observar que o peptídeo FITC-FIGGLL-NH₂ (**Figura 37A**), mesmo após a lavagem, permaneceu ligado à membrana celular, não sendo internalizado. Já o peptídeo TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ foi internalizado quase que imediatamente após o contato com as células. Porém, ao contrário da Lunatina-1-FITC, apresentou uma distribuição uniforme pelo citoplasma e inclusive pelo núcleo (**Figura 37B**).

Ao contrário do observado para o peptídeo TAMRA-LKTLTSFF-NH₂, praticamente não houve internalização para o peptídeo TAMRA-LKKITNFF-NH₂, com exceção de pouquíssimas células, sendo quase que totalmente lavado pela perfusão (**Figura 37C**). Tal fato chamou atenção devido à ausência de atividade deste peptídeo (L1C3M) nas linhagens testadas, provavelmente por não entrar na célula ou interagir com a membrana celular, nenhuma atividade foi detectada. Deste modo, a sequência FIGGLL mostra-se importante para a atividade do peptídeo L1C3, visto que este é um peptídeo biologicamente ativo.

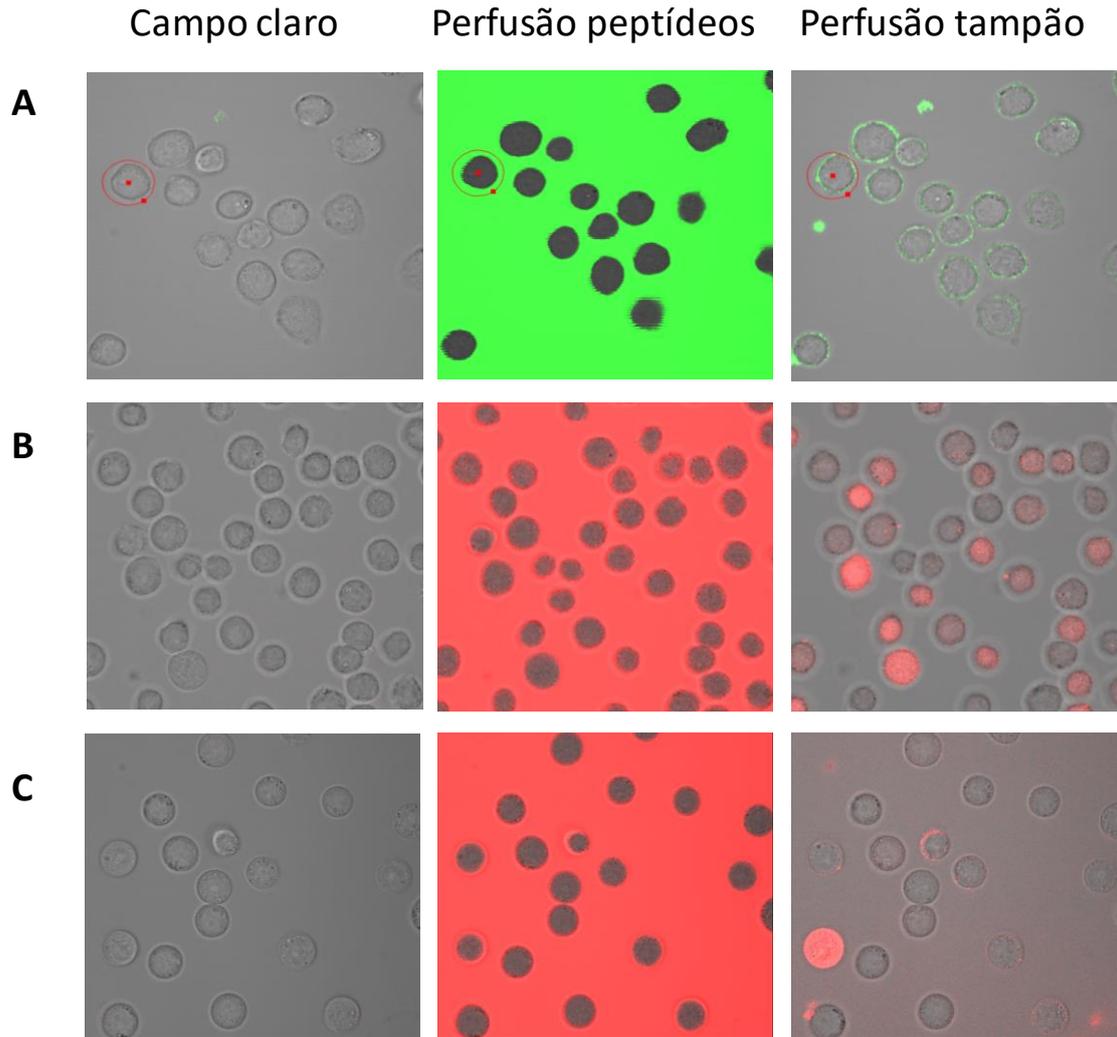


Figura 37: Internalização dos peptídeos FITC-FIGGLL-NH₂, TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ e TAMRA-LKKITNFF-NH₂ por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*. Células HL60 foram perfundidas, separadamente, com os três peptídeos a 50 μM e na presença de cálcio. **A)** Peptídeo FITC-FIGGLL-NH₂ **B)** Peptídeo TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ **C)** Peptídeo TAMRA-LKKITNFF-NH₂. Aumento 40X. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição testada.

Na Figura 38, podemos ver em melhor detalhe o peptídeo FITC-FIGGLL-NH₂ ligado à membrana das células HL60 (**Figura 38A**), assim como o peptídeo TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ no interior das células (**Figura 38B**).

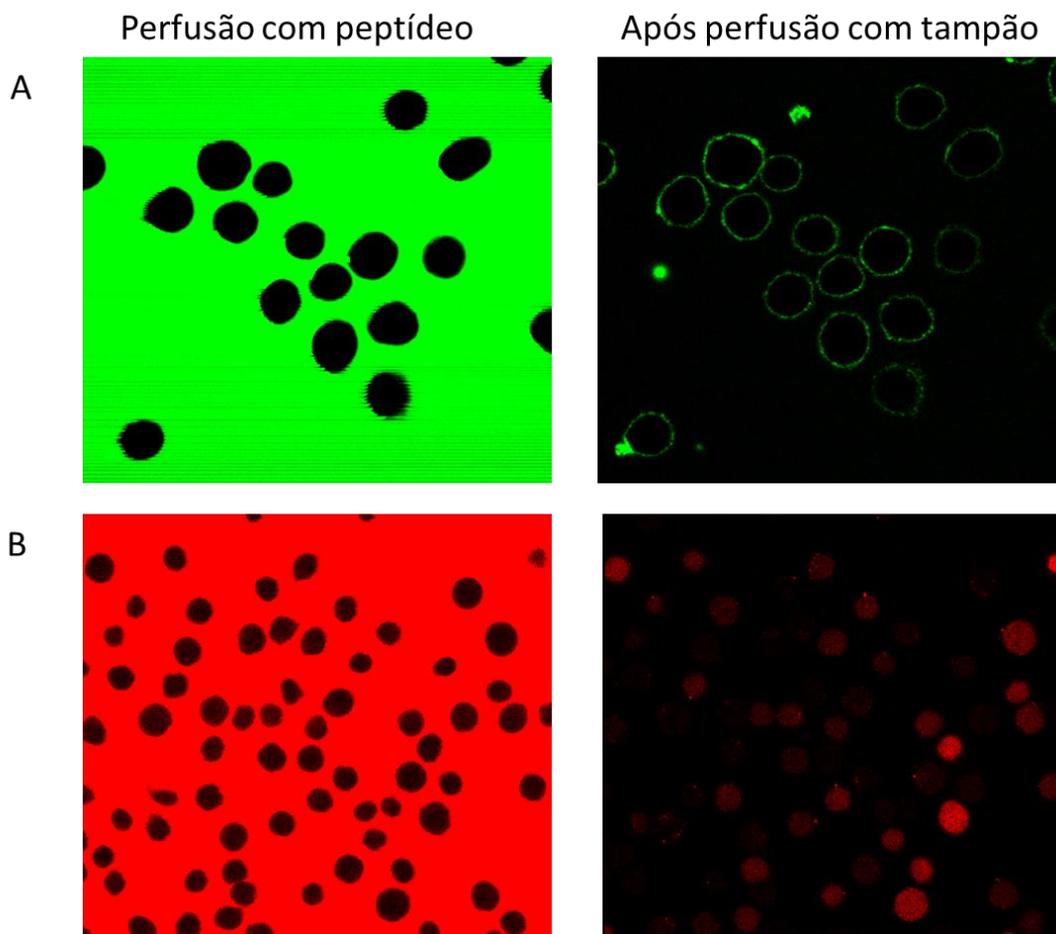


Figura 38: Internalização dos peptídeos FITC-FIGGLL-NH₂ e TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*. Células HL60 foram perfundidas, separadamente, com os dois peptídeos na concentração de 50 μ M e na presença de cálcio. **A)** Peptídeo FITC-FIGGLL-NH₂ permaneceu ligado à membrana das células HL60 após 80 minutos de perfusão. **B)** Peptídeo TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ foi rapidamente internalizado e a perfusão mantida somente até os 30 minutos. Aumento 40X. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição testada.

Para o peptídeo FITC-L1C3 (**Figura 39**), podemos observar que houve internalização em algumas células, porém em menor quantidade que o peptídeo Lunatina-1-FITC. A troca dos resíduos de T, L e S da Lunatina-1 por K, I e N de L1C3, interferiu no processo de entrada do peptídeo na célula, visto que TAMRA-LKTLTSFF-NH₂ rapidamente foi internalizado, enquanto TAMRA-LKKITNFF-NH₂ foi quase totalmente lavado. Sendo assim, o peptídeo FITC-L1C3 poderia ser perfundido por mais tempo, objetivando-se melhor marcação das células.

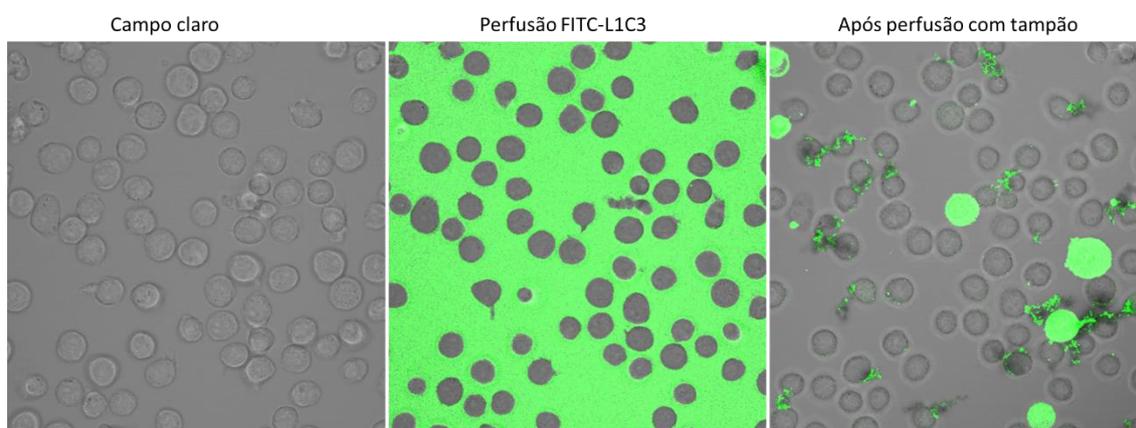


Figura 39: Internalização do peptídeo FITC-L1C3 por microscopia confocal em *Time-Lapse-Imaging*. Células HL60 foram perfundidas com FITC-L1C3 50 μ M durante 10 minutos e novamente perfundidas com tampão HBSS, na presença de cálcio, até 80 minutos. Aumento 40X. Foram realizados três experimentos independentes.

7 DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem-se dedicado ao estudo de peptídeos da família das Lunatinas. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a relação estrutura-atividade da Lunatina-1, assim como alguns peptídeos derivados, utilizando-se diferentes linhagens celulares como modelo.

No capítulo 1, foi descrito o mecanismo de ação da Lunatina-1 sobre a linhagem HL60, uma linhagem leucêmica humana do tipo pró-mielocítica. O mecanismo de morte proposto envolve tanto a ativação da via extrínseca, quanto da via intrínseca de apoptose (ou mitocondrial), devido a participação de caspase-8 e caspase-9, respectivamente.

Caspase-8 e caspase-9 ativas contribuem para a ativação da cascata efetora, via caspase-3, além disso, foi observado estresse celular provocado pela produção de ROS e perda do potencial de membrana mitocondrial. O resumo do mecanismo proposto pode ser visualizado na **Figura 40**. Neste contexto, Lunatina-1 apresentou atividade pró-apoptótica contra a linhagem HL60.

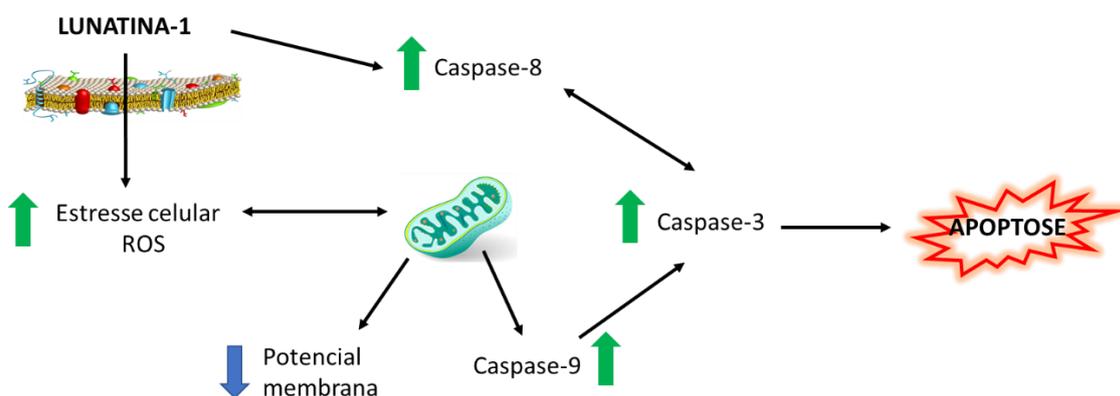


Figura 40: Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da Lunatina-1 em células leucêmicas, HL60, por apoptose.

No capítulo 2, foi estudado o efeito da Lunatina-1 sobre duas linhagens de adenocarcinoma mamário humano, MDA-MB-231 e MCF-7, assim como o mecanismo de ação da Lunatina-1 frente à linhagem MDA-MB-231. Neste capítulo, foi claramente demonstrado que Lunatina-1, ao contrário do observado para linhagem HL60, induz morte celular via mecanismos de alteração da permeabilidade da membrana plasmática.

No primeiro momento, poderíamos imaginar que Lunatina-1 estaria atuando como um peptídeo formador de poros, sendo um *pore-forming peptide*. Entretanto, durante a discussão, abriremos caminho para uma nova proposta de mecanismo de ação.

Proteínas formadoras de poros (PFPs) são, geralmente, produzidas em forma de monômeros, e de forma orquestrada, são capazes de montar oligômeros complexos que podem se inserir na membrana plasmática. Dentro das classes das PFPs, a maior e mais bem caracterizada é a classe das toxinas bacterianas formadoras de poros (PFTs). Bactérias produzem PFTs para diferentes propósitos, dentre eles matar outras bactérias e no caso de bactérias patogênicas, para promover a colonização de hospedeiros (PERARO, VAN DER GOOT, 2016; BISCHOFBERGER et. al., 2012).

PFTs, e também PFPs, podem ser classificadas em dois grupos, α -PFTs e β -PFTs, de acordo com os elementos presentes na estrutura formada na membrana, composta por α -hélices ou β -barris, respectivamente (PERARO, 2016). A oligomerização de PFTs tem sido relacionada a ligação a receptores específicos de superfície celular, os chamados receptores PFT, sendo na grande maioria lipídios ou proteínas ancoradas a lipídios, como colesterol, esfingomiélin e proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (BISCHOFBERGER et. al., 2012). Como resultado deste processo, temos a permeabilização da membrana plasmática e alteração na concentração de íons no citosol da célula alvo, como cálcio, potássio e também de ATP, e consequente morte celular (COSKUN, SIMONS, 2011).

O tipo de morte celular causada por PFTs é dependente da concentração, sendo que em concentrações mais altas, geralmente observa-se necrose, e em concentrações menores, necroptose, piroptose ou apoptose (KENNEDY et al., 2009; KNAPP et al., 2010; LIN et al., 2010).

Um fator crucial para que ocorra a formação de poros, é o tamanho da proteína, que deve no mínimo, ser do tamanho do diâmetro da membrana. A espessura da bicamada lipídica é em torno de 30Å, e considerando que o arranjo mais simples que a cadeia polipeptídica possa assumir seja uma estrutura helicoidal, e que cada volta de hélice é formada por 3,6 resíduos de aminoácidos, o que corresponde a cerca de 5,4 Å, seriam necessários no mínimo 20 resíduos para atravessar a membrana plasmática (NELSON; COX, 2014).

Peptídeos formadores de poros como os bem descritos Magainina 2, Cecropina A e Melittina possuem 23, 37 e 26 resíduos de aminoácidos, respectivamente (BOOHAKER et al., 2012). Mahendran e colaboradores (2017) também relataram a formação de poros

transmembranares por um peptídeo com estrutura em α -hélice com 35 resíduos de aminoácidos.

Diante da situação exposta, Lunatina-1, assim como L1C3, não poderiam atuar como peptídeos formadores de poros, porque são peptídeos pequenos, sendo que ambos possuem 13 resíduos de aminoácidos, não dispendo, portanto, de tamanho adequado para transpor a membrana.

Também foi verificado que ambos não foram capazes de lisar lipossomas de fosfatidilcolina, o que abre margem para a possibilidade de interação com proteínas de membrana. Entretanto lipossomas mais complexos, contendo fosfatidilserina ou fosfatidilglicerol, podem ser preparados para verificar a influência da carga negativa na membrana da vesícula sobre os peptídeos Lunatina-1 e L1C3.

Outro detalhe curioso, é que quando realizada uma busca no BLASTp (Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 17/05/18) para Lunatina-1, várias famílias de permeases e proteínas transportadoras (ou carreadoras) de membrana aparecem, dentre estas a família de transportadores do tipo ABC (**Figura 41**).

Uma das principais características das células tumorais envolvidas na resistência às drogas antineoplásicas é o aumento da expressão de bombas de efluxo, como os transportadores do tipo ABC (BERETTA et.al., 2017). Linhagens de câncer de mama, como MCF-7 e MDA-MB-231, têm sido relacionadas à super-expressão destas bombas de efluxo, principalmente as do tipo ABCG2 (FERREIRA et. al., 2017), ABCB1 e ABCC11 (OBA; IZUMI; ITO, 2016). Tal característica seria um indício de que o mecanismo membranolítico de morte celular observado para Lunatina-1, e possivelmente L1C3, nestas linhagens esteja relacionado a interferência no funcionamento destas bombas de efluxo. Em adição, células HL60 não expressam estas bombas de efluxo, o que reforça ainda mais esta ideia (QADIR et al., 2005; BROOKS et al, 2003).

Ao contrário do esperado para inibidores de bombas de efluxo, que atuam como inibidores competitivos, ou alternativamente, ligando-se ao substrato que será expelido da célula, impedido a saída das drogas de dentro das células (BERETTA et.al., 2017), Lunatina-1 e L1C3 estariam favorecendo o efluxo de material citoplasmático, como a liberação de LDH que foi observada, e conseqüentemente, afetando a viabilidade celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 por meio de desestabilização da membrana plasmática.

Proteínas/ peptídeos	Sequências
Lunatina-1	FIGGLLKTLSFF ^{-NH₂}
L1C3	FIGGLLKKITNFF ^{-NH₂}
Caspase-3 [Homo sapiens]	LKKITNFF
ABC transporter ABCG2 [Homo sapiens]	GLLVNLT
ABC transporter ATP-binding protein [Octadecabacter temperatus]	FVGGLLMVLPSFF
GntP family permease [Sphingomonas sp. Leaf208]	LLKTLTAF
SMAC/DIABLO isoform 1,3 [Homo sapiens]	TSEF
SMAC/DIABLO isoform 1,2,3,4 e 5 [Homo sapiens]	TLTS
Mitogen-activated protein kinase isoform 1 [Homo sapiens]	KTLTNF
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 [Mus musculus]	TLESFF

Figura 41: Alinhamento obtido entre os peptídeos Lunatina-1 e L1C3 com proteínas do BLASTp. (Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Além do alinhamento com bombas de efluxo, Lunatina-1 também exibe similaridade com a sequência de algumas proteínas importantes para a via apoptótica, como caspase-3 e SMAC/DIABLO (**Figura 41**).

IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) são super-expressas em tumores, e interferem na regulação de proteínas essenciais para a apoptose, como na ativação de caspase-3 e na função da SMAC/DIABLO. IAPs possuem entre 1 e 3 domínios BIR, denominados BIR1, BIR2 e BIR3 em XIAPs humanas, e também um domínio RING-finger. IAPs inibem algumas caspases, enquanto a DIABLO tem efeito antagonista (**Figura 42**). BIR3 interage com caspase-9 na sua forma inativa, e somente quando a DIABLO se liga à BIR3 que caspase-9 é liberada ativando a via apoptótica. Da mesma forma, BIR2 interage com caspase3/7 e SMAC/DIABLO é requerida para deslocar e liberar a caspase 3/7 sendo, portanto, interações mutuamente exclusivas (RIEDL et al., 2001). Sendo assim, inibidores de IAPs e modelos miméticos de SMAC/DIABLO são promissores para a terapêutica do câncer (FALKENHORST et. al., 2016), e dentro deste contexto, Lunatina-1 poderia estar mimetizando parte da SMAC/DIABLO e ativando apoptose na linhagem HL60.

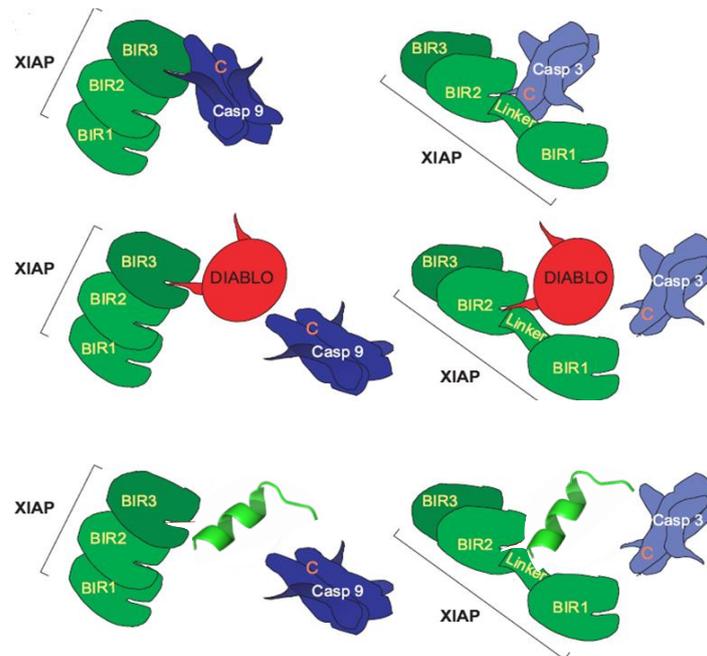


Figura 42: Mecanismo de inibição de caspases por IAPs e sua prevenção pelo antagonista Smac/DIABLO e a Lunatina-1 mimetizando a Smac/DIABLO. Adaptado: VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001.

Além disso, a regulação da expressão de várias cinases está diretamente ligada a ativação de apoptose em células de câncer do tipo hematopoiético. Em células leucêmicas malignas as cascatas de cinases pró-sobrevivência Src-PI3K-Akt-mTOR e Raf-Ras-MEK-ERK estão ativas. Portanto, intervir nesta cascata de sinalização seria uma maneira de induzir apoptose em células leucêmicas, favorecendo a expressão de Bim e ativação de GSK3 (glicogênio sintase cinase-3), que atuam como antagonistas destas vias pró-sobrevivência (KFIR-ERENFELD et al., 2010; KAMPEN, 2011)

A caracterização do proteoma e/ou fosfoproteoma de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) revelou a importância da rede de fosforilação para a malignidade da doença. Dentro desta rede, a proteína fosfo-tirosina (pY) merece destaque, por representar a maior forma de regulação celular, abrangendo as proteínas tirosina-cinase (PTKs) e tirosina-fosfatase (PTPs). A desregulação destas proteínas pY está intimamente ligada à LMA, sendo potenciais alvos para o tratamento da doença, em especial as PTPs, cuja expressão é altamente variável em tecidos normais e tumorais, exercendo uma forte

influência na rede de fosforilação (TONG et. al., 2017). E curiosamente, Lunatina-1, assim como Lunatina-2, possui similaridade com várias fosfatases humanas, podendo alguma PTP servir como alvo molecular para ativação da via apoptótica em células HL60. Em conformidade com esta premissa, COSTA (2016) e MOTTA (2017) demonstraram que Lunatina-2 e peptídeos análogos, foram capazes de inibir, *in vitro*, as PTPs humanas PTP1B, LYP e PEST e as de bactérias PtpA, PtpB e YopH. Contrariamente, a Lunatina-1 foi capaz de aumentar a atividade intrínseca da PTP YopH.

A constituição lipídica da membrana celular também é um fator importante para a atividade do peptídeo, e diferenças entre as membranas das células malignas e das células normais devem ser consideradas (HE; GUO; LI, 2015).

Membranas de células normais de mamíferos consistem, na maioria, de fosfolipídios neutros, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiélna, sendo menos atraentes para peptídeos catiônicos. As membranas das células tumorais, normalmente, carregam uma carga líquida negativa, devido ao aumento na expressão de moléculas aniônicas, como fosfatidilserina e mucinas O-glicosiladas. A quantidade de colesterol é outro fator que interfere na interação dos peptídeos com a membrana celular. Células tumorais, geralmente, são mais fluidas que células normais, o que pode favorecer a atividade do peptídeo devido a facilidade na desestabilização da membrana (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

Alterações na membrana celular têm importantes implicações na progressão do câncer, como afetar a motilidade auxiliando na invasão e metástase, além de desempenhar um papel fundamental na resposta da célula ao seu ambiente (HE; GUO; LI, 2015).

Sendo assim, futuramente, com estudos de relação estrutura-atividade, poderemos propor novas sequências peptídicas para cada tipo específico de célula, baseando-se na composição de suas proteínas e lipídeos de membrana, direcionando a atividade antitumoral e aumentando a eficiência do tratamento.

Além disso, a descoberta de alvos moleculares ajudaria nesta busca pela otimização da sequência peptídica, seja pelo reconhecimento de proteínas e/ou lipídeos de membrana, como no caso das células aderentes MDA-MB-231 e MCF-7, ou pela interação com algum alvo citoplasmático, visto a internalização dos peptídeos Lunatina-1 e L1C3 em células HL60.

Em relação à citotoxicidade dos peptídeos, ambos, Lunatina-1 e L1C3, exibiram toxicidade contra as linhagens HEK-293, HepG2 e LUHMES, porém não exibiram atividade hemolítica, o que constitui uma vantagem. Entretanto, faz-se necessário o

planejamento de ensaios *in vivo* para melhor caracterizar a citotoxicidade destes peptídeos. Além disso, uma estratégia seria conjugar os peptídeos a moléculas carreadoras, como nanopartículas, polímeros e lipossomas, visando aumentar a estabilidade e diminuir a degradação, permitindo ainda a entrega em tecidos específicos, potencializando o efeito antitumoral dos peptídeos e diminuindo sua citotoxicidade (LI; TSUI; MA, 2015).

No capítulo 3, foi proposta uma nova sequência peptídica, obtida a partir de uma quimera entre Lunatina-1 e caspase-3. Com base nas modificações realizadas, podemos observar que o resíduo de Lisina (K) importante para atividade, conforme apresentado no resultado de Alanina Scan, foi mantido, contudo, a substituição de Treonina (T) por outro resíduo de Lisina (K) não favoreceu a atividade do peptídeo L1C3. As demais modificações, Leucina (L) por Isoleucina (I) e Serina (S) por Asparagina (N) parecem ter comprometido a entrada do peptídeo na célula, visto que L1C3M não entrou na célula e também não apresentou atividade. Considerando que L e I são isômeros e apolares, enquanto S e N são polares não carregados, o índice de hidropatia para L e I não varia muito (3,8 e 4,5, respectivamente), entretanto para S é de -0,8 e para N é de -3,5, sendo portanto N bem mais polar que S (NELSON; COX, 2014), o que provavelmente, pode ter dificultado a passagem pela bicamada lipídica, visto que a porção c-terminal da Lunatina-1 é internalizada quase que instantaneamente.

Como L1C3 é um peptídeo ativo e L1C3M não apresentou atividade, este resultado nos leva a acreditar que a porção n-terminal, FIGGLL (comum a L1 e L1C3), seja importante para o reconhecimento e função do peptídeo, haja vista que ela permanece ligada à membrana da célula, mesmo após 80 minutos de perfusão. Outro fato que corrobora esta premissa é que um peptídeo sintetizado erroneamente e cuja sequência resultante foi FIGGLKTLTSFF_{-NH₂}, não apresentou atividade. Este peptídeo contém 12 resíduos de aminoácidos, de modo que uma L foi deletada da sequência original (FIGGLL_{KTLTSFF}_{-NH₂}), sendo, portanto, uma forma truncada da Lunatina-1. Em concordância com estes resultados, PARRA (2018) sintetizou um outro peptídeo cuja sequência FGTNGPVDL**KKITNFF**_{-NH₂} corresponde ao alinhamento entre Lunatina-1(em negrito) e caspase-3 humana, com uma extensão de 8 resíduos da sequência da caspase-3 (FGTNGPVD) na porção N-terminal. Nos resultados de triagem obtidos, este peptídeo não se mostrou ativo contra as linhagens celulares testadas.

Neste capítulo, também identificamos um novo CPP, de apenas 8 resíduos de aminoácidos, que corresponde à porção C-terminal da Lunatina-1 (L_{KTLTSFF}_{-NH₂}).

CPPs são a mais promissora estratégia não retroviral para entrega intracelular de moléculas. CPPs apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas virais como, por exemplo, maior facilidade e flexibilidade de montagem, menor toxicidade, baixos níveis de imunogenicidade e de inserção de mutagênese. Deste modo, CPPs têm recebido uma atenção especial para seu uso como ferramenta para entrega de medicamentos e agentes de diagnóstico (LIU et al., 2016), sendo que até o momento 25 ensaios clínicos envolvendo diferentes tipos de CPPs estão em andamento (NGWA et al., 2017).

Além disso, CPPs têm sido utilizados para entrega de siRNAs dentro de células eucarióticas, prevenindo de maneira eficiente a degradação dos siRNAs e garantindo a inibição da expressão dos genes alvo (VAISSIÈRE et al., 2017) e também têm sido amplamente utilizados para entrega de nanopartículas no citosol (CLEAL et al., 2013).

Considerando ainda que os peptídeos Lunatina-1 e L1C3 foram internalizados, estes próprios peptídeos poderiam atuar como CPPs conjugados a outras moléculas já utilizadas no tratamento do câncer, buscando um efeito sinérgico entre ambos e servindo como modelo de estudo para mecanismos de morte celular.

8 CONCLUSÕES

Por meio deste estudo, podemos identificar dois peptídeos, Lunatina-1 e L1C3, com atividade antitumoral contra as linhagens de leucemia pró-mielocítica humana, HL60, e de adenocarcinoma mamário humano, MDA-MB-231 (ER⁻) e MCF-7 (ER⁺).

Além destes dois peptídeos, também encontramos por meio dos ensaios de Alanina Scan um outro peptídeo derivado da Lunatina-1 que apresentou melhor atividade frente a linhagem HL60, o mutante L1-G4A, de sequência: FIGALLKTLTSFF-NH₂.

Também identificamos um novo CPP com apenas 8 resíduos de aminoácidos, cuja sequência corresponde a porção C-terminal da Lunatina-1, LKTLTSFF-NH₂.

Na linhagem HL60, Lunatina-1 foi capaz de induzir morte celular por ativação da via apoptótica. Já para as linhagens aderentes, MDA-MB-231 e MCF-7, Lunatina-1, assim como L1C3, parecem atuar por meio de algum mecanismo de alteração da permeabilidade da membrana celular. É possível, dada a similaridade observada entre a Lunatina-1 e transportadores do tipo ABC, que tal alteração seja resultado de interações de natureza proteica.

Lunatina-1 foi internalizado na presença de cálcio e acúmulos em algumas regiões citoplasmáticas são observados. Deste modo, acreditamos que para a linhagem HL60, possa existir algum alvo intracelular.

Lunatina-1, assim como L1C3, exibiram certa citotoxicidade, entretanto suas sequências podem ser quimicamente otimizadas visando um bom índice de seletividade e servindo, portanto, como ponto de partida para novos estudos.

9 PERSPECTIVAS

Investigar possíveis alvos intracelulares considerando os resultados de internalização da Lunatina-1 na linhagem HL60.

Realizar vídeo em *time-lapse* com o peptídeo marcado (FITC-Lunatina-1) em outras linhagens celulares, como MDA-MB-231 e/ou MCF-7.

Investigar melhor o mecanismo de ação para os peptídeos Lunatina-1 e L1C3 nas linhagens celulares MDA-MB-231 e/ou MCF-7, com especial atenção ao possível envolvimento dos transportadores do tipo ABC, ou ainda em células HL60 que superexpressem este tipo de transportador. O uso de ciclosporina A, inibidor de amplo espectro de bombas de efluxo, concomitante ao tratamento com os peptídeos podem fornecer indícios importantes sobre esta possível interação.

Investigar a possível interação entre os peptídeos Lunatina-1 e L1C3 com as BIRs 2 e 3 e a SMAC/DIABLO por meio de ITC (calorimetria de titulação isotérmica) e/ou ressonância plasmônica de superfície (*Biacore Assay*).

Verificar se o peptídeo L1C3 também induz morte celular por ativação da via apoptótica na linhagem HL60.

Verificar se os peptídeos FIGLL-NH₂ e LKTLTSFF-NH₂ também apresentam atividade sobre linhagens tumorais e/ou normais.

Otimizar a atividade antitumoral dos peptídeos Lunatina-1 e L1C3 com base nos resultados de internalização e de Alanina Scan.

Explorar o uso do peptídeo LKTLTSFF-NH₂ como um novo CPP.

10 REFERÊNCIAS

ADAM-VIZI, V.; TRETTER, L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. **Neurochemistry International**, v. 62, p.757-63, 2013.

AILI, S. R. et al. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. **Toxicon**, v. 92, p. 166–178, 2014.

ARIF, K. et al. The role of nanog expression in tamoxifen- resistant breast cancer cells. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 1327–1334, 2015.

BEA, R. D. L. S.; PETRAGLIA, A. F.; JOHNSON, L. E. L. DE. Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides. **Toxicon**, v. 101, p. 79–84, 2015.

BERETTA, G. L. et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 271–289, 2017.

BHATTACHARYA, S. et al. A cytotoxic protein (BF-CT1) purified from Bungarus fasciatus venom acts through apoptosis, modulation of PI3K/AKT, MAPKinase pathway and cell cycle regulation. **Toxicon**, v. 74, p. 138–150, 2013.

BISCHOFBERGER, M.; IACOVACHE, I.; GISOU VAN DER GOOT, F. Pathogenic pore-forming proteins: Function and host response. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 3, p. 266–275, 2012.

BOOHAKER R. J. et al. The Use of Therapeutic Peptides to Target and to Kill Cancer Cells. **Curr Med Chem**, v. 19(22), p.3794–3804, 2012.

BROOKS T.; MINDERMAN H.; O'LOUGHLIN K. L. et al. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. **Mol Cancer Ther**, v.;2, p-1195 – 205. 2003.

CHEN Y, MANT CT, FARMER SW, HANCOCK RE, VASIL ML, HODGES RS. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic. **J Biol Chem**, v. 280, p.12316–12329. 2005.

CLEAL, K. et al. Endocytosis, Intracellular Traffic and Fate of Cell Penetrating Peptide Based Conjugates and Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Design**, p. 2878–2894. 2013.

COSKUN, U., SIMONS, K. Cell membranes: the lipid perspective. **Structure** v. 19, p.1543–1548. 2011.

COSTA, N. C. Estudo da atividade inibitória e da interação molecular das Lunatinas e análogos sobre a proteína tirosina fosfatase de *Yersinia sp* (YopH) Universidade Federal de Minas Gerais. **Tese de Doutorado**, 2016.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 934–942, 2012.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 103, p. 129–134, 2015.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, p. 2-9, 2017.

CRUCIANI, R. A., BARKER, J. L., ZASLOFF, M., CHEN, H. C., AND COLAMONICI, O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed-cell lines through channel formation. **Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A**, v.88, p.3792–3796. 1991.

DAMPIER, K. et al. Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 618–624, 2001.

D'SUZE, G. et al. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1497–1505, 2010.

ECACC®, 2017. Triple-negative cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424). v. 231, n. 92020424, p. 6–8, [s.d.]. Disponível em: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/>.

ESCOBAR, E. et al. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* Koch, 1867 (Scorpionida: Vejovidae). **Revista Peruana de Biología**, v. 9, n. 1, p. 3–10, 2002.

ESCOBAR, E.; RIVERA, C.; TINCOPA, L. Acción de la toxina HI3 sobre músculo esquelético. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 88–92, 2003.

FALKENHORST, J. et al. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the pro-apoptotic activity of imatinib. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41390–41403, 2016.

FELÍCIO, M. R. et al. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. February, p. 1–9, 2017.

FERREIRA, R. J. et al. Structure-function relationships in ABCG2: insights from molecular dynamics simulations and molecular docking studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15534, 2017.

FINK, S. L., COOKSON, B. T. et al. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells, **Infection and Immunity**, v. 73(4), p.1907–1916. 2005.

FOSGERAU K.; HOFFMANN T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v.20(1), p-122-128, 2015.

FRANK, ANDREAS O. et al. Discovery of a potent stapled helix peptide that binds to the 70N domain of replication protein A. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2455–2461, 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-Biology and Chemistry**, v. 64, p. 31-38, 2017.

FREITAS, A. C. N et al. PnPP-19, a spider toxin peptide, induces peripheral antinociception through opioid and cannabinoid receptors and inhibition of neutral endopeptidase. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, p. 1491-1501, 2016.

FREZARD F, SANTAELLA C, VIERLING P, RIESS JG. Permeability and stability in buffer and in human serum of fluorinated phospholipid- based liposomes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1192, p.61–70. 1994.

FONSECA, D. P. et al. A spider derived peptide, PnPP-19, induces central antinociception mediated by opioid and cannabinoid systems. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (Online), v. 22, p. 22-34, 2016.

GAGANDEEP S. et al. Paclitaxel shows cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cell lines. **Cancer Letters**, v.136(1), p.109-18. 1999.

GALLUZZI, L. et al. Cell Death Signaling and Anticancer Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 1, n. May, p. 1–18, 2011.

GARTLON, J., KINSNER, A., BAL-PRICE, A., COECKE, S., CLOTHIER, R.H. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicology in Vitro**. v. 20, p.1569-1581. 2006.

GASPAR, D.; VEIGA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–16, 2013.

GEORGE, M. et al. Designing and testing of novel taxanes to probe the highly complex mechanisms by which taxanes bind to microtubules and cause cytotoxicity to cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–23, 2015.

GOLDAR S, KHANIANI MS, DERAKHSHAN SM, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.16, p.2129-44, 2015.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314–9, 1994.

GRÄSLUND, A. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. **Journal of Biophysics**, v. 2011, 2011.

GRIMBERG, J. et al. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 20, p. 8390, 1989.

HAJREZAIE, M. et al. Apoptotic effect of novel Schiff based CdCl₂(C(1)(4)H(2)(1)N(3)O(2)) complex is mediated via activation of the mitochondrial pathway in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9097, 2015.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115–137, 2014.

HE, M.; GUO, S.; LI, Z. In situ characterizing membrane lipid phenotype of breast cancer cells using mass spectrometry profiling. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015.

HENNINOT, A.; COLLINS, J. C.; NUSS, J M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p.1382–1414. 2018.

HERRMANN, J. et al. Pretubulysin: From hypothetical biosynthetic intermediate to potential lead in tumor therapy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012.

HOLBROOK, J. J. e GUTFREUND, H. Approaches of the study of enzyme mechanisms: Lactate dehydrogenase. **FEBS Letters**, v. 31, n. 2, p. 157–169, 1973.

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

JIAO, C. Y. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 33957–33965, 2009.

KALKAVAN, H., GREEN, D. R. Coordinators and initiators of MOMP, the Bcl2 family. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, p-46-55, 2018.

KAMPEN K. R. Membrane Proteins: The Key Players of a Cancer Cell. **J Membrane Biol**, v.242, p.69–74, 2011

KAPUVÁRI, B. et al. Improved in vivo antitumor effect of a daunorubicin - GnRH-III bioconjugate modified by apoptosis inducing agent butyric acid on colorectal carcinoma bearing mice. **Investigational New Drugs**, 2016.

KENNEDY, C.L., SMITH, D.J., LYRAS, D., CHAKRAVORTY, A., AND ROOD, J.I. Programmed cellular necrosis mediated by the pore-forming alpha-toxin from *Clostridium septicum*. **PLoS Pathog**, v.5, e1000516. 2009.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

KFIR-ERENFELD, S. et al. Protein kinase networks regulating glucocorticoid-induced apoptosis of hematopoietic cancer cells: Fundamental aspects and practical considerations. **Leukemia and Lymphoma**, v. 51, n. 11, p. 1968–2005, 2010.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Calcium based non-viral gene delivery: An overview of methodology and applications. **Acta Medica Iranica**, v. 48, n. 3, p. 133–141, 2010.

KING P.; PERRY M. Hepatotoxicity of Chemotherapy. **The Oncologist**, v.6, p.162-176. 2001.

KNAPP, O., MAIER, E., MKADDEM, S.B., BENZ, R., BENS, M., CHENAL, A., GENY, B., VANDEWALLE, A., and POPOFF, M.R. *Clostridium septicum* alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis. **Toxicon**, v. 55, p.61–72. 2010.

KROEMER G1, GALLUZZI L, BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev**, v.87(1), p.99-163, 2007.

KUO, H.-M. et al. MSP-4, an Antimicrobial Peptide, Induces Apoptosis via Activation of Extrinsic Fas/FasL- and Intrinsic Mitochondria-Mediated Pathways in One Osteosarcoma Cell Line. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, p. 8, 2018.

LABELLE, J. L. et al. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2018–2031, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections, **Cell Host & Microbe**, v.8, p. 44-54, 2010.

LAU, J. L.; DUNN M K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.26, p-2700–2707, 2018.

LEIST, M. et al. Novel technologies and an overall strategy to allow hazard assessment and risk prediction of chemicals, cosmetics, and drugs with animal-free methods. **Altex**, v. 29, n. 4, p. 373–388, 2012.

LI, H.; TSUI, T. Y.; MA, W. Intracellular delivery of molecular cargo using cell-penetrating peptides and the combination strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19518–19536, 2015.

LI, W. et al. Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 3–8, 2014.

LIAU et al. Synthesis and Characterization of a Walnut Peptides-Zinc Complex and Its Antiproliferative Activity against Human Breast Carcinoma Cells through the Induction of Apoptosis. **J Agric Food Chem**, v. 64, p. 1509-19, 2016.

LIN, C.F., CHEN, C.L., HUANG, W.C., CHENG, Y.L., HSIEH, C.Y., WANG, C.Y., and HONG, M.Y. Different types of cell death induced by enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p.2158–2176. 2010.

LIN, Y. C. et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. **Nature Communications**, v. 5, n. 11, 2014.

LIMA-BATISTA E. M. Interferência das Lunatinas e análogos modificados na sinalização celular em modelos de células tumorais. **Qualificação de doutorado**. Universidade federal de Minas Gerais. 2018.

LIU, B. R. et al. Identification of a Short Cell-Penetrating Peptide from Bovine Lactoferricin for Intracellular Delivery of DNA in Human A549. **PLOS one**, p.1–19. 2016.

LIU, S., YANG, H., WAN, L., CHENG, J., AND LU, X. Penetratin-mediated Delivery enhances the antitumor activity of the cationic antimicrobial peptide magainin II. **Cancer Biother. Radiopharm**, v.28, p.289–297. 2013.

LIU, Z. et al. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways. **Current molecular medicine**, v. 12, p. 1350–60, 2012.

MAHENDRAN, K. R. et al. A monodisperse transmembrane α -helical peptide barrel. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 411–419, 2017.

MARTINS RM, SFORCA ML, AMINO R, JULIANO MA, OYAMA S JR, JULIANO L, PERTINHEZ TA, SPISNI A, SCHENKMAN S. Lytic activity and structural differences of amphipathic peptides derived from trialysin. **Biochemistry**. v.45, p.1765–1774. 2006.

MASANGO, MXOLISI G.; ELLIS, CHARLOTTE E; BOTHA, CHRISTO J. Characterization of cell death caused by diplodiatoxin and dipmatol, toxic metabolites of *Stenocarpella maydis*. **Toxicon**, v. 102, p. 14–24, 2015.

MCLLWAIN, D. R. et al., Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.5. 2013

MERRIFIELD, R. B. The Synthesis of Biologically Active Peptides and Proteins. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 210, n. 7, p. 1247, 1969.

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

MORDANT, P. et al. Dependence on phosphoinositide 3-kinase and RAS-RAF pathways drive the activity of RAF265, a novel RAF/VEGFR2 inhibitor, and RAD001 (Everolimus) in combination. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 358–68, 2010.

MOTTA, L. D. E. A. Inibição de proteínas tirosinas fosfatases causadas pelo peptídeo sintético Lunatina 2.1K (desenhado a partir do Lunatina 2, originado do veneno do escorpião *Hadruidoies lunatus*). **Trabalho de conclusão de curso**. 2017.

MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 321, 2013.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6. ed. 2014.

NGWA, V. M. et al. A versatile cell-penetrating peptide-adaptor system for efficient delivery of molecular cargos to subcellular destinations. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–13, 2017.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271–9, 1991.

NOWATZKI, J. et al. Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 396–405, 2012.

OBA, T.; IZUMI, H.; ITO, K.-I. ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 70011–70027, 2016.

OCHOA, A. Patrones de distribución de escorpiones de la región andina en el sur peruano. **Online**, v. 12, n. 1, p. 49–68, 2005.

OCHOA, J. A.; PRENDINI, L. The Genus *Hadruidoies* Pocock, 1893 (Scorpiones: Iuridae), in Peru: New Records and Descriptions of Six New Species. **American Museum Novitates**, v. 3687, n. 3687, p. 1–56, 2010.

PARRA, J.A.A. Caracterização da atividade citotóxica e antitumoral de peptídeos obtidos por similaridade com as Lunatinas. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, 2017.

PERARO, M. D.; VAN DER GOOT, F. G. Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 77–92, 2016.

PERDIGÃO, GABRIELE DE MATOS CARDOSO et al. Novel nitroaromatic compound activates autophagy and apoptosis pathways in HL60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 107–115, 2018.

PINTO, M. C. X. et al. Discovery of cytotoxic and pro-apoptotic compounds against leukemia cells: Tert-butyl-4-[(3-nitrophenoxy) methyl]-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate. **Life Sciences**, v. 89, n. 21–22, p. 786–794, 2011.

PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M. E. Small peptides, big world: Biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 670–676, 2005.

QADIR M. et al. Cyclosporin A Is a Broad-Spectrum Multidrug Resistance Modulator. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p.2320 – 2326, 2005.

RABAH, S. O. Acute Taxol nephrotoxicity: Histological and ultrastructural studies of mice kidney parenchyma. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 105–114, 2010.

RIEDL, S. J. et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 791–800, 2001.

ROBINSON, S. D. et al. Venom peptides as therapeutics: advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 10, p. 931–939, 2017.

RODRIGUES, E. G. et al. Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 503–520, 2009.

SANTANA, H. F. Determinação da diversidade peptídica do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

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.

SARVOTHAMAN et al., Apoptosis: role in myeloid cell development, **Blood Res**, v. 50(2), p.73–79. 2015.

SCHILDKNECHT, S. et al. Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 241, n. 1, p. 23–35, 2009.

SIEDLAKOWSKI, P. et al. Synergy of Pancreatistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 376–384, 2008.

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

SILVA, T. L. et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 32–40, 2004.

SKULACHEV VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v.4, p. 473-85. 2006.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231–41, 2008.

TOMMASI, S. et al. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 10, p. 2078–2085, 2007.

TONG, J. et al. Integrated analysis of proteome, phosphotyrosine-proteome, tyrosine-kinome, and tyrosine-phosphatome in acute myeloid leukemia. **Proteomics**, v. 17, n. 6, p. 8–26, 2017.

VAISSIÈRE, A. et al. A retro - inverso cell - penetrating peptide for siRNA delivery. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1–18. 2017.

VERANO-BRAGA, T. et al. Tityus serrulatus Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, n. 3, p. 515–520, 2008.

VERANO-BRAGA, T. et al. Structure-function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2kinin receptor. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1162–1171, 2010.

VERHAGEN, A. M.; COULSON, E. J.; VAUX, D. L. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. **Genome Biology**, v. 2, p-1-10, 2001.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 1995.

WALKER, P. R. et al. Cell-penetrating peptides — the Swiss Army knife of cancer vaccines. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 3, p. 1–3, 2016.

WANG, L. et al. Separation and purification of an anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis. **Food & Function**, v. 7, p. 2239–48, 2016.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.

XU, H. et al. Luteolin synergizes the antitumor effects of 5-fluorouracil against human hepatocellular carcinoma cells through apoptosis induction and metabolism. **Life Sciences**, v. 144, p. 138–47, 2016.

XU, X. et al. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 2004–2014, 2007.

XUE L, LI M, CHEN T, SUN H, ZHU J, LI X, WU F, WANG B, LI J, CHEN Y. PE-induced apoptosis in SMMC-7721 cells: involvement of Erk and Stat signalling pathways. **Int J Mol Med**, V.34(1), p.119–29, 2014.

ZAVALETA, A.; NAVARRO, J.; CASTRO DE LA MATA, R. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 906–909, 1981.

ZHANG, X. M.; YIN, M.; ZHANG, M. H. Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 7, p. 945–956, 2014.

ZHANG, W. H., YANG, Y., LIN, C. J., & WANG, Q. Antioxidant attenuation of ROS-involved cytotoxicity induced by Paraquat on HL60 cells. **Health**, v.2(03), p.253, 2010.

ZHAO, J. et al. Toxicity study of ochratoxin A using HEK293 and HepG2 cell lines based on microRNA profiling. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 8–22, 2017.

ZHAO, J. et al. Two hits are better than one: synergistic anticancer activity of α -helical peptides and doxorubicin/epirubicin. **Oncotarget**, v. 6, n. 3, p. 1769–1778, 2014.

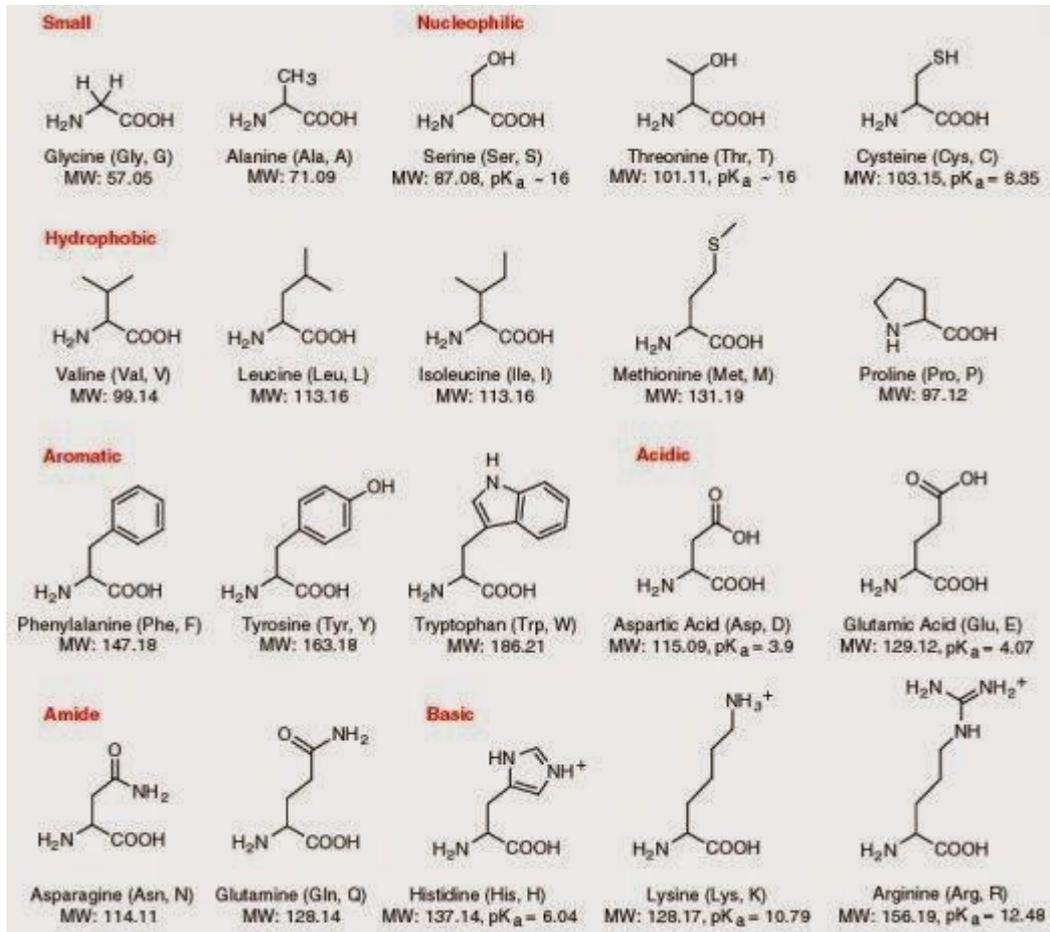
ZHENG, L. H. et al. Antitumor peptides from marine organisms. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1840–1859, 2011.

ZHU, L. N. et al. Novel cytotoxic exhibition mode of antimicrobial peptide anoplin in MEL cells, the cell line of murine Friend leukemia virus-induced leukemic cells. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 9, p. 566–574, 2013.

ZIPS, D., THAMES, H.D., BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **In Vivo**, v.19, p.1-7, 2005.

11 ANEXOS

11.1 LISTA DE AMINOÁCIDOS



11.2 ARTIGO

Structure-activity relationship of Lunatin-1: a novel pro-apoptotic peptide against leukemia cells

Abstract

Lunatin-1 is a 13mer antimicrobial/antitumor peptide isolated from the scorpion *Hadruidoidea lunatus* venom, with distinct primary and tertiary structural features. The aim of this work is to characterize the cell death mechanism and to describe thoroughly the structure-activity relationship for Lunatin-1 using human promyelocytic leukemia (HL60) cell as model. Lunatin-1 induced DNA fragmentation, phosphatidylserine exposure, partial LDH release (3h) and total lysis (24h), activated caspases 3, 8 and 9, and increased ROS production and MMP loss. Lunatin-1 penetrates HL60 cells in a Ca^{2+} -dependent manner and could be imported via endocytosis. Ala-scan depicted the hot spots involved in Lunatin-1 activity.

Key words: Lunatin-1, ACPs, leukemia and apoptosis.

1 Introduction

Peptide therapy has played a remarkable role in medical practice (LAU; DUNN, 2018). In the last years, more than sixty peptides were approved for commercial use in the United States, Europe and Japan; and the most interesting areas of the pharmaceutical industry are those of metabolic diseases, cardiovascular diseases and oncology (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; HENNINOT, COLLINS, NUSS, 2018).

Peptides are good option for the development of new drugs for being relatively small and easy to synthesize, have good efficacy and safety, high selectivity, potency and predictable metabolism (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Consequently, anticancer peptides (ACPs) highlight in the antitumor drugs researches.

ACPs usually present α -helix, β -conformation, random or cyclic structure, (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008), able to act on both solid and hematological tumors (LIU et al., 2013; CRUCIANI et al., 1991). ACPs operate by different cell death mechanisms, such as anti-angiogenesis, mediated immunity, DNA synthesis inhibition and mainly to induce necrosis and apoptosis (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013).

ACPs are found on a variety of sources, as extract vegetables and animal venoms (AILI et al., 2014). Snakes, spiders and scorpions' venoms are rich in peptide diversity and

bioactive peptides from their venoms against tumor cells has been reported previously in literature (BEA; PETRAGLIA; JOHNSON, 2015; RODRIGUES et al., 2009; LIU et al., 2012; CALDERON et al., 2014).

Lunatins are members of a peptide family, describe by Santana (2012), isolated from the venom of the Peruvian scorpion *Hadruidoidea lunatus*. Lunatin-1 is a small peptide with only 13 amino acids residues that shows antimicrobial activity against gram positive and negative bacteria (SANTANA, 2012). Looking to broaden the knowledge concerning this bioactive peptide, in this work, we study the antitumor and structural properties of the synthetic peptide Lunatin-1 (FIGGLLKTLTSFF-NH₂), using human promyelocytic leukemia (HL60) cell as model for cell death mechanism.

2 Material and methods

2.1 Peptide synthesis, purification and sequence confirmation

Lunatin-1 (FIGGLLKTLTSFF-NH₂) was synthesized by solid-phase methodology using Rink amide resin and Fmoc strategy, followed by deprotection and cleavage from the resin, as described by Reis et al. (2018). FITC-Lunatin-1 (FITC-FIGGLLKTLTSFF-NH₂) and Alanine-Scan peptides were purchased from GenOne (Rio de Janeiro, Brazil).

Lunatin-1 was purified by reverse phase HPLC using Äkta Explorer 100 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and semi-preparative Discovery® BIO Wide Pore C18 column (25 cm x 10 mm) equilibrated with 30% acetonitrile in 0.1% TFA in water. A linear gradient was made to 100% acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was 5 ml min⁻¹ with detection at 214 nm.

The peptide molecular mass and sequence were confirmed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry in AutoFlex IIITM (Bruker Daltonics, Billerica, USA) instrument. Samples were spotted onto AnchorChipTM 600/384 (Bruker Daltonics, Billerica, USA) plate with CHCA matrix (1:1, v/v) and allowed to dry at room temperature. MS and the MS/MS spectra were acquired in the positive reflector mode with external calibration.

2.2 Cell culture and assays

HL60 cell line (human acute promyelocytic leukemia) was routinely cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin-streptomycin, and 2 mM L-glutamine (All Sigma-Aldrich) at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in a HeraCell incubator.

HL60 cells (5×10^4 /well) were seeded onto 96-well plates in 180 μ L of medium, and treated with 20 μ L of peptides followed by serial dilution. After 48h of treatment, cell viability was evaluated by Resazurin metabolization assay (Gartlon et al., 2006). IC₅₀ was calculated using sigmoidal dose-response (variable slope) analysis supported by GraphPad Prism7 software (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). For Alanine-Scan, IC₅₀ values were converted in percentage, using Lunatin-1 as reference (100% of activity). For the cell death mechanism assays, 2×10^5 cells were seeded onto 24-well plates in 360 μ L of medium and treated with 40 μ L of Lunatin-1 (25 or 50 μ M) or Etoposide (50 μ M), as positive control.

2.3 DNA fragmentation assay

The fragmented DNA (subG0) was quantified by propidium iodide (PI) staining as described by Nicoletti et al. (1991). After the treatment, HL60 cells were incubated with hypotonic fluorochrome solution (50 μ g/mL PI in 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100) for 4 h at 4°C. The PI fluorescence was measured in BD FASCan™ flow cytometer and data were analyzed using FlowJo software 7.5.5 (TreeStar Inc, CA). DNA samples were isolated, quantified using NanoDrop™, and subjected to electrophoresis in agarose gel (1.5%), and stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL) for visualization.

2.4 Evaluation of cellular and nuclear morphology

Cell nuclei were stained with Hoechst 33342 and PI, visualized by Zeiss 5 LIVE confocal microscope in 405 and 488 nm, respectively, using a 40 NA objective lens. Images were captured by ZEM 2009 software.

Lactate dehydrogenase (LDH) release assay was performed as proposed by Holbrook e Gutfreund (1973). NADH (6.3 mM) and sodium pyruvate (0.6 mM) in sodium phosphate buffer 50 mM (pH 7.4) were added to the samples supernatant. The absorbance was kinetically accomplished at 340 nm during 30 min using Varioskan™ Flash (Thermo Scientific). Triton X-100 (0.5%) was used as positive control for 100% of lyses.

Phosphatidylserine externalization was evaluated by FITC Annexin-V/PI Apoptosis Detection (BD Pharmingen®) kit. Cells were analyzed using BD FACSCalibur™ flow cytometer and data were analyzed in FlowJo 7.5.5 software (Tree Star Inc, CA).

2.5 Detection of caspase activity

Caspases 3/7 activity was assessed using FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3 kit (BD Pharmingen™). The events were acquired through flow cytometry in BD FASCan™ system with exc/emi of 488/525 nm and analyzed by SSC-H vs FL1-H-FITC dot plot model in FlowJo software 7.5.5 (TreeStar Inc, CA).

Caspase-8 activity was performed by Caspase-8 Colorimetric Protease Assay (Invitrogen™) kit and caspase-9 by ApoTarget™ Caspase-9/Mch6/Apaf-3 Colorimetric Protease Assay (Invitrogen™) kit. Protein concentration was measured by Bradford method and standardized as 100µg/sample. IETD-*p*NA (200 µM) e LEHD-*p*NA (200 µM) were used as substrate for caspase-8 and -9, respectively. Samples readings were performed in spectrophotometer using 405 nm.

2.6 Detection of ROS and mitochondrial transmembrane electrical potential gradient ($\Delta\psi_m$)

ROS generation was detected by 1µM DCFH-DA (2',7'- Dichlorofluorescein diacetate) probe (Sigma-Aldrich). Cells were analyzed by flow cytometry in BD FASCan™ system with exc/emi of 488/525 nm.

$\Delta\psi_m$ was measured by MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit for Flow Cytometry (Invitrogen™) in BD LSRFotessa™ system using the APC filter for DiIC₁(5) with exc/emi of 638/658 nm.

2.7 Confocal time-lapse of FITC-Lunatin-1 entry in HL60

HL60 cells were fixed in ornithine pre-treated coverslips and transferred to a custom-built perfusion chamber on the stage of a Zeiss LSM 880 confocal microscope. FITC fluorescence was monitored using a 40 NA/oil objective lens and with excitation at 488 nm and observation at 505–550 nm. Perfusion were performed at room temperature, and started with HBSS buffer, in the presence or absence of calcium (2.5 mM), by 2 min. Cells were then stimulated with FITC-Lunatin (50 µM) by 10 min, and subsequently washed with buffer until 80 min.

2.8 Statistics

Values express means±SD of two/three experiments performed in triplicate. Student's t-test unpaired, One-way or Two-way ANOVA were used as appropriate,

followed by post-hoc Tukey's test. Results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3 Results

3.1 Cytotoxic activity of Lunatin-1

Cytotoxic effects of the synthetic peptide Lunatin-1 on tumor cells were determined using Resazurin assay. Lunatin-1 (50 μ M) inhibited cell viability of HL60 (68%), Jurkat (44%), THP-1 (46%), MCF-7 (58%), MDA-MB-231 (51%) and HCT-116 (44%) cell lines. Lunatin-1 was most cytotoxic towards HL60 cells and the calculated IC_{50} value $IC_{50} 45.79 \pm 4.85 \mu$ M after 48h. Therefore, HL60 was used to determine the cell death mechanism for Lunatin-1.

3.2 Lunatin-1 induces DNA fragmentation

Lunatin-1 induced the accumulation of cells (73%) in the G₀ phase of the cell cycle, which is a hallmark for fragmented DNA (Figure 1). Simultaneously, the G₁ population decreases for cells treated with Lunatin-1 (50 μ M) after 24h. Lunatin-1 (25 μ M) showed discrete percentage (10%) of the number of cells with fragmented DNA. Etoposide also showed fragmented DNA (91%) and reduction of the G₁ population. Agarose gel confirmed the DNA fragmentation for Lunatin-1 (50 μ M) and Etoposide (50 μ M) samples, due to the presence of DNA ladders every 200pb (Figure 1C).

3.3 Apoptotic membrane and nuclear changes induced by Lunatin-1

To investigate morphological changes induced by Lunatin-1, HL60 cells were analyzed by phosphatidylserine exposure profile, chromatin condensation and cell membrane permeability. Lunatin-1 promoted progressive LDH release to total lysis at 24h (Figure 2A). Triton 0.5% was positive control for membrane lyses (100%). HL60 cells was stained with propidium iodate (PI) and Hoechst 33342 to observe any nuclear changes as condensed chromatin (green arrow) or nuclear fragmentation (yellow/red arrows), characteristic of apoptosis. Concomitantly, cell membrane permeability change was available, and cells in early apoptosis (yellow arrow), late apoptosis (red arrows) and secondary necrosis (24h) were identified (Figure 2B). Lunatin-1 (50 μ M) mainly increased the number of the cells (56.1%) with double-stained (ANX+/PI+) after 3h, characterizing

late apoptosis cells. Etoposide also increased the cells (5.19%) with ANX+/PI+ double-stained (Figure 2C).

3.4 Lunatin-1 induces caspases activation

To evaluate the involvement of caspases in cell death induced by Lunatin-1, caspases -3/7, -8 and -9 activations were estimated (Figure 3A-C). After 3h of treatment, Lunatin-1 (50 μ M) increased the percentage of cells (30%) with caspase-3/7 active. Lunatin-1 also increased caspases -8 and -9 by 2.0 and 4.0-fold, respectively, compared to the untreated control. Etoposide also significantly activated all caspases.

3.5 Lunatin-1 induces ROS production and $\Delta\psi_m$ loss

The involvement of oxidative stress in HL60 cells induced by Lunatin-1 was confirmed after 1h and 6h of treatment (Figure 3D). Cells treated with Lunatin-1 (50 μ M) significantly increased ROS, H₂O₂ and O^{2•-}, after 1h (30%). A similar trend was observed at 6h. Lunatin-1 (50 μ M) induced partial loss (40%) of $\Delta\psi_m$ in HL60 cells after 3h of treatment (Figure 3E). Etoposide (50 μ M) and CCCP (500 μ M), a positive control, also induced $\Delta\psi_m$ loss, 60% and 100%, respectively, as expected.

3.6 HL60 cells internalize FITC-Lunatin-1 in Ca²⁺ presence

Lunatin-1 conjugated with FITC was utilized to verify the permeabilization the peptide across the HL60 cell membrane. HL60 cells are able to internalize Lunatin-1 only in Ca²⁺ presence (Figure 4). After 20 min, the fluorescence of the cells increased, confirming that FITC-Lunatin-1 peptide was probably internalized by endocytosis. FITC-Lunatin-1 seems to accumulate mainly in the cytoplasmic regions and was not observed internalization across nuclear membrane.

3.7 Alanine-Scan for Lunatin-1

Structure-activity-relationships (SARs) studies for Lunatin-1 by the Alanine-Scan approach elucidated the hot spots in the primary sequence of the peptide (Figure 5). Mutant K7A was the most important to activity, probably by positive charge loss. Mutants G3A, L9A and F12A show significant loss of activity. Interestingly, F13A peptide was almost equipotent to Lunatin-1, showing a slight loss of activity. In contrast, G4A peptide

exhibited an improvement of the activity. Mutants F1A, I2A, L5A, L6A, T8A, T10A and S11A had reduced activity compared to Lunatin-1.

4 Discussion

The development of resistance to antitumor drugs remains an important clinical problem. In this study, we showed the key role of Lunatin-1 as a novel pro-apoptotic peptide against leukemia cells, one of the most common type of cancer worldwide. Peptide-based targeted tumor therapy has been effective against several cancer cells. Previous studies showed that ACPs, mainly, induce necrosis and apoptosis in tumor cells (GASPAR; VEIGA; CASTANHO, 2013).

In our research, we postulated that Lunatin-1 could induce apoptosis via intrinsic ROS-dependent mitochondrial pathway. $\Delta\psi_m$ loss and ROS production are critical steps in the occurrence of apoptosis (SKULACHEV, 2006). Lunatin-1 might trigger apoptosis by mitochondrial membrane depolarization and the release of ROS. Changes in the mitochondrial membrane potential are directly related to ROS production, mainly $O^{2\cdot-}$, by I and III complex of the electron transport chain. In addition, α -KGDH e α -GPDH enzymes were correlated with oxidative stress (ADAM-VIZI, TRETTER, 2013). ROS production might contribute to activate caspases, to interfere with $\Delta\psi_m$, and to promote phosphatidylserine exposure at the surface of the plasma membrane of cells (XUE et al., 2014).

Our results showed that Lunatin-1 induced phosphatidylserine exposure with cell population distributed in the viable portion (ANX-/PI-), early apoptotic (ANX+), late apoptotic (ANX+/PI+) and secondary necrotic (PI+) events. After 3h of treatment, Lunatin-1 induced, mainly, late apoptosis in HL60 cells.

The confocal microscopy of the nuclear morphology revealed condensed and fragmented nuclei. PI stain were observed mainly after 24h of the treatment, corresponding to cells with cell membrane committed permeability. These cells are in late apoptosis or secondary necrosis. After 24h is likely that cells are in secondary necrosis, due to the absence of a phagocytic system (KEPP et al., 2011). According to these results, LDH release was observed mainly after 24h of the treatment. Cells in primary necrosis show rapid collapse of the cell membrane and high levels of LDH release, which was not observed, since the increase of the cell lyse was progressive.

To verify if apoptosis induced by Lunatin-1 in HL60 cells were caspase-dependent, we evaluate the caspases -3, -8 and -9 engagements. Activation of the caspases

-8 and -9 after treatment with Lunatin-1 suggest involvement of both extrinsic and intrinsic pathways. Caspases -8 and -9 are responsible by caspase-3 activation (GOLDAR et al., 2015). Caspase-9, Apaf-1 and cytochrome c assemble the apoptosome, which activates caspase-3, and can also to activate caspase-8 (GALLUZZI et al., 2011; LAMKANFI; DIXIT, 2010). Caspase-8 also activates the intrinsic pathway by Bid translocation to mitochondrial membrane (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007), releasing cytochrome c. However, ACPs activate, mainly, the intrinsic pathway, modulating anti- and pro-apoptotic factors, being extrinsic pathway activated indirectly (LABELLE et al., 2012).

Caspase-3 and -7 regulate morphological changes during apoptotic process. These caspases, known as effector caspases, promote DNA fragmentation, condensation of chromatin (Pyknosis), fragmentation of the nucleus (Karyorrhexis) and phosphatidylserine externalization (MASANGO et al., 2015; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008), results observed in this work.

We postulated that the uptake of Lunatin-1 into the cytosol may occur by endocytosis, mainly because it is calcium-dependent. Cell-penetrating peptides (CPPs) can be internalized by direct translocation or endocytosis, depending on the peptide sequence, extracellular concentration of the peptide and membrane components (JIAO et al, 2009). The direct translocation is preferred in conditions of high concentration of CPPs (LI et. al., 2015), and when peptides are rich in positive charge amino acids, such as arginine and lysine (FRANK et al., 2014). The calcium-dependent internalization is involved mainly in endocytosis (KHOSRAVI-DARANI et al. 2010), being the cellular uptake pathway for the majority of the described CPPs (GRÄSLUND et al. 2011). In addition, Lunatin-1 has only one positive amino acid residue, which, apparently, may not be sufficient for direct translocation.

Lunatin-1 would be to conjugate with anticancer drugs for synergistic effect studies. Other strategy for improve its activity is conjugate the peptide to carrier molecules, such as nanoparticles, polymers and liposomes, aiming to increase stability, delivery in specific tissues (LI; TSUI; MA, 2015).

5 Conclusion

In summary (Figure 6), Lunatin-1 was internalized by endocytosis and induced oxidative stress in HL60 cells that has led to apoptosis via extrinsic and intrinsic pathways

with mitochondrial membrane potential loss. Moreover, Lunatin-1 induced DNA fragmentation, nuclear morphological changes and phosphatidylserine exposure. This unveils the potential of Lunatin-1 as pro-apoptotic peptide against leukemia cells, still being as prototype peptide for new ACPs based on hot spots find by Alanine-Scan.

Acknowledgment

CNPq, CAPES and FAPEMIG (Brazil) supported this work.

References

ADAM-VIZI, V.; TRETTER, L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. **Neurochemistry International**, v. 62, p.757-63, 2013.

AILI, S. R. et al. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. **Toxicon**, v. 92, p. 166–178, 2014.

BEA, R. D. L. S.; PETRAGLIA, A. F.; JOHNSON, L. E. L. DE. Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides. **Toxicon**, v. 101, p. 79–84, 2015.

CALDERON L. A. et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**. 19p. 2014.

CRUCIANI, R. A., BARKER, J. L., ZASLOFF, M., CHEN, H. C., AND COLAMONICI, O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed-cell lines through channel formation. **Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A**, v.88, p.3792–3796. 1991.

FOSGERAU K.; HOFFMANN T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v.20(1), p-122-128, 2015.

FRANK, ANDREAS O. et al. Discovery of a potent stapled helix peptide that binds to the 70N domain of replication protein A. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2455–2461, 2014.

GALLUZZI, L. et al. Cell Death Signaling and Anticancer Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 1, n. May, p. 1–18, 2011.

GOLDAR S, KHANIANI MS, DERAKHSHAN SM, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.16, p.2129-44, 2015.

GRÄSLUND, A. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. **Journal of Biophysics**, v. 2011, 2011.

GARTLON, J., KINSNER, A., BAL-PRICE, A., COECKE, S., CLOTHIER, R.H. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicology in Vitro**. 20, 1569-1581. 2006.

GASPAR, D.; VEIGA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1–16, 2013.

HENNINOT, A.; COLLINS, J. C.; NUSS, J M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p.1382–1414. 2018.

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

JIAO, C. Y. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 33957–33965, 2009.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Calcium based non-viral gene delivery: An overview of methodology and applications. **Acta Medica Iranica**, v. 48, n. 3, p. 133–141, 2010.

KROEMER G1, GALLUZZI L, BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev**, v.87(1), p.99-163, 2007.

LABELLE, J. L. et al. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2018–2031, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections, **Cell Host & Microbe**, v.8, p. 44-54, 2010.

LAU, J. L.; DUNN M K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.26, p-2700–2707, 2018.

LI, H.; TSUI, T. Y.; MA, W. Intracellular delivery of molecular cargo using cell-penetrating peptides and the combination strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19518–19536, 2015.

LIU, S., YANG, H., WAN, L., CHENG, J., AND LU, X. Penetratin-mediated Delivery enhances the antitumor activity of the cationic antimicrobial peptide magainin II. **Cancer Biother. Radiopharm**, v.28, p.289–297. 2013.

LIU, Z. et al. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways. **Current molecular medicine**, v. 12, p. 1350–60, 2012.

MASANGO, MXOLISI G.; ELLIS, CHARLOTTE E; BOTHA, CHRISTO J. Characterization of cell death caused by diplodiatoxin and dipmatol, toxic metabolites of *Stenocarpella maydis*. **Toxicon**, v. 102, p. 14–24, 2015.

RODRIGUES, E. G. et al. Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 503–520, 2009.

SANTANA, H. F. Determinação da diversidade peptídica do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

SKULACHEV V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v.4, p. 473-85. 2006.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231–41, 2008.

XUE L, LI M, CHEN T, SUN H, ZHU J, LI X, WU F, WANG B, LI J, CHEN Y. PE-induced apoptosis in SMMC-7721 cells: involvement of Erk and Stat signalling pathways. **Int J Mol Med**, V.34(1), p.119-29, 2014.

Figures

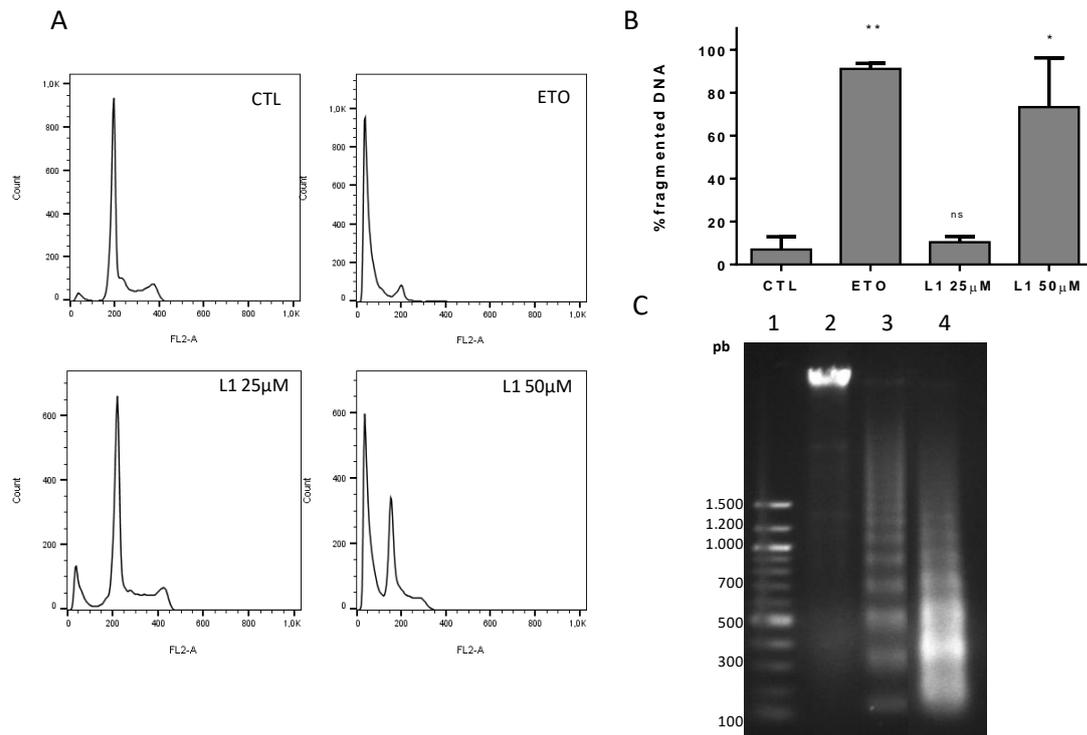


Figure 1: Quantification of DNA fragmentation in HL60 cells induced by Lunatin-1 (25 and 50 μ M). A) Cells labeled with PI and analyzed by flow cytometry. B) Quantification of DNA fragmentation. C) Agarose gel. 1- Label. 2-Control. 3-Etoposide 50 μ M. 4- Lunatin-1 50 μ M. Two independent experiments were performed in triplicate, */**p<0,05.

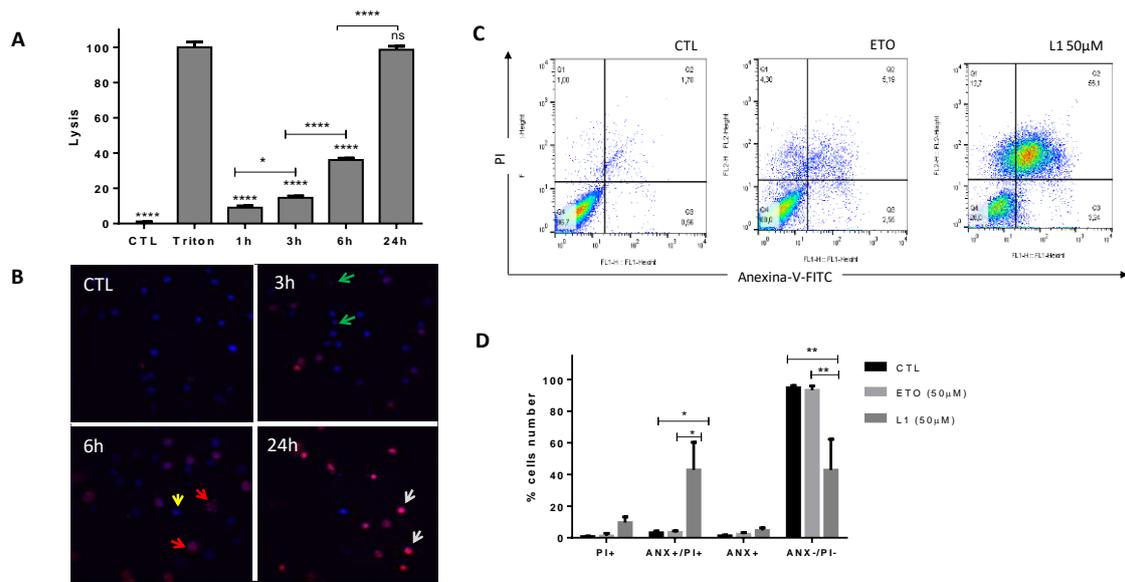


Figure 2: **A)** Percent lysis observed in HL60 cells treated with Lunatin-1 50µM. CTL- negative control. Triton- positive control, 100% lysis. Three independent experiments were performed in triplicate, *p<0,05; ****p<0,0001. **B)** Nuclear microscopy of HL60 cells treated with Lunatin-1 50µM using Hoechst 33342 and PI as label. CTL untreated and 3, 6 and 24 hours of treatment. The arrows represent nuclear condensation (green), DNA fragmentation / early apoptotic (yellow), late apoptosis (red) and cell death (gray). 400X magnification. **C)** Phosphatidylserine exposure and PI labeling of HL60 cells treated with Lunatin-1 50µM. Dot plot (FL1-H-FITC x FL2-H-PI) obtained by flow cytometry. Q1- PI+. Q2- ANX+/PI+. Q3- ANX+ and Q4- ANX-/PI-. **D)** Percentage analysis of the cell number with phosphatidylserine exposure and PI labeling. Two independent experiments were performed in triplicate, */**p<0,05; Two-way ANOVA.

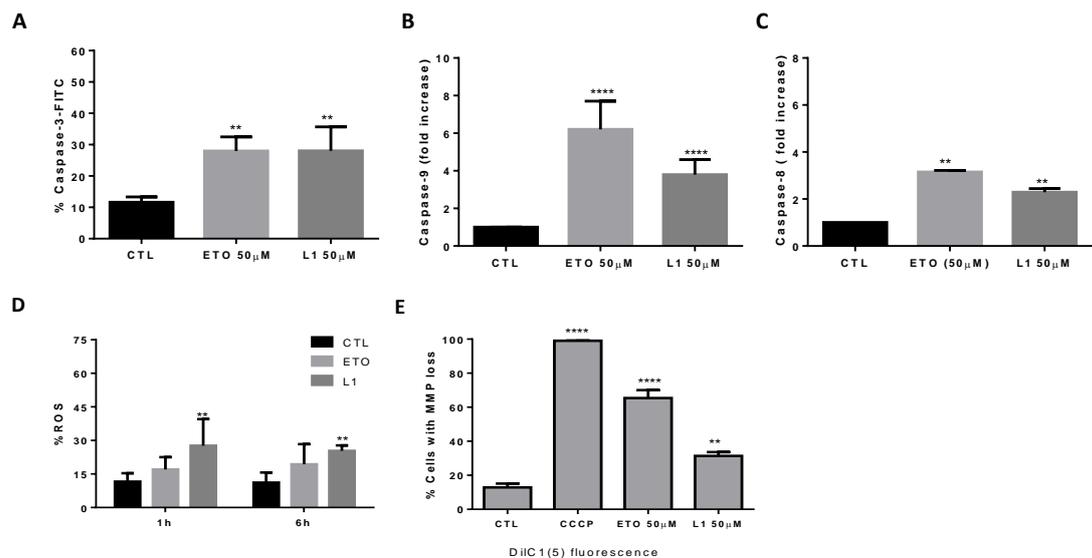


Figure 3: **A)** Analysis of the percentages of the cell number of with caspase-3 active after 3h of treatment. **B)** Caspase-9 activity **C)** Caspase-8 activity. **D)** Effect of Lunatin-1 on ROS production: H₂O₂ and O₂^{-•}, 1 and 6h of treatment. **E)** % cells with MMP loss after 3h of treatment. CTL: Control. ETO: Etoposide 50 μ M. L1: Lunatin-1 50 μ M. CCCP 500 μ M: uncoupler of mitochondrial membrane. **p<0,05; ****p<0,0001.

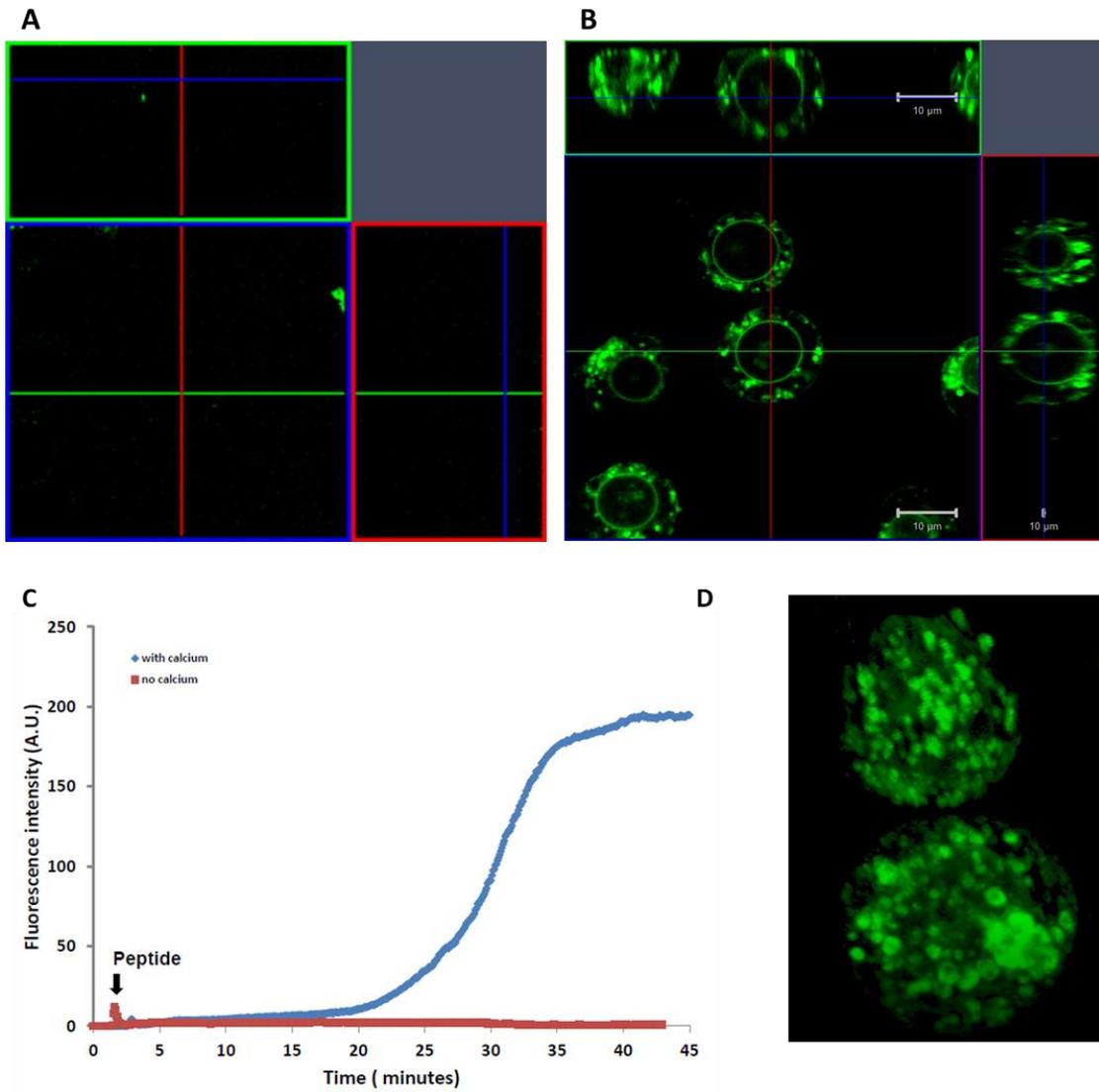


Figure 4: Time-lapse image by confocal microscopy for FITC-Lunatin-1 in HL60 cells. **A)** Orthogonal plane for cells, without calcium. **B)** Orthogonal plane for cells, with calcium. **C)** Quantification of fluorescence intensity of cells after perfusion with FITC-Lunatin-1. **D)** 3D cell image with peptide internalized. Were performed three experiments for each condition.

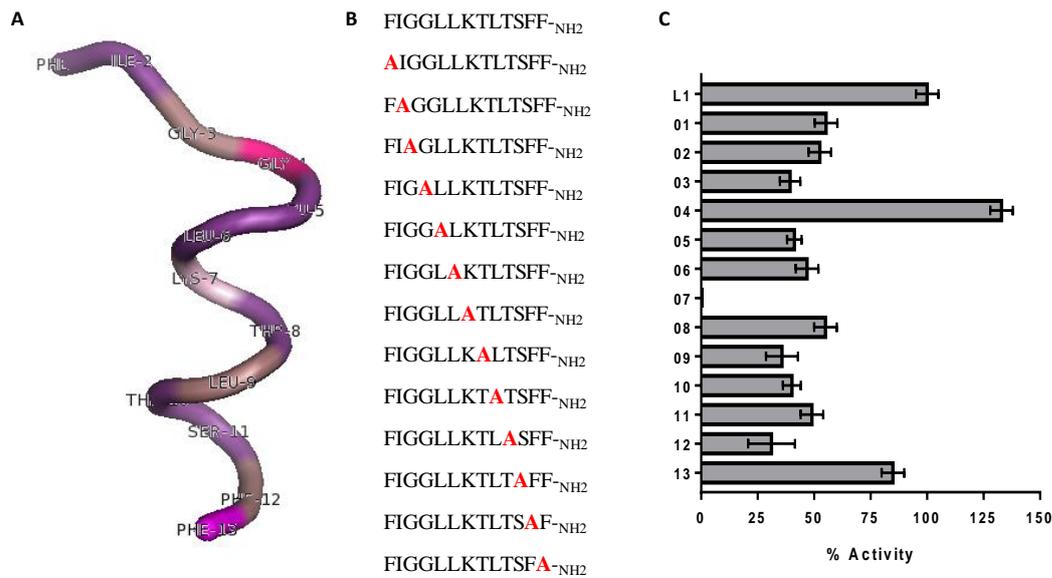


Figure 5: Alanine Scan for Lunatin-1 peptide. **A)** 3D structure of Lunatin-1 obtained by RMN. The colors represent each residues and dark colors correspond to amino acids residues more activate after substitution by Alanine. **B)** Alanine Scan profile. **C)** Activity of modified peptides (01 to 13), in comparison with L1 (Lunatin-1). IC₅₀ for Lunatin-1 was considered 100% activity. Were performed four independent experiments in triplicate.

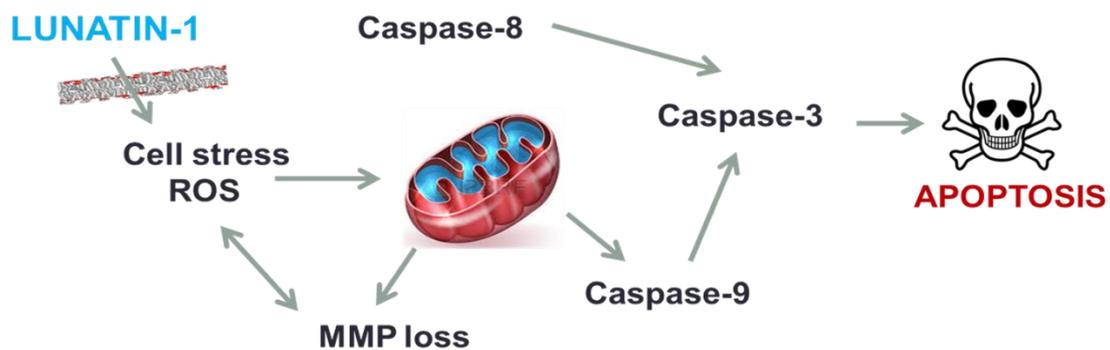


Figure 6: Proposed mechanism of cell death in HL60. Lunatin-1 induce oxidative stress, mitochondrial membrane potential loss and activation of extrinsic and intrinsic pathways.

11.3 CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO



CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled

**Lunatin 1 From The Venom Of The Peruvian Scorpion *Hadruroides Lunatus* As Cytotoxic
And Pro-Apoptotic Peptide – (R – 16)**

Gomes, K.S.¹; Marques, L.B.²; Souza-Fagundes, E.M.²; Lima, M.E.¹; Pimenta, A.M.C.¹

¹Dep. de Bioquímica e Imunologia, and ²Dep. de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

received the “**SBBq AWARD**” for best poster presented during the 45th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), June 18th to 21st, 2016, in the Convention Center of Natal in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

June, 21th, 2016



Jerson Lima Silva
President of SBBq