

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

**Brenda Raíssa De Oliveira**

**LUNATINA-1: DESVENDANDO O SEU MECANISMO CITOTÓXICO EM  
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

**Belo Horizonte**  
**2024**

**Brenda Raíssa De Oliveira**

**LUNATINA-1: DESVENDANDO O SEU MECANISMO CITOTÓXICO EM  
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia da Faculdade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor(a) em Bioquímica e Imunologia.

**Orientador:** Thiago Verano-Braga

**Co-orientadora:** Elaine Maria de Souza-Fagundes

**Belo Horizonte  
2024**

043

Oliveira, Brenda Raíssa de.

Lunatina-1: desvendando o seu mecanismo citotóxico em células de câncer de mama triplo negativo [manuscrito] / Brenda Raíssa de Oliveira. – 2024.  
112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Thiago Verano-Braga. Co-orientadora: Elaine Maria de Souza-Fagundes.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Peptídeos. I. Verano-Braga, Thiago. II. Souza-Fagundes, Elaine Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



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



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRENDA RAÍSSA DE OLIVEIRA.** Aos quinze dias do mês de julho de 2024 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Lunatina-1: desvendando o seu mecanismo citotóxico em células de câncer de mama triplo negativo", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Thiago Verano-Braga, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rafael Pinto Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Claudiana Lameu (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Maria Aparecida Nagai (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Thiago Verano-Braga - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de julho de 2024.

Dr. Rafael Pinto Vieira (UFMG)

Documento assinado digitalmente  
 gov.br  
 RAFAEL PINTO VIEIRA  
 Data: 22/07/2024 16:14:39-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Claudiana Lameu (Universidade de São Paulo)

Documento assinado digitalmente  
 gov.br  
 CLAUDIANA LAMEU GOMES  
 Data: 22/07/2024 15:42:21-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Aparecida Nagai (Universidade de São Paulo)

Documento assinado digitalmente  
 gov.br  
 MARIA APARECIDA NAGAI  
 Data: 18/07/2024 14:41:21-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

gov.br  
 MARIA APARECIDA AZEVEDO KOIKE FOLGUEIRA  
 Data: 19/07/2024 21:23:48-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (Universidade de São Paulo)

Dr. Thiago Verano-Braga - Orientador (UFMG)

Documento assinado digitalmente  
 gov.br  
 THIAGO VERANO BRAGA  
 Data: 18/07/2024 11:54:47-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



*Dedico essa tese, meu sonho, aos meus pais e vó Ana, principalmente a minha mãe que sempre apoiou com todas as forças todos esses anos de estudo.*

*Dedico essa tese ao meu namorado, que também me apoiou durante o percurso.*

*E por fim, dedico essa tese a meu orientador Thiago Verano e co-orientadoras Marcella Nunes de Melo Braga e Elaine Fagundes.*

*A todos vocês meu muito obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a força necessária para seguir a trajetória do doutorado e escrever, bem como me auxiliar também de forma sobrenatural com pequenos sinais e palavras a partir de pessoas de meu convívio, de que eu realmente estava onde deveria estar.

Aos meus pais e familiares.

Um agradecimento especial a minha mãe, que além de tudo, me deu apoio emocional aos desabafos ao longo das experiências vividas.

Aos amigos, que me deram um certo alívio cômico ao longo do estresse do percurso do doutorado.

Ao meu namorado, Gabriel, que me “aturava”- e atura - nos momentos difíceis e escutava meus desabafos me dando apoio emocional e alívio cômico das experiências vividas no doutorado.

Ao meu orientador Dr. Thiago Verano por me guiar da melhor forma possível em toda a trajetória do doutorado.

A minhas co-orientadoras Dra Marcela Nunes de Melo Braga e Dra Elaine Fagundes por terem me guiado ao longo do doutorado.

E finalmente a UFMG, a todos os professores e funcionários que contribuíram de alguma forma no decorrer deste doutorado, uma continuação da minha jornada acadêmica...

O trajeto do DOUTORADO, assim como o do MESTRADO, pra mim, não constituiu apenas de crescimento profissional, realização de um trabalho com amor, lágrimas e obtenção de um título. O doutorado me proporcionou crescimento pessoal, auto reflexão e descobertas que acredito que só foram possíveis com a “pressão” que eu sentia sobre a ideia de estar em um doutorado na UFMG em si. Auto reflexões sobre quem eu sou ou o que quero/preciso ser ou amadurecer sobre mim mesma. Passei por constantes períodos de introspecção, períodos que foram necessários para desprender, ou começar a desprender dos fantasmas das inseguranças do passado e então seguir com a realização do sonho de ser DOUTORA na área que escolhi seguir.

*“(...) Quem se arrisca a se manter sonhando até o último dia da sua vida, vive muito mais acordado para a verdadeira alegria das coisas. Ela está escondida na inquietude permanente de quem nunca está realizado. Não preciso de realizações, me basta a plenitude de saber que o realizado já parou, adormeceu. O sonhador não dorme nunca, correndo atrás do que já viu – no sonho – mas que ainda não viveu.”*

Clarice Freire

## RESUMO

A Lunatina-1 é um peptídeo isolado do veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus* que induz apoptose em experimentos *in vitro* na linhagem celular de leucemia promielocítica humana HL-60 e causa morte celular em células cancerosas humanas MCF-7 e MDA-MB-231 por mecanismos ainda desconhecidos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de morte celular induzido pela Lunatina-1 em células de MDA-MB-231, uma linhagem de câncer de basal-like que representa um câncer de mama triplo negativo com alta taxa de recorrência. Ensaio de cinética de absorção de iodeto de propídio (PI, sigla do inglês) medidas por um leitor de microplacas Cytation 5 mostrou que a Lunatina-1 induz permeabilidade da membrana celular, evidenciada através da marcação positiva para PI, desde o primeiro minuto de tratamento ( $p < 0,05$ ). Além disso, a Lunatina-1 foi capaz de reduzir a marcação para Red CellMask, uma sonda de ligação em membrana plasmática, após 5 minutos de tratamento, indicando que a Lunatina-1 possui ação contra a membrana celular. Dados de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que a Lunatina-1 induziu danos à membrana celular, com redução de microvilosidades desde os primeiros minutos de tratamento, e aumento de estruturas semelhantes a poros após 10 minutos. A quantificação do número de microvilosidades foi realizada usando os softwares Cell Profiler e CellPose, que confirmaram a redução significativa ( $p < 0,05$ ) das microvilosidades após 10 minutos de tratamento com a Lunatina-1. A quantificação das estruturas semelhantes a poros foi realizada usando o software Fiji/ImageJ, confirmando o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número dessas estruturas, sem aumento no seu diâmetro: controle (DMSO 0,5%) =  $41,8 \pm 2,1$  nm vs. Lunatina-1 (25  $\mu$ M) =  $42,3 \pm 1,2$  nm ( $p > 0,05$ ). Os resultados demonstraram que a Lunatina-1 causa a morte na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 através de mecanismos relacionados a diferentes formas de perturbações da membrana celular, sendo classificado como um peptídeo disruptivo de membrana (MDP, sigla do inglês), podendo ser um protótipo para conjugação com proteínas marcadoras de tumor e peptídeos do tipo *Tumor Homing*, para melhorar a sua seletividade, pois a Lunatina-1 também induziu citotoxicidade contra a linhagem celular não tumoral HEK-293.

Palavras-chave: lunatina-1; câncer de mama; peptídeo disruptivo de membrana.

## ABSTRACT

Lunatin-1 is a peptide isolated from the venom of the Peruvian scorpion *Hadruioides lunatus* that induces apoptosis in *in vitro* experiments on the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 and causes cell death in human cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 through unknown mechanisms, thus far. Therefore, this study aimed to investigate the mechanism of cell death induced by Lunatin-1 in MDA-MB-231 cells, a basal-like breast cancer cell line, which represents a triple-negative breast cancer with a high recurrence rate. A propidium iodide (PI) uptake kinetics assay measured by a Cytation 5 microplate reader showed that Lunatin-1 induces cell membrane permeability, evidenced by positive PI staining from the first minute of treatment ( $p < 0.05$ ). Furthermore, Lunatin-1 was able to reduce Red CellMask staining, a plasma membrane-binding probe, after 5 minutes of treatment, indicating that Lunatin-1 targets the cell membrane of MDA-MB-231 cells. Scanning electron microscopy data demonstrated that Lunatin-1 induced damage to the cell membrane, with a reduction in microvilli from the first minutes of treatment and an increase in pore-like structures after 10 minutes. The quantification of microvilli was performed using Cell Profiler and CellPose software, which confirmed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in microvilli after 10 minutes of treatment with Lunatin-1. The quantification of pore-like structures was performed using Fiji/ImageJ software, confirming a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the number of these structures, with no increase in their diameter: control (0.5% DMSO) =  $41.8 \pm 2.1$  nm vs. Lunatin-1 (25  $\mu$ M) =  $42.3 \pm 1.2$  nm ( $p > 0.05$ ). The results demonstrated that Lunatin-1 causes death in the MDA-MB-231 breast cancer cell line through mechanisms related to different forms of cell membrane disruption, being classified as a membrane-disrupting peptide (MDP). Lunatin-1 could be used as a prototype for conjugation with tumor marker proteins or tumor homing peptides to improve its selectivity for tumor cells, as it also induced cytotoxicity against the non-tumoral cell line HEK-293.

Key-words: lunatin-1; breast cancer; membrane-disrupting peptide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores do câncer: Novas dimensões. Retirado de: (HANAHAN, 2022).....	16
Figura 2. Representação gráfica da anatomia da mama em corte sagital. Figura produzida no Biorender. ....	17
Figura 3. Heterogenicidade do câncer de mama triplo negativo, demonstrando as principais características de cada um dos seus subtipos. Retirado de: (MAHMOUD; ORDÓÑEZ-MORÁN; ALLEGRUCCI, 2022).....	20
Figura 4. Mecanismos de desestabilização da membrana plasmática induzida por peptídeos disruptores de membrana (MDPs) e/ou com atividade antitumoral (ACPs). Retirado de: (LIN et al., 2021).....	26
Figura 5. Mecanismos de morte por apoptose induzido por peptídeos com atividade antitumoral (ACPs). Figura produzida no Biorender. ....	27
Figura 6. Apoptose: representação das vias extrínsecas, intrínsecas e via induzida por estresse do ER. Retirado de: (NIRMALA; LOPUS, 2019). ....	30
Figura 7. Representação das vias apoptóticas mediadas por granzima A e granzima B. Retirado de: (NIRMALA; LOPUS, 2019). ....	31
Figura 8. Estrutura tridimensional do peptídeo Lunatina-1 resolvida por ressonância nuclear magnética (NMR, sigla em inglês). Retirado de: (Gomes et al, 2018).....	34
Figura 9. Purificação do peptídeo sintético Lunatina-1.....	49
Figura 10. Espectro de massa do peptídeo sintético Lunatina-1 obtido com sistema MALDI-TOF/MS.....	50
Figura 11. Sequenciamento do peptídeo Lunatina-1 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Espectro de massa da fragmentação do íon parental $m/z = 1442,800$ .....	51
Figura 12. Atividade citotóxica e de CI50 da Lunatina-1 em células MDA-MB-231, LNCap e HEK-293.....	53
Figura 13. Imagens em campo claro das alterações morfológicas induzidas pela Lunatina-1 em células MDA-MB-231 em diferentes tempos de tratamento.....	55
Figura 14. Análise qualitativa do efeito da Lunatina-1 na integridade de membranas plasmáticas. ....	57
Figura 15. Análise quantitativa do efeito da Lunatina-1 na integridade de membranas plasmáticas. ....	58
Figura 16. Avaliação qualitativa da estrutura da membrana celular.....	59
Figura 17. Avaliação estrutural da superfície de células MDA-MB-231 tratadas com Lunatina-1.....	60
Figura 18. Lunatina-1 induz a formação de estruturas semelhantes a poros e reduz a quantidade de microvilosidades na membrana plasmática de células MDA-MB-231.....	62
Figura 19. Lunatina-1 reduz a densidade de microvilosidades na superfície de células MDA-MB-231.....	63
Figura 20. Lunatina-1 aumenta significativamente o número de estruturas semelhantes a poros em células MDA-MB-231.....	64
Figura 21. Lunatina-1 induz um rápido comprometimento da membrana plasmática de células MDA-MB-231.....	65

Figura 22. A concentração utilizada de DMSO não induziu toxicidade aparente nas células MDA-MB-231.....	66
Figura 23. Imagens representativas de células MDA-MB-231 tratadas por 20 minutos com diferentes concentrações de estreptolisina O.....	71
Figura 24. Indução de permeabilidade de membranas de células MDA-MB-231 tratadas por 20 e 30 minutos com estreptolisina O. ....	72
Figura 25. SLO induz a formação de poros, blebs e compromete a superfície de células MDA-MB-231.....	73
Figura 26. Ilustração esquemática do mecanismo citotóxico induzido pelo tratamento de MDA-MB-231 com Lunatina-1. ....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPs: peptídeos com atividade antitumoral

AMPs: peptídeos com atividade antimicrobiana

BC: câncer de mama

BF: campo claro

CAPI: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens, ICB-UFMG

CARDS: domínio recrutador de caspase

CI50: concentração que inibe 50% do crescimento celular

CTLs: Linfócitos T citotóxico

CK: creatina quinase

DCIS: carcinomas ductais *in situ*

DICS\*: complexo de sinalização indutor de morte

ER: receptor de estrógeno

IAPS: inibidores de proteínas de apoptose

IDC: carcinomas ductais invasivos

ILC: carcinomas lobulares invasivos

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico

HOE: Hoechst

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

LCIS: carcinomas lobulares *in situ*

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MDP: peptídeos disruptores de membrana

NK: células *Natural Killers*

NMR: ressonância nuclear magnética

PI: Iodeto de propídio

PLA2: fosfolipase A2

PR: receptor de progesterona

ROS: espécies reativas de oxigênio



SLO: estreptolisina O

WHO: Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. Câncer .....	15
1.2. Câncer de Mama .....	16
1.3. Peptídeos biologicamente ativos .....	22
1.3.1. Morte celular induzida por ACPs .....	24
1.3.2. Lunatina-1 .....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>36</b>
2.1. Hipótese .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.3. Objetivo Geral: .....	38
3.2. Objetivos Específicos: .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1. Obtenção da Lunatina-1 .....	39
4.2. Cultura de células e tratamento com Lunatina-1 .....	40
4.3. Determinação da atividade citotóxica da Lunatina-1 .....	41
4.4. Análise da integridade da membrana plasmática após o tratamento com a Lunatina-1 .....	42
4.4.1. Análises morfológicas e permeabilidade de membrana das MDA-MB-231 após tratamento com Lunatina-1 .....	42
4.4.2. Análise qualitativa de danos na membrana das células MDA-MB-231 após tratamento com Lunatina-1 por microscopia confocal .....	44
4.4.3. Análise da estrutura tridimensional da membrana de células MDA-MB-231 após o tratamento com Lunatina-1 por microscopia eletrônica de varredura .....	44
4.4.4. Determinação da atividade citotóxica do peptídeo formador de poros estreptolisina O em células MDA-MB-231 .....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
5.1. Purificação da Lunatina-1 .....	48
5.2. Lunatina-1 é citotóxica para as células de câncer de mama MDA-MB-231 e células de câncer de próstata LNCap .....	51
5.3. Lunatina-1 induz alterações morfológicas em células MDA-MB-231 .....	54
5.4. Lunatina-1 induz diferentes formas de comprometimento de membrana celular em células MDA-MB-231 .....	56

5.4.1. Lunatina-1 induz a redução de microvilosidades, aumento de estruturas semelhantes a poros e comprometimento da membrana plasmática de células MDA-MB-231.....	59
5.5. Atividade da estreptolisina O em células MDA-MB-231 .....	70
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

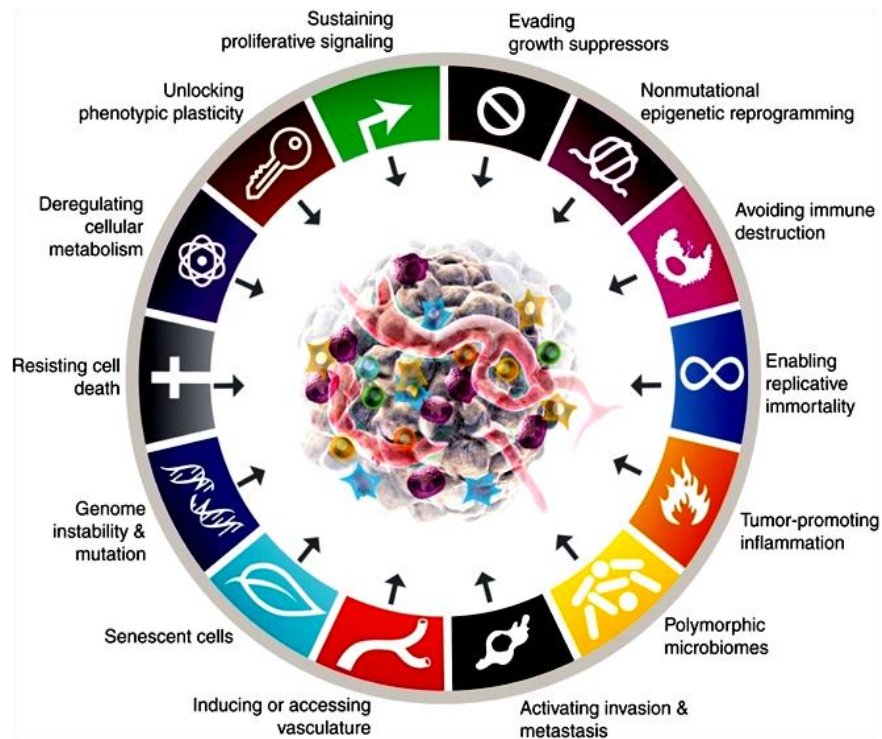
### 1.1. Câncer

O câncer é um problema mundial de saúde pública, sendo responsável, em 2020, por cerca de 10 milhões de óbitos no mundo (SUNG *et al.*, 2021). Enquanto, no Brasil, ocorreram 239.644 óbitos por câncer em 2022 (ATLAS ON-LINE DE MORTALIDADE, [s. d.]).

As nomenclaturas “câncer” ou “tumor maligno” são usadas para se referir a um conjunto de doenças que apresentam semelhanças, como o crescimento desordenado de células, que se mantém de forma excessiva, mesmo com o desaparecimento dos estímulos iniciadores, além de apresentarem uma capacidade invasiva, ou seja, de migrarem para tecidos próximos e/ou distantes (INCA; WHO).

O processo de desenvolvimento do tumor, chamado de tumorigênese, acontece em um microambiente dinâmico e complexo, composto por células tumorais, bem como diversas outras células e moléculas, como citocinas, fatores de crescimento e exossomos. As células e moléculas presentes neste microambiente contribuem para o estabelecimento da tumorigênese (COMINETTI; ALTEI; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2019). Durante o início da tumorigênese ocorre, primeiramente, alterações da atividade de reguladores do ciclo celular e o estabelecimento do crescimento desordenado. Após essa etapa inicial, surgem mutações adicionais que promovem alterações funcionais nas células cancerosas que começam a coordenar, além do crescimento, a sobrevivência e a propagação do tumor. Tais alterações funcionais são denominadas *hallmarks* do câncer (Figura 1), sendo elas: i) capacidade de sustentação da sinalização, ii) proliferação, iii) instabilidade genômica, iv) reprogramação do metabolismo energético celular, v) ativação, invasão e metástase, vi) indução de angiogênese, vii) resistência à morte celular, viii) microambiente de inflamação, e ix) evasão do sistema

imunológico (AMAYA ARBELÁEZ *et al.*, 2021; HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).



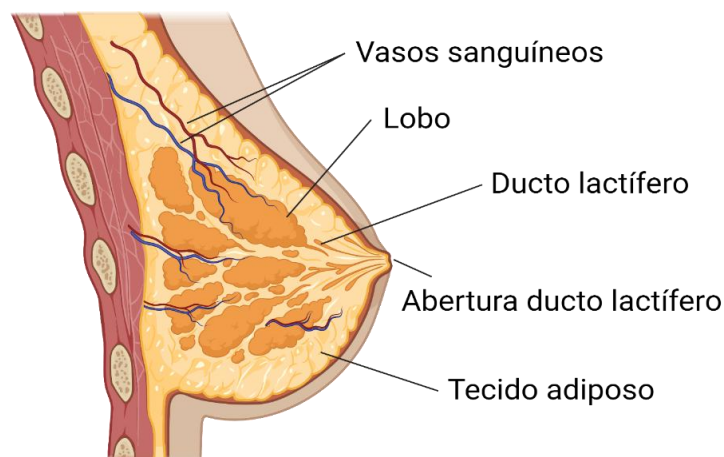
**Figura 1.** Marcadores do câncer: Novas dimensões. Retirado de: (HANAHAHAN, 2022)

## 1.2. Câncer de Mama

O câncer de mama é o de maior incidência e óbitos entre as mulheres no mundo, sendo responsável por mais de 2 milhões de novos casos e 684.996 óbitos em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, ocorreram 19.363 mortes em decorrência do câncer de mama no ano de 2022 (INCA, ATLAS ON-LINE DE MORTALIDADE).

A classificação do câncer de mama é diversa, devido à heterogeneidade da doença, sendo realizada considerando os aspectos histológicos e moleculares, bem como a sua capacidade de invasão (GHANNAM *et al.*, 2023; LOGAN *et al.*, 2015; REED *et al.*, 2015; SHEHATA *et al.*, 2019).

A maioria das neoplasias de mama são adenocarcinomas, originadas a partir de células que compõem as glândulas produtoras de leite (lóbulos) ou nos ductos lactíferos (Figura 2). A terminologia carcinoma é usada para descrever um tipo de tumor que se origina de células epiteliais que revestem os órgãos e os tecidos do corpo. Quando analisamos a classificação relacionada à localização anatômica, os carcinomas de mama são divididos em ductal e lobular. Carcinomas ductais e lobulares podem, ainda, ser classificados em relação ao grau de invasividade, como carcinomas ductais *in situ* (DCIS, sigla em inglês), carcinomas ductais invasivos (IDC, sigla em inglês), carcinomas lobulares *in situ* (LCIS) e carcinomas lobulares invasivos (ILC, sigla em inglês) (GHANNAM *et al.*, 2023; LOGAN *et al.*, 2015; SHEHATA *et al.*, 2019), 2019; (TYPES OF BREAST CANCER, [s. d.]).



**Figura 2.** Representação gráfica da anatomia da mama em corte sagital. Figura produzida no Biorender.

O carcinoma de mama ductal *in situ* limita-se a membrana basal (SHEHATA *et al.*, 2019), ou seja, sem invasão do estroma ou de vasos sanguíneos e linfáticos, enquanto o carcinoma ductal invasivo pode invadir o estroma devido ao rompimento da membrana basal (GHANNAM *et al.*, 2023). Similarmente, os carcinomas lobulares *in situ*, por definição, ocorrem com a permanência das células dentro da unidade ducto-lobular terminal (REED *et*

*al.*, 2015), podendo progredir para o carcinoma lobular invasivo, quando ocorre a ruptura da camada mioepitelial adjacente (LOGAN *et al.*, 2015).

A introdução da ideia de que o câncer de mama poderia ser classificado mediante ao seu perfil molecular foi proposta por Perou *et al.*, 2000, que utilizaram microarranjos de DNA para avaliação de amostras oriundas de pacientes com câncer de mama. Neste estudo foi proposto a classificação molecular do câncer de mama em 4 subtipos moleculares, sendo eles ER+/luminal-like, basal-like, Erb-B2+ e mama normal (PEROU *et al.*, 2000). Estudos subsequentes mostraram, ainda, que o subtipo luminal-like poderia ser dividido em dois subtipos: o Luminal A e Luminal B (SORLIE *et al.*, 2003)

Na prática clínica é utilizado análises imuno-histoquímicas baseadas na expressão de três receptores: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2) (AL-THOUBAITY, 2020). Avaliando a expressão desses marcadores, o câncer de mama pode ser classificado em cinco subtipos distintos: mama normal, luminal A, luminal B, Her2 e *basal-like*, esse último também denominado triplo negativo (ER<sup>-</sup> / PR<sup>-</sup> / HER<sup>-</sup>). Outro marcador que também é avaliado é a proteína nuclear não histona Ki-67, que é presente em todas as fases ativas do ciclo celular (SOLIMAN; YUSSIF, 2016) e indica a proliferação celular durante a avaliação imuno-histoquímica (FULAWKA *et al.*, 2022) (Tabela 1).

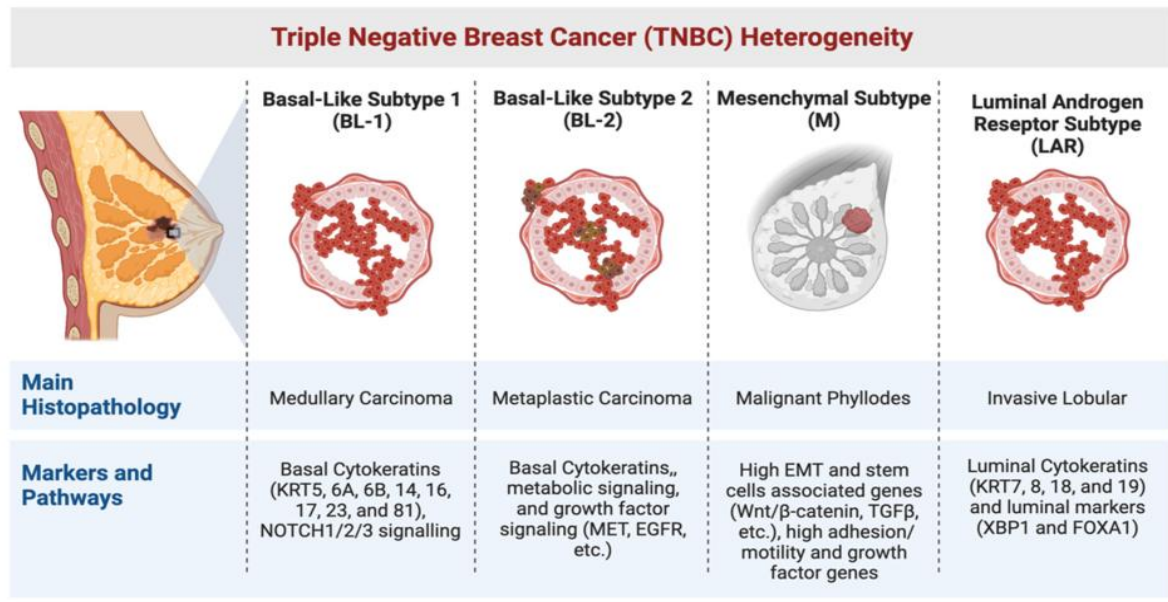
**Tabela 1.** Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama demonstrando sua frequência e grau histológico comumente associados.

Subtipo	ER	PR	HER2	Ki-67	Grade Histológica	Características clínica e epidemiológica
Luminal A	++	++	-	+	1 ou 2	Prognóstico favorável, menor taxa de proliferação. Representa, aproximadamente, 40% dos casos.
Luminal B	+	+	-	++	3	Prognóstico não favorável, alta taxa de proliferação. Representa, aproximadamente, 20% dos casos.
HER2 Enriquecido	-	-	+	Qualquer	3	Pior prognóstico comparado ao do tipo Luminal, mais agressivo. Representa, aproximadamente, 10-15% dos casos.
<i>Basal-like</i>	-	-	-	Qualquer	3	O de pior prognóstico, mais agressivo, nenhum tratamento específico. Representa, aproximadamente, 15-20% dos casos.

Abreviaturas: ER, receptor de estrogênio; HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; PR, receptor de progesterona. Fonte: Adaptado de (FIRATLIGIL-YILDIRIR; YALCIN-OZUYSAL; NONAPPA, 2023; JOHNSON; CONANT; SOO, 2020; KROPYVKO *et al.*, 2019).

O câncer de mama do tipo *basal-like* pode ser classificado em diferentes subtipos, como demonstrado na Figura 3: *basal-like 1*, *basal-like 2*, imunomodulador, mesenquimal, mesenquimal semelhante a células-tronco e andrógeno luminal, variando de acordo com a expressão de genes distintos (PRATELLI *et al.*, 2023).





**Figura 3.** Heterogenicidade do câncer de mama triplo negativo, demonstrando as principais características de cada um dos seus subtipos. Retirado de: (MAHMOUD; ORDÓÑEZ-MORÁN; ALLEGRUCCI, 2022).

Diferente do câncer de mama *basal-like* derivado de biópsias de pacientes, o derivado de linhagens celulares foi classificado em dois grandes subtipos, no trabalho realizado por Neve *et al.*, 2006, sendo eles o *basal-like A* e o *basal-like B*. O câncer de mama *basal-like A* possui características epiteliais, não invasivo, mais diferenciando, apresentando em sua assinatura molecular uma alta expressão dos genes GATA3, TOB1, ERBB3 e SPDEF (NEVE *et al.*, 2006). Em contrapartida, o câncer de mama *basal-like B* possui uma baixa diferenciação celular e características mesenquimais, incluindo a expressão de vimentina (VIM) e um comportamento altamente invasivo, apresentando os genes CD44, MSN, TGFBR2, CAV1/2, VIM, SPARC, e AXL altamente expressos, e o gene CD24 com baixa expressão em sua assinatura gênica (HERO *et al.*, 2019; NEVE *et al.*, 2006).

A linhagem tumoral analisada neste trabalho, a MDA-MB-231, consiste em uma linhagem de câncer de mama estabelecida na década de 1970, do tipo triplo negativa (*basal-like*) e metastática com baixa diferenciação, sendo descrita como *basal-like B* (CAILLEAU *et al.*, 1974; HERO *et al.*, 2019).

O câncer de mama *basal-like* ou triplo negativo (ER<sup>-</sup> / PR<sup>-</sup> / HER2<sup>-</sup>) é considerado extremamente invasivo e de pior prognóstico (Tabela 1), com curto tempo de sobrevida dos pacientes e uma taxa de mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Além disso, é observado metástase em tecidos distantes do foco primário em cerca de 46% dos pacientes. Devido ao seu perfil molecular (ER<sup>-</sup> / PR<sup>-</sup> / HER2<sup>-</sup>), esse tipo de câncer não responde aos tratamentos endócrinos ou terapia molecular direcionada. Deste modo, o seu tratamento consiste, principalmente, em quimioterapia com a radioterapia como adjuvante pós operatório. No entanto, a sua eficácia é baixa, com alto risco de lesões metastáticas residuais, que podem conduzir a recorrência mesmo após o procedimento cirúrgico para ressecção do tumor primário. Ademais, as respostas à quimioterapia são frequentemente de curta duração e muitas vezes acompanhadas por toxicidade significativa (YIN *et al.*, 2020).

Deste modo, o câncer de mama *basal-like* continua sem um tratamento específico (FIRATLIGIL-YILDIRIR; YALCIN-OZUYSAL; NONAPPA, 2023). Neste contexto, se torna necessária a descoberta de novas moléculas com ação antitumoral, que sejam mais eficientes, apresentem menos efeitos colaterais e que minimizem a possibilidade de recorrência. Um exemplo de moléculas promissoras são os inibidores de PARP e de checkpoint imunológico, usadas para o tratamento de tumores com mutação no gene BRCA ou positivo para PD-L1, respectivamente (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018). Além disso, estudos vêm demonstrando que peptídeos com atividade antitumoral regulam a apoptose, bem como a invasão e a motilidade das células cancerosas (MIKAELIAN *et al.*, 2020). Esse assunto será abordado nos tópicos que se seguem.

### 1.3. Peptídeos biologicamente ativos

Os primeiros relatos da utilização de peptídeos na clínica médica se deram através do uso da insulina em 1922 (GHALY *et al.*, 2023). Na atualidade, a semaglutida (Ozempic, Novo Nordisk) é, provavelmente, o peptídeo de maior destaque, que é uma fármaco utilizada *off-label* para o tratamento da obesidade (GARVEY *et al.*, 2022), pois foi desenvolvida para o tratamento da diabetes do tipo II.

O uso de peptídeos apresenta algumas vantagens quando comparado a proteínas e anticorpos, tais como: (i) baixa massa molecular, o que facilita a sua síntese e modificações estruturais; (ii) maior capacidade de penetração nas membranas celulares, principalmente se apresentarem um caráter mais hidrofóbico; (iii) alta especificidade e afinidade aos seus respectivos alvos moleculares; (iv) menor imunogenicidade; dentre outras (MARQUIS; PIROGOVA; PIVA, 2017). Além disso, estratégias bioquímicas e/ou biofísicas podem ser empregadas para aumentar a meia-vida plasmática de um determinado peptídeo, visando melhorar suas propriedades farmacocinéticas, especificidade e solubilidade (LAU; DUNN, 2018).

Até 2018, cerca de 60 fármacos peptídicos haviam sido aprovados nos Estados Unidos, Europa e Japão (LAU; DUNN, 2018). Contudo, 5.027 estudos clínicos foram ou estão sendo realizados com peptídeos entre 2001 e 2024. Esses dados foram identificados através de uma pesquisa no site *clinicaltrials.gov*, usando as palavras-chave *peptide* e *drugs*. Nessa busca, focando em fármacos peptídicos para o tratamento do câncer de mama, foram encontrados 144 ensaios clínicos (2001 a 2024).

Os peptídeos podem ser classificados tanto pelos seus mecanismos de interação com as células quanto pela sua origem. As categorias de classificação dos peptídeos de acordo com os mecanismos de interação com as células são: (i) capacidade de internalização nas células

(CPPs, do inglês *cell penetrating peptides*), (ii) interação com alvos moleculares específicos e (iii) interação com a membrana plasmática (MDP, do inglês *membrane disruptive peptides*), que apresenta esse nome devido à sua ação disruptiva/lítica na membrana plasmática (BOOHAKER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2021).

Os nomes de acordo com a origem dos peptídeos são: (i) natural, (ii) modificado e (iii) sintético (GHALY *et al.*, 2023).

Receptores de membrana e intracelulares, assim como a matriz extracelular, constituem alvos moleculares de peptídeos antitumorais com alvos específicos (TTP, sigla do inglês). Os TTPs podem ser de origem natural ou sintética, sendo este último produzido por meio de síntese química, bibliotecas de fagos ou outra tecnologia de *screening* (ZHAO *et al.*, 2018).

Alguns peptídeos que possuem atividade antitumoral (ACPs, do inglês *anti-cancer peptides*) podem ser direcionados molecularmente para as células cancerosas, por exemplo, por sistemas de *delivery*, onde podem interagir com a membrana plasmática e membranas de organelas (CHIANGJONG; CHUTIPONGTANATE; HONGENG, 2020). Outra forma de direcionar os ACPs para as células cancerosas é pela conjugação com peptídeos de ligação. Tais moléculas podem não apresentar uma atividade antitumoral, mas são usadas para direcionar fármacos anticâncer que não possuem a capacidade de penetrar nas células, melhorando a ação destes (CHIANGJONG; CHUTIPONGTANATE; HONGENG, 2020).

Peptídeos naturais ou derivados de proteínas conhecidas interagem com a célula através de diversos mecanismos, sendo eles formação de poros ou rompimento de membranas celulares com consequente necrose, bem como apoptose como consequência da interação com membrana e danos a mitocôndria (BOOHAKER *et al.*, 2012; TRINIDAD-CALDERÓN; VARELA-CHINCHILLA; GARCÍA-LARA, 2021).

Venenos animais constituem uma mistura complexa de componentes, incluindo peptídeos, com atividades biológicas diversas. Captopril (*Bothrops jararaca*), exenatide (*Heloderma suspectum*) e ziconotide (*Conus magus*) são alguns exemplos de fármacos que foram desenvolvidos a partir de peptídeos encontrados em venenos animais (CHAIKUL *et al.*, 2016).

ACPs derivados do veneno de escorpião possuem ações diversas, atuando em vários marcadores do câncer, como apoptose, proliferação, adesão, invasão e motilidade (MIKAELIAN *et al.*, 2020), como o gonearrestide (LI *et al.*, 2018) e o RK1 (KHARAZIHA *et al.*, 2015). Os tipos de morte celular induzidos por ACPs serão abordados a seguir.

### **1.3.1. Morte celular induzida por ACPs**

#### **1.3.1.1. Desestabilização da membrana plasmática e necrose**

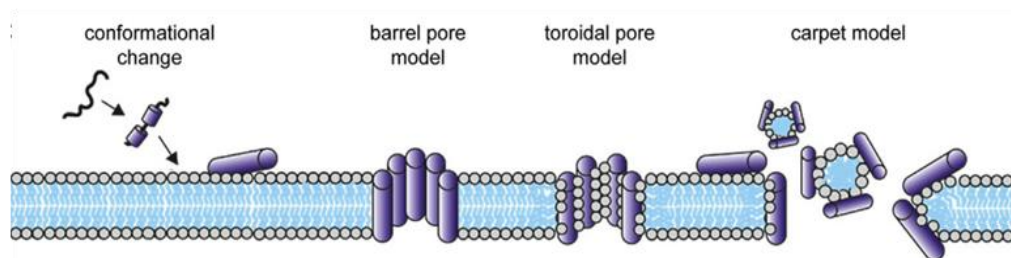
Células cancerosas possuem a membrana plasmática com carga líquida mais negativa em virtude da presença de lipídios carregados negativamente em sua superfície externa (TORNESELLO *et al.*, 2020), como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina, que normalmente estão confinados principalmente nos folhetos internos da membrana (PRETA, 2020), altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês), ambiente de hipóxia, bem como ausência da assimetria na distribuição lipídica (TORNESELLO *et al.*, 2020). Muitos peptídeos antimicrobianos (AMPs, sigla em inglês), que também podem ser ACPs, interagem com os lipídios de carga negativa presentes na membrana plasmática dessas células, causando danos pela formação de poros ou pela formação de micelas na membrana plasmática (LIU, Q. *et al.*, 2016), como representado na Figura 4. Tais peptídeos podem ser denominados de líticos ou disruptores de membrana (LIN *et al.*, 2021).

Os peptídeos disruptores de membrana (MDPs) possuem uma ação rápida, o que dificulta o estabelecimento de resistência por células cancerosas. Por isso, autores indicam o uso desses peptídeos como uma possível estratégia de superação da crise causada pela resistência de células tumorais a quimioterápicos (LIN *et al.*, 2021). Uma outra vantagem terapêutica dos MDPs é o seu uso como adjuvante em tratamento com quimioterápicos, atuando como ferramenta promissora para aumentar a eficácia destes medicamentos. Como os MDPs desestabilizam a membrana plasmática, facilitam o acúmulo do quimioterápico, aumentando a sensibilidade celular ao fármaco. Além disso, os MDPs podem ser conjugados com peptídeos do tipo *tumor-homing*, ou seja, moléculas que o endereçam às células tumorais ou com proteínas endereçadoras para proteínas que são superexpressas em células tumorais, melhorando, assim, a sua sensibilidade as células tumorais. (LEUSCHNER; HANSEL, 2004; LIN *et al.*, 2021), como vêm sendo descrito em outros estudos (HANSEL; LEUSCHNER; ENRIGHT, 2007; KUMKOON; NOREE; BOONSERM, 2023; LEUSCHNER *et al.*, 2001; VADEVOO *et al.*, 2023).

Os mecanismos envolvidos na ação de formação de poros induzidas por MDPs são descritos como dois modelos distintos: modelo barril e modelo toroidal. No modelo barril, peptídeos líticos contendo alfa hélice se ligam na membrana, agregando-as, formando poros transmembranares, de forma independente da carga, medindo entre 1 e 2 nm de diâmetro. Esses poros podem aumentar de tamanho após o agrupamento de hélices adicionais (LEUSCHNER; HANSEL, 2004; LIN *et al.*, 2021). Nesse processo, os peptídeos líticos devem possuir ao menos 23 resíduos de aminoácidos para serem capazes de atravessar a membrana plasmática. Por outro lado, no modelo toroidal, os MDPs interagem com a cabeça lipídica da membrana, induzem uma curvatura local nela, formando poros transmembranares que medem entre 3 e 10 nm de diâmetro e são revestidos parcialmente pelos MDPs e pelas

cabeças lipídicas, de forma que o tamanho dos poros depende do estado da bicamada lipídica (LIN *et al.*, 2021).

Finalmente, os MDPs de caráter anfipáticos e hidrofóbicos podem induzir a desestabilização de membranas pelo modelo tapete, devido a sua ação através da interação eletrostática com a membrana celular, ligando-se paralelamente à mesma, cobrindo a sua superfície de maneira semelhante a um tapete, desintegrando-a através da formação de partículas semelhantes a micelas, formando danos nas membranas com diâmetros maiores do que 10 nm (LIN *et al.*, 2021). A Figura 4 ilustra os três mecanismos de ação descritos para os MDPs.

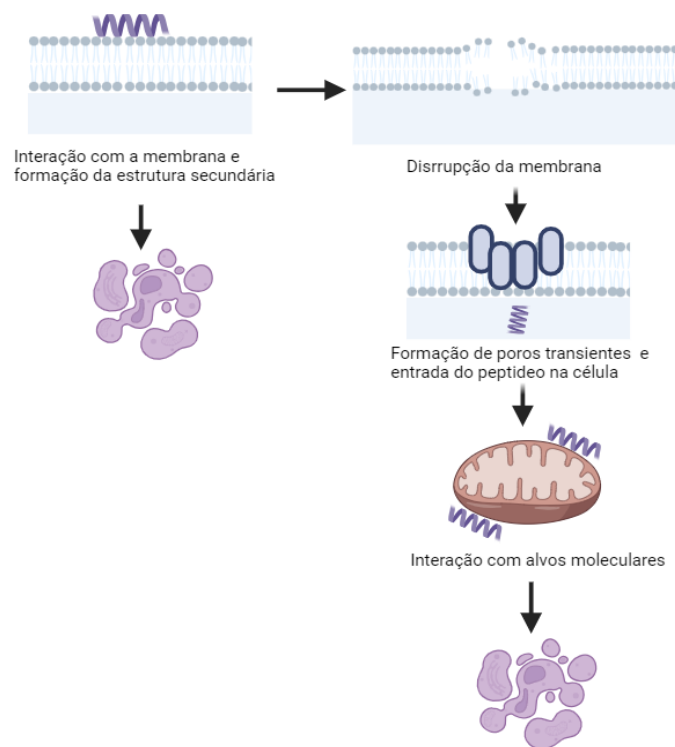


**Figura 4.** Mecanismos de desestabilização da membrana plasmática induzida por peptídeos disruptores de membrana (MDPs) e/ou com atividade antitumoral (ACPs). Retirado de: (LIN *et al.*, 2021)

Ao final da ação disruptiva de membranas provocada pelos MDPs, ocorre a morte celular por necrose (LIU, Q. *et al.*, 2016). Esse processo de morte celular é caracterizado morfológicamente pelo inchaço do núcleo e das organelas, fragmentação aleatória do DNA, ruptura da membrana plasmática, liberação de conteúdo intracelular e consequente resposta inflamatória e lise celular (KHALID; AZIMPOURAN, 2023; WESTMAN; GRINSTEIN; MARQUES, 2019).

### 1.3.1.2. Interação com alvos moleculares e apoptose

Apoptose induzida por ACPs tem sido relatada como consequência da interação do peptídeo com a membrana plasmática e/ou dano mitocondrial (LIN *et al.*, 2021; TRINIDAD-CALDERÓN; VARELA-CHINCHILLA; GARCÍA-LARA, 2021), como representado na Figura 5.



**Figura 5.** Mecanismos de morte por apoptose induzido por peptídeos com atividade antitumoral (ACPs). Figura produzida no Biorender.

O termo apoptose refere-se ao processo de morte celular programada proposto primeiramente por Kerr *et al.*, 1972, que caracterizaram os eventos da apoptose como: (i) encolhimento celular; (ii) condensação do citoplasma e núcleo com fragmentação de DNA em tamanhos oligonucleossômicos (corpos apoptóticos); e (iii) perda da atividade mitocondrial (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019; SEARLE *et al.*, 1975; XU; LAI; HUA, 2019).



Ao contrário da morte celular por necrose, as células apoptóticas têm seus vestígios de fragmentação fagocitados por macrófagos e eliminados por células jusantes, não ocorrendo, portanto, processo inflamatório (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; SEARLE *et al.*, 1975); (DUVALL; WYLLIE; MORRIS, 1985). A translocação de um fosfolípídeo, a fosfatidilserina, da região interna da membrana celular para a externa constitui um sinal para o início do processo fagocítico de células apoptóticas (MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019).

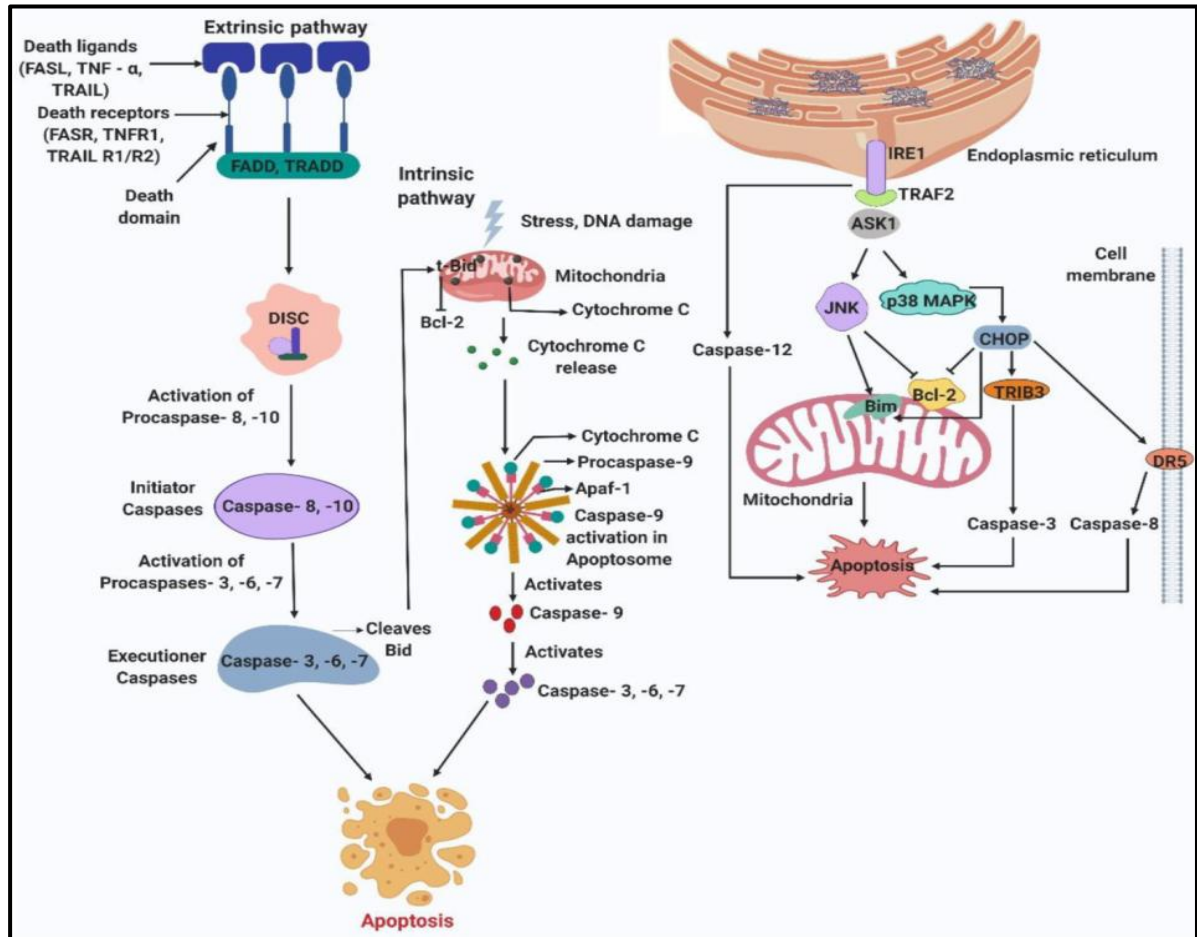
No processo de apoptose ocorre o envolvimento de mecanismos complexos e coordenados abrangendo eventos que acontecem em cascata e que incluem a ativação de proteases denominadas caspases. As vias de sinalização apoptóticas são divididas em (i) extrínseca, (ii) intrínseca e (iii) induzida por estresse do retículo endoplasmático (ER) (Figura 6); e mediada por linfócitos T citotóxicos e células Natural Killers (Figura 7), sendo que as vias intrínseca e extrínseca são consideradas as principais. Os eventos finais das vias extrínseca, intrínseca, induzida por estresse do ER e mediada por granzima B convergem na mesma via de execução, onde ocorre ativação das proteínas caspase-3 e caspase-7, culminando na fragmentação do DNA e consequente degradação da célula (NIRMALA; LOPUS, 2019).

As caspases pertencem a uma família de cisteínas proteases que possuem a capacidade de clivar resíduos de aspartato contidos em substratos e são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), que são clivados e ativados ao longo da cascata de eventos apoptóticos (NGUYEN; GILLET; POPGEORGIEV, 2021) e, quando ativadas, podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham o domínio de morte (DD, sigla em inglês) ou domínio recrutador de caspase (CARD, sigla do inglês). Essas proteínas podem ser divididas em iniciadoras, efetoras e inflamatórias (BOICE; BOUCHIER-HAYES, 2020).

A ativação da via intrínseca é realizada por estímulos diversos que possuem como consequência o estresse intracelular ou extracelular, bem como a indução de alterações na permeabilidade da membrana interna mitocondrial. Nesse sentido, o citocromo c, componente da cadeia transportadora de elétrons, é liberado, levando a perda do potencial transmembrana ( $\Delta\psi$ ) das mitocôndrias e, conseqüentemente, a perda da sua capacidade de produção de energia e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ADACHI *et al.*, 1997; SCAFFIDI *et al.*, 1998), bem como a liberação de proteínas pró-apoptóticas (Smac/DIABLO). As proteínas Smac/DIABLO permitem a progressão do processo de apoptose através da interação e desativação de IAPs (inibidores de proteínas de apoptose), impedindo que estes interrompam o processo apoptótico (CHAI *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2000). A caspase-9 pode, então, interagir com o citocromo c, liberado no citosol, e a proteína APAF-1, formando o complexo apoptossomo (LIU, X. *et al.*, 1996). As pró-caspases 3 e 7 são clivadas e ativadas por ação da caspase9, liberada do complexo apoptossomo com conseqüente eventos da via de execução que essas caspases são responsáveis (NIRMALA; LOPUS, 2019) .

A interação de ligantes específicos indutores de apoptose, como o TNF, ligante de Fas (CD95) e ligante APO2 (TRAIL) a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de TNF, de CD95 (Fas) e de APO2, com conseqüente ativação da cascata das caspases, marcam o início da via extrínseca da apoptose (HSU; XIONG; GOEDDEL, 1995; ITOH; NAGATA, 1993; PITTI *et al.*, 1996). Depois de ativados, ocorre o recrutamento e agrupamento de proteínas adaptadoras, essas, por sua vez, recrutam pró-caspase 8 e formam um complexo de sinalização indutor de morte (DICS\*, sigla do inglês),(KISCHKEL *et al.*, 1995; XU; LAI; HUA, 2019), com conseqüente clivagem e ativação das pró-caspases 8 e 10. A caspase-8 ativada promove a ativação da caspase-3, culminando na degradação da célula (NIRMALA; LOPUS, 2019).

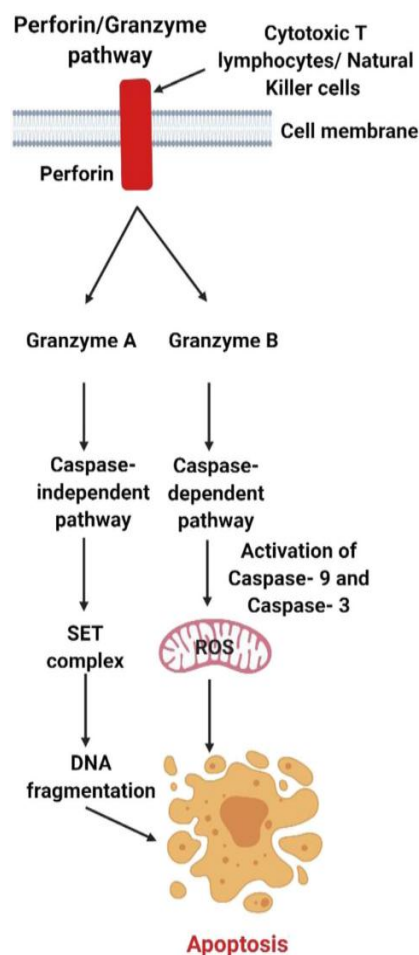
Um resumo das vias extrínsecas, intrínsecas e via induzida por estresse do ER do processo de a apoptose pode ser visualizado na Figura 6.



**Figura 6.** Apoptose: representação das vias extrínsecas, intrínsecas e via induzida por estresse do ER. Retirado de: (NIRMALA; LOPUS, 2019).

A via apoptótica mediada por Linfócitos T citotóxico (CTLs, sigla do inglês) e células *Natural Killers* (NKs) conta com a ação de porfirinas e granzimas, onde as granzimas A e B são consideradas os componentes mais importantes, produzidas e secretadas por CTLs e NKs. Porfirinas sintetizadas por CTLs e secretadas por exocitose no meio extracelular são direcionadas à membrana da célula alvo onde formam poros que permitem a entrada de granzimas (HENKART, 1985; NIRMALA; LOPUS, 2019). Na célula alvo, a granzima B é capaz de ativar diretamente as caspases, culminando no início da cascata de sinalização. A granzima A desencadeia a apoptose por uma via independente de caspases, induzindo a

fragmentação do DNA por meio da clivagem e inibição do complexo SET (NIRMALA; LOPUS, 2019), proteínas Lamina A/C e B1, *histone cluster 1 H1b* (Histone H1b), HMG2 e as caudas das histonas nucleares Histona H2 e Histona H3 (FAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2001), bem como a ativação da proteína NDPKA, liberada do complexo SET, que é capaz de cortar a dupla fita do DNA (FAN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006), como representado na Figura 7.



**Figura 7.** Representação das vias apoptóticas mediadas por granzima A e granzima B. Retirado de: (NIRMALA; LOPUS, 2019).

A regulação dos eventos apoptóticos é realizada por um conjunto de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas homólogas a proteína BCL-2, IAPS e miRNAs. Proteínas anti-apoptóticas podem se ligar às proteínas pró-apoptóticas evitando que as últimas interajam e perturbem a integridade da membrana (NGUYEN; GILLET; POPGEORGIEV, 2021).

Diversas citocinas ativam fatores de transcrição que regulam a transcrição de genes relacionados a proteínas pró-apoptóticas (KALONI *et al.*, 2022). Por outro lado, as IAPs, proteínas descobertas em vertebrados em 1995, podem se ligar a caspases ativadas, inibindo-as, além de exercerem um controle através da marcação para degradação por meio de ubiquitinação (NGUYEN; GILLET; POPGEORGIEV, 2021; ROTHE *et al.*, 1995).

### 1.3.1.3. Outros mecanismos de morte celular

Além de induzir necrose e apoptose, as ACPs podem induzir a morte celular por modulação da resposta imune e hormonal, atividade anti angiogênica, inibição da síntese de DNA (LIN *et al.*, 2021; TRINIDAD-CALDERÓN; VARELA-CHINCHILLA; GARCÍA-LARA, 2021), modulação de canais iônicos (DEPLAZES, 2018), indução de necroptose (ABDEL-SALAM *et al.*, 2019) e oncose (FANG *et al.*, 2021), bem como nos *hallmarks* do câncer: motilidade, invasão, proliferação e adesão (MIKAELIAN *et al.*, 2020).

### 1.3.2. Lunatina-1

A Lunatina-1 pertence a uma família de peptídeos denominada Lunatinas, que foi identificada no veneno do escorpião *Hadruroides lunatus* por Santana e colaboradores (2012).

*H. lunatus* pertence à família Iuridae e subfamília Caraboctoninae. Essa espécie é encontrada de forma predominante ao longo da costa do Peru e o seu veneno não é considerado letal para humanos, no entanto, são relatados sintomas como dor intensa, edema e ulceração (COSTA-OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Zavaleta *et al.*, (1981) relataram o efeito do veneno em cachorros e ratos, sendo descrito em cachorros os sintomas de diminuição da pressão arterial e alteração do ritmo respiratório, onde os autores sugeriram que o sistema histaminérgico poderia estar envolvido. Em ratos, o veneno provocou taquifilaxia respiratória devido à liberação de acetilcolina e efeitos

inotrópicos positivos em átrios isolados de ratos, com aumento do tônus basal de íleo de cobaia e diminuição de contrações musculares espontâneas (ZAVALETA; NAVARRO; CASTRO DE LA MATA, 1981).

Estudos posteriores descobriram que o veneno de *H. lunatus* provoca alterações hematológicas, imunológicas (ESCOBAR *et al.*, 2002; COSTA-OLIVEIRA *et al.*, 2015), bem como aumento da atividade enzimática em ratos de creatina quinase (ESCOBAR *et al.*, 2002), aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase (COSTA-OLIVEIRA *et al.*, 2015; ESCOBAR *et al.*, 2002)

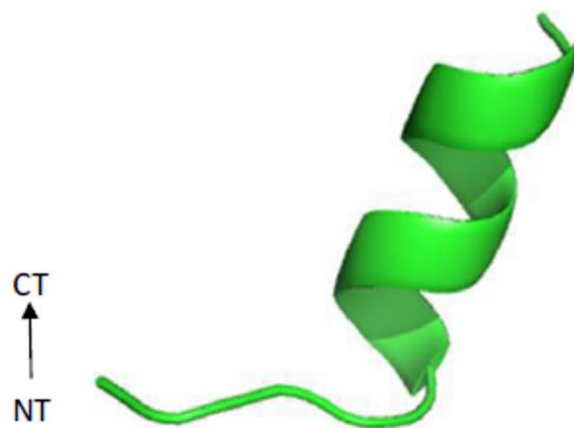
O fracionamento do veneno de *H. lunatus* por cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex C-25 com tampão acetato de amônio 0,05M em pH 7, realizado por Escobar *et al.*, (2002), reportou 3 proteínas de carga básica, denominadas H11, H12 e H13, que apresentaram atividades tóxicas em insetos, crustáceos e ratos. As proteínas H11 e H12 induziram um efeito de paralisia em grilos e crustáceos, respectivamente. A proteína H13 levou ao aumento da atividade da creatina quinase (CK), quando inoculada em ratos (ESCOBAR *et al.*, 2002).

Nos estudos de Costal-Oliveira *et al.* (2012), foi mostrado que o veneno de *H. lunatus* possuía atividades proteolítica, hialuronidásica, fosfolipásica e cardiotoxica em ratos. Os autores identificaram 20 frações, após a purificação do veneno, onde muitos componentes apresentaram atividade de fosfolipase A2 (PLA2, sigla em inglês). Dessas frações, foram identificados 2 peptídeos com massa molecular de 11.914,5 Da e 13.650,6 Da e 6 componentes com atividades imunogênicas (COSTA-OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Santana e colaboradores (2012), realizaram o sequenciamento de componentes do veneno de *H. lunatus*, encontrando dois peptídeos biologicamente ativos, denominados Lunatina-1 e Lunatina-2.

A Lunatina-1 apresenta 13 resíduos de aminoácidos, com a seguinte sequência de resíduos: H-FIGGLLKTLTSFF-NH<sub>2</sub> (contém o N-terminal livre e a porção C-terminal amidada) e uma massa molecular (MW, sigla em inglês) de 1441,83 Da.

Já a Lunatina-2 possui 18 resíduos de aminoácidos, também com a porção C-terminal amidada e a seguinte sequência: H-FLSTIANIVGGILGGGAL-NH<sub>2</sub>, e MW = 1670,97 Da. A Figura 8 apresenta um modelo tridimensional da estrutura da Lunatina-1.



**Figura 8.** Estrutura tridimensional do peptídeo Lunatina-1 resolvida por ressonância nuclear magnética (NMR, sigla em inglês). Retirado de: (Gomes et al, 2018).

Santana e colaboradores (2012) reportaram que a Lunatina-1 apresentava um efeito antibacteriano contra bactérias gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*). Os autores reportaram valores da concentração inibitória mínima (MIC, sigla em inglês) variando entre 1,49 e 5,95 µmol/L contra as bactérias gram-positivas e MIC = 23,8 µmol/L para *E. coli* (gram-negativa) e MIC = 47,6 µmol/L para *P. fluorescens* (gram-negativa). Ademais, como será apresentado a seguir, a Lunatina-1 também vêm demonstrando ações antitumorais, já tendo sido descrito tais efeitos em linhagens celulares de leucemia (HL-60 e TDH-1), carcinoma colorretal (HC-116) e câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) (GOMES, 2018).

Gomes e colaboradores (2018) estudaram o efeito antitumoral da Lunatina-1 em células de leucemia promielocítica aguda (HL-60), leucemia monocítica humana (TDH-1) e carcinoma colorretal (HC-116). Neste estudo, foi demonstrado que a Lunatina-1 é internalizada por células HL-60 de forma dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , e que esse peptídeo induziu apoptose de células HL-60 pelas vias extrínseca e intrínseca.

Análises de proteômica e fosfoproteômica foram realizadas por Batista e colaboradores (2020) nas células HL-60 tratadas com a Lunatina-1 por diferentes tempos, objetivando elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na atividade citotóxica do peptídeo nessas células. Nesse estudo, foram identificadas proteínas reguladas envolvidas em processos de apoptose, ciclo celular, transcrição, replicação, manutenção da integridade e reparo do DNA, *splicing* de pré-mRNA e cinases relacionadas a processos de sobrevivência e morte celular.

No estudo realizado por Gomes e colaboradores (2018), também foi demonstrado que a Lunatina-1 apresentava uma atividade antitumoral em células metastáticas de adenocarcinoma tripla negativo de glândula mamária MDA-MB-231 e em MCF-7, células metastáticas de adenocarcinoma de glândula mamária positivas para receptores de estrogênio. Nesse estudo, foi mostrado que células de MDA-MB-231 tratadas com Lunatina-1 sofriam alterações morfológicas, extravasamento de conteúdo citoplasmático e aumento da liberação de LDH, por um processo não relacionado a necroptose.

Os estudos citados acima sugerem que a Lunatina-1 induz diversos mecanismos de citotoxicidade, que dependem da linhagem celular utilizada. De toda forma, o potencial efeito terapêutico da Lunatina-1, agindo como um agente antitumoral, abriu novos caminhos, podendo, futuramente, ser usado na pesquisa translacional e representar um novo fármaco em potencial para o tratamento de vários cânceres, incluindo o de mama.



## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer é um problema de saúde mundial que apresenta altas taxas de incidência e mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (WHO, sigla do inglês) reportou cerca de 19 milhões de novos casos de câncer, com aproximadamente 10 milhões de óbitos no mundo apenas em 2020. Dentre os diferentes tipos de tumores malignos, o câncer de mama representa o de maior incidência e óbitos entre mulheres no Brasil e no mundo, sendo reportados mais de 2 milhões de casos novos e cerca de 684.996 óbitos no mundo em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, ocorreram 19.363 mortes por essa doença em 2022 (INCA, ATLAS ON-LINE DE MORTALIDADE).

Como mencionado anteriormente, o câncer de mama é extremamente heterogêneo, sendo classificado mediante perfis histológicos e moleculares, e pela capacidade de invasão (GHANNAM *et al.*, 2023; LOGAN *et al.*, 2015; PEROU *et al.*, 2000; REED *et al.*, 2015; SHEHATA *et al.*, 2019), sendo considerado extremamente invasivo e de pior prognóstico, com curto tempo de sobrevivência dos pacientes e com uma taxa de mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. O subtipo *basal-like* possui um perfil molecular que não responde a tratamentos endócrinos ou terapia molecular direcionada. Assim, a quimioterapia é o tratamento usual para este subtipo, tendo a radioterapia como adjuvante pós-operatório. No entanto, a resposta ao tratamento é frequentemente de curta duração e, muitas vezes, acompanhada por uma toxicidade significativa, com risco de lesões metastáticas residuais conduzirem à recorrência do tumor (YIN *et al.*, 2020).

Neste contexto, é necessária a descoberta de tratamentos mais eficientes para os tipos de câncer de mama mais agressivos e de difícil tratamento, como o *basal-like*, por exemplo com a descoberta de moléculas com ação antitumoral que sejam eficazes, seletivas e que não induzam resistência ou efeitos colaterais. Estudos vêm demonstrando que peptídeos derivados

de veneno de escorpião são capazes de regular a apoptose, invasão e motilidade de diversas linhagens de câncer (AAHIV A SODIUM CHANNEL SCORPION TOXIN INHIBITS THE PROLIFERATION OF DU145 PROSTATE CANCER CELLS, 2020; LI *et al.*, 2018). Como mencionado anteriormente, experimentos realizados por Gomes *et al.*, 2018 mostraram que a Lunatina-1, um peptídeo derivado do veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*, possui atividade citotóxica em células de câncer de mama MDA-MB-231 por mecanismos desconhecidos, se fazendo necessária a sua investigação.

### **2.1. Hipótese**

O mecanismo de ação da Lunatina-1 depende da linhagem de célula tumoral estudada. Nesse contexto, a hipótese deste trabalho é que a Lunatina-1 induz ação citotóxica em células de câncer de mama MDA-MB-231 via o comprometimento da integridade estrutural da membrana celular.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.3. Objetivo Geral:

Estudar o mecanismo de ação envolvido na atividade citotóxica da Lunatina-1 em células de câncer de mama triplo negativo (*basal-like*) MDA-MB-231.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Purificar lotes de Lunatina-1 sintética e confirmar a sua estrutura primária.
- Determinar o  $CI_{50}$  da Lunatina-1 nas células de câncer de mama metastáticas humanas MDA-MB-231 e células não tumorais HEK-293 utilizadas neste estudo.
- Avaliar o impacto da Lunatina-1 na integridade estrutural da membrana plasmática de células de câncer de mama MDA-MB-231.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção da Lunatina-1

A Lunatina-1 sintética foi gentilmente cedida pelo Professor Adriano Monteiro de Castro Pimenta (UFMG). A purificação do peptídeo sintético foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) usando um equipamento de UPLC (Shimatzu) e uma coluna semi-preparativa de fase reversa *Discovery® BIO Wide Pore C18* (25 cm x 10 mm). A coluna foi previamente equilibrada com a solução A (0,1% de TFA em água Milli-Q). A solução B era composta por 0,1% de TFA em acetonitrila.

Devido ao caráter hidrofóbico do peptídeo, ele foi reconstituído em solução de Acetonitrila em água a 35%. Foi utilizado o seguinte gradiente cromatográfico para a sua purificação (valores expressam a concentração percentual da solução B): (i) 25-40% em 15 minutos, (ii) 40-60% em 40 min, (iii) 60-100% com 70 minutos de corrida e 25% em 11 minutos, (iv) 100% por 10 min. Foram coletadas, de forma manual, frações de 1 mL no momento de eluição do peptídeo de interesse, após verificação do aumento rápido da leitura de absorvância ( $\lambda = 220$  nm) das amostras eluídas.

Visando aumentar a escala de purificação do peptídeo, o fluxo cromatográfico foi aumentado para 3 mL/min. Para acomodar essa alteração, o gradiente cromatográfico foi ajustado: (i) 25-40% em 15 minutos, (ii) 40-52% em 30 minutos, (iii) 52-100% em 5 minutos, (iv) 100% por 6 minutos. Com essa otimização, o tempo total da cromatografia passou de 86 minutos (gradiente 1) para 56 minutos (gradiente 2).

Os comprimentos de onda  $\lambda = 220$  nm e  $\lambda = 280$  nm foram usadas para acompanhamento da cromatografia em ambos os métodos empregados.

O controle de qualidade do peptídeo sintético e do seu processo de purificação foi realizado por espectrometria de massa (MALDI-TOF AutoFlex III, Bruker). Uma solução contendo o peptídeo sintético purificado (1mg / mL em ACN 30% e TFA 0,1%) foi preparada. Posteriormente, 0,5 µL dessa solução foi depositada na superfície de uma placa para MALDI (MTP 384 *target plate ground steel*, Bruker). O mesmo volume (0,5 µL) de uma solução da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em solução contendo acetonitrila 70% em TFA 0,1%) foi adicionado em cima da solução de peptídeo. Após evaporação em temperatura ambiente e consequente cristalização do *spot* contendo peptídeo e matriz cristalizados, a placa foi introduzida no espectrômetro de massa, que foi operado em polaridade positiva e no modo refletido. Os espectros *in tandem* (MS/MS) foram adquiridos no modo LIFT do instrumento. As análises dos dados foram realizadas pelo software FlexAnalysis (versão 3.4, Bruker). As frações contendo Lunatina-1 foram posteriormente liofilizadas e armazenadas a -20°C até o seu uso.

#### **4.2. Cultura de células e tratamento com Lunatina-1**

A linhagem celular MDA-MB-231 foi utilizada como modelo experimental de câncer de mama triplo negativo e metastático. Para a avaliação dos possíveis efeitos citotóxicos da Lunatina-1 em células não tumorais, foi utilizado como modelo experimental às células epiteliais embrionárias de rim humano HEK-293. A linhagem HEK-293 foi estabelecida em 1977 por Graham e colaboradores através da inserção de DNA do adenovírus tipo 5 (GRAHAM *et al.*, 1977).

As células MDA-MB-231 e HEK-293 foram cedidas pela professora Elaine Fagundes. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% antibióticos, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.3. Determinação da atividade citotóxica da Lunatina-1

As células HEK-293 e MDA-MB-231, cedidas pela professora Elaine Fagundes, foram cultivadas até atingirem 70% de confluência, onde as mesmas foram repicadas em placas de 96 poços e tratadas com Lunatina-1 nas seguintes concentrações (valores expressos em  $\mu\text{M}$ ): 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,16, previamente diluídas em DMSO 0,5% em PBS, a fim de determinar a sua citotoxicidade e CI50. Foram realizados três experimentos independentes.

Para o tratamento das células MDA-MB-231 com a Lunatina-1, foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células e tratadas por 48 horas, enquanto para o tratamento das células HEK-293 foram plaqueadas  $10^3$  células, que foram tratadas por 24 horas com a Lunatina-1.

A determinação da atividade citotóxica da Lunatina-1, assim como a concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI50), foi realizada pelo método de resazurina, que é uma substância com capacidade de penetração nas células e de cor azul (emite pouca fluorescência), onde é reduzida a resorufin (cor rosa e emite fluorescência) durante o processo proliferativo. Sendo assim, espera-se que poços contendo células viáveis tenham uma coloração rosa, enquanto os com células inviáveis apresentem uma cor azulada (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). A preparação da resazurina foi realizada por dissolução de 4 mg do composto em 40 mL de PBS (0,1 mg/mL). Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  dessa solução foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços contendo 90  $\mu\text{L}$  de meio, de forma que em cada poço contivesse 10  $\mu\text{g/mL}$  de solução de resazurina. A placa foi incubada durante 4 horas e a relação do metabólito foi mensurada por sua fluorescência em 570-640 nm.

#### **4.4. Análise da integridade da membrana plasmática após o tratamento com a Lunatina-1**

A hipótese de comprometimento de membrana celular provocada por Lunatina-1 e sugerida por Gomes e colaboradores (2018) foi investigada através da análise qualitativa e quantitativa da permeabilidade de membrana plasmática por iodeto de propídio (PI, sigla em inglês), visualização de possíveis danos da membrana plasmática por microscopia confocal, utilizando marcador de membrana plasmática, e visualização da estrutura tridimensional da membrana por microscopia eletrônica de varredura (SEM, sigla do inglês).

##### **4.4.1. Análises morfológicas e permeabilidade de membrana das MDA-MB-231 após tratamento com Lunatina-1**

Nestas análises,  $5 \times 10^3$  células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> *overnight*. Decorrido esse tempo, as células MDA-MB-231 foram coradas com os marcadores PI (5 µg/mL), usado para marcar DNA em células com baixa integridade de membrana plasmática, e Hoescht (HOE, 10 µg/mL), usado para marcar DNA em células totais, viáveis, com integridade de membrana plasmática, e células não viáveis, sem integridade de membrana plasmática. Após a marcação, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 10 minutos, como descrito anteriormente (FANI *et al.*, 2016), com algumas adaptações nas concentrações dos marcadores.

Decorrido o tempo de marcação das sondas, a placa de 96 poços foi analisada no microscópio óptico, Cytation Reader, presente no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. O aparelho foi configurado para capturar imagens de fluorescência e campo claro com intervalos de 8 minutos durante o tempo de 1 hora de tratamento, em 16 campos de cada poço da duplicata dos tratamentos com 25 µM de

Lunatina-1, previamente diluída em DMSO 0,5%, e apenas DMSO 0,5% (controle negativo).  
Imagens anteriores ao tratamento também foram captadas.

As imagens de fluorescência geradas no microscópio ótico Cytation Reader dos três experimentos independentes realizados em duplicata foram avaliadas visualmente quanto ao número de células coradas para o marcador PI, que indica aumento de permeabilidade de membrana, e HOE, que neste caso representa o número de células totais.

Para as análises quantitativas da permeabilidade de membrana, foi realizado o processamento das imagens de fluorescência para PI e HOE geradas pelo Cytation Reader, utilizando o software Fiji/ImageJ. Resumidamente, para análise de permeabilidade de membrana, foi realizada a conversão das imagens para o modo 8 bits, aplicado o filtro “gaussian blur”, o “threshold” foi ajustado, o filtro “watershed” foi aplicado para separação das células e, então, foi realizada a análise de partículas para os marcadores HOE e PI em todos os campos e tempos de tratamento das células, bem como em todos os campos das imagens captadas antes do tratamento. Após a contagem das partículas presentes em cada campo de cada tratamento, foi realizada a soma das partículas dos campos do mesmo tratamento para os marcadores PI e HOE e, então, foi feita a diferença de intensidade das células coradas com PI após e antes do tratamento. Usando a diferença do valor total das células coradas com HOE e das células coradas com PI antes do tratamento, foi feito cálculos de porcentagem com a contagem das células coradas com PI em cada tempo do tratamento, gerando assim uma curva tempo dependente que foi plotada usando o software GraphPad Prisma.



#### **4.4.2. Análise qualitativa de danos na membrana das células MDA-MB-231 após tratamento com Lunatina-1 por microscopia confocal**

Foram plaqueadas  $10^3$  células MDA-MB-231 em placas de 24 poços contendo lamínulas revestidas com poli-l-lisina, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> *overnight*. Posteriormente, as células foram tratadas com a Lunatina-1 em uma concentração de 25 µM por 5 minutos. Após o tratamento, as células foram fixadas com o fixador Karnovsky por 2 horas. No dia da análise, os núcleos foram corados com HOE (10 µg/mL), as células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> por 10 minutos, e as membranas celulares foram coradas com cellmask orange (Invitrogen) concentração final de 5µg/mL em DMSO, por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram acondicionadas em lâminas para a captura das imagens por microscopia confocal (Spinning Disk Confocal, Yokogawa), no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. Dois experimentos independentes foram realizados.

#### **4.4.3. Análise da estrutura tridimensional da membrana de células MDA-MB-231 após o tratamento com Lunatina-1 por microscopia eletrônica de varredura**

Nestas análises,  $10^3$  células MDA-MB-231 foram semeadas em lamínulas revestidas com poli-l-lisina contidas em placas de 24 poços, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, *overnight*. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com PBS, tratadas com solução de Lunatina-1 25 µM em DMSO 0,5% (diluído em PBS), DMSO 0,5% diluído em PBS (controle negativo do DMSO), PBS (controle negativo), e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2, 5, 10 e 15 minutos.

Para avaliar a formação de poros na membrana induzida pela Lunatina-1, foi usado um controle positivo bem conhecido na literatura para a formação de poros, a estreptolisina O

(SLO, sigla do inglês), que é uma exotoxina bacteriana da família das citolisinas dependentes de colesterol, com capacidade de ligação ao colesterol da membrana celular com consequente oligomerização em poros grandes (YANG *et al.*, 2021). Foi utilizada a concentração de 80 ng/mL de SLO por 20 e 30 minutos, com tempos de duração e concentração previamente estabelecidas em células MDA-MB-231 por nosso grupo através de análise quantitativa de células permeabilizadas por SLO com consequente visualização da marcação com iodeto de propídio (PI) como descritas no item 4.4.4. As análises de contagem das células marcadas com PI foram realizadas como descrito anteriormente utilizando o software Fiji/Image J.

Após cada tempo de incubação, foi adicionado 500 µL do fixador primário Karnovsky por 2 horas em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, o fixador foi retirado da placa e foi adicionado 1 mL de PBS. No Centro de Microscopia da UFMG, ocorreram as etapas de fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>, montagem em stub/lâmina e metalização com ouro/paládio com 3 nm de espessura.

Após o preparo das amostras, a captura das imagens MEV foi realizada de forma online em uma sessão com o técnico do Centro de Microscopia utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 FEG - Thermo Fisher / FEI).

As lamínulas de poli-L-lisina, fixador primário e tampão fosfato foram fornecidos pelo Centro de Microscopia da UFMG e os dois experimentos independentes foram realizados.

#### **4.4.3.1. Processamento das imagens de microscopia eletrônica de varredura**

A medida do diâmetro dos poros foi realizada utilizando a ferramenta “straight” para traçar as estruturas, em seguida foi utilizada a função “measure” para determinar o comprimento da linha traçada no software Fiji/Image J.

A contagem das microvilosidades e a área ocupada por elas foi realizada utilizando os softwares Cellpose e Cell Profiler, respectivamente. Foi realizado uma pipeline visando o aperfeiçoamento de brilho e contraste da imagem usando o software Cell Profiler, seguido da contagem das microvilosidades pelo software Cellpose, com correções manuais. Foi criado um segundo pipeline usando o software Cell Profiler para agrupar a máscara da contagem das microvilosidades geradas pelo Cellpose na imagem gerada previamente pelo Cell Profiler, e para o cálculo de área ocupada pelas microvilosidades na célula.

#### **4.4.4. Determinação da atividade citotóxica do peptídeo formador de poros estreptolisina O em células MDA-MB-231**

Resumidamente,  $5 \times 10^3$  células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços e foram deixadas aderir *overnight* neste experimento. No dia seguinte, foi realizada a ativação da toxina com DTT como descrito nas instruções do reagente, e as células foram tratadas com o SLO em diferentes concentrações: 80, 130, 200 ou 300 ng/mL por 20 minutos. Após o tratamento, as células foram marcadas com 5µg/mL/poço de PI e 10µg/mL/poço de HOE por 10 minutos. Decorrido o tempo, as células foram analisadas pelo microscópio ótico Cytation Reader. As análises e quantificação das imagens foram realizadas como descrito previamente no item 4.3.

Foi realizado, primeiramente, um experimento em duplicata, e, devido à baixa atividade visual da fluorescência para PI induzido pelo SLO nas concentrações superiores a 80 ng/mL, foi decidido dar continuidade aos experimentos somente com a concentração de 80 ng/mL.

#### **4.5. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares GraphPad Prisma (versão 8.02). Foi utilizado o teste de análise de variância two-way ou one-way ANOVA com intervalo de

confiança de 95% bem como análises post-hoc de comparação múltipla utilizando o teste de Sidak e Dunnet, respectivamente. Foi utilizado também o teste T de Student não pareado. Foi realizado análise de outliers, valores de p inferiores a 0.05 foram considerados significativos e valores de  $R^2$  maiores que 0,9 foram considerados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Purificação da Lunatina-1

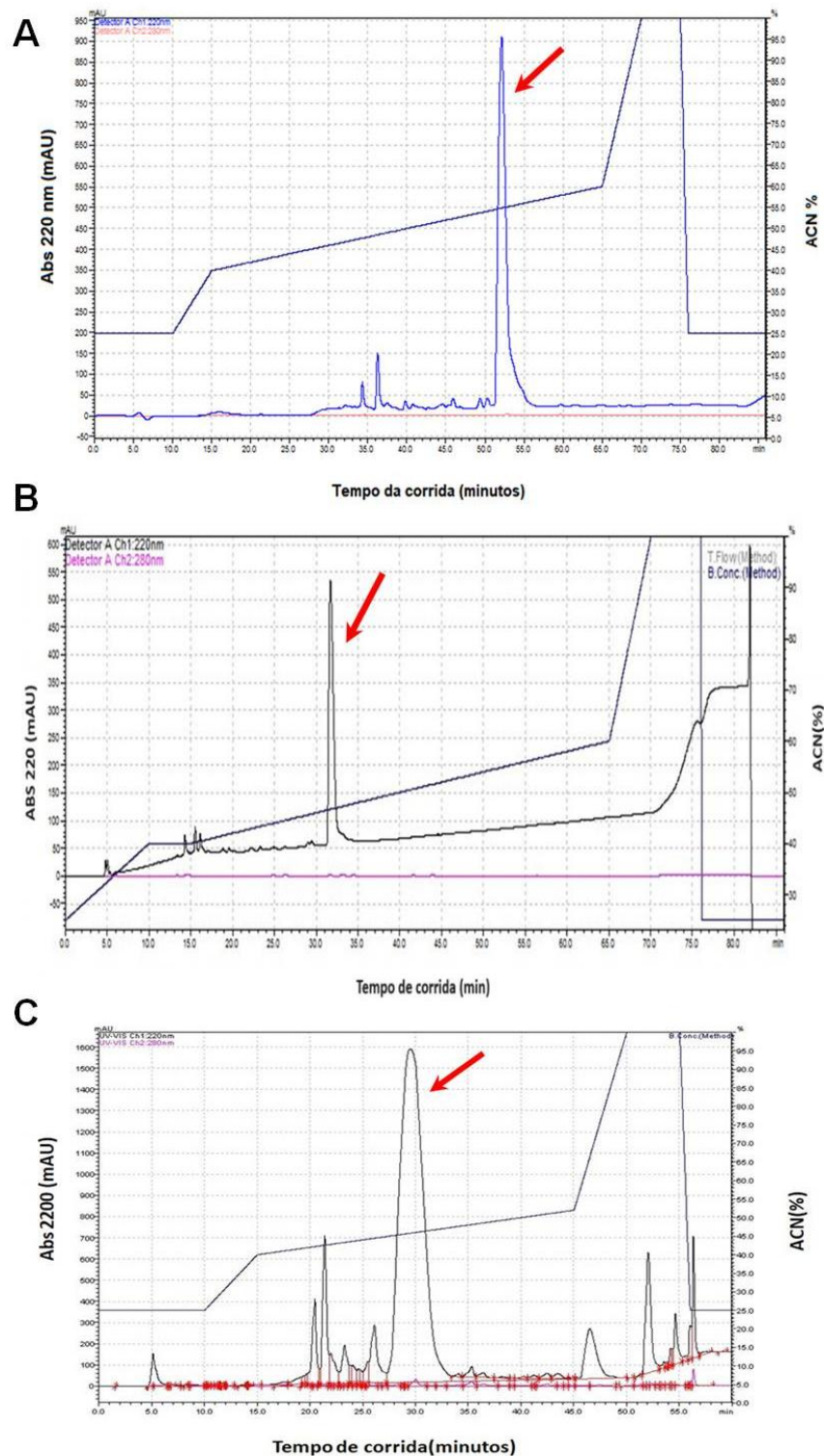
Os perfis cromatográficos obtidos nos processos de purificação do peptídeo sintético Lunatina-1 estão representados na Figura 9A-C.

Durante o primeiro processo de purificação, o método estava ajustado com um fluxo de 1 mL/min e, por isso, a eluição do peptídeo de interesse ocorreu em um tempo de retenção mais longo, de 53 minutos, com 55% da solução B (0,1% de TFA em acetonitrila), como exibido na Figura 8A. Foi injetado 4 $\mu$ g de peptídeo por corrida (Figura 9A).

Posteriormente, o método foi ajustado para um fluxo de corrida de 3 mL/min, modificando, portanto, o tempo de retenção do peptídeo de interesse, que foi eluído da coluna após 32 minutos, com 47% da solução B (0,1% de TFA em acetonitrila), como mostrado na Figura 8B. Foi injetado 3 $\mu$ g de peptídeo por corrida (Figura 9B).

A eluição do peptídeo de interesse, durante o terceiro processo de purificação, com injeção de 32  $\mu$ g de peptídeo por corrida, ocorreu após 27 minutos do início da purificação, com 45% da solução B (0,1% de TFA em acetonitrila), como mostrado na Figura 8C.

A otimização do gradiente cromatográfico fez o tempo total de cada corrida passar de 86 minutos (Figura 8A-B) para 56 minutos (Figura 9C).

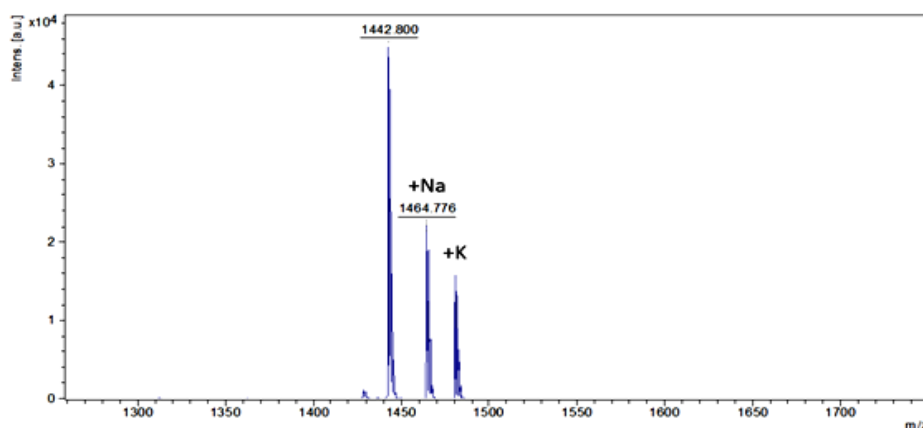


**Figura 9.** Purificação do peptídeo sintético Lunatina-1

Perfil cromatográfico do peptídeo sintético Lunatina-1 em coluna semi-preparativa de fase reversa Discovery® BIO Wide Pore C18 (25 cm x 10 mm). A) Injeção de 4 $\mu$ g do peptídeo por corrida, que foi eluído após 53 minutos, com 55% da solução B (0,1% de TFA em acetonitrila). B) Injeção de 3 $\mu$ g do peptídeo por corrida, que foi eluído após 32 minutos, com 47% da solução de B (0,1% de TFA em acetonitrila). C) Injeção de 32  $\mu$ g de peptídeo por corrida, que foi eluído após 27 minutos, com 45% da solução B (0,1% de TFA em acetonitrila).

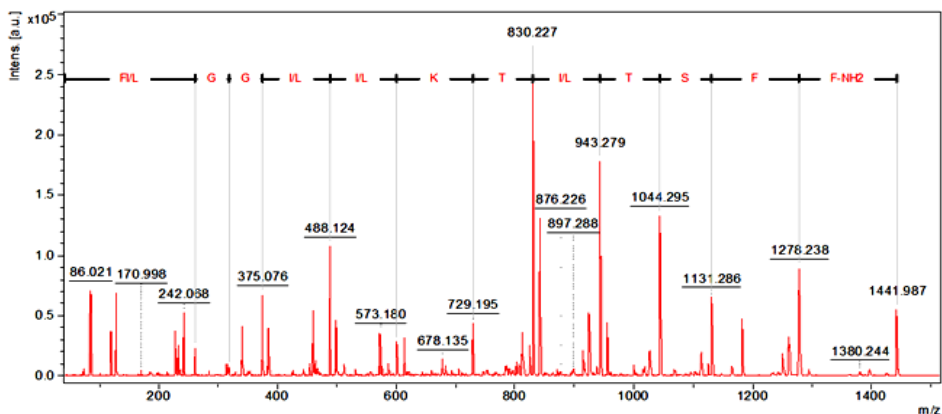
A verificação qualitativa de pureza e confirmação da sequência do peptídeo sintetizado foi realizada por espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF-MS. Como mostrado na Figura 10, percebe-se um sinal predominante correspondente ao íon mono carregado ( $z = 1$ ) do peptídeo sintetizado de  $1.442,800 [M + H]^+$ , além dos íons correspondentes aos adutos de sódio e potássio. Nesta análise, nós pudemos confirmar que o peptídeo estava com alto grau de pureza e que a massa ( $M$ ) monoisotópica experimental do peptídeo era igual a  $1.441,800$  Da, semelhante a massa monoisotópica teórica da Lunatina-1, calculada sendo  $M = 1.441,83$  Da (erro =  $\pm 0,03$  Da).

Visando confirmar se a sequência do peptídeo sintetizado era a mesma da Lunatina-1, foi realizada a fragmentação (em modo LIFT) do íon monoisotópico da Lunatina-1  $[M + H]^+ = 1.442,800$ . A sequência do peptídeo Lunatina-1 (H-FIGGLLKTLSFF-NH<sub>2</sub>) foi confirmada através da interpretação manual do espectro MS/MS gerado, como apresentado na Figura 11.



**Figura 10.** Espectro de massa do peptídeo sintético Lunatina-1 obtido com sistema MALDI-TOF/MS.

Sinais correspondem a relação massa e carga ( $m/z$ ) monocarregada ( $z = 1$ ) da Lunatina-1  $[M + H]^+ = 1.442,800$  e aos adutos de sódio  $[M + Na]^+ = 1.464,776$  e potássio  $[M + K]^+ = 1.480,757$ .



**Figura 11.** Sequenciamento do peptídeo Lunatina-1 por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Espectro de massa da fragmentação do íon parental  $m/z = 1442,800$ .

## 5.2. Lunatina-1 é citotóxica para as células de câncer de mama MDA-MB-231 e células de câncer de próstata LNCap

Na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, o peptídeo foi citotóxico em concentrações superiores a 12,5  $\mu\text{M}$ , em comparação com o controle PBS, como mostrado na Figura 12 A. O CI50 calculado foi de  $17,52 \pm 4,61 \mu\text{M}$ , como exibido na Figura 12 B.

Interessantemente, a Lunatina-1 apresentou atividade citotóxica e CI50 em células tumorais de mama MDA-MB-231 muito inferior a estudos de citotoxicidade de outro peptídeo derivado do veneno de escorpião em células de câncer de cólon. Li *et al.* (2018) demonstram que a gonearrestide, um peptídeo derivado do veneno de escorpiões do gênero *Androctonus*, induziu atividade inibitória de crescimento de tumor primário de células humanas de câncer de cólon HCT116 e FHC na concentração de concentração 250  $\mu\text{M}$ , ou seja, uma concentração aproximadamente 10 vezes maior do que a necessária para a Lunatina-1 induzir citotoxicidade em células MDA-MB-231. Os autores confirmaram tais achados por estudos *in vivo* nas doses de 50  $\mu\text{g}/\text{tumor}$  e 100  $\mu\text{g}/\text{tumor}$ . Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a atividade inibitória do crescimento tumoral para células HCT116, após o tratamento com 250



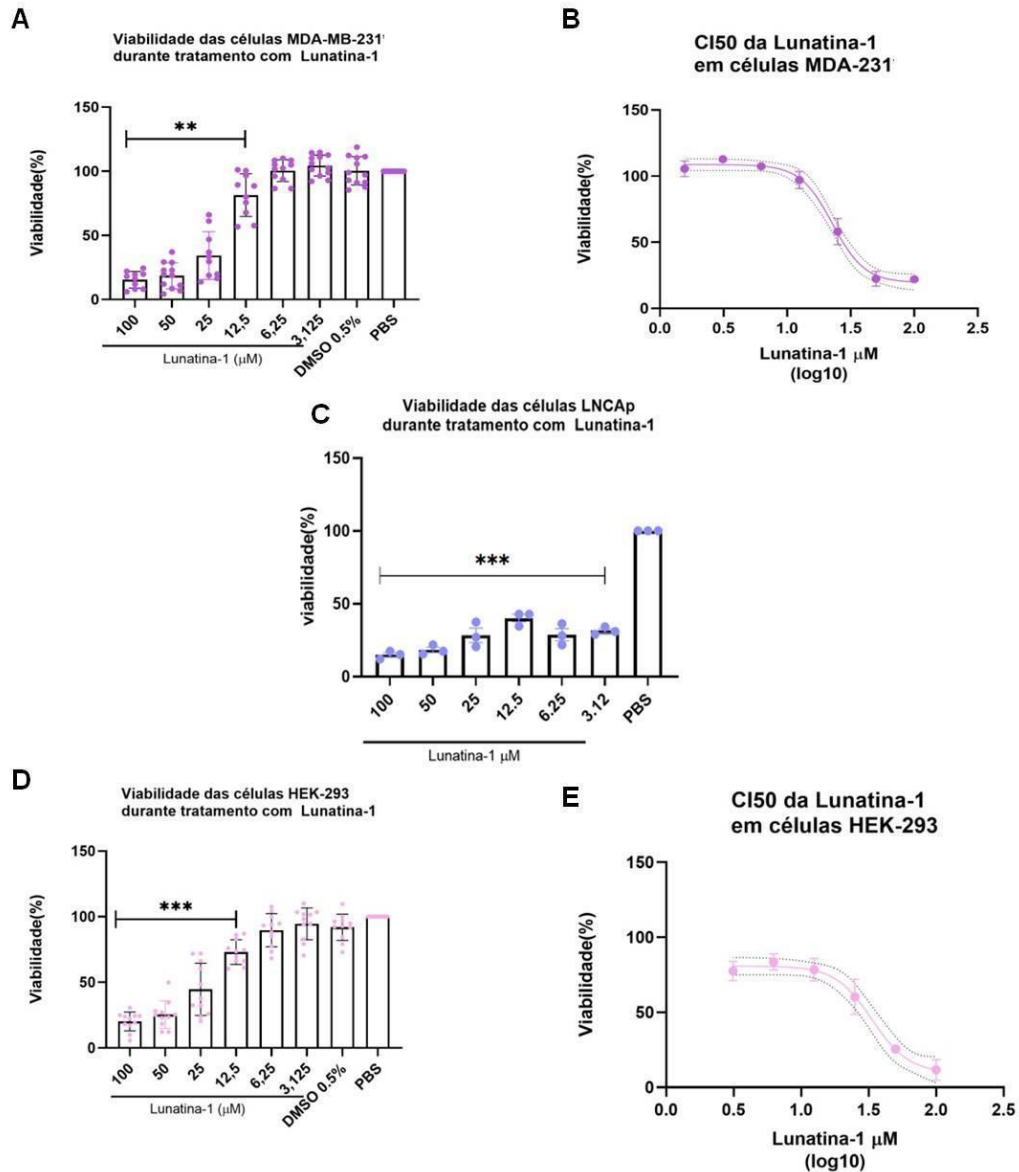
$\mu\text{M}$  do peptídeo, estava relacionada com a redução da enzima ciclina dependente de quinase 4 (CDK4), que é uma proteína envolvida na duplicação do DNA, e na regulação de seus inibidores p27 e p21, dados esses também confirmados em experimentos *in vivo* (LI *et al.*, 2018).

Na linhagem de câncer de próstata LNCap, o peptídeo apresentou citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas, mesmo nas menores utilizadas, como 3,125  $\mu\text{M}$ , em comparação ao controle tratado com PBS, como representado na Figura 12 C. Nessas células, o peptídeo mostrou-se citotóxico em concentrações inferiores a um estudo de um peptídeo isolado do veneno de escorpião *Androctonus australis* identificado por BenAissa *et al.*, 2020 e denominado AaHIV. Os autores reportaram que o peptídeo apresentou atividade citotóxica inibindo a proliferação de células de câncer de próstata DU-145 com  $\text{CI}_{50} = 15 \mu\text{M}$ . Contudo, o peptídeo apresentou uma regulação mínima da migração e invasão dessas células. Além disso, o AaHIV também apresentou uma atividade tóxica significativa em estudos *in vivo*, com uma dose letal capaz de causar morte de 50% dos animais  $\text{LD}_{50} = 18 \text{ ng}/20\text{g}$  rato. Ainda nesse estudo, foi mostrado que a concentração de 5  $\mu\text{M}$  do peptídeo era capaz de alterar a cinética de desativação do canal de sódio Nav1.6. Os autores sugeriram ainda que a regulação do Nav1.6 poderia estar envolvida com a inibição da proliferação das células tumorais causadas pelo peptídeo (BENAÏSSA *et al.*, 2020).

Visando avaliar a potencial atividade citotóxica da Lunatina-1 em células não tumorais, foi utilizada a linhagem HEK-293, que se mostrou sensível ao peptídeo em concentrações superiores a 12,5  $\mu\text{M}$  (Figura 12 D), com um  $\text{CI}_{50}$  calculado de 21,11  $\mu\text{M}$ , com desvio padrão de 10,72 (Figura 12 E).

Apesar de faltar um teste de toxicidade com células de mama não tumorais, por exemplo com a linhagem MCF-10, os dados sugerem que o peptídeo não é seletivo para células tumorais, sendo citotóxico também para células não tumorais embrionárias de rim.

Contudo, a citotoxicidade em células não tumorais pode ser reduzida, futuramente, em formulações conjugando a Lunatina-1 com peptídeos que a endereçam para células tumorais, como os “*tumor-homing*”, por exemplo (LEUSCHNER; HANSEL, 2004).



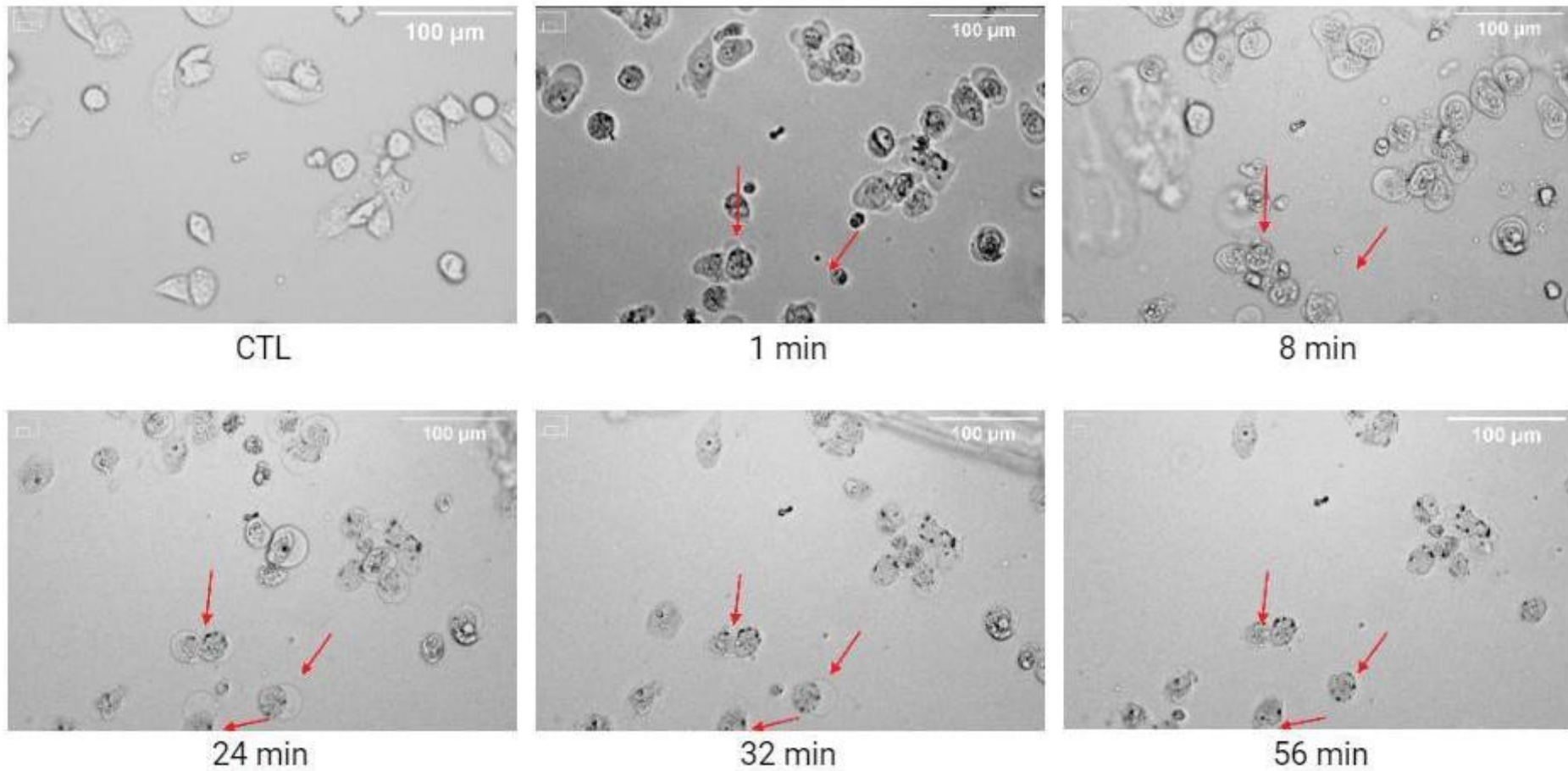
**Figura 12.** Atividade citotóxica e de CI50 da Lunatina-1 em células MDA-MB-231, LNCap e HEK-293.

A) Atividade citotóxica da Lunatina-1 em células MDA-MB-231. B) Gráfico concentração x resposta representando o CI50 da Lunatina-1 em células MDA-MB-231. C) Atividade citotóxica da Lunatina-1 em células LNCap. D) Atividade citotóxica da Lunatina-1 em células não tumorais HEK-293. E) Gráfico concentração x resposta representando o CI50 da Lunatina-1 em células não tumorais HEK-293. As células foram tratadas com diferentes concentrações de Lunatina-1 durante 48 horas (MDA-MB-231 e LNCap) ou 24 horas (HEK-293). Dados representativos de um experimento independente realizado em triplicata para as células LNCap e três ensaios independentes para as células HEK-293 e MDA-MB-231. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Aqui é importante mencionar a concentração que foi utilizada da Lunatina-1 nos experimentos seguintes. Apesar do valor calculado de CI50 da Lunatina-1 em células MDA-MB-231 ser  $CI50 = 17,52 \pm 4,61 \mu\text{M}$ , decidimos utilizar a concentração igual a  $25 \mu\text{M}$ , que foi um valor obtido por nós na mesma linhagem celular, mas proveniente de outro colaborador (Prof. Dawidson Assis Gomes - UFMG), além de ter sido o valor encontrado nos ensaios realizados por Gomes e colaboradores em 2018. De toda forma, vale ressaltar que os valores são muito próximos, dentro do intervalo de erro calculado.

### **5.3. Lunatina-1 induz alterações morfológicas em células MDA-MB-231**

O tratamento com  $25 \mu\text{M}$  de Lunatina-1 induziu o arredondamento e um possível aumento do volume intracelular das células MDA-MB-231 desde os primeiros minutos de tratamento, mas mais perceptível após 8 minutos, permanecendo até 24 minutos de tratamento, onde é possível observar a ruptura da membrana de algumas células (Figura 13). Após 56 minutos, é possível observar alterações morfológicas em todas as células, com formato arredondado e condensadas (Figura 13).

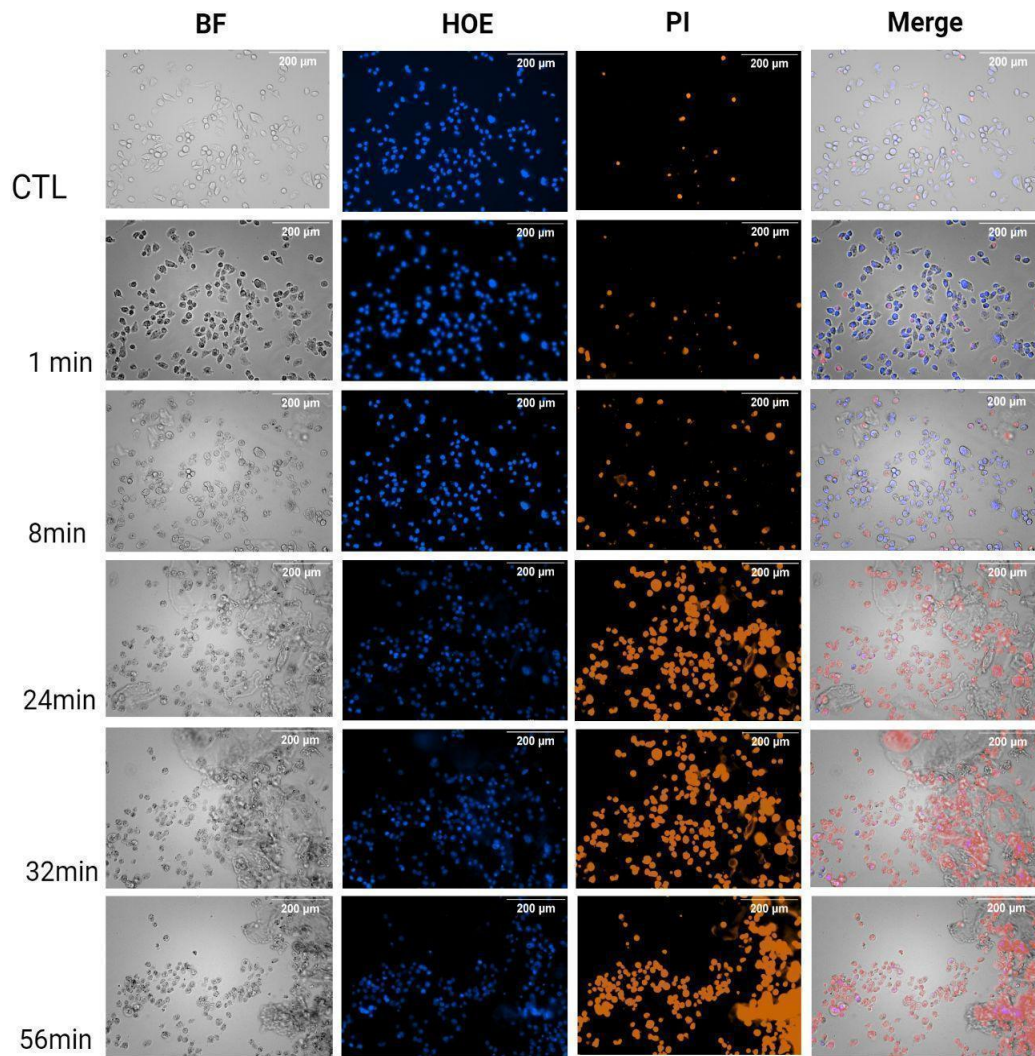


**Figura 13.** Imagens em campo claro das alterações morfológicas induzidas pela Lunatina-1 em células MDA-MB-231 em diferentes tempos de tratamento

Setas indicam as células em processo de ruptura de membrana. Imagens representativas de 3 experimentos independentes realizados em duplicata, com captura de imagens em 16 campos de cada poço.

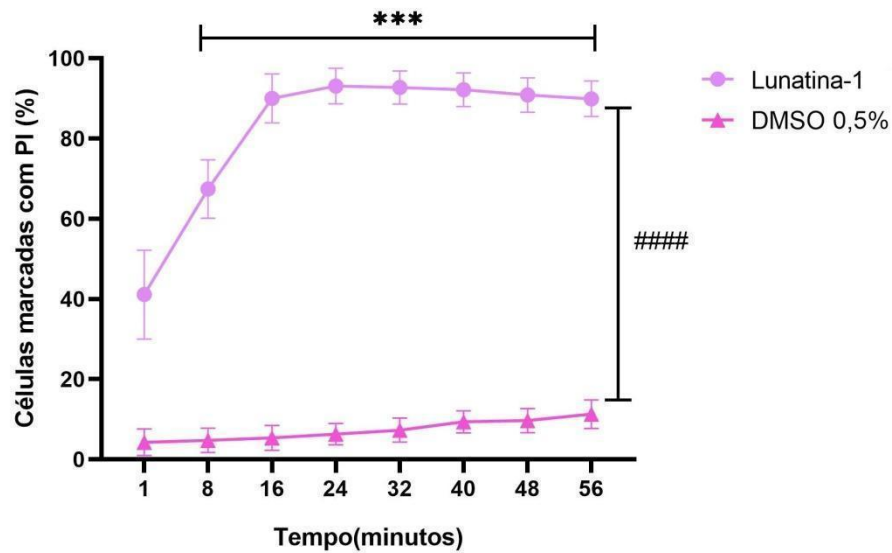
#### **5.4. Lunatina-1 induz diferentes formas de comprometimento de membrana celular em células MDA-MB-231**

A Lunatina-1 causou a perda de integridade da membrana plasmática das células MDA-MB-231, observado pelo aumento de células marcadas com o iodeto de propídio (PI) já nos primeiros minutos, sugerindo um efeito muito rápido (Figura 14). A quantificação das células marcadas com PI confirmou que o tratamento com 25  $\mu$ M de Lunatina-1 induziu um rápido aumento de permeabilidade das membranas plasmáticas das células MDA-MB-231 (Figura 16). Foi possível observar 48% de células MDA-MB-231 marcadas com PI já desde o primeiro minuto de tratamento, chegando a 74% após 8 minutos e com o pico da atividade (~90%) observado após 16 minutos de tratamento (Figura 15).



**Figura 14.** Análise qualitativa do efeito da Lunatina-1 na integridade de membranas plasmáticas.

Imagens de campo claro (BF) e de fluorescência para Hoechst (HOE) e iodeto de propídio (PI), após o tratamento de células MDA-MB-231 tratadas com 25  $\mu$ M de Lunatina-1 por 1h. Foram realizados 3 experimentos independentes, cada um em duplicata, com captura de imagens em 16 campos de cada poço.

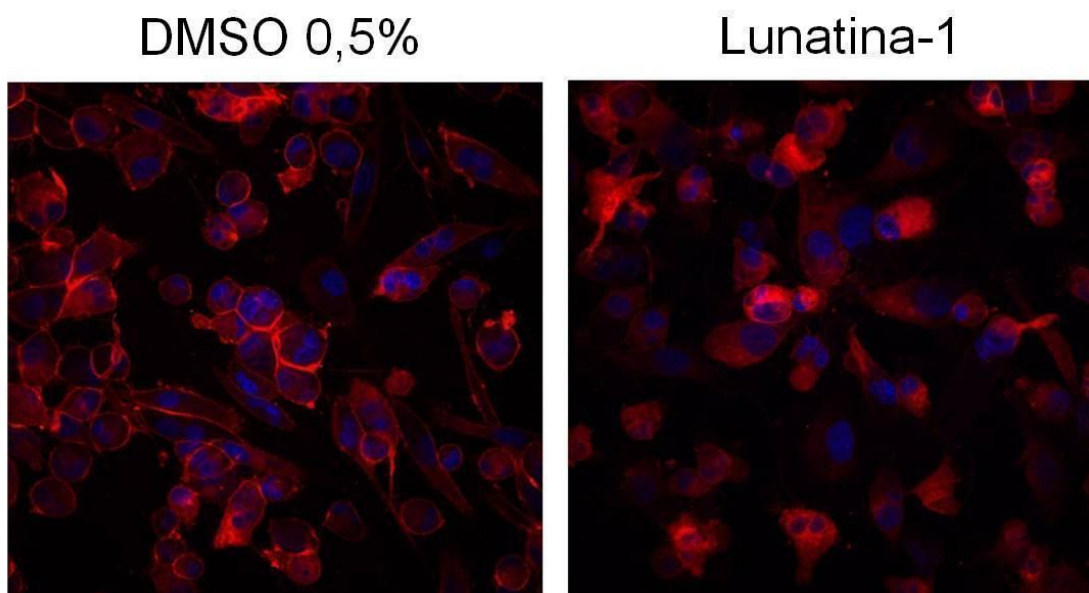


**Figura 15.** Análise quantitativa do efeito da Lunatina-1 na integridade de membranas plasmáticas.

Tratamento de células MDA-MB-231 com a Lunatina-1 (25 $\mu$ M). As células foram plaqueadas, coradas com iodeto de propídio (PI) e Hoechst (HOE), e tratadas com 25  $\mu$ M de Lunatina-1. Os experimentos foram realizados no microscópio Cytation Reader, com imagens capturadas em intervalos de 8 minutos para MDA-MB-231. O tempo total de experimento para ambas as células foi de 60 minutos. Foram realizados 4 experimentos independentes em duplicata. ####  $p < 0,0001$  para Lunatina-1 vs. DMSO 0,5%, Teste T de Student não pareado. \*\*\*  $p < 0,001$ , para tratamento com Lunatina-1 vs. DMSO em todos os tempos de tratamento, Teste de Sidak para múltiplas comparações independentes.

Visando aprofundar a análise do potencial efeito da Lunatina-1 na membrana celular da linhagem de câncer de mama *basal-like*, foi utilizado o marcador de membrana CellMask (Figura 16). As células MDA-MB-231 tratadas apenas com o veículo DMSO 0,5% exibiram a membrana plasmática bem delineada, com acúmulo do marcador nos limites celulares, enquanto foi possível perceber uma diminuição de coloração nos limites da membrana plasmática de células tratadas com 25  $\mu$ M de Lunatina-1 por 5 minutos (Figura 16).





**Figura 16.** Avaliação qualitativa da estrutura da membrana celular

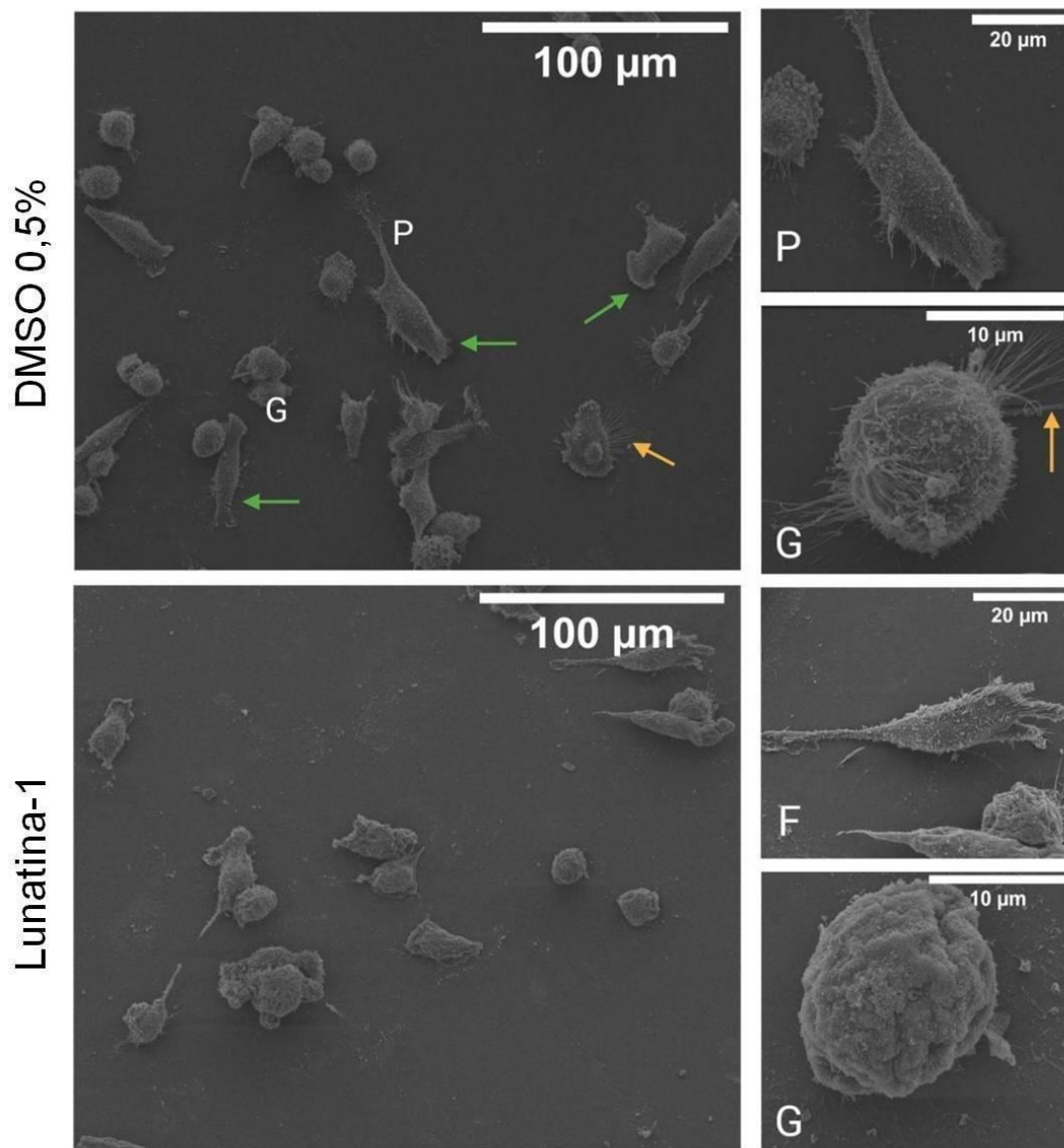
As células foram semeadas em lamínulas contendo poli-l-lisina e tratadas com 25  $\mu\text{M}$  de Lunatina-1 por 5 minutos, fixadas em Karnovsky. As células foram coradas CellMask Orange, para marcar a membrana plasmática, e com Hoechst (HOE), para marcar o núcleo.

#### **5.4.1. Lunatina-1 induz a redução de microvilosidades, aumento de estruturas semelhantes a poros e comprometimento da membrana plasmática de células MDA-MB-231**

Células MDA-MB-231 tratadas com o veículo (DMSO 0,5%) exibiram três fenótipos distintos, observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV): (i) fusiforme (mesenquimal), (ii) globular e (iii) poligonal (TAVIANATOU *et al.*, 2019), como pode ser observado na Figura 17. As células apresentaram microvilosidades, protusões da membrana plasmática (FRANCHI *et al.*, 2020), filopódia (KISO *et al.*, 2018) e lamelopódia, sendo as microvilosidades longas e evidentes.

As células MDA-MB-231 tratadas com Lunatina-1 (25  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos apresentaram uma redução na densidade de células poligonais, possível redução de microvilosidades, e ausência de filopódias e lamelopódias (Figura 17).





**Figura 17.** Avaliação estrutural da superfície de células MDA-MB-231 tratadas com Lunatina-1.

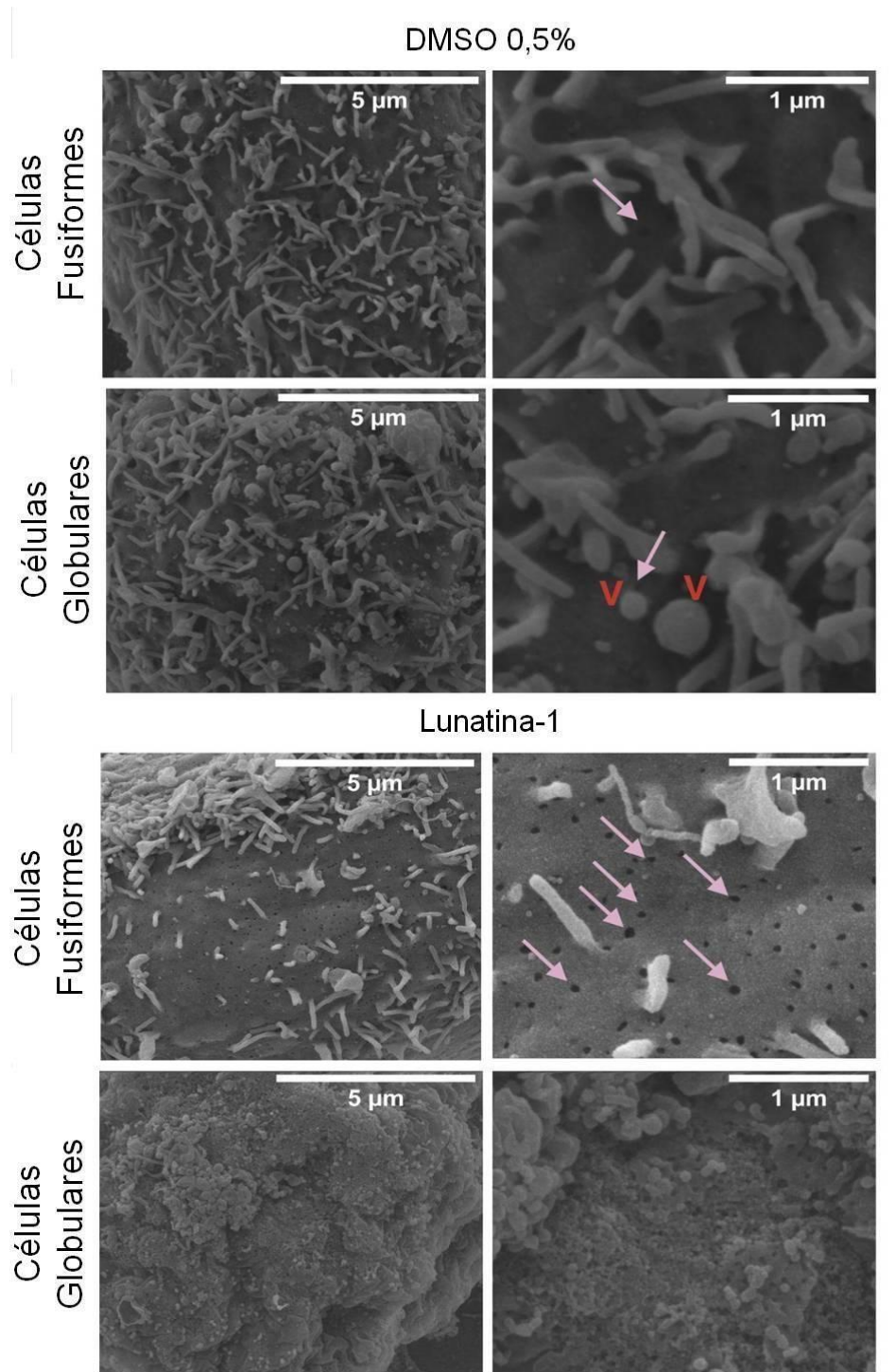
As células foram semeadas em lamínulas de poli-L-lisina, tratadas com veículo (DMSO 0,5%) ou 25  $\mu\text{M}$  de Lunatina-1 por diferentes tempos, fixadas em Karnovsky e preparadas para análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura mostra os aspectos morfológicos da superfície celular após 10 minutos de tratamento com DMSO 0,5% (painéis superiores) ou Lunatin-1 (painéis inferiores). Três fenótipos celulares diferentes são mostrados, incluindo globular (G), fusiforme/alongada (F) e poligonal (P). Lamelipódios (setas verdes) e filopódios (setas laranja) estão destacados.

Utilizando um aumento entre 14.000 e 50.000 vezes, visando avaliar as alterações estruturais induzidas pelo peptídeo com maior detalhe, podemos observar nas células tratadas com Lunatina-1 (25  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos uma visível redução de microvilosidades nas de

fenótipo fusiforme, quando comparadas às tratadas com o veículo DMSO 0,5% (Figura 18). Essa redução foi considerada significativa após a quantificação do número de microvilosidades e área ocupada por essas estruturas na superfície das células (Figura 19).

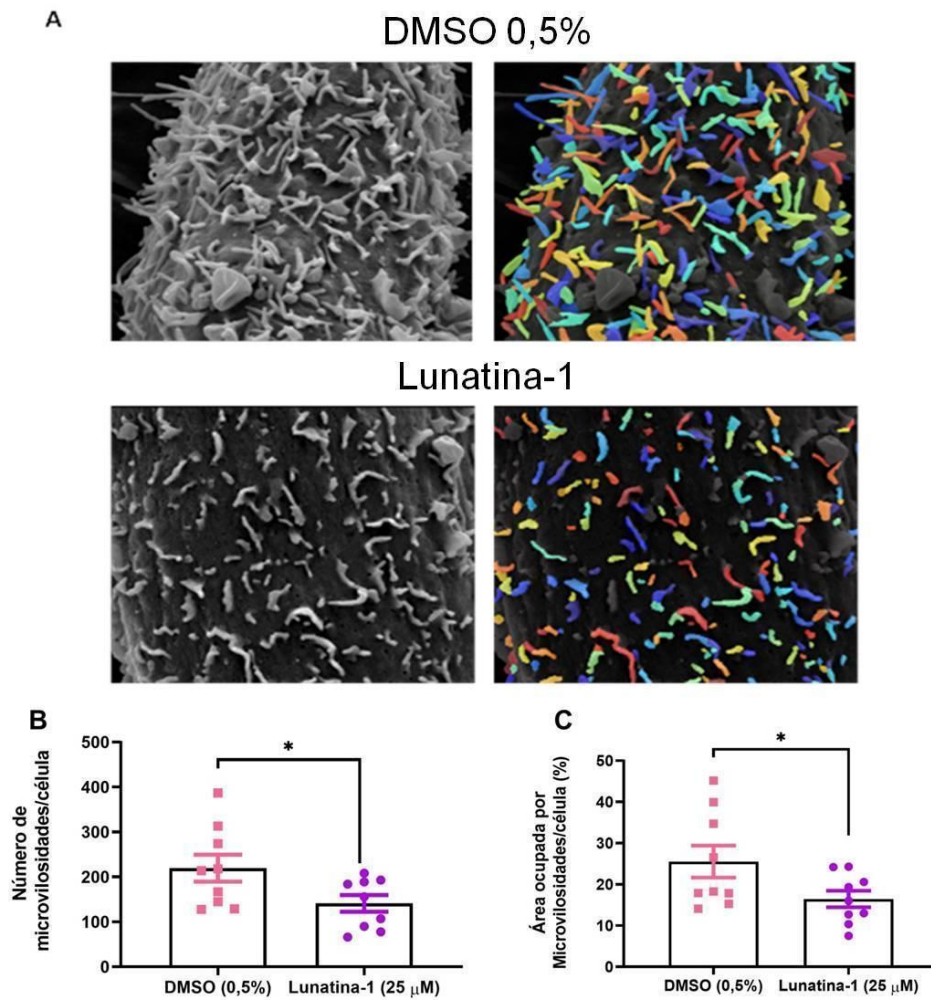
As microvilosidades constituem protruções de membrana sustentadas pelo citoesqueleto de actina, com atividade sugestiva de transdução de sinais para ativação de linfócitos, tendo em vista a presença de certas proteínas sinalizadoras nesta estrutura (ORBACH; SU, 2020). Além de integrar o citoesqueleto (GAETA *et al.*, 2021), possui atuação na motilidade celular, aumento da área de superfície celular (ORBACH; SU, 2020) e participa em funções diversas, incluindo absorção, secreção e indução de força mecânica (LIU *et al.*, 2019). O aumento das microvilosidades em comprimento e densidade em câncer de pâncreas correlaciona positivamente com o aumento da captação de glicose, maior potencial invasivo (metastático) e proliferativo das células (HAN *et al.*, 2021).

Ademais, foram observadas estruturas semelhantes a poros nas células fusiformes com diâmetros de  $41,8 \pm 2,1$  nm e  $42,3 \pm 1,2$  após o tratamento, por 10 minutos, com DMSO (0,5%) e Lunatina-1 ( $25\mu\text{M}$ ), respectivamente, sem diferença significativa. Contudo, as células tratadas com Lunatina-1 apresentaram uma maior quantidade dessas estruturas do que as tratadas com DMSO, após análise qualitativa (Figura 18) e quantitativa (Figura 20).



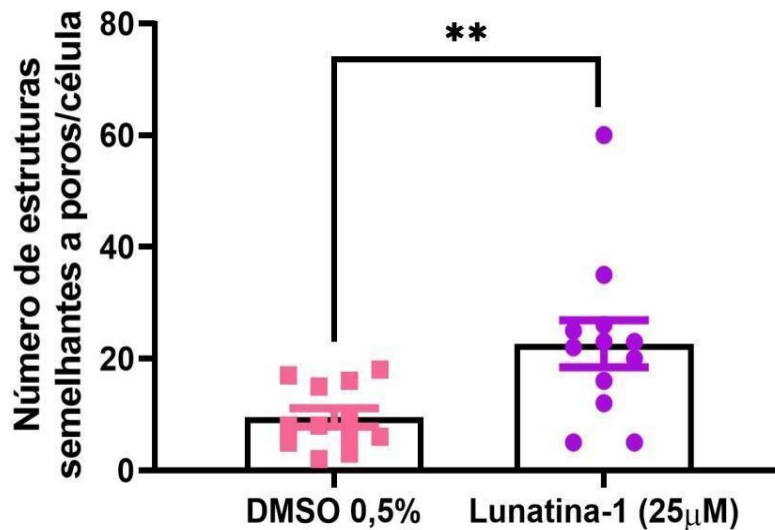
**Figura 18.** Lunatina-1 induz a formação de estruturas semelhantes a poros e reduz a quantidade de microvilosidades na membrana plasmática de células MDA-MB-231.

As células foram semeadas em lamínulas de poli-l-lisina, tratadas com DMSO (0,5%) ou Lunatina-1 (25  $\mu$ M), fixadas em Karnovsky e preparadas para MEV. Para as células tratadas com DMSO, é possível notar a integridade das membranas citoplasmáticas, das microvilosidades e a presença de algumas estruturas semelhantes a poros nas células fusiformes e globulares (seta rosa). Vesículas (vermelho “v”) também são visualizadas em células globulares. Após o tratamento com a Lunatina-1, as células exibiram uma redução no número de microvilosidades e um aumento de estruturas semelhantes a poros (seta rosa), observadas principalmente nas células fusiformes.



**Figura 19.** Lunatina-1 reduz a densidade de microvilosidades na superfície de células MDA-MB-231

(A) Figuras representativas da medição de microvilosidades com imagem tratada no CellProfiler e a máscara para detecção das microvilosidades desenvolvida no Cellpose. A sobreposição de imagens celulares foi feita no CellProfiler. (B) Número de microvilosidades por superfície celular e (C) área da superfície celular ocupada pelas microvilosidades. Testes realizados utilizando 9 células diferentes por tratamento. \*  $p < 0,05$ ; Teste T de Student não pareado.



**Figura 20.** Lunatina-1 aumenta significativamente o número de estruturas semelhantes a poros em células MDA-MB-231.

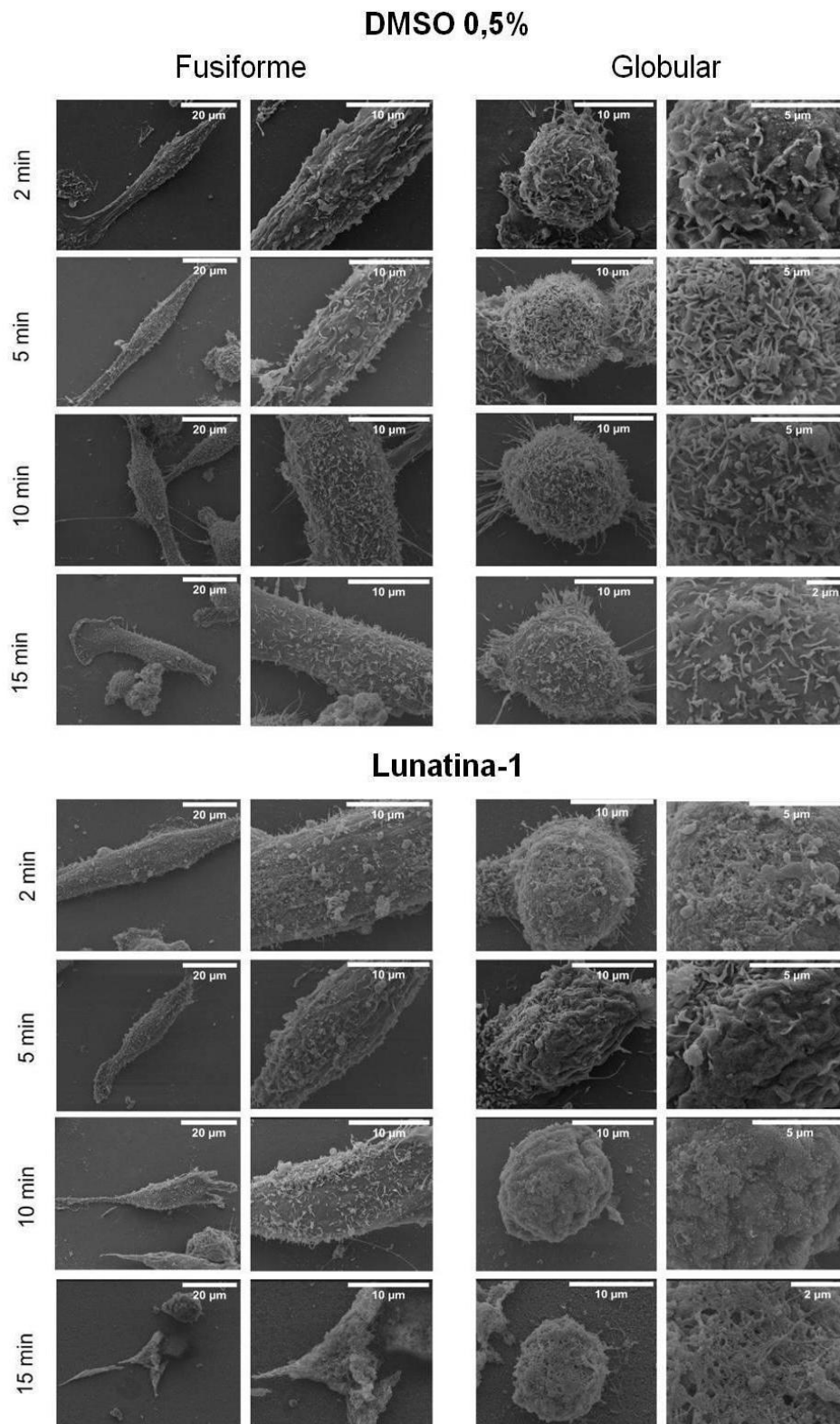
A contagem de estruturas semelhantes a poros foi realizada em 12 células diferentes utilizando o software Fiji/Image J. \*\*  $p < 0,01$ ; teste T de Student teste não pareado.

As células de fenótipo globular tratadas com a Lunatina-1 (25µM) por 10 minutos apresentaram a membrana deformada, quando comparadas às de mesmo fenótipo tratadas com o veículo (DMSO 0,5%), como pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

Quando tratamos as células MDA-MB-231 por 2 ou 5 minutos com a Lunatina-1 (25 µM) e o veículo (DMSO 0,5%), é possível observar que a redução das microvilosidades em células fusiformes e a deformação das células globulares acontece desde os primeiros minutos do tratamento (Figura 21). Já após 15 minutos, as células tratadas (fusiformes e globulares) com a Lunatina-1 estão totalmente comprometidas (Figura 21).

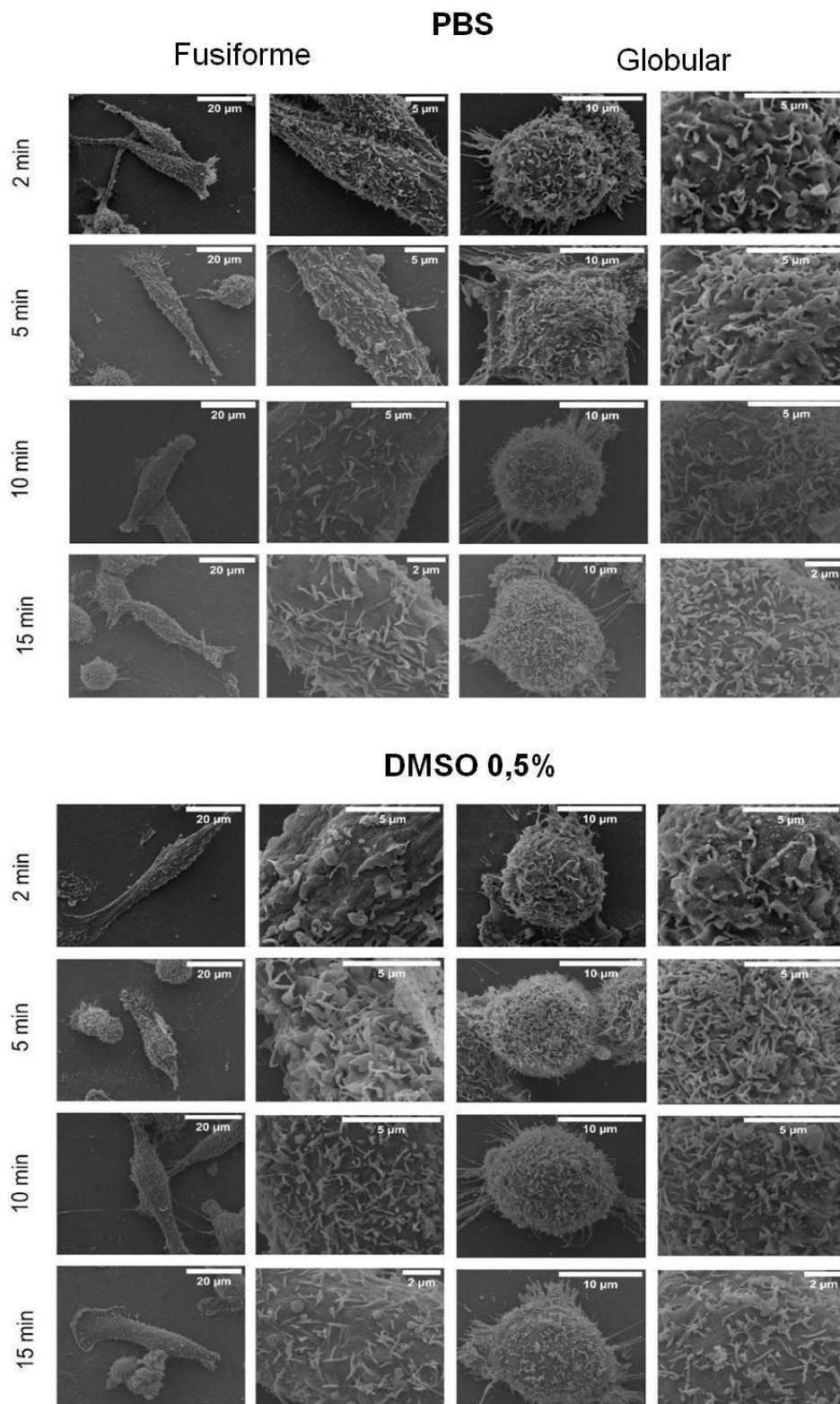
Finalmente, células MDA-MB-231 tratadas com PBS apresentaram uma morfologia semelhante ao veículo (DMSO 0,5%), demonstrando que a concentração utilizada desse solvente não induziu toxicidade para as células MDA-MB-231 (Figura 22), o que nos permite afirmar que os efeitos descritos nesta tese são induzidos pela Lunatina-1.





**Figura 21.** Lunatina-1 induz um rápido comprometimento da membrana plasmática de células MDA-MB-231.

Células foram semeadas em lamínulas de poli-l-lisina, tratadas com 25  $\mu\text{M}$  de Lunatina-1 ou DMSO 0,5% por diferentes tempos, fixadas em Karnovsky e preparadas para MEV.



**Figura 22.** A concentração utilizada de DMSO não induziu toxicidade aparente nas células MDA-MB-231.

Células foram semeadas em lamínulas de poli-l-lisina, tratadas com PBS ou DMSO 0,5% por diferentes tempos, fixadas em Karnovsky e preparadas para MEV.

Os efeitos citotóxicos induzidos pelo tratamento de células MDA-MB-231 com a Lunatina-1 se assemelham aos publicados por Hilchie *et al.*, 2013, que mostraram que o tratamento de células de leucemia T Jurkat pelo peptídeo MPLfcinB6 também provocou um aumento de permeabilidade da membrana, demonstrada pelo aumento da captação de PI, e dano à membrana, demonstrado por MEV (HILCHIE *et al.*, 2013).

No presente trabalho, foram observadas diversas alterações na membrana celular, como a diminuição das microvilosidades, o aumento no número de estruturas semelhantes a poros, a ausência dos contornos evidentes e aumento de permeabilidade da membrana, sugerindo uma ação direta do peptídeo na membrana plasmática.

Peptídeos com ação disruptiva de membrana (MDPs), como a Lunatina-1, são geralmente denominados como peptídeos líticos, devido a sua ação na membrana por ruptura, formação de poros ou micelas, podendo ser antimicrobianos (AMPs) e/ou antitumorais (ACPs). Esses peptídeos interagem eletrostaticamente com lipídios de carga negativas presentes em maior densidade em células tumorais e bacterianas, causando danos essa estrutura com conseqüente morte por necrose (VAEZI *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2021).

As ações dos peptídeos MDPs vêm sendo explicadas por três mecanismos distintos, sendo eles a formação de poros por modelos barril ou toroidal, bem como indução de danos a membrana e formação de micelas membranares pelo modelo carpete. Nos modelos de formação de poros transmembranares provocados por MDPs, o diâmetro dos danos observados varia entre 1-2 nm para o modelo barril e 3-10 nm no modelo toroidal. Adicionalmente, o MDP, para ser capaz de atravessar a membrana plasmática durante a formação dos poros, deve possuir em sua composição cerca de 20 resíduos de aminoácidos ou mais. No modelo carpete ocorre um recobrimento da membrana plasmática de maneira semelhante a um tapete, com conseqüente desintegração da mesma através da formação de



partículas semelhantes a micelas e danos nas membranas com diâmetros maiores do que 10 nm. (LEUSCHNER; HANSEL, 2004; LIN *et al.*, 2021).

A Lunatina-1 é um peptídeo curto, contando com apenas 13 resíduos de aminoácidos, portanto, segundo a literatura, este peptídeo seria incapaz de atravessar a membrana plasmática durante a formação dos poros transmembranares. Estudos de bioinformática proposto por Chen e Mark sugerem que peptídeos curtos, como aureína e citoplina, induzem curvatura local na membrana, agindo como detergente, diferindo de peptídeos mais longos, como maculatina e caerina, que induzem curvatura de longo alcance, e são capazes de dobrar-se, ligar-se à membrana plasmática estabilizando os poros transmembranares(CHEN; MARK, 2011).

Adicionalmente, as estruturas semelhantes a poros observadas na membrana plasmática de células MDA-MB-231 de fenótipo fusiformes possuem diâmetro medindo em torno de 42 nm. Deste modo, a Lunatina-1 poderia ser um MDP com mecanismo do modelo carpete, agindo como detergente, solvatando as estruturas membranares nessas células, contudo não foram observadas a formação de micelas membranares para confirmar esta suposição. Nas células de fenótipo globular, no entanto, foram observadas membranas plasmáticas completamente danificadas, sendo sugestivo uma ação semelhante a um detergente com a solvatação não apenas das estruturas membranares e sim da membrana como um todo.

É importante salientar que as células MDA-MB-231 de fenótipo fusiforme constituem de células com características mais próximas de células mesenquimais (TAVIANATOU *et al.*, 2019), o que poderia justificar as diferenças da ação do peptídeo observadas por SEM nessas células em relação a sua maior toxicidade observadas pela mesma técnica nas células de fenótipo globular.

A ação rápida da Lunatina-1 em células MDA-MB-231 sugere uma baixa propensão para o estabelecimento de resistência ao tratamento, o que é desejável, pois se observa um aumento de tumores resistentes aos tratamentos convencionais (LEUSCHNER; HANSEL, 2004; LIN *et al.*, 2021).

As interações eletrostáticas dos MDPs com a membrana plasmática é insuficiente para o estabelecimento de seletividade quanto à toxicidade (VAEZI *et al.*, 2020), o que também foi observada neste trabalho, pois a Lunatina-1 também foi citotóxica para as células não tumorais HEK-293. Contudo, essa desvantagem pode ser contornada ao conjugar os MDPs com proteínas que se liguem a proteínas superexpressas na membrana de tumores ou a um peptídeo direcionador de tumor (THP, do inglês), promovendo, assim, uma maior seletividade (LEUSCHNER; HANSEL, 2004).

Por exemplo, um MDP denominado Hecate foi conjugado à cadeia  $\beta$  do hormônio luteinizante (LH), o que aumentou a sua seletividade para células de câncer de próstata em comparação com células não tumorais (LEUSCHNER *et al.*, 2001). Esse mesmo peptídeo, juntamente a outros MDPs (Phor14 e Phor21), quando conjugados com 15 resíduos de aminoácidos da cadeia  $\beta$  da gonadotrofina coriônica ( $\beta$  CG) ou do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), exerceram atividade citotóxica apenas em xenoinxertos de câncer de próstata em camundongos, diferindo da atividade induzida apenas pela administração dos MDPs não conjugados, que se mostraram inefetivos (HANSEL; LEUSCHNER; ENRIGHT, 2007).

Apesar das vantagens acima mencionadas a respeito da conjugação de peptídeos MDPs com peptídeos THPs ou a proteínas que ligam-se em proteínas superexpressas na membrana de tumores, é importante salientar que a natureza covalente dessa reação tem como consequência a modificação da conformação da estrutura secundária do MDP, o que também

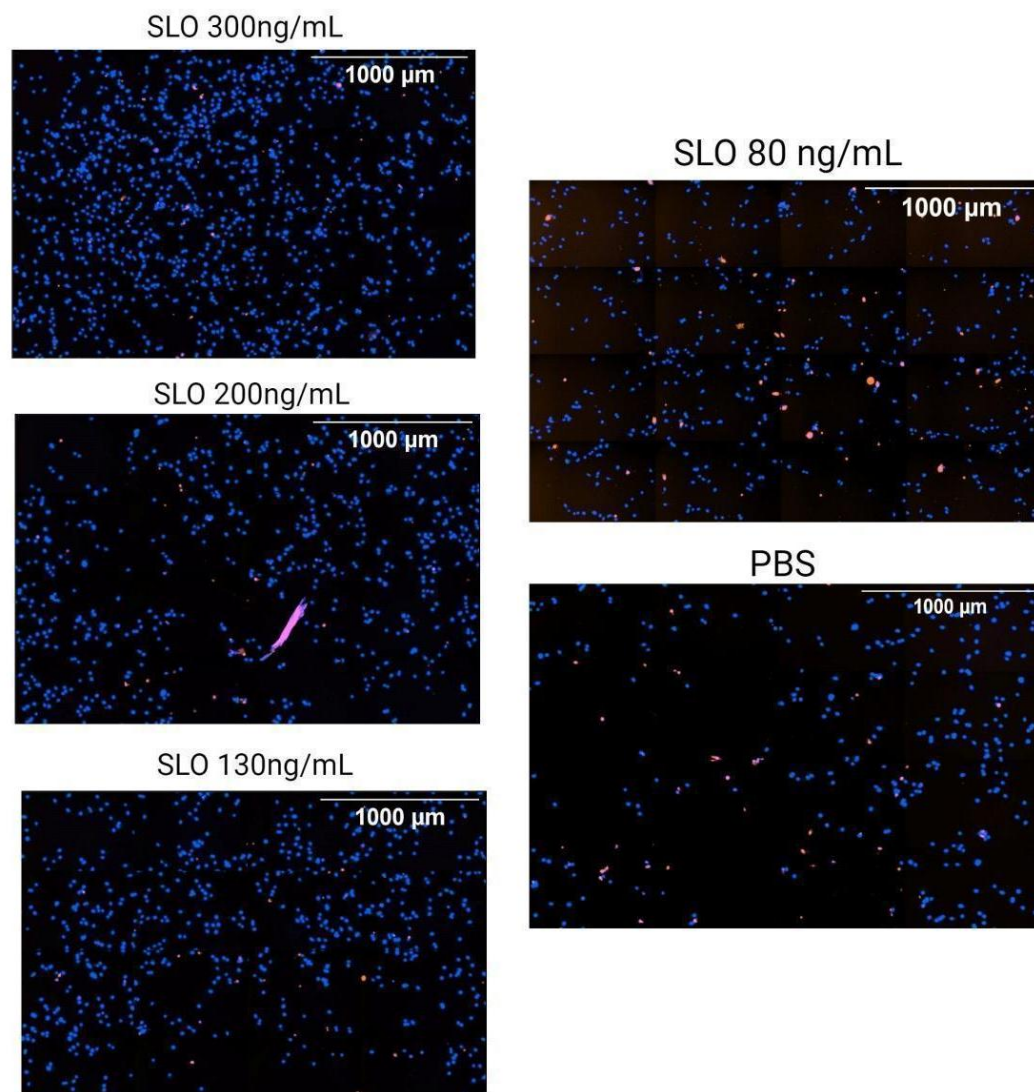
poderia afetar o efeito antitumoral do MDP avaliado previamente. Havendo, portanto, a necessidade de estudar os efeitos desse novo peptídeo ou polipeptídeo gerado.

Uma outra possível solução para minimizar a toxicidade de peptídeos MDPs em células não tumorais pode ser alcançada com a incorporação destes peptídeos em vesículas lipídicas, ou lipossomas, contendo peptídeos que alvejem proteínas superexpressas pela célula tumoral em questão. No caso do câncer de mama triplo negativo, o lipossoma poderia ser formulado juntamente com o peptídeo (AKRGARSTA) Linear TT1, alvejando a proteína p32 (receptor trans-membrana gC1q), assim como nos estudos de D'Avanzo et al., 2021 (D'AVANZO *et al.*, 2021)

D'Avanzo et al., 2021, utilizaram a formulação Linear TT1-lipossomas para incorporação de fármacos antitumorais, como Sorafenib e Doxorubicina, onde obtiveram aumento da toxicidade destes em células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 (D'AVANZO *et al.*, 2021).

### **5.5. Atividade da estreptolisina O em células MDA-MB-231**

Como observamos a formação de poros pelo tratamento de células MDA-MB-231 com a Lunatina-1, resolvemos confirmar esse achado usando a estreptolisina O (SLO, sigla do inglês), um peptídeo sabidamente indutor de poros em diversos tipos celulares (KEYEL *et al.*, 2013, 2011). Como observado na Figura 23, o tratamento das células com concentrações superiores a 80 ng/mL de SLO por 20 minutos não apresentaram marcação com PI, portanto, a concentração de 80 ng/mL foi selecionada para os experimentos com SEM.

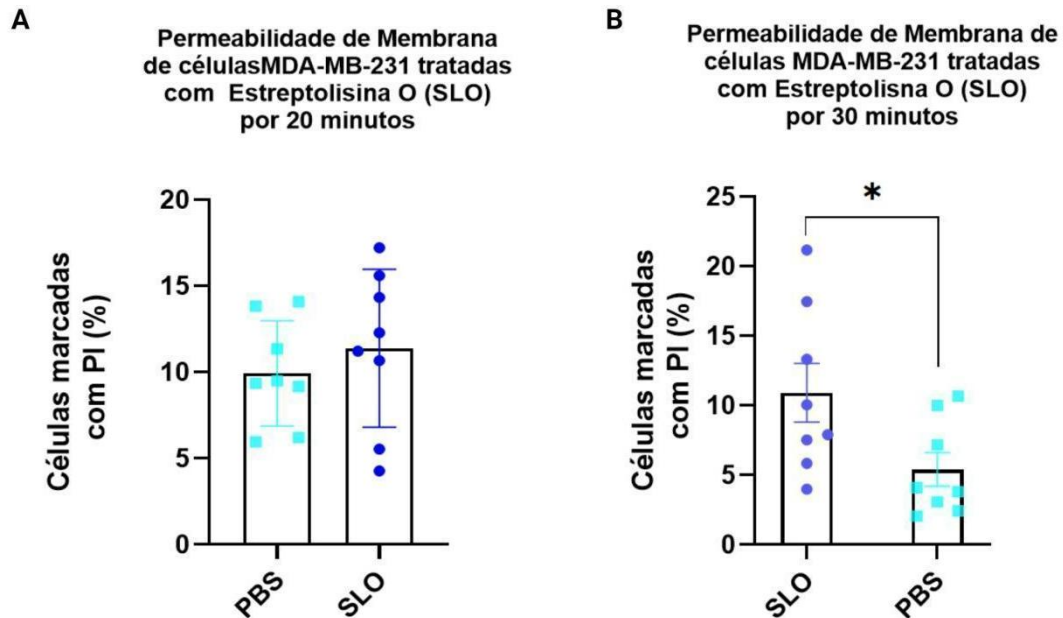


**Figura 23.** Imagens representativas de células MDA-MB-231 tratadas por 20 minutos com diferentes concentrações de estreptolisina O.

Células foram tratadas com diferentes concentrações (80, 130, 200 ou 300 ng/mL) de estreptolisina O (SLO) ou PBS. Células coradas com iodeto de propídio (PI) e Hoechst (HOE). Imagem representativa de um experimento independente realizado em duplicata.

Como representado na Figura 24, o SLO (80 ng/mL) induziu um aumento significativo na marcação de células MDA-MB-231 tratadas por 30 minutos (SLO =  $11,0 \pm 5,96\%$  vs. PBS =  $5,41 \pm 3,42\%$ ,  $p < 0,05$ ). Não foi observado um aumento significativo da permeabilidade das células ao PI após 20 minutos de tratamento (SLO =  $11,4 \pm 4,6\%$  vs. PBS =  $9,9 \pm 3,1\%$ ,  $p > 0,05$ ), mas o percentual elevado de células marcadas com PBS pode indicar algum problema

na execução dos experimentos. Após esses ensaios preliminares de permeabilização de membrana provocados pela SLO, este peptídeo foi usado como controle positivo de formação de poros nos ensaios de MEV.



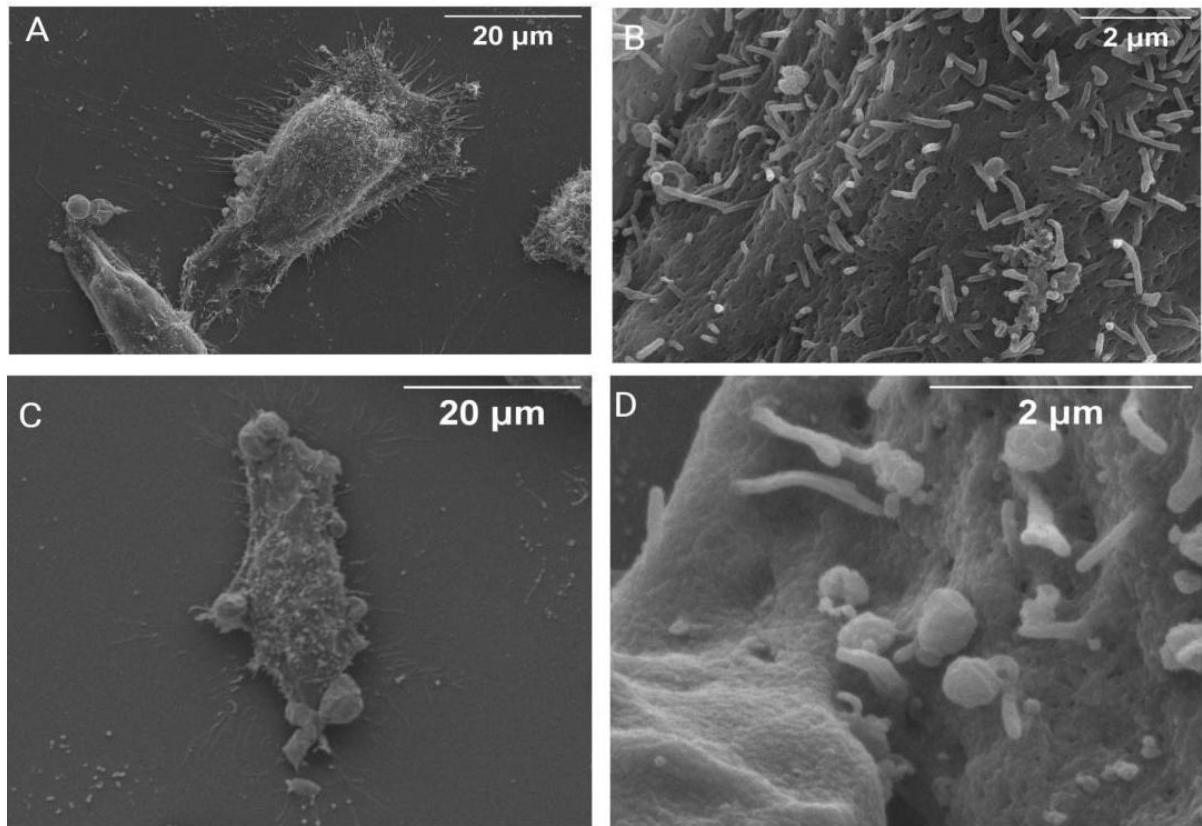
**Figura 24.** Indução de permeabilidade de membranas de células MDA-MB-231 tratadas por 20 e 30 minutos com estreptolisina O.

Células foram tratadas com 80 ng/mL de estreptolisina O (SLO) ou PBS e coradas com iodeto de propídio (PI) e Hoechst (HOE). A) Quantificação de células marcadas com o PI após 20 minutos de tratamento. B) Quantificação de células marcadas com o PI após 30 minutos de tratamento. \*  $p < 0,05$ ; Teste T de Student não pareado.

Células MDA-MB-231 tratadas com SLO (80 ng/mL) por 20 minutos, ao serem visualizadas por MEV (Figura 25), apresentam estruturas semelhantes a poros similares às induzidas pela Lunatina-1 (Figura 18).

Keyel *et al.* (2011) notaram a presença de poros dentro de pequenos *blebs* na membrana de células HeLa provocados pelo SLO (KEYEL *et al.*, 2011), o que não observamos nas células MDA-MB-231 tratadas com SLO por 20 minutos, sendo observado apenas poros inseridos diretamente na membrana (Figura 25) e com uma morfologia similar

aos associados ao tratamento com a Lunatina-1 (Figura 18). Contudo, foi possível observar a formação de *blebs* na membrana após 30 minutos de tratamento com o SLO (Figura 25).



**Figura 25.** SLO induz a formação de poros, blebs e compromete a superfície de células MDA-MB-231.

Células foram semeadas em lamínulas de poli-l-lisina, tratadas com 80 ng/mL de SLO por 20 (A-B) ou 30 minutos (C-D), fixadas em Karnovsky e preparadas para MEV.

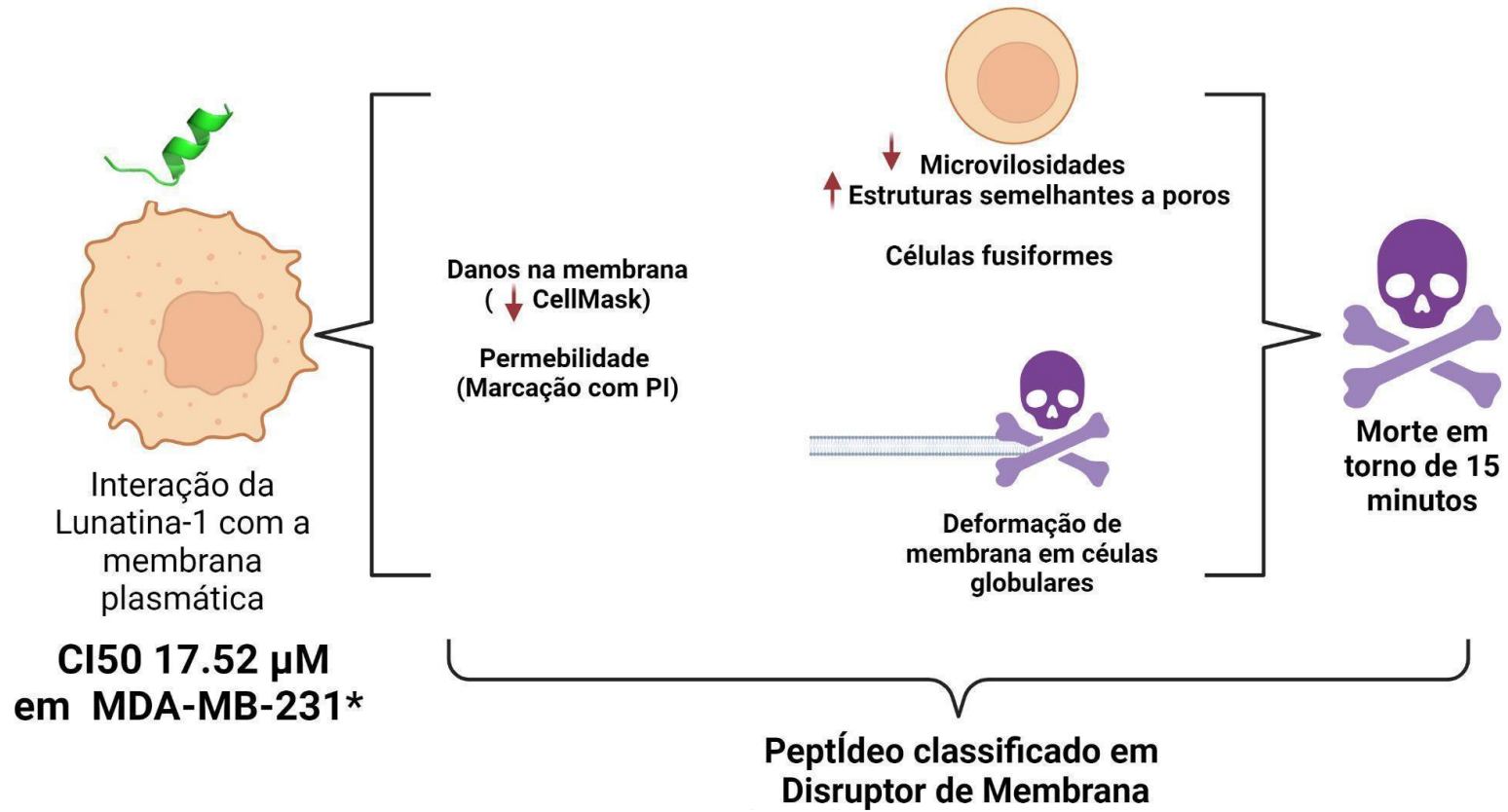
Babiychuk *et al.* (2010) discutiram que o comprometimento da membrana induzido pela presença de poros, ruptura mecânica, ou lise da bicamada lipídica pode romper a barreira de permeabilidade, permitindo, assim, um influxo de cálcio e um efluxo dos constituintes intracelulares, com conseqüente contração do citoesqueleto cortical induzida pela miosina e o aumento localizado da pressão hidrostática dentro do citoplasma circundante, o que visualizamos como uma bolha contendo a membrana danificada (*bleb*). Quando a célula é

capaz de reparar a lesão, o cálcio intra *bleb* é direcionado para fora e a bolha eventualmente se retrai. Caso a célula falhe no processo de reparação, a concentração de cálcio intra *bleb* continua a aumentar, com conseqüente aumento do *bleb*. Caso o dano à membrana seja extremamente extenso para a sua reparação, a célula sacrifica as regiões danificadas, descartando, assim, as bolhas obstruídas e permeabilizadas (BABIYCHUK *et al.*, 2010).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, foi estudado o possível mecanismo de ação citotóxico da Lunatina-1, um peptídeo isolado do veneno do escorpião peruano *Hadruidoidea lunatus* em células MDA-MB-231, uma linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo (ER-/PR-/HER2-), notoriamente resistente à quimioterapia. A Figura 26 ilustra o mecanismo de ação da Lunatina-1 sugerido nessa linhagem celular. Como a atividade citotóxica da Lunatina-1 ocorreu nos primeiros minutos de tratamento, acreditamos que seja reduzida a possibilidade de resistência adquirida pelas células MDA-MB-231 ao seu tratamento. Assim, a Lunatina-1 é uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a eficácia dos medicamentos antitumorais. Sugerimos que a potencial citotoxicidade deste peptídeo em células não tumorais pode ser reduzida pelo uso de formulações que aumentem a sua seletividade contra células transformadas.





**Figura 26.** Ilustração esquemática do mecanismo citotóxico induzido pelo tratamento de MDA-MB-231 com Lunatina-1.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, M. A. L.; CARVALHO-TAVARES, J.; GOMES, K. S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; KITTEN, G. T.; NYFFELER, J.; DIAS, F. F.; DOS REIS, P. V. M.; PIMENTA, A. M. C.; LEIST, M.; DE LIMA, M. E.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M. The synthetic peptide LyeTxI-b derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom is cytotoxic to U-87 MG glioblastoma cells. **Amino acids**, vol. 51, no. 3, p. 433–449, Mar. 2019. DOI 10.1007/s00726-018-2678-4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-018-2678-4>.

ADACHI, S.; CROSS, A. R.; BABIOR, B. M.; GOTTLIEB, R. A. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, vol. 272, no. 35, p. 21878–21882, 29 Aug. 1997. DOI 10.1074/jbc.272.35.21878. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.35.21878>.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current pharmaceutical biotechnology**, vol. 17, no. 14, p. 1213–1221, 2016. DOI 10.2174/1389201017666160808160513. Available at: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>.

AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of western medicine and surgery**, vol. 49, p. 44–48, 1 Jan. 2020. DOI 10.1016/j.amsu.2019.11.021. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S204908011930192X>.

AMAYA ARBELÁEZ, M. I.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; NAVEGANTE, G.; VALENTE, V.; BARBUGLI, P. A.; VERGANI, C. E. Proto-Oncogenes and Cell Cycle Gene Expression in Normal and Neoplastic Oral Epithelial Cells Stimulated With Soluble Factors From Single and Dual Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, vol. 11, p. 627043, 25 Feb. 2021. DOI 10.3389/fcimb.2021.627043. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.627043>.

AMERICAN CANCER SOCIETY, Types of Breast Cancer. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>. Accessed on: 31 May 2024.

BABIYCHUK, E. B.; MONASTYRSKAYA, K.; POTEZ, S.; DRAEGER, A. Blebbing confers resistance against cell lysis. **Cell death and differentiation**, vol. 18, no. 1, p. 80–89, 2 Jul. 2010. DOI 10.1038/cdd.2010.81. Available at: <https://www.nature.com/articles/cdd201081>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

BATISTA E. M. L. Análises diferenciais por proteoma e fosfoproteoma revelam vias de sinalização moduladas pelo peptídeo Lunatina-1 em células de linhagem tumoral HL60. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

BENAISSA R, OTHMAN H, VILLARD C, PEIGNEUR S, MLAYAH-BELLALOUNA S,

ABDELKAFI-KOUBAA Z, MARRAKCHI N, ESSAFI-BENKHADIR K, TYTGAT J, LUIS J, SRAIRI-ABID N. AaHIV a sodium channel scorpion toxin inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, vol. 521, no. 2, p. 340–346, 8 Jan. 2020. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.10.115. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.115>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L.; Targeting apoptotic caspases in cancer., **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, vol. 1867, no. 6, p. 118688, 1 Jun. 2020. DOI 10.1016/j.bbamcr.2020.118688. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>. Accessed on: 31 May 2024.

BOOHAKER, R. J.; LEE, M. W.; VISHNUBHOTLA, P.; PEREZ, J. M.; KHALED, A. R. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. **Current medicinal chemistry**, vol. 19, no. 22, p. 3794–3804, 2012. DOI 10.2174/092986712801661004. Available at: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712801661004>.

CAILLEAU, R.; YOUNG, R.; OLIVÉ, M.; REEVES, W. J., Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 53, no. 3, p. 661–674, Sep. 1974. DOI 10.1093/jnci/53.3.661. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>.

CHAI, J.; DU, C.; WU, J. W.; KYIN, S.; WANG, X.; SHI, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. **Nature**, vol. 406, no. 6798, p. 855–862, 24 Aug. 2000. DOI 10.1038/35022514. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35022514>.

CHAIKUL, J.; HODGSON, W. C.; KURUPPU, S.; PRASONGSOOK, N. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. **Journal of Cancer**, vol. 7, no. 11, p. 1571–1578, 15 Jul. 2016. DOI 10.7150/jca.15309. Available at: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.15309>.

CHEN, R.; MARK, A. E. The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: implications for binding and the mechanism of action. **European biophysics journal: EBJ**, vol. 40, no. 4, p. 545–553, Apr. 2011. DOI 10.1007/s00249-011-0677-4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-011-0677-4>.

CHIANGJONG, W.; CHUTIPONGTANATE, S.; HONGENG, S. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). **International journal of oncology**, vol. 57, no. 3, p. 678–696, Sep. 2020. DOI 10.3892/ijo.2020.5099. Available at: <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2020.5099>.

COMINETTI, M. R.; ALTEI, W. F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. **Breast cancer**, vol. 11, p. 165–178, 18 Apr. 2019. DOI 10.2147/BCTT.S166725. Available at: <http://dx.doi.org/10.2147/BCTT.S166725>.

COSTAL-OLIVEIRA, F.; DUARTE C.G.; MACHADO DE AVILA R.A.; MELO M.M.; BORDON K.C.; ARANTES E.C.; PAREDES N.C.; TINTAYA B.; BONILLA C.;

BONILLA R.E.; SUAREZ W.S.; YARLEQUE A.; FERNANDEZ J.M.; KALAPOTHAKIS E; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, vol. 60, no. 5, p. 934–942, 1 Oct. 2012. DOI 10.1016/j.toxicon.2012.06.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.013>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

COSTAL-OLIVEIRA F.; GUERRA-DUARTE C.; CASTRO K.L.P.; TINTAYA B.; BONILLA C.; SILVA W.; YARLEQUÉ A.; FUJIWARA R.; MELO M.M., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, vol. 103, p. 129–134, 1 Sep. 2015. DOI 10.1016/j.toxicon.2015.06.022. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.022>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

D'AVANZO, N.; TORRIERI, G.; FIGUEIREDO, P.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; CORREIA, A.; MOSLOVA, K.; TEESALU, T.; FRESTA, M.; SANTOS, H. A. LinTT1 peptide-functionalized liposomes for targeted breast cancer therapy. **International journal of pharmaceuticals**, vol. 597, p. 120346, 15 Mar. 2021. DOI 10.1016/j.ijpharm.2021.120346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120346>.

DEPLAZES, E. Molecular simulations of venom peptide-membrane interactions: Progress and challenges. **Peptide Science**, vol. 110, no. 3, p. e24060, May 2018. DOI 10.1002/pep2.24060. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pep2.24060>.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, vol. 102, no. 1, p. 33–42, 7 Jul. 2000. DOI 10.1016/s0092-8674(00)00008-8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00008-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00008-8).

DUVALL, E.; WYLLIE, A. H.; MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology**, vol. 56, no. 2, p. 351–358, Oct. 1985. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3876985>.

ESCOBAR, E.; RIVERA, C.; TINCOPA, L.; RIVERA, D. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* Koch, 1867 (Scorpionida: Vejovidae) RPIONIDA: VEJOVIDAE). **Revista peruana de biología**, vol. 9, no. 1, p. 3–10, 15 Jul. 2002. DOI 10.15381/rpb.v9i1.2511. Available at: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/2511>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

FANG, C.; LI, W.; YIN, R.; ZHU, D.; LIU, X.; WU, H.; WANG, Q.; WANG, W.; BAI, Q.; CHEN, B.; YAO, X.; CHEN, Y. Potent antitumor activity of a glutamyltransferase-derived peptide via an activation of oncosis pathway. **Scientific reports**, vol. 11, no. 1, p. 16507, 13 Aug. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-93055-5. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-93055-5>.

FANI, S.; KAMALIDEHGHAN, B.; LO, K. M.; NIGJEH, S. E.; KEONG, Y. S.; DEHGHAN, F.; SOORI, R.; ABDULLA, M. A.; CHOW, K. M.; ALI, H. M.; HAJIAGHAALIPOUR, F.; ROUHOLLAHI, E.; HASHIM, N. M. Anticancer activity of a monobenzyltin complex C1 against MDA-MB-231 cells through induction of Apoptosis and inhibition of breast cancer stem cells. **Scientific reports**, vol. 6, p. 38992, 15 Dec. 2016. DOI 10.1038/srep38992. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep38992>.

FAN, Z.; BERESFORD, P. J.; ZHANG, D.; XU, Z.; NOVINA, C. D.; YOSHIDA, A.; POMMIER, Y.; LIEBERMAN, J. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. **Nature immunology**, vol. 4, no. 2, p. 145–153, Feb. 2003. DOI 10.1038/ni885. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni885>.

FIRATLIGIL-YILDIRIR, B.; YALCIN-OZUYSAL, O.; NONAPPA. Recent advances in lab-on-a-chip systems for breast cancer metastasis research. **Nanoscale advances**, vol. 5, no. 9, p. 2375–2393, 2 May 2023. DOI 10.1039/d2na00823h. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/d2na00823h>.

FRANCHI, M.; PIPERIGKOU, Z.; KARAMANOS, K.-A.; FRANCHI, L.; MASOLA, V. Extracellular Matrix-Mediated Breast Cancer Cells Morphological Alterations, Invasiveness, and Microvesicles/Exosomes Release. **Cells**, vol. 9, no. 9, p. 2031, 4 Sep. 2020. DOI 10.3390/cells9092031. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/9/2031>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

FULAWKA, L.; BLASZCZYK, J.; TABAKOV, M.; HALON, A. Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ). **Scientific reports**, vol. 12, no. 1, p. 1–12, 24 Feb. 2022. DOI 10.1038/s41598-022-06555-3. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-06555-3>. Accessed on: 31 May 2024.

GAETA, I.M, MEENDERINK, L.M, POSTEMA, M.M, CENCER, C.S, TYSKA, M.J. Direct visualization of epithelial microvilli biogenesis. **Current biology: CB**, vol. 31, no. 12, p. 2561–2575.e6, 21 Jun. 2021. DOI 10.1016/j.cub.2021.04.012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.012>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

GARVEY, W. T.; BATTERHAM, R. L.; BHATTA, M.; BUSCEMI, S.; CHRISTENSEN, L. N.; FRIAS, J. P.; JÓDAR, E.; KANDLER, K.; RIGAS, G.; WADDEN, T. A.; WHARTON, S. Two-year effects of semaglutide in adults with overweight or obesity: the STEP 5 trial. **Nature medicine**, vol. 28, no. 10, p. 2083–2091, 10 Oct. 2022. DOI 10.1038/s41591-022-02026-4. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41591-022-02026-4>. Accessed on: 31 May 2024.

GHALY, G.; TALLIMA, H.; DABBISH, E.; BADR ELDIN, N.; ABD EL-RAHMAN, M. K.; IBRAHIM, M. A. A.; SHOEIB, T. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. **Molecules**, vol. 28, no. 3, p. 1148, 23 Jan. 2023. DOI 10.3390/molecules28031148. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1148>. Accessed on: 31 May 2024.

GHANNAM, S. F.; RUTLAND, C. S.; ALLEGRUCCI, C.; MONGAN, N. P.; RAKHA, E. Defining invasion in breast cancer: the role of basement membrane. **Journal of clinical pathology**, vol. 76, no. 1, p. 11–18, 1 Jan. 2023. DOI 10.1136/jcp-2022-208584. Available at: <https://jcp.bmj.com/content/76/1/11.abstract>. Accessed on: 31 May 2024.

GOMES K. S. Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **The Journal of general virology**, vol. 36, no. 1, p. 59–74, Jul. 1977. DOI 10.1099/0022-1317-36-1-59. Available at: <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, vol. 12, no. 1, p. 31–46, Jan. 2022. DOI 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Available at: <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, vol. 144, no. 5, p. 646–674, 4 Mar. 2011. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANSEL, W.; LEUSCHNER, C.; ENRIGHT, F. Conjugates of lytic peptides and LHRH or betaCG target and cause necrosis of prostate cancers and metastases. **Molecular and cellular endocrinology**, vol. 269, no. 1-2, p. 26–33, 15 Apr. 2007. DOI 10.1016/j.mce.2006.06.017. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2006.06.017>.

HAN, X.; MA, L.; GU, J.; WANG, D.; LI, J.; LOU, W.; SAIYIN, H.; FU, D. Basal microvilli define the metabolic capacity and lethal phenotype of pancreatic cancer. **The Journal of pathology**, vol. 253, no. 3, p. 304–314, Mar. 2021. DOI 10.1002/path.5588. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/path.5588>.

HENKART, P. A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annual review of immunology**, vol. 3, p. 31–58, 1985. DOI 10.1146/annurev.iy.03.040185.000335. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.000335>.

HERO, T.; BÜHLER, H.; KOUAM, P. N.; PRIESCH-GRZESZOWIAK, B.; LATEIT, T.; ADAMIETZ, I. A. The Triple-negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB 231 Is Specifically Inhibited by the Ionophore Salinomycin. **Anticancer research**, vol. 39, no. 6, p. 2821–2827, Jun. 2019. DOI 10.21873/anticancer.13410. Available at: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.13410>.

HILCHIE A.L.; VALE R.; ZEMLAK T.S.; HOSKIN D.W. Generation of a hematologic malignancy-selective membranolytic peptide from the antimicrobial core (RRWQWR) of bovine lactoferricin. **Experimental and molecular pathology**, vol. 95, no. 2, p. 192–198, 1 Oct. 2013. DOI 10.1016/j.yexmp.2013.07.006. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.07.006>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell**, vol. 81, no. 4, p. 495–504, 19 May 1995. DOI 10.1016/0092-8674(95)90070-5. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90070-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90070-5).

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Atlas on-line de mortalidade. Available at: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>. Accessed on: 31 May 2024.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, O Que é Câncer?. Available at: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/o-que-e-cancer>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **The Journal of biological chemistry**, vol. 268, no. 15, p. 10932–10937, 25 May 1993. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684370>.

JOHNSON, K. S.; CONANT, E. F.; SOO, M. S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. **Journal of Breast Imaging**, vol. 3, no. 1, p. 12–24, 30 Dec. 2020. DOI 10.1093/jbi/wbaa110. Available at: <https://academic.oup.com/jbi/article-pdf/3/1/12/36112605/wbaa110.pdf>. Accessed on: 31 May 2024.

KALONI, D.; DIEPSTRATEN, S. T.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, vol. 28, no. 1, p. 20–38, 7 Nov. 2022. DOI 10.1007/s10495-022-01780-7. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-022-01780-7>. Accessed on: 31 May 2024.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, vol. 26, no. 4, p. 239–257, Aug. 1972. DOI 10.1038/bjc.1972.33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.

KEYEL, P. A.; LOULTCHEVA, L.; ROTH, R.; SALTER, R. D.; WATKINS, S. C.; YOKOYAMA, W. M.; HEUSER, J. E. Streptolysin O clearance through sequestration into blebs that bud passively from the plasma membrane. **Journal of cell science**, vol. 124, no. Pt 14, p. 2414–2423, 15 Jul. 2011. DOI 10.1242/jcs.076182. Available at: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.076182>.

KEYEL, P. A.; ROTH, R.; YOKOYAMA, W. M.; HEUSER, J. E.; SALTER, R. D. Reduction of Streptolysin O (SLO) Pore-Forming Activity Enhances Inflammasome Activation. **Toxins**, vol. 5, no. 6, p. 1105–1118, 6 Jun. 2013. DOI 10.3390/toxins5061105. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6651/5/6/1105>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

KHALID, N.; AZIMPOURAN, M. Necrosis. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls

Publishing, 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491559>.

KHARAZIHA, P.; CHIOUREAS, D.; RUTISHAUSER, D.; BALATZIS, G.; LENNARTSSON, L.; FONSECA, P.; AZIMI, A.; HULTENBY, K.; ZUBAREV, R.; ULLÉN, A.; YACHNIN, J.; NILSSON, S.; PANARETAKIS, T. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. **Oncotarget**, vol. 6, no. 25, p. 21740–21754, 28 Aug. 2015. DOI 10.18632/oncotarget.3226. Available at: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3226>.

KHOSRAVI-SHAHI, P.; CABEZÓN-GUTIÉRREZ, L.; CUSTODIO-CABELLO, S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. **Asia-Pacific journal of clinical oncology**, vol. 14, no. 1, p. 32–39, 1 Feb. 2018. DOI 10.1111/ajco.12748. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajco.12748>. Accessed on: 31 May 2024.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO journal**, vol. 14, no. 22, p. 5579–5588, 15 Nov. 1995. DOI 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x>.

KISO, M.; TANAKA, S.; SAJI, S.; TOI, M.; SATO, F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, vol. 143, no. 11, p. 2905–2918, 1 Dec. 2018. DOI 10.1002/ijc.31645. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31645>.

KROPYVKO, S. V.; TSYBA, L. O.; NOVOKHATSKA, O. V.; NEMESH, Y. M.; SYVAK, L. A.; TARASENKO, T. Y.; GRABOVOY, A. N.; RYNDITCH, A. V. Expression of ITS2 and TKS5 in different subtypes of breast cancer tumors. **Biopolymers & cell**, vol. 35, no. 1, p. 21–29, 2019. DOI 10.7124/bc.00098F. Available at: <http://www.biopolymers.org.ua/pdf/en/35/1/021/biopolym.cell-2019-35-1-021-en.pdf>. Accessed on: 31 May 2024.

KUMKOON, T.; NOREE, C.; BOONSERM, P. Engineering BinB Pore-Forming Toxin for Selective Killing of Breast Cancer Cells. **Toxins**, vol. 15, no. 4, 18 Apr. 2023. DOI 10.3390/toxins15040297. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins15040297>.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & medicinal chemistry**, vol. 26, no. 10, p. 2700–2707, 1 Jun. 2018. DOI 10.1016/j.bmc.2017.06.052. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.

LEUSCHNER, C.; ENRIGHT, F. M.; MELROSE, P. A.; HANSEL, W. Targeted destruction of androgen-sensitive and -insensitive prostate cancer cells and xenografts through luteinizing hormone receptors. **The Prostate**, vol. 46, no. 2, p. 116–125, 1 Feb. 2001. DOI



10.1002/1097-0045(20010201)46:2<116::AID-PROS1015>3.0.CO;2-B. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0045%2820010201%2946%3A2%3C116%3A%3AAID-PROS1015%3E3.0.CO%3B2-B>. Accessed on: 31 May 2024.

LEUSCHNER, C.; HANSEL, W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. **Current pharmaceutical design**, vol. 10, no. 19, p. 2299–2310, 2004. DOI 10.2174/1381612043383971. Available at: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612043383971>.

LI, B.; LYU, P.; XI, X.; GE, L.; MAHADEVAPPA, R.; SHAW, C.; KWOK, H. F. Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide-Gonearrestide. **Journal of cellular and molecular medicine**, vol. 22, no. 9, p. 4460–4473, Sep. 2018. DOI 10.1111/jcmm.13745. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.13745>.

LIN, L.; CHI, J.; YAN, Y.; LUO, R.; FENG, X.; ZHENG, Y.; XIAN, D.; LI, X.; QUAN, G.; LIU, D.; WU, C.; LU, C.; PAN, X. Membrane-disruptive peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, vol. 11, no. 9, p. 2609–2644, Sep. 2021. DOI 10.1016/j.apsb.2021.07.014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.014>.

LIU, L.; WANG, K.; LIU J.; WEI, Y.; LIU, W.; ZHANG, P.; HU, J.; LI, B., Starvation effect on the morphology of microvilli in HeLa cells, **Biochemical and biophysical research communications**, vol. 514, no. 4, p. 1238–1243, 5 Jul. 2019. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.05.073. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.073>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

LIU, Q.; ZHAO, H.; JIANG, Y.; WU, M.; TIAN, Y.; WANG, D.; LAO, Y.; XU, N.; LI, Z. Development of a lytic peptide derived from BH3-only proteins. **Cell death discovery**, vol. 2, p. 16008, 7 Mar. 2016. DOI 10.1038/cddiscovery.2016.8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.8>.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, vol. 86, no. 1, p. 147–157, 12 Jul. 1996. DOI 10.1016/s0092-8674(00)80085-9. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9).

LOGAN, G. J.; DABBS, D. J.; LUCAS, P. C.; JANKOWITZ, R. C.; BROWN, D. D.; CLARK, B. Z.; OESTERREICH, S.; MCAULIFFE, P. F. Molecular drivers of lobular carcinoma in situ. **Breast cancer research: BCR**, vol. 17, no. 1, p. 1–10, 4 Jun. 2015. DOI 10.1186/s13058-015-0580-5. Available at: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0580-5>. Accessed on: 31 May 2024.

MAHMOUD, R.; ORDÓÑEZ-MORÁN, P.; ALLEGRUCCI, C. Challenges for Triple Negative Breast Cancer Treatment: Defeating Heterogeneity and Cancer Stemness. **Cancers**, vol. 14, no. 17, p. 4280, 1 Sep. 2022. DOI 10.3390/cancers14174280. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/17/4280>. Accessed on: 31 May 2024.

MARQUS, S.; PIROGOVA, E.; PIVA, T. J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. **Journal of biomedical science**, vol. 24, no. 1, p. 1–15, 21 Mar. 2017. DOI 10.1186/s12929-017-0328-x. Available at:

<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-017-0328-x>. Accessed on: 31 May 2024.

MIKAELIAN, A. G.; TRABOULAY, E.; ZHANG, X. M.; YERITSYAN, E.; PEDERSEN, P. L.; KO, Y. H.; MATALKA, K. Z. Pleiotropic Anticancer Properties of Scorpion Venom Peptides: *Rhopalurus princeps* Venom as an Anticancer Agent. **Drug Design, Development and Therapy**, vol. 14, p. 881–893, 27 Feb. 2020. DOI 10.2147/DDDT.S231008. Available at: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=56414>. Accessed on: 31 May 2024.

MOHAMMADINEJAD, R.; MOOSAVI, M. A.; TAVAKOL, S.; VARDAR, D. Ö.; HOSSEINI, A.; RAHMATI, M.; DINI, L.; HUSSAIN, S.; MANDEGARY, A.; KLIONSKY, D. J. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. **Autophagy**, vol. 15, no. 1, p. 4–33, Jan. 2019. DOI 10.1080/15548627.2018.1509171. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2018.1509171>.

NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J.-P.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P. T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N. J.; KUO, W.-L.; STILWELL, J. L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G.; ... GRAY, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer cell**, vol. 10, no. 6, p. 515–527, Dec. 2006. DOI 10.1016/j.ccr.2006.10.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>.

NGUYEN, T. T. M.; GILLET, G.; POPGEORGIEV, N. Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, vol. 9, p. 702404, 16 Jul. 2021. DOI 10.3389/fcell.2021.702404. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.702404>. Accessed on: 31 May 2024.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell biology and toxicology**, vol. 36, no. 2, p. 145–164, 9 Dec. 2019. DOI 10.1007/s10565-019-09496-2. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10565-019-09496-2>. Accessed on: 31 May 2024.

ORBACH, R.; SU, X. Surfing on Membrane Waves: Microvilli, Curved Membranes, and Immune Signaling. **Frontiers in immunology**, vol. 11, p. 2187, 11 Sep. 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.02187. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.02187>.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, vol. 406, no. 6797, p. 747–752, 17 Aug. 2000. DOI 10.1038/35021093. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>.

PITTI, R. M.; MARSTERS, S. A.; RUPPERT, S.; DONAHUE, C. J.; MOORE, A.; ASHKENAZI, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **The Journal of biological chemistry**, vol. 271, no. 22, p. 12687–12690, 31 May 1996. DOI 10.1074/jbc.271.22.12687. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.22.12687>.

PRATELLI, G.; CARLISI, D.; DI LIBERTO, D.; NOTARO, A.; GIULIANO, M.; D'ANNEO, A.; LAURICELLA, M.; EMANUELE, S.; CALVARUSO, G.; DE BLASIO, A. MCL1 Inhibition Overcomes the Aggressiveness Features of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. **International journal of molecular sciences**, vol. 24, no. 13, p. 11149, 6 Jul. 2023. DOI 10.3390/ijms241311149. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/11149>. Accessed on: 31 May 2024.

PRETA, G. New Insights Into Targeting Membrane Lipids for Cancer Therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, vol. 8, p. 571237, 2 Sep. 2020. DOI 10.3389/fcell.2020.571237. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.571237>. Accessed on: 31 May 2024.

REED, A. E. M.; KUTASOVIC, J. R.; LAKHANI, S. R.; SIMPSON, P. T. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. **Breast cancer research: BCR**, vol. 17, no. 1, p. 1–11, 30 Jan. 2015. DOI 10.1186/s13058-015-0519-x. Available at: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0519-x>. Accessed on: 31 May 2024.

ROTHER, M.; PAN, M. G.; HENZEL, W. J.; AYRES, T. M.; GOEDDEL, D. V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. **Cell**, vol. 83, no. 7, p. 1243–1252, 29 Dec. 1995. DOI 10.1016/0092-8674(95)90149-3. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90149-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90149-3).

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

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K. J.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **The EMBO journal**, vol. 17, no. 6, p. 1675–1687, 16 Mar. 1998. DOI 10.1093/emboj/17.6.1675. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.6.1675>.

SEARLE, J.; LAWSON, T. A.; ABBOTT, P. J.; HARMON, B.; KERR, J. F. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. **The Journal of pathology**, vol. 116, no. 3, p. 129–138, Jul. 1975. DOI 10.1002/path.1711160302. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/path.1711160302>.

SHEHATA, M.; GRIMM, L.; BALLANTYNE, N.; LOURENCO, A.; DEMELLO, L. R.; KILGORE, M. R.; RAHBAR, H. Ductal Carcinoma in Situ: Current Concepts in Biology,

Imaging, and Treatment. **Journal of Breast Imaging**, vol. 1, no. 3, p. 166–176, 18 Aug. 2019. DOI 10.1093/jbi/wbz039. Available at: <https://academic.oup.com/jbi/article-pdf/1/3/166/33501834/wbz039.pdf>. Accessed on: 31 May 2024.

SOLIMAN, N. A.; YUSSIF, S. M. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. **Cancer biology & medicine**, vol. 13, no. 4, p. 496–504, Dec. 2016. DOI 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066. Available at: <http://dx.doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066>.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J. S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C. M.; LØNNING, P. E.; BROWN, P. O.; BØRRESEN-DALE, A.-L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 100, no. 14, p. 8418–8423, 8 Jul. 2003. DOI 10.1073/pnas.0932692100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0932692100>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, vol. 71, no. 3, p. 209–249, May 2021. DOI 10.3322/caac.21660. Available at: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TAVIANATOU, A.-G.; PIPERIGKOU, Z.; BARBERA, C.; BENINATTO, R.; MASOLA, V.; CAON, I.; ONISTO, M.; FRANCHI, M.; GALESSO, D.; KARAMANOS, N. K. Molecular size-dependent specificity of hyaluronan on functional properties, morphology and matrix composition of mammary cancer cells. **Matrix biology plus**, vol. 3, p. 100008, Aug. 2019. DOI 10.1016/j.mbplus.2019.100008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbplus.2019.100008>.

TORNESELLO, A. L.; BORRELLI, A.; BUONAGURO, L.; BUONAGURO, F. M.; TORNESELLO, M. L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. **Molecules**, vol. 25, no. 12, 19 Jun. 2020. DOI 10.3390/molecules25122850. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25122850>.

TRINIDAD-CALDERÓN, P. A.; VARELA-CHINCHILLA, C. D.; GARCÍA-LARA, S. Natural Peptides Inducing Cancer Cell Death: Mechanisms and Properties of Specific Candidates for Cancer Therapeutics. **Molecules**, vol. 26, no. 24, 9 Dec. 2021. DOI 10.3390/molecules26247453. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26247453>.

VADEVOO, S. M. P.; GURUNG, S.; LEE, H.-S.; GUNASSEKARAN, G. R.; LEE, S.-M.; YOON, J.-W.; LEE, Y.-K.; LEE, B. Peptides as multifunctional players in cancer therapy. **Experimental & molecular medicine**, vol. 55, no. 6, p. 1099–1109, Jun. 2023. DOI 10.1038/s12276-023-01016-x. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-023-01016-x>.

VAEZI Z, BORTOLOTTI A, LUCA V, PERILLI G, MANGONI M L, KHOSRAVI-FAR R,

BOBONE S, STELLA L. Aggregation determines the selectivity of membrane-active anticancer and antimicrobial peptides: The case of killerFLIP. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, vol. 1862, no. 2, p. 183107, 1 Feb. 2020. DOI 10.1016/j.bbamem.2019.183107. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183107>. Accessed on: 1 Jun. 2024.

WANG, J.; SHINKURA, R.; MURAMATSU, M.; NAGAOKA, H.; KINOSHITA, K.; HONJO, T. Identification of a specific domain required for dimerization of activation-induced cytidine deaminase. **The Journal of biological chemistry**, vol. 281, no. 28, p. 19115–19123, 14 Jul. 2006. DOI 10.1074/jbc.M601645200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M601645200>.

WESTMAN, J.; GRINSTEIN, S.; MARQUES, P. E. Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. **Frontiers in immunology**, vol. 10, p. 3030, 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.03030. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.03030>.

WHO, World Health Organization, CANCER. Available at: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Accessed on: 1 Jun. 2024.

WU, G.; CHAI, J.; SUBER, T. L.; WU, J. W.; DU, C.; WANG, X.; SHI, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. **Nature**, vol. 408, no. 6815, p. 1008–1012, 2000. DOI 10.1038/35050012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35050012>.

XU, X.; LAI, Y.; HUA, Z.-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience reports**, vol. 39, no. 1, 31 Jan. 2019. DOI 10.1042/BSR20180992. Available at: <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20180992>.

YANG, Y.; CHEN, Y.; GUO, J.; LIU, H.; JU, H. A pore-forming protein-induced surface-enhanced Raman spectroscopic strategy for dynamic tracing of cell membrane repair. **iScience**, vol. 24, no. 9, p. 102980, 24 Sep. 2021. DOI 10.1016/j.isci.2021.102980. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.102980>.

YIN, L.; DUAN, J.-J.; BIAN, X.-W.; YU, S.-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast cancer research: BCR**, vol. 22, no. 1, p. 1–13, 9 Jun. 2020. DOI 10.1186/s13058-020-01296-5. Available at: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>. Accessed on: 31 May 2024.

ZAVALETA A.; NAVARRO J.; CASTRO DE LA MATA R. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, vol. 19, no. 6, p. 906–909, 1 Jan. 1981. DOI 10.1016/0041-0101(81)90090-8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90090-8](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(81)90090-8). Accessed on: 1 Jun. 2024.

ZHANG, D.; BERESFORD, P. J.; GREENBERG, A. H.; LIEBERMAN, J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 98, no. 10, p. 5746–5751, 8 May 2001. DOI 10.1073/pnas.101329598. Available at: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.101329598>.

ZHAO, N.; QIN, Y.; LIU, H.; CHENG, Z. Tumor-Targeting Peptides: Ligands for Molecular Imaging and Therapy. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, vol. 18, no. 1, p. 74–86, 2018. DOI 10.2174/1871520617666170419143459. Available at: <http://dx.doi.org/10.2174/1871520617666170419143459>.


**ANEXOS**

**ANEXO 1 - Artigo publicado como colaboradora**



## RESEARCH ARTICLE

# Proteomic analysis reveals stage-specific reprogrammed metabolism for the primary breast cancer cell lines MGSO-3 and MACL-1

Fabio Henrique Guimarães Braga<sup>1,2</sup> | Diana Paola Gómez-Mendoza<sup>1</sup> |  
Rafael Pereira Lemos<sup>1</sup> | Lucas Rodrigues-Ribeiro<sup>1</sup> | Brenda Raíssa-Oliveira<sup>1</sup> |  
Andréia Laura Prates Rodrigues<sup>2</sup> | Vladimir Gorshkov<sup>3</sup> | Frank Kjeldsen<sup>3</sup> |  
Jader Santos Cruz<sup>2</sup> | Thiago Verano-Braga<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

## Correspondence

Jader Santos Cruz, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

Email: [jcruz@ufmg.br](mailto:jcruz@ufmg.br)

Thiago Verano-Braga, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

Email: [tvbraga@ufmg.br](mailto:tvbraga@ufmg.br)

Fabio Henrique Guimarães Braga and Diana Paola Gómez-Mendoza contributed equally to this study.

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 309122/2019-8, 421021/2016-0, 312474/2017-2; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: FINANCECODE001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Number: APQ-03242-16

## Abstract

Breast cancer is the most prevalent cancer in women worldwide. Its molecular subtypes are based on the presence/absence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). MACL-1 and MGSO-3 are cell lines derived from primary tumor sites of patients diagnosed with luminal A subtype carcinoma (ER+/PR+/HER2-) and ductal carcinoma in situ (ER-/PR-/HER2+), respectively. However, these cell lines lost the expression of these markers over cell culturing, and both have triple-negative phenotypes (ER-/PR-/HER2-), which has the poorest prognosis. Here, we sought to study the proteome signature of MGSO-3 and MACL-1, comparing them with the epithelial cell line MCF-10A and the well-established metastatic-derived breast cancer cell line MDA-MB-231. Our results showed that proteins associated with the tricarboxylic acid cycle (TCA) and oxidative phosphorylation (OXPHOS) were upregulated in MGSO-3 and MACL-1 cells. These cell lines also showed upregulation of pro-apoptotic proteins when compared with MDA-MB-231. The molecular differences highlighted in this study may clarify the molecular basis behind cancer cells functioning and may reveal novel signatures across the breast cancer cell models.

## KEYWORDS

biomedicine, cancer, mass spectrometry – LC-MS/M, stable isotope labeling, technology

**Abbreviations:** ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PR, progesterone receptor; TCA, tricarboxylic acid cycle; TNBC, triple-negative breast cancer.

## 1 | INTRODUCTION

The Global Cancer Statistics estimated 2,261,419 new cases worldwide and 684,996 deaths in 2020 due to breast cancer [1]. An epidemiological paradox is currently seen as the mortality associated with the breast cancer is decreasing in the higher income countries while it is increasing in the low- and mid-income countries [2]. This phenomenon is attributed to early detection and state-of-the-art treatment for patients from the European Union and North America, for example, which seems to be lacking in South America, Africa, and Asia [2, 3].

Breast cancer is a heterogeneous disease that can be divided based on molecular profiles as triple negative [4] and others [5]. Triple-negative breast cancers (TNBCs) are represented by tumor cells lacking the expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2). TNBCs are aggressive, highly invasive, and difficult to treat as TNBC are refractory to most known treatments. Tumor resection combined with chemotherapy is the only available treatment, though prognosis is usually worse than other types of breast cancer [6].

At molecular level, cancer progression includes a cellular reprogram of the metabolic activities to overcome the uncontrolled growth, and poor oxygen and nutrients supplies in consequence of the tumor expansion. This metabolic reprogramming is regulated by the activation of oncogenic proteins and tumor suppressors such as hypoxia-inducible factor (HIF-1), Myc, p53, and PI3K/Akt/mTOR pathway [7]. Cancer cells undergo a metabolic shift that favors high rates of glycolysis and lactic acid fermentation even in the presence of sufficient oxygen (Warburg effect) that is ideal for energy production in a rapid pace [8]. Other alterations in cancer cells include high biosynthetic rates and increased levels of reactive oxygen species (ROS) to support the high bioenergetic demands of rapid and sustained proliferation [9–11].

Because of the complexity of the biochemical scenario of cancer cell metabolism, proteomic analysis has been used to map the molecular state of cell cultures lines, tissues and fluids [12–16], and the discovery of protein biomarkers for early detection and monitoring of cancer evolution and responses to therapeutic treatments [17–19].

Correa et al. [20] isolated and cultured cells derived from the primary site of two breast cancer patients from Brazil, and named them MACL-1 and MGSO-3 cell lines. Histological and genetic analyses of the tumor tissues shown that MACL-1 was originated from a luminal A subtype carcinoma (ER+/PR+/HER2-) while MGSO-3 was derived from a ductal carcinoma in situ (ER-/PR-/HER2+) but both cell lines lost these markers over cell culturing and they currently have a TNBC phenotype (ER-/PR-/HER2-) [21].

In this study, we sought to determine the proteome signature of MGSO-3 and MACL-1. We conducted a TMT-based proteome analysis of MGSO-3, MACL-1, the non-tumorigenic epithelial cells MCF-10A, and the well-established breast cancer cell line MDA-MB-231, originated from a metastatic site. We were able to provide a comprehensive proteomic map, quantifying most enzymes involved in the  $\beta$ -oxidation, tricarboxylic acid cycle (TCA), and oxidative phospho-

rylation (OXPHOS). Data suggest a negative regulation of the Warburg effect for MGSO-3 and MACL-1 cells.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Cell culture

MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, and MDA-MB-231 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with sodium bicarbonate 1.2 g/L, 10% bovine fetal serum (Cultilab) and 1% solution 5 mg/dl penicillin/streptomycin in saline 0.9%, at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After reaching a cell monolayer with >90% confluence, cells were washed three times with phosphate buffer (PBS), pH 7.4, subsequently washed with sterile saline solution three times. Four replicates of each cell type were harvested and collected in low-binding tubes (Eppendorf) in the presence of 1 ml of a solution containing protease inhibitor (mini EDTA-free complement, Roche). Samples were centrifuged at 3000×g for 5 min, the supernatant was removed, and the cells were kept at -70°C until further use.

### 2.2 | Cell lysis and protein digestion

Cell lysis, protein extraction, reduction, and alkylation of thiol groups were achieved in a single step essentially as previously described [22]. Briefly, 50  $\mu$ l of lysis buffer composed of urea 6 M; thiourea 2 M; tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) 10 mM; chloroacetamide 40 mM; and triethylammonium bicarbonate (TEAB) 20 mM was added to each sample. Tip sonication on ice bath was used to shear DNA filaments and enhance cell lysis. Then, the samples were incubated for 2 h at room temperature. Protein quantification was performed by fluorescent method (Qubit, Thermo). Samples were diluted 10 times with TEAB 20 mM and incubated (1:50 enzyme/protein ratio) with Lys-C (Wako) for 2 h at room temperature. Trypsin (Promega) was added (1:50 enzyme/protein ratio) and the samples were incubated for 16 h at room temperature. Reaction was quenched with TFA (final concentration of 1%), and the samples were desalted using C18 ZipTip Pipette Tips (Millipore) using the manufacturer's protocol. A sample reference pool was prepared by combining the same amount of peptides from each cell line used in this study. Samples were kept at -20°C until further use.

### 2.3 | Peptide labeling and sample pre-fractionation

The TMT 10plex (Thermo) was used to label 25  $\mu$ g from each experimental condition (MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-MB-231, and Samples' Pool) following the manufacturer's protocol. Samples were combined in equal amount and subjected to offline high-pH reverse-phase fractionation. Samples were resuspended in ammonium formate 20 mM (pH 10) and loaded in the Sep-Pak SPE (Waters) equilibrated

**TABLE 1** Top-scoring KEGG pathways related to the regulated datasets

KEGG term	Count	%	p-value	Adjusted p-value (Benjamini-Hochberg)
Ribosome	87	4.7	2.00E-38	5.40E-36
Spliceosome	65	3.5	6.30E-20	8.70E-18
Carbon metabolism	56	3.0	1.40E-17	1.30E-15
Protein processing in endoplasmic reticulum	69	3.7	6.10E-16	3.40E-14
Proteasome	31	1.7	1.90E-15	8.70E-14
Citrate cycle (TCA cycle)	22	1.2	1.60E-11	5.50E-10
Ribosome biogenesis in eukaryotes	40	2.1	2.30E-11	7.10E-10
Oxidative phosphorylation	52	2.8	2.70E-11	7.40E-10
RNA transport	60	3.2	1.50E-10	3.50E-09
Biosynthesis of amino acids	33	1.8	1.90E-09	4.10E-08
Glycolysis/gluconeogenesis	28	1.5	4.10E-07	7.60E-06
Protein export	14	0.7	4.90E-06	8.40E-05
Valine, leucine, and isoleucine degradation	20	1.1	2.10E-05	3.30E-04
Pyruvate metabolism	18	1.0	2.60E-05	3.70E-04
Endocytosis	61	3.3	3.10E-05	4.30E-04
Metabolic pathways	230	12.3	4.60E-05	6.00E-04
Phagosome	41	2.2	1.40E-04	1.70E-03
Fatty acid degradation	17	0.9	2.10E-04	2.50E-03
Propanoate metabolism	13	0.7	3.70E-04	4.10E-03
Fatty acid metabolism	18	1.0	3.70E-04	4.10E-03
Vasopressin-regulated water reabsorption	17	0.9	3.90E-04	4.20E-03
DNA replication	15	0.8	4.10E-04	4.20E-03
mRNA surveillance pathway	27	1.4	6.40E-04	6.30E-03
NAFLD	38	2.0	1.40E-03	1.30E-02
2-Oxocarboxylic acid metabolism	9	0.5	1.70E-03	1.50E-02
Fatty acid elongation	11	0.6	2.10E-03	1.80E-02
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	20	1.1	3.00E-03	2.50E-02
RNA degradation	22	1.2	3.80E-03	3.10E-02

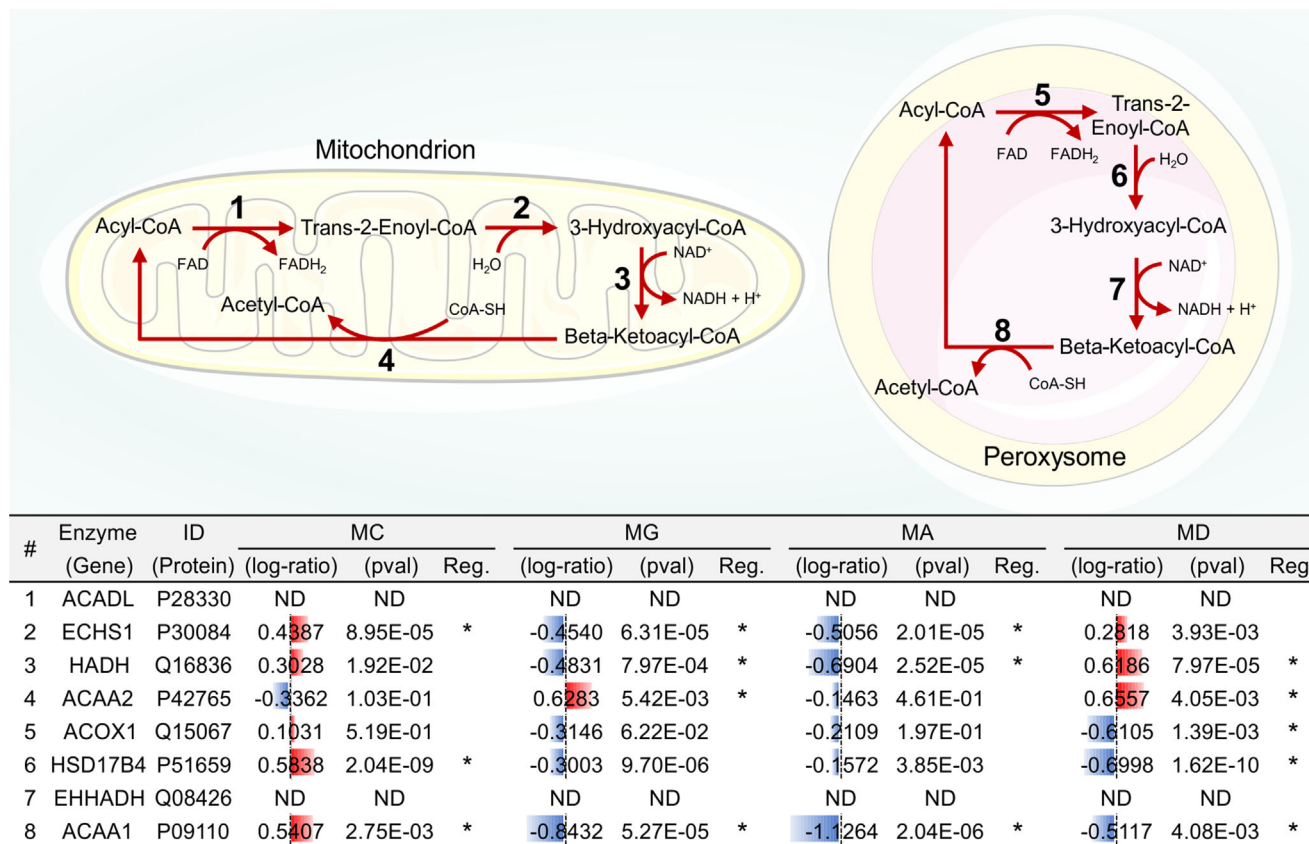
KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TCA, tricarboxylic acid cycle.

previously with ammonium formate 20 mM (pH 10). On-column samples were washed three times with ammonium formate 20 mM (pH 10). Samples were eluted with acetonitrile at 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27%, 30%, 50%, or 95% and collected in eight concatenated fractions. Samples were dried down using a vacuum centrifuge and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use (Figure S1A, Supporting Information).

## 2.4 | Mass spectrometry analysis

Samples were resuspended in 0.1% acid formic (solvent A) and loaded on a pre-column (3 cm long  $\times$  100  $\mu\text{m}$  inner diameter) packed with the resin Reprosil-Pur C18-AQ (5  $\mu\text{m}$  particle size) using the EasyLC HPLC system (Thermo) at 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Peptide separation was achieved in the analytical (20 cm long  $\times$  75  $\mu\text{m}$  inner diameter) reverse-phase column

packed with the resin Reprosil-Pur C18-AQ (3  $\mu\text{m}$  particle size) using the following gradient, expressed as the percentage (%) of solvent B (0.1% formic acid in 95% acetonitrile): (i) 1%–3% solvent B in 3 min, (ii) 3%–28% solvent B in 45 min, (iii) 28%–45% solvent B in 10 min, and (iv) 45%–100% solvent B in 3 min. The flow was kept constant at 0.25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Eluted peptides were analyzed online in the mass spectrometer Q-Exactive HF (Thermo). The instrument was operated in the positive polarity and in the data-dependent acquisition (DDA) mode. The peptide ions were accumulated until  $3 \times 10^6$  ions or 120 ms, and scanned out in the orbitrap using 120,000 resolution at  $m/z$  200 Th. The 20 most intense ions (Top20) were selected in the quadrupole ( $m/z$  1.2 Th isolation width) for HCD fragmentation (32% normalized collision energy). Fragment ions were accumulated for up to  $1 \times 10^5$  ions or 120 ms, and analyzed in the orbitrap using 60,000 resolution at  $m/z$  200 Th. Selected ions were included in the dynamic exclusion list for 15 s.



**FIGURE 1** Regulation profile of the proteins associated with the  $\beta$ -oxidation across the cell lines. Schematic representations of the  $\beta$ -oxidation pathways in mitochondria and peroxisomes (upper panel). Each number indicates a key enzyme involved with the represented reaction. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (\*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is ANOVA  $p$ -value  $< 0.05$ ,  $\log_2$ -ratio  $< -0.38$  (downregulated) or  $\log_2$  ratio  $> 0.38$  (upregulated). Reg., regulated; MC, MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG, MGSO-3 (cell line derived from primary breast carcinoma); MA, MACL-1 (cell line derived from primary breast carcinoma); MD, MDA-MB-231 (breast cancer cell line). ANOVA, analysis of variance; ND, not detected

## 2.5 | Statistical and bioinformatic analyses

Raw mass spectra were analyzed using the MaxQuant software (version 1.6.1.0). Proteins were identified by searching the experimental spectra against the human UniProt FASTA sequence database downloaded in June 2019 (26,468 entries). Error tolerance for first peptide search set at 20 ppm and main peptide search set at 4.5 ppm. Trypsin was selected as proteolytic enzyme allowing up to two missed cleavages. Carbamidomethyl (Cys) was defined as fixed modification. Oxidation (Met) and acetyl (N-terminal protein) were defined as variable modifications. Protein FDR was controlled at 1%. We only analyzed proteins quantified in the four technical replicates of all the four cell lines analyzed. Protein intensity has been transformed into  $\log_2$  and normalized using median values. We used one-way ANOVA test considering  $p < 0.05$  and 1.3-fold change ( $\pm 0.38 \log_2$  fold-change) to define regulated proteins among cell lines. The Volcano plots and the heat maps were done using the DanterR (<https://omics.pnl.gov/software/danter>). Venn diagrams were done using the BioVenn (<http://www.biovenn.nl>). Gene ontology was determined using DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) and the Cytoscape (<https://cytoscape.org/>).

Protein interaction maps were done using the String (<http://www.string-db.org>).

## 2.6 | Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [23] partner repository with the dataset identifier PXD028400.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 | Experimental design and proteome datasets

To characterize the molecular grounds of the carcinoma-derived primary cell lines MGSO-3 and MACL-1, we used a TMT-based proteomics and compared their proteomes with the proteome of normal epithelial cells (MCF-10A) and metastatic-derived breast cancer cell line (MDA-MB-231). We created a reference group (pool) composed

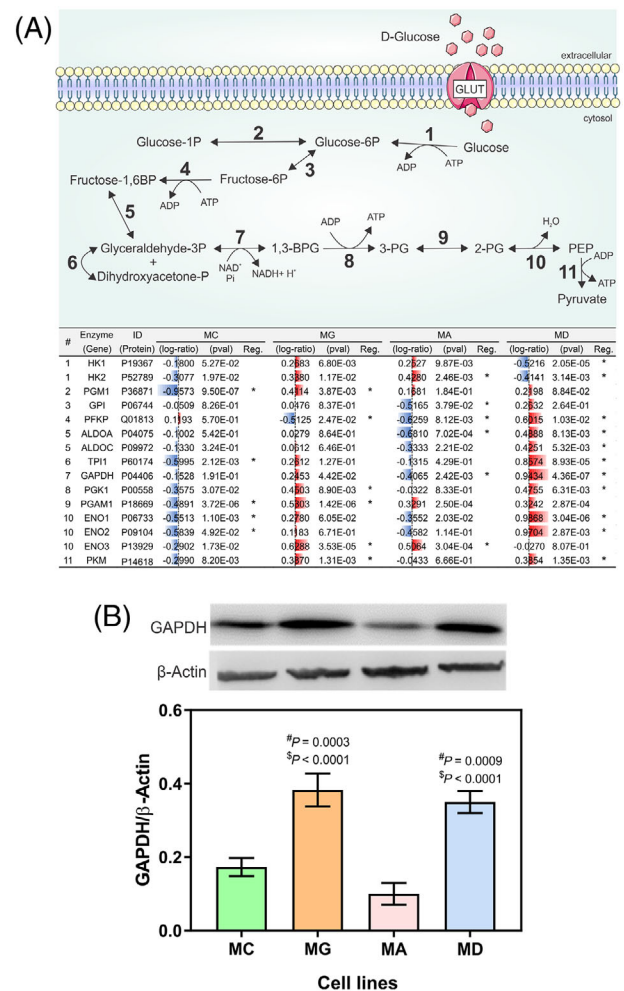
of equal peptide amounts from each cell line (Figure S1A, Supporting Information). As shown in the principal component analysis (PCA) plot, the pools' datasets grouped nicely in the center of the plot indicating that they indeed represent an equimolar protein composition from all four cell lines used in the study (Figure S1B, Supporting Information). It is also possible to observe that all four replicates from each cell line are in the same cluster in the PCA, indicating a good experimental reproducibility. MGSO-3 and MACL-1 clusters are closer in the PCA suggesting that these datasets are more similar with each other than with MDA-MB-231 or MCF-10A. The same conclusion can be drawn from the heat map (Figure S1C, Supporting Information) where it is possible to observe that the MACL-1 and MGSO-3 datasets were clustered together (column dendrogram). We believe that these results reflect the fact that we are comparing the proteome of two breast cancer cells derived from primary sites (MACL-1 and MGSO-3) with a metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231) and an epithelial cell line (MCF-10A). Figure S2 (Supporting Information) represents the distribution of the regulated proteins by means of volcano plots. All proteins quantified in this study are presented in Table S1 (Supporting Information).

### 3.2 | Pathway analysis highlights important proteins for the breast cancer cell metabolism

Table 1 represents the most confident KEGG terms associated with the regulated proteins. The number of terms with low *p*-values (high confidence) related with cell metabolism drawn our attention, and we decided to focus our analysis on them. The canonical energy metabolism terms that were the most associated with our datasets were "citrate cycle (TCA cycle)" (*p*-value = 1.60E-11), "OXPHOS" (*p*-value = 2.70E-11), "glycolysis/gluconeogenesis" (*p*-value = 4.10E-07), "fatty acid degradation" (*p*-value = 2.10E-04), and "fatty acid metabolism" (*p*-value = 3.70E-04). A list of all proteins associated with these KEGG terms, including their abundances across MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-MB-231 can be found in the Supporting Information (Figures S3–S7).

### 3.3 | Regulation profile of proteins associated with the fatty acid metabolism

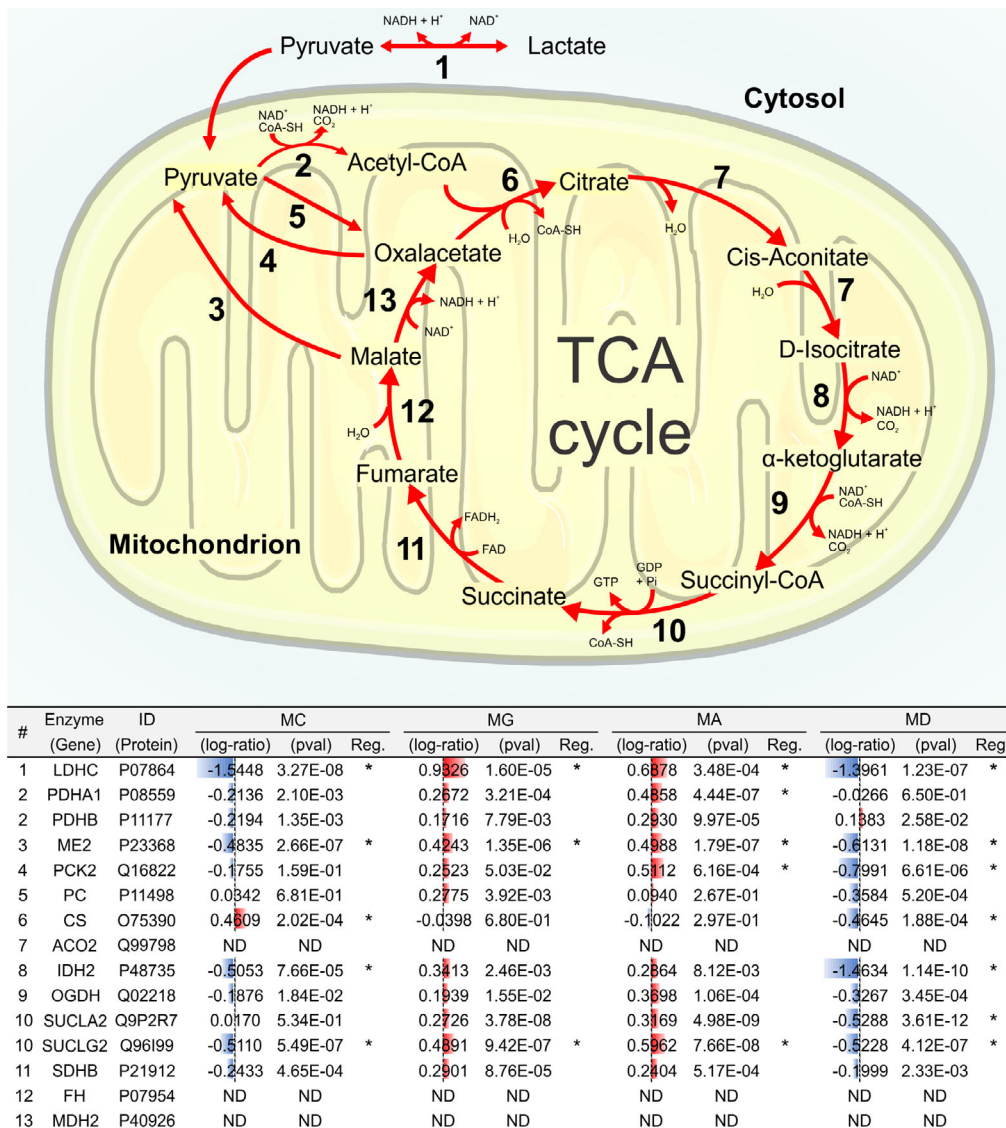
Proteins involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation were found differentially regulated in all cell lines used in this study (Figures S3 and S4, Supporting Information). We were able to quantify most key enzymes associated with the  $\beta$ -oxidation (Figure 1). Interestingly, we observed that most proteins involved in this process were downregulated in the primary breast cancer-derived cells MGSO-3 and MACL-1, while the opposite regulation profile was observed for the MDA-MB-231 proteins. An exception was observed for the carnitine *O*-palmitoyltransferase 2, mitochondrial (CPT2), which was observed upregulated in MGSO-3 and MACL-1 cell lines and downregulated in



**FIGURE 2** Regulation profile of the proteins associated with the glycolysis across the cell lines. (A) Schematic representations of the glycolysis pathways in the cytosol (upper panel). Each number indicates key enzyme(s) involved with the represented reaction. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (\*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is ANOVA *p*-value 0.05 and log2-ratio < -0.38 (downregulated) or log2 ratio > 0.38 (upregulated). (B) Validation of GAPDH abundance by western blot. Data are expressed as mean ± standard deviation (*n* = 3). ANOVA corrected with Tukey, # versus MC and \$ versus MA. Reg., regulated; MC, MCF10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG, MGSO-3 (cell line derived from primary breast carcinoma); MA, MACL-1 (cell line derived from primary breast carcinoma); MD, MDA-MB-231 (breast cancer cell line). ANOVA, analysis of variance; 1,3-BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate; 3-PG: 3phosphoglycerate

MDA-MB-231 (Table S1, Supporting Information). CPT2 is a component of the carnitine system, which is involved in the transport of fatty acids across mitochondrial membranes. Park et al. [24] have shown that CPT genes play an important role in TNBC tumorigenesis. CPT2 knock-out in MDA-MB-231 inhibited transwell migration and cell growth [24].



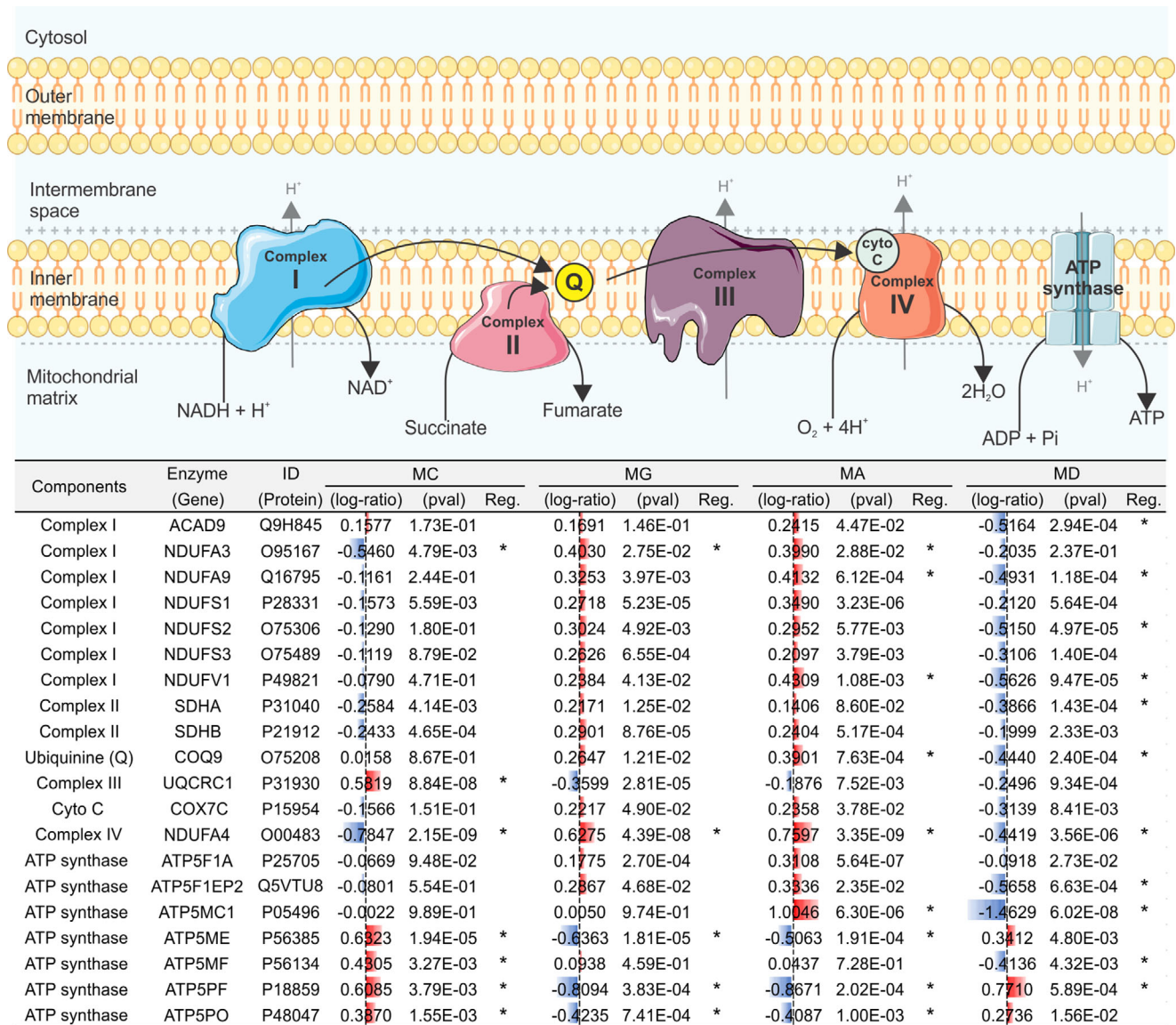


**FIGURE 3** Regulation profile of the proteins associated with the TCA cycle across the cell lines. Schematic representations of the pyruvate pathways and the citric acid cycle (upper panel). Each number indicates key enzyme(s) involved with the represented reaction. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (\*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is ANOVA  $p$ -value  $< 0.05$  and  $\log_2$ -ratio  $< -0.38$  (downregulated) or  $\log_2$  ratio  $> 0.38$  (upregulated). Reg., regulated; MC, MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG, MGSO-3 (cell line derived from primary breast carcinoma); MA, MACL-1 (cell line derived from primary breast carcinoma); MD, MDA-MB-231 (breast cancer cell line). ANOVA, analysis of variance; ND, not detected; TCA, tricarboxylic acid cycle

Dysregulation of lipid metabolism in cancer cells is one of the most studied phenomena since it is important to produce the needed building blocks for the synthesis of cholesterol, membrane lipoproteins, and as energy source [25]. During the reprogram of the bioenergetic metabolism in cancer cells the inhibition of lipid metabolism promotes cell survival in the tumor microenvironment by reducing fatty acid oxidation and ROS overproduction that correlates with proliferation, invasion, and metastatic potential [26, 27]. In this work, we observed the downregulation of enzymes associated with mitochondrial  $\beta$ -oxidation, which may suggest a more aggressive phenotype for MACL-1 and MGSO-3, which is in line with

previous reports showing that these cells have high proliferation rates [21].

Uptake of exogenous fatty acids released by cancer-associated adipocytes and de novo synthesis of fatty acids by cancer cells may have different roles in proliferation and malignancy capacities [25, 28–30]. A meta-analysis study based on transcriptomic data from different molecular phenotypes of breast cancer showed that TNBCs have higher expression of genes related to uptake and storage of exogenous fatty acids. In turn, less aggressive receptor-positive breast cancers have higher expression of genes related to de novo synthesis of fatty acids [25].



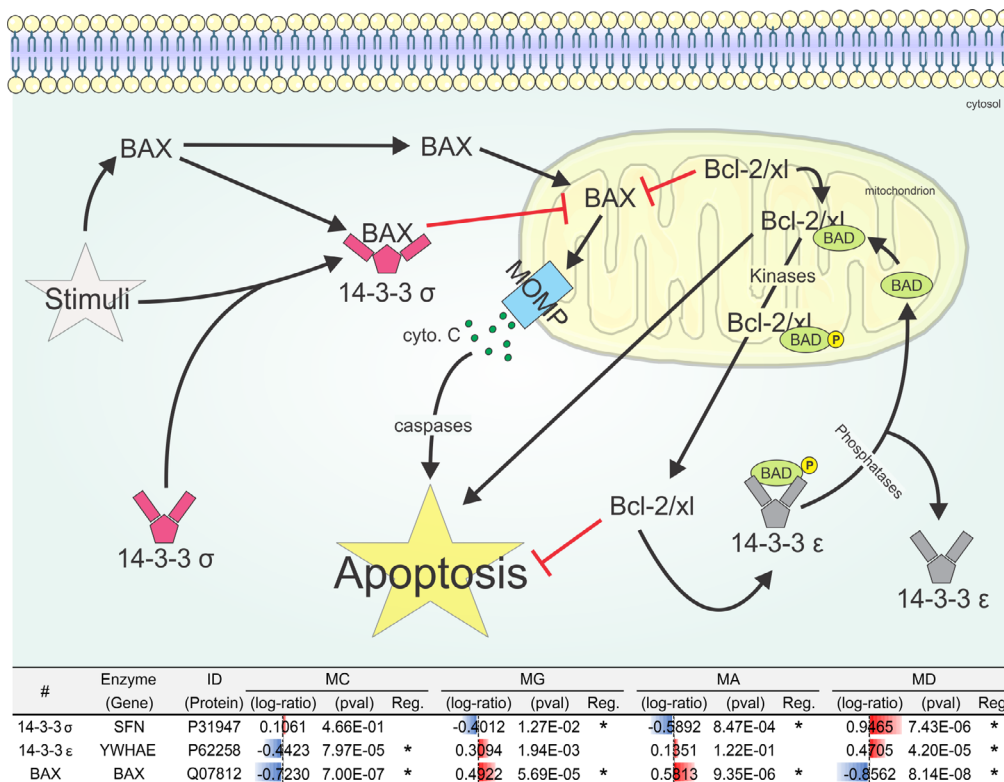
**FIGURE 4** Regulation profile of the proteins associated with OXPHOS across the cell lines. Schematic representations of the OXPHOS in mitochondria (upper panel). Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (\*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is ANOVA *p*-value < 0.05 and log2ratio < -0.38 (downregulated) or log2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg., regulated; MC, MCF-10A (nontumorigenic epithelial cells); MG, MGSO-3 (cell line derived from primary breast carcinoma); MA, MACL-1 (cell line derived from primary breast carcinoma); MD, MDA-MB-231 (breast cancer cell line). ANOVA, analysis of variance; OXPHOS, oxidative phosphorylation

### 3.4 | Regulation profile of proteins associated with the glucose metabolism

We mapped most key enzymes involved with glycolysis (Figure 2A), TCA (Figure 3), and OXPHOS (Figure 4). Regarding glycolysis (Figure 2A, and Figure S5, Supporting Information), most enzymes were found upregulated in the cancer cell lines but mainly in MGSO-3 and MDA-MB-231. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is an important enzyme with therapeutic potential since is involved in the production of NADH associated to several cellular processes crucial to cancer evolution and proposed as target in cancer therapy [7, 31] (Figure 2A, reaction # 7). This enzyme was found down-

regulated in MACL-1 and upregulated in MDA-MB-231, however, due to the stringent regulation criteria used in the study (*p*-value < 0.05; -0.38 < log2 fold-change > 0.38), GAPDH was not found significantly regulated in MGSO-3 (log2-ratio = 0.25; *p*-value = 0.04). Nonetheless, because of its relevance in cancer biology, we decided to validate the abundance of GAPDH across all cell lines by western blotting. Validation confirmed that GAPDH is less abundant in MCF-10A and MACL-1 (approximately two-fold) than in MDA-MB-231 and MGSO-3 (Figure 2B).

Pyruvate is produced in the end of glycolysis and its fate relies on oxygen availability. In anaerobic conditions, pyruvate is converted to lactate by lactate dehydrogenase (LDH), which is overexpressed in



**FIGURE 5** Regulation profile of the proteins associated with apoptosis across the cell lines. Schematic representations of BAX/Bcl-2-dependent apoptotic pathways (upper panel). Experimental quantitative information is provided in the table (lower panel). Asterisks (\*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is analysis of variance (ANOVA)  $p$ -value  $< 0.05$  and  $\log_2$ -ratio  $< -0.38$  (downregulated) or  $\log_2$  ratio  $> 0.38$  (upregulated). Reg., regulated; MC, MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG, MGSO-3 (cell line derived from primary breast carcinoma); MA, MACL-1 (cell line derived from primary breast carcinoma); MD, MDA-MB-231 (breast cancer cell line)

tumor cells to maintain the high glycolytic influx [32]. The L-lactate dehydrogenase C chain (LDHC) was found upregulated in MGSO-3 and MACL-1 and downregulated in MCF-10A and MDA-MB-231 (Figure 3, and Figure S5, Supporting Information). Several studies have shown an association between increased expression of glycolytic enzymes such as GAPDH and LDH with cancer progression and chemotherapy resistance [33–35].

In aerobic conditions, pyruvate is translocated to mitochondria where TCA and OXPHOS take place. As shown in Table 1, the KEGG terms “citrate cycle (TCA cycle)” and “OXPHOS” were significantly associated with the datasets ( $p$ -value =  $1.60E-11$  and  $p$ -value =  $2.70E-11$ , respectively). Indeed, as shown in Figure 3, several key enzymes from TCA were found upregulated in MGSO-3 and MACL-1. In contrast, only downregulated TCA enzymes were found in MDA-MB-231 (Figure 3, and Figure S6, Supporting Information). We believe that these alterations in the TCA cycle are a consequence of the reprogrammed metabolism in primary cancer cells, which makes them more sensible to TCA inhibitors, an alternative in the treatment of disease [36].

OXPHOS occurs in the mitochondrial inner membrane, and it is the final phase of aerobic catabolism. Most OXPHOS proteins from MGSO-3 and MACL-1 were found upregulated while for MDA-MB-231 these proteins were found downregulated (Figure 4, and Figure S7, Supporting Information). The proteomic data may suggest that aerobic

pathways (TCA cycle and OXPHOS) are more active in the cells derived from primary carcinomas (MGSO-3 and MACL-1) compared with the MDA-MB-231.

The Warburg effect is the metabolic shift of cancer cell basal metabolism from aerobic pathways (TCA and OXPHOS) to anaerobic pathways (glycolysis and fermentation) to produce energy at rapid rate, which is beneficial for highly proliferative cells [37, 38]. We observed several enzymes and protein complexes associated to the TCA cycle and OXPHOS upregulated in MGSO-3 and MACL-1 compared with MDA-MB-231, suggesting that MGSO-3 and MACL-1 cells favor aerobic means to produce energy (negative Warburg effect). It is important to stress, though, that we quantified protein abundances rather than protein activities. Thus, more experiments are required to validate our hypothesis that the mitochondrial respiration is increased in MGSO-3 and MACL-1 cells than in MDA-MB-231.

### 3.5 | Regulation profile of proteins associated with cell apoptosis

Impairment in the electron transport chain may lead to cell apoptosis [39], and proteins related to apoptosis were found regulated in our study (Figure 5). BAX is a pro-apoptotic protein encoded by the *Bax* gene. It belongs to the Bcl-2 protein family and participates in signaling



pathways associated with breast cancer. BAX inhibits the mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2, leading to cell death. BAX can translocate into mitochondria to induce the formation of the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMPs). MOMPs alter mitochondrial membrane permeability, which is a “point of no return” in apoptosis [40], as it releases cytochrome C into the cytosol leading to apoptosis via caspases activation. BAX have been reported to be involved in tumorigenesis, as BAX expression increases in primary cancer cells to then decreases in metastatic cells [41, 42]. The 14-3-3 is a family of adaptors that activates or inhibits cell proliferation and differentiation pathways. The 14-3-3 $\sigma$  is an anti-apoptotic agent as it inhibits BAX in the cytosol. On the other hand, the 14-3-3 $\epsilon$  is an apoptotic agent as it binds to the phosphorylated BAD, preventing the anti-apoptotic action of Bcl-2/xL. In this study, we observed BAX upregulated in MGSO-3 and MACL-1 and downregulated in MDA-MB-231 and MCF-10A. The anti-apoptotic protein 14-3-3 $\sigma$  was found downregulated in MGSO-3 and MACL-1 and upregulated in MDA-MB-231. The 14-3-3 $\epsilon$  was upregulated in MDA-MB-231 and downregulated in MCF-10A (Figure 5). Altogether, data suggest that apoptosis is more active in the primary cancer cells, as we observed BAX upregulated and 14-3-3 $\sigma$  downregulated in MGSO-3 and MACL-1 (Figure 5).

## 4 | CONCLUSION

Cell models for breast cancer have been extensively used in the search for molecular signatures of oncogenic mechanisms and tumor progression. We reported, for the first time, the proteome signature of breast cancer cell lines that have been isolated from the primary site of two Brazilian patients – which is important as it increases in number and genetic variability the available breast cancer cell lines. Importantly, their proteome data were made available for the scientific community seeking to compare them with others. In comparison with the metastatic cell line MDA-MB-231, the proteome of MGSO-3 and MACL-1 suggest that these cell lines have a metabolic adaptation corresponding to a negative regulation of the Warburg effect in addition to a pro-apoptotic status. Bearing in mind all the limitations that an in vitro study represents, including the use of four replicates ( $n = 4$ ) and four cell lines (MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, and MDA-MB-231), our data improves the current knowledge on these types of cell lines and may contribute to a better understanding of the breast cancer tumorigenesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the VILLUM Center for Bioanalytical Sciences and PRO-MS: Danish National Mass Spectrometry Platform for Functional Proteomics (grant no. 5072-00007B) for support to the infrastructure. This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) [grant numbers: 421021/2016-0, 309122/2019-8, 312474/2017-2], “Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais” (FAPEMIG) [grant number: APQ-03242-16, PES-00008-16, AUC-00056-15], and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) [FINANCE CODE 001].

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Thiago Verano-Braga  <https://orcid.org/0000-0002-7083-2588>

## REFERENCES

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
3. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
4. Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
5. Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
6. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
7. Abdel-Wahab, A. F., Mahmoud, W., & Al-Harizy, R. M. (2019). Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: Prospective of anti-glycolytic cancer therapy. *Pharmacological Research*, 150, 104511. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104511>
8. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
9. Munir, R., Lisec, J., Swinnen, J. V., & Zaidi, N. (2019). Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *British Journal of Cancer*, 120(12), 1090–1098. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0451-4>
10. Wang, Y., Xia, Y., & Lu, Z. (2018). Metabolic features of cancer cells. *Cancer Communications (Lond)*, 38(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0335-7>
11. Wang, K., Jiang, J., Lei, Y., Zhou, S., Wei, Y., & Huang, C. (2019). Targeting metabolic – redox circuits for cancer therapy. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(5), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.001>
12. Ding, Z., Wang, N., Ji, N., & Chen, Z. S. (2022). Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. *Molecular Cancer*, 21(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>
13. Nusinow, D. P., Szpyt, J., Ghandi, M., Rose, C. M., McDonald, E. R., Kalocsay, M., Jané-Valbuena, J., Gelfand, E., Schweppe, D. K., Jedrychowski, M., Golji, J., Porter, D. A., Rejtar, T., Wang, Y. K., Kryukov, G. V., Stegmeier, F., Erickson, B. K., Garraway, L. A., Sellers, W. R., & Gygi, S. P. (2020). Quantitative proteomics of the cancer cell line Encyclopedia. *Cell*, 180(2), 387–402.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.023>
14. Huang, A., Zhang, M., Li, T., & Qin, X. (2018). Serum proteomic analysis by tandem mass tags (TMT) based quantitative proteomics in gastric cancer patients. *Clinical Laboratory*, 64(5), 855–866. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.171129>

15. Hoshino, A., Kim, H. S., Bojmar, L., Gyan, K. E., Cioffi, M., Hernandez, J., Zambirinis, C. P., Rodrigues, G., Molina, H., Heissel, S., Mark, M. T., Steiner, L., Benito-Martin, A., Lucotti, S., Di Giannatale, A., Offer, K., Nakajima, M., Williams, C., Nogués, L., ... Lyden, D. (2020). Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell*, 182(4), 1044–1061.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.009>
16. Raffel, S., Klimmeck, D., Falcone, M., Demir, A., Pouya, A., Zeisberger, P., Lutz, C., Tinelli, M., Bischel, O., Bullinger, L., Thiede, C., Flörcken, A., Westermann, J., Ehninger, G., Ho, A. D., Müller-Tidow, C., Gu, Z., Herrmann, C., Krijgsveld, J., ... Hansson, J. (2020). Quantitative proteomics reveals specific metabolic features of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 136(13), 1507–1519. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003654>
17. Ryu, J., & Thomas, S. N. (2021). Quantitative mass spectrometry-based proteomics for biomarker development in ovarian cancer. *Molecules*, 26(9), 2674. <https://doi.org/10.3390/molecules26092674>
18. Wu, D., Zhang, P., Ma, J., Xu, J., Yang, L., Xu, W., Que, H., Chen, M., & Xu, H. (2019). Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric cancer. *Cancer Medicine*, 8(4), 1576–1583. <https://doi.org/10.1002/cam4.2055>
19. Krug, K., Jaehnig, E. J., Satpathy, S., Blumenberg, L., Karpova, A., Anurag, M., Miles, G., Mertins, P., Geffen, Y., Tang, L. C., Heiman, D. I., Cao, S., Maruvka, Y. E., Lei, J. T., Huang, C., Kothadia, R. B., Colaprico, A., Birger, C., Wang, J., ... Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. (2020). Proteogenomic landscape of breast cancer tumorigenesis and targeted therapy. *Cell*, 183(5), 1436–1456.e31 e1431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.036>
20. Correa, C. R., Bertollo, C. M., & Goes, A. M. (2009). Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncology Research*, 17(10), 473–482. <https://doi.org/10.3727/096504009789735404>
21. Corrêa, N. C. R., Kuasne, H., Faria, J. A. Q. A., Seixas, C. C. S., Santos, I. G. D., Abreu, F. B., Nonogaki, S., Rocha, R. M., Silva, G. A. B., Gobbi, H., Rogatto, S. R., Goes, A. M., & Gomes, D. A. (2013). Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors. *Oncology Research*, 29(4), 1299–1307. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2284>
22. Rodrigues-Ribeiro, L., Melo-Braga, M. N., Kjeldsen, F., Gómez-Mendoza, D. P., & Verano-Braga, T. (2019). Assessment of protein extraction and digestion efficiency of well-established shotgun protocols for heart proteomics. *Analytical Biochemistry*, 578, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.05.006>
23. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, Ş., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., ... Vizcaino, J. A. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>
24. Park, J. H., Vithayathil, S., Kumar, S., Sung, P.-L., Dobrolecki, L. E., Putluri, V., Bhat, V. B., Bhowmik, S. K., Gupta, V., Arora, K., Wu, D., Tsouko, E., Zhang, Y., Maity, S., Donti, T. R., Graham, B. H., Frigo, D. E., Coarfa, C., Yotnda, P., ... Kaiparettu, B. A. (2016). Fatty acid oxidation-driven src links mitochondrial energy reprogramming and oncogenic properties in triple-negative breast cancer. *Cell Reports*, 14(9), 2154–2165. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.004>
25. Monaco, M. E. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 8(17), 29487–29500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>[Crosse]
26. Jerby, L., Wolf, L., Denkert, C., Stein, G. Y., Hilvo, M., Oresic, M., Geiger, T., & Ruppin, E. (2012). Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Research*, 72(22), 5712–5720. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2215>
27. Smolková, K., Bellance, N., Scandurra, F., Génot, E., Gnaiger, E., Plecítá-Hlavatá, L., Ježek, P., & Rossignol, R. (2010). Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(1), 55–67. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9267-x>
28. Tang, K., Yu, Y., Zhu, L., Xu, P., Chen, J., Ma, J., Zhang, H., Fang, H., Sun, W., Zhou, L., Wei, K., Li, F., Lv, J., Xie, J., Liu, Y., & Huang, B. (2019). Hypoxia-reprogrammed tricarboxylic acid cycle promotes the growth of human breast tumorigenic cells. *Oncogene*, 38(44), 6970–6984. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0932-1>
29. Zaidi, N., Swinnen, J. V., & Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. *Cancer Research*, 72(15), 3709–3714. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4112>
30. Lucenay, K. S., Doostan, I., Karakas, C., Bui, T., Ding, Z., Mills, G. B., Hunt, K. K., & Keyomarsi, K. (2016). Cyclin E associates with the lipogenic enzyme ATP-citrate lyase to enable malignant growth of breast cancer cells. *Cancer Research*, 76(8), 2406–2418. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1646>
31. Ganapathy-Kanniappan, S., Kunjithapatham, R., & Geschwind, J. F. (2012). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A promising target for molecular therapy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 3(9), 940–953. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.623>
32. Shim, H., Dolde, B. C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6658–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>
33. Zhou, Y., Tozzi, F., Chen, J., Fan, F., Xia, L., Wang, J., Gao, G., Zhang, A., Xia, X., Brasher, H., Widger, W., Ellis, L. M., & Weihua, Z. (2012). Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Research*, 72(1), 304–314. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1674>
34. Yeh, C. S., Wang, J. Y., Chung, F. Y., Lee, S. C., Huang, M. Y., Kuo, C. W., Yang, M. J., & Lin, S. R. (2008). Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncology Research*, 19(1), 81–91.
35. Demarse, N. A., Ponnusamy, S., Spicer, E. K., Apohan, E., Baatz, J. E., Ogretmen, B., & Davies, C. (2009). Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 789–803. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.062>
36. Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G., & Feng, H. (2018). The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein & Cell*, 9(2), 216–237. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0451-1>
37. Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enriquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274(6), 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>
38. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
39. Kwong, J. Q., Henning, M. S., Starkov, A. A., & Manfredi, G. (2007). The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 179(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704059>
40. Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., & Green, D. R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation*, 13(8), 1396–1402. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963>
41. Jansson, A., & Sun, X. F. (2002). Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3), 811–816. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.811>

42. Eguchi, H., Suga, K., Saji, H., Toi, M., Nakachi, K., & Hayashi, S. I. (2000). Different expression patterns of Bcl-2 family genes in breast cancer by estrogen receptor status with special reference to pro-apoptotic Bak gene. *Cell Death & Differentiation*, 7(5), 439–446. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400675>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online <https://doi.org/10.1002/pmic.202200095> in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Braga, F. H. G., Gómez-Mendoza, D. P., Lemos, R. P., Rodrigues-Ribeiro, L., Raíssa-Oliveira, B., Rodrigues, A. L. P., Gorshkov, V., Kjeldsen, F., Cruz, J. S., & Verano-Braga, T. (2022). Proteomic analysis reveals stage-specific reprogramed metabolism for the primary breast cancer cell lines MGSO-3 and MACL-1. *Proteomics*, e2200095. <https://doi.org/10.1002/pmic.202200095>

**ANEXO II – Artigo publicado como primeira autora**

# Chapter 8

## Cardioproteomics: Insights on Cardiovascular Diseases



Brenda Raíssa-Oliveira, Ana Carolina Lara-Ribeiro, Júlia Rezende-Ribeiro, Ana Beatriz Queiroz Bahia, and Thiago Verano-Braga

### 8.1 Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) encompass a range of conditions, including coronary heart disease, cerebrovascular disease, and cardiomyopathies, among others. These diseases constitute a significant global health problem, ranking as the primary cause of mortality worldwide. To illustrate this problem, in 2019 only, CVDs were responsible for a staggering 18.56 million deaths, accounting for 33% of all global fatalities, as illustrated in Fig. 8.1a.

While high-income countries have made progress in reducing CVD-related mortality rates, lower-middle and upper-middle income countries are still experiencing an upward trend in such deaths (Fig. 8.1b). But it is worth noting that the COVID-19 pandemic had a significant effect on the cardiovascular health of populations worldwide, including those high-income countries. To illustrate, in 2020, the United States witnessed a notable increase in CVD-related deaths, making the 2019–2020 period the highest yearly rise, as reported in the recent report from the American Heart Association [1].

---

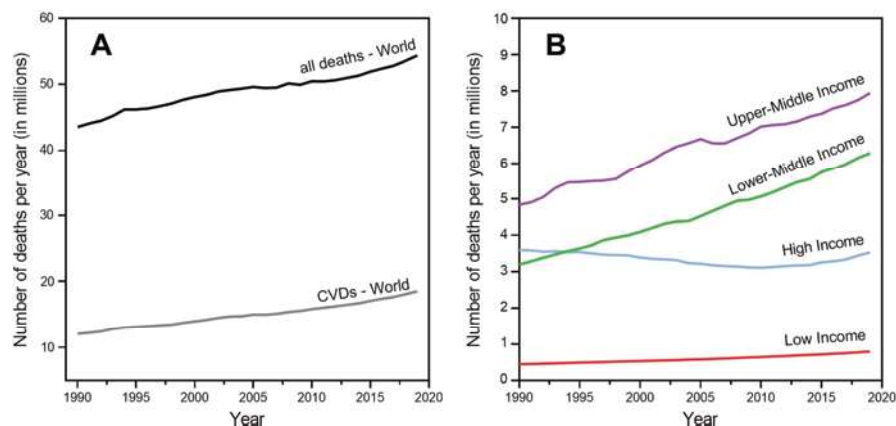
Brenda Raíssa-Oliveira and Ana Carolina Lara-Ribeiro contributed equally with all other contributors.

---

B. Raíssa-Oliveira · A. C. Lara-Ribeiro · J. Rezende-Ribeiro · A. B. Q. Bahia · T. Verano-Braga (✉)

Núcleo de Proteômica Funcional (NPF), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

INCT-Nanobiofar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil  
e-mail: [tvbraga@ufmg.br](mailto:tvbraga@ufmg.br)



**Fig. 8.1** Global burden of cardiovascular diseases (CVDs). (a) Noncumulative number of all deaths and CVD-related ones from 1990 to 2019 worldwide. (b) Noncumulative number of deaths due to CVDs from 1990 to 2019. Countries were grouped by the World Bank Data classification. (Data was retrieved from <https://ourworldindata.org/causes-of-death>)

Proteomics has proven its efficacy in the study of CVDs, offering valuable insights into the discovery of novel promising biomarkers, potential drug targets, and the broader pursuit of personalized medicine. In this review, our main objective was to spotlight key breakthroughs in the application of proteomics for the study of CVDs, with a specific emphasis on cardiomyopathy and ischemic heart diseases.

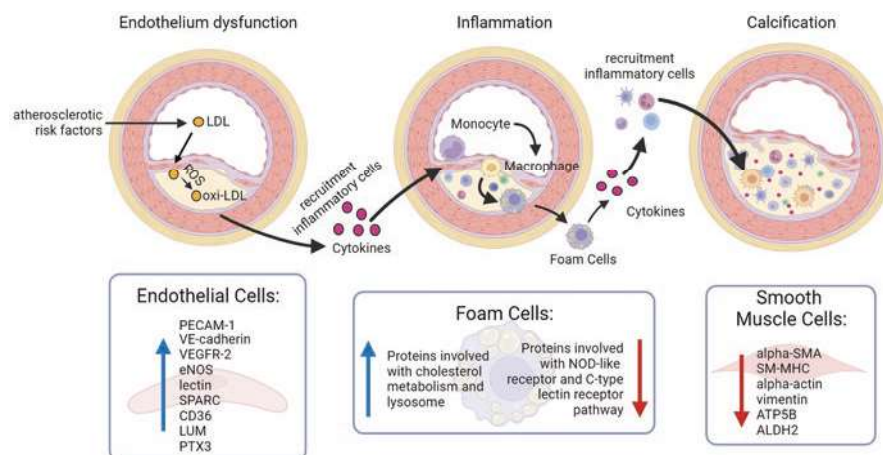
## 8.2 Atherosclerosis

Atherosclerosis is an artery intimal layer disease characterized by atherosclerotic plaque formation and its thickening which can progress for decades clinically silent. Atherosclerosis is involved in ischemic diseases such as coronary heart disease, cerebrovascular disease, and peripheral arterial disease. Myocardial infarction (MI) and stroke may occur as direct consequences of plaque rupture [2]. The main molecular and cellular aspects of the physiopathology of atherosclerosis are summarized in Fig. 8.2. Next, each step of the atherosclerotic plaque formation will be presented at the proteome level.

### 8.2.1 Endothelial Dysfunction

Since it is difficult to obtain ECs from patients to study the endothelial dysfunction, Tan et al. [5] sought to determine whether the proteome of circulating endothelial colony-forming cells (ECFCs), which can be isolated from blood samples, could be used to identify patients with endothelial dysfunction. The authors sampled blood from 11 young adults (55% women, aged  $27 \pm 5$  years) to isolated ECFCs. As





**Fig. 8.2** Atherosclerosis pathway. A representation of the atherosclerosis process, where various risk factors, including lipid deposition, hypertension, inflammatory factors, and hyperhomocysteinemia, contribute to endothelial dysfunction. This dysfunction increases endothelial permeability, facilitating the accumulation of LDL in the intima layer. Oxidized LDL (oxi-LDL) triggers the upregulation of MCP-1, IP10, VCAM, and ICAM-1 in endothelial cells (ECs), leading to the recruitment of circulating monocytes. Additionally, cytokines produced by ECs promote the recruitment of other inflammatory cells, such as dendritic cells, mast cells, and lymphocytes. In the vascular wall, monocytes transform into macrophages, absorbing oxidation-specific epitopes and forming macrophage foam cells. These foam cells exhibit upregulation of protein related to cholesterol metabolism and lysosomes while downregulating proteins from NOD-like receptor and C-type lectin receptor pathways. Macrophage foam cells release inflammatory signals, further promoting the recruitment of inflammatory cells and oxi-LDL formation. Smooth muscle cells (SMCs) also take up oxi-LDL via lipoprotein lipase (LPL) receptors, leading to the formation of muscle-derived foam cells. Cytokines produced by inflammatory cells in the intima may alter the phenotype of SMCs, converting them into synthetic SMCs with reduced contractility. Synthetic SMCs exhibit downregulation of alpha-SMA, SM-MHC, alpha-actin, vimentin, ATP5B, and ALDH2 and are associated with calcification development while inhibiting the regulation of mineralization molecules [3, 4]

reported, the proteome of dysfunctional ECFCs exhibited SPARC (approx. Ninefold increase), PTX3 (approx. Sixfold increase), LUM (approx. 21-fold increase), and CD36 (approx. 13-fold increase) when compared with the proteome of functional ECFCs, representing potential new markers for endothelial dysfunction that can be assessed in blood samples.

### 8.2.2 Inflammation

Macrophage foam cells undergo proteome changes. In 2003, a paper reported the identification of 37 proteins from the human monoblastic leukemia (U937) cell and macrophage-derived foam cell [5, 6]. More recently, Zhang et al. [7] used a TMT-based LC-MS/MS strategy to identify and quantify 5146 proteins in macrophage foam cells obtained in vitro after collecting human peripheral blood mononuclear

cells (PBMCs) from healthy young adult volunteers (aged 18–21 years old). The authors reported 182 regulated proteins when comparing the proteome of foam cells vs. macrophages. The upregulated proteins in foam cells (130 proteins) were mainly associated with lipid transport and response to LDL particle (GO biological processes) and with glycosaminoglycan degradation and immune response (KEGG pathways).

Extracellular vesicles (EVs) secreted by macrophage foam cells may modulate the activity of smooth muscle cells (SMCs). A proteomic study of EVs isolated from blood collected from 50 individuals – 25 healthy subjects and 25 patients with atherosclerosis – revealed 269 proteins differentially regulated in foam cell-derived EVs (FC-EVs) when compared with normal macrophage-derived EVs (NM-EVs). Regulated proteins are related to actin cytoskeleton regulation and focal adhesion pathways in vascular smooth muscle cells (VSMCs) [8].

### 8.2.3 *Calcification*

In atherosclerosis, cytokines secreted by inflammatory cells present in the intima may induce phenotype changes in VSMCs leading to synthetic phenotype (synthetic VSMCs) with loss of contractility, calcification, and arterial stiffness [9]. The change in phenotype implies a proteome regulation in affected vascular cells. For example, synthetic VSMCs possess downregulation of contractile proteins such as alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) and smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC). Using two-dimensional electrophoresis (2-DE) and LC-HRMS/MS, Viiri et al. [10] compared the proteome of VSMCs derived from carotid artery stenosis, obtained from plaque-derived intimal SMCs (AthSMCs), with control vascular cells, obtained from human medial thoracic aorta-derived SMC (AoSMC). The relative comparison of AthSMCs' and AoSMCs' proteomes by 2-DE led to the identification of 13 spots differentially regulated out of 84 spots analyzed by LC-HRMS/MS and successfully identified after search in protein database. Since inflammation is the driven force for VSMCs' phenotype change (Fig. 8.2), the authors treated AoSMCs with TNF $\alpha$  and observed the intensity reduction of actin-related spots in 2D-GE, which is in line with the synthetic VSMCs' phenotype with loss of contractility. Furthermore, they reported the downregulation of ATP5B and ALDH2 in AthSMCs. ATP5B is a component of the ATP synthase catalytic core in the complex V of the electron transport chain, and ALDH2 plays an important role in the detoxication of reactive aldehydes. AthSMCs presented increased levels of the over-oxidized form of peroxideroxin-4 (PRDX4), an antioxidant protein. The results suggested mitochondrial damage in AthSMCs, which was confirmed by a reduction in mitochondrial mass in AthSMCs, which was seen by the significant reduction in the citrate synthase activity in AthSMCs when compared with AoSMCs. Finally, the authors compared the AthSMCs' proteome from symptomatic (n = 6) and asymptomatic (n = 4) patients. They found annexin 1 (ANXA1), which is a potent anti-inflammatory agent, significantly increased in asymptomatic patients in



comparison with asymptomatic patients, and the use of ANXA1 receptor blockade or gene deletion leads to an increase in pro-inflammatory cytokine production in VSMCs, highlighting ANXA1 as a potential prognostic marker.

### 8.3 Coronary Artery Disease

In coronary artery disease (CAD), there is a disruption in the normal blood flow within the coronary arteries, resulting in inadequate oxygen delivery to the myocardium. This deficiency is primarily attributed to the occlusion of coronary arteries, typically caused by the development of atherosclerotic plaques. These atherosclerotic plaques can either increase in size or attain a stable state if no further damage occurs to the endothelium. Stable CAD presents fibrous cap formation, and the lesion may become calcified over time. Notably, in the serum of patients with stable CAD, certain proteins associated with cholesterol metabolism exhibit downregulation profiles. These proteins include apolipoprotein AI, apolipoprotein AIV, apolipoprotein VI, and the plasmatic protein albumin. This downregulation of cholesterol-related proteins in serum is an important aspect to consider when studying the pathophysiology and potential biomarkers of stable CAD [11].

Over time, atherosclerotic plaques can expand in size to a degree where they significantly hinder the blood flow to the myocardial tissue, particularly during periods of heightened demand (e.g., during physical exercises). This blockage in blood flow can give rise to the onset of angina symptoms. Ku et al. [12] conducted a cohort study in which they identified (by untargeted LC-HRMS/MS) and validated (by targeted LC-MRM/SRM) certain prognosis markers for stenosis in the coronary arteries. This study involved CAD patients, both symptomatic and asymptomatic, and control individuals, including or not individuals with diabetes mellitus in all groups. The authors reported APOC2, CXCL7, DOCK2, and VTDB upregulations and C4A downregulation as potential earlier markers for CVD in diabetes mellitus patients, LBP and VTDB downregulations as CAD biomarkers for non-diabetes mellitus individuals, and the upregulation of APOC2 and VTDB as subclinical biomarkers for CAD in diabetes mellitus patients.

#### 8.3.1 Myocardial Infarction

Another manifestation of CAD is called acute coronary syndrome (ACS). In ACS, it usually occurs the rupture of the atherosclerosis fibrous cap plaque resulting in thrombosis formation and coronary artery occlusion. It is classified as unstable angina, ST-elevation myocardial infarction (STEMI), and non-ST-elevation myocardial infarction (NSTEMI), according to the presence or absence of the elevation of ST segment in the electrocardiogram (ECG). Shin et al. [13] reported four potential protein biomarkers for ACS, including hemopexin (HPX), leucine-rich

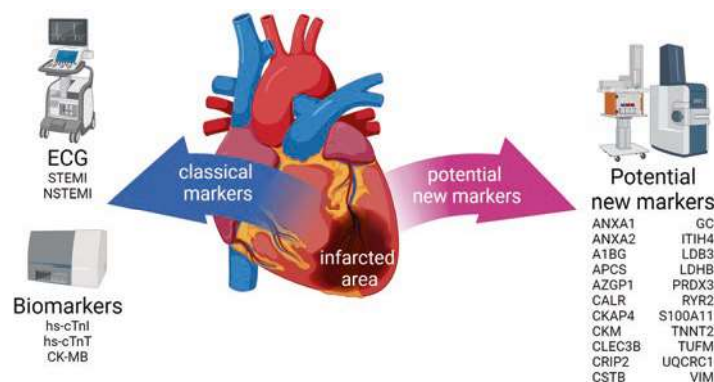
alpha-2-glycoprotein (LRG1), and vitronectin (VTN) upregulated, and fibronectin downregulated in ACS patients in comparison with healthy individuals.

Stable CAD possesses a proteome signature different from ACS, as demonstrated by Darder et al. [14] using 2D-DIGE and MALDI-MS. The authors reported new potential markers for ACS, including alpha-1-B-glycoprotein (A1BG), ficolin-3 (FCN3), serum amyloid P-component (APCS), tetranectin (CLEC3B), transthyretin (TTR), vitamin D-binding protein (GC), and zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1).

Mitochondria emerge as promising targets for both the identification and prevention of myocardial infarction (MI). These organelles play a critical role in determining cell fate when exposed to stress, particularly during ischemia-reperfusion events, where cells may undergo apoptosis due to inadequate oxygen and ATP supplies. When stress occurs, an influx of calcium into the mitochondria ensues, resulting in heightened cellular permeability, disruption of mitochondrial respiration, activation of the caspase signaling pathway, and ultimately cell death [15]. The significance of mitochondria extends beyond diagnosing tissue damage as they also present an intriguing target for cardioprotection. Analysis of the mitochondrial proteome has unveiled that ischemic preconditioning boosts the expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and the cardioprotective molecule PKC $\epsilon$ . These factors work in harmony to safeguard mitochondrial integrity [16]. Additionally, Chen et al. [17] have demonstrated that preconditioning triggers the phosphorylation of ALDH2, an enzyme known to reduce the size of ischemic injuries when activated. Remarkably, they identified an ALDH2 agonist, Alda-1, which mimics preconditioning and holds promise as a potential drug for MI prevention.

To gain deeper insights into the development of heart failure (HF) as a consequence of the deleterious progression of CVDs, including myocardial infarction (MI). Aboumsallem et al. [18] employed a multifaceted approach. They utilized three distinct mouse models – experimental transverse aortic constriction (TAC), experimental MI induced by ligation of the left anterior descending artery (LAD), and a transgenic animal with a phospholamban mutation (PLN-R14 $\Delta/\Delta$ ) – to then apply a comprehensive workflow encompassing both proteomics and transcriptomics to unravel the intricate molecular mechanisms at play in these cardiac conditions. The authors observed upregulation of proteins involved with “cell death” and “tissue repair-related pathways” and downregulated proteins associated with “ATP metabolism,” “energy derivation process,” and “fatty acid oxidation” in all three models. The authors used the gained knowledge with the murine models to evaluate potential plasma biomarkers for HF-induced rehospitalization and deaths to find ANXA1, CKAP4, CSTB, PRELP, and S100A11 and as interesting candidates [18].

Thus, ongoing research strives to identify novel effective and selective biomarkers for MI. In this context, proteomic analyses are highly valuable, capable of detecting even minor alterations in circulating components that can serve as predictive indicators of pathogenic events at very early stages. Figure 8.3 summarizes the current biomarkers available for MI (STEMI or NSTEMI) as well as the potential new biomarkers unveiled by proteomics papers cited before or in a recent review paper of this topic [19].



**Fig. 8.3** Biomarkers for coronary artery disease (CAD) and myocardial infarction (MI). The classical (current) markers for CAD and consequent MI are proteins found in the cardiac tissue that can be released in circulation during ischemia. Also, diagnosis relies on ECG to determine whether ischemia produces elevation of the ST segment (STEMI) or not (NSTEMI). Potential new biomarkers represented in the figure were identified by proteomics. Abbreviations: ECG, electrocardiogram; NSTEMI, non-ST-elevation myocardial infarction; STEMI, ST-elevation myocardial infarction

Our research group has recently published two papers unveiling promising findings related to cardioprotective peptides. In a 2019 publication, we explored the beneficial effects of angiotensin-(1–7), an endogenous peptide of the renin-angiotensin system (RAS), in an experimental model of myocardial infarction (MI). In brief, MI was induced surgically in rats through the occlusion of the left anterior descending coronary artery (LAD ligation). These rats received daily oral administration of angiotensin-(1–7) encapsulated in cyclodextrin for either 7 or 60 days, while control animals were treated with empty cyclodextrin. We conducted a comprehensive cardiac proteomic analysis using a TMT-based approach. Our research revealed the upregulation of CXCR4 following MI, and notably, the treatment with angiotensin-(1–7) led to a significant reduction in the abundance of this receptor for pro-inflammatory cytokines. This discovery identifies CXCR4 as a potential molecular target for MI treatment [20].

Furthermore, our investigation ventured into the potential cardioprotective properties concealed within scorpion venom. Specifically, we examined Ts14 (formerly known as TsHpt-I), a venom peptide originating from the yellow scorpion *Tityus serrulatus* [21, 22]. Ts14 undergoes extensive proteolysis within the venom gland, resulting in the generation of several cryptic peptides [23]. Intriguingly, one of these cryptic peptides exhibited properties indicative of cardioprotection. Our research involved a comprehensive analysis combining proteomics and phosphoproteomics to unveil its mode of action within cardiomyocytes isolated from the cardiac tissue of male mice. Notably, this peptide demonstrated the ability to activate the AKT/eNOS signaling pathway, a well-established player in cardioprotective mechanisms [24].

## 8.4 Cardiomyopathy

Cardiomyopathies are described as abnormalities of the myocardium, specifically in the tissue contraction (systole), relaxation (diastole), or both generating cardiac dysfunction. They are composed of genetic and nongenetic factors and can be classified into four categories: dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy, and arrhythmogenic cardiomyopathy [25–27].

The dysregulation of myocardial signaling due to mechanical stress can occur in a pressure overload and contribute directly to the development of cardiomyopathies. The altered biochemical signals together with neurohumoral activation, growth factors, and cytokines are converted into changes in gene and protein expression, being determinant for adverse cardiac remodeling [28].

Many protein groups can act like an initiator for the stimulus of cardiac tissue remodeling such as integrins [29], focal adhesions [30], extracellular matrix [31], sarcomere [32], and intercalated disc [33]. As the measurement of protein biomarkers gives important insights into the physiopathology of cardiac diseases, the “omics” technologies are extremely helpful tool in the study of pathways and in the discovery of new pharmacology targets and new biomarkers [34].

### 8.4.1 Hypertrophic Cardiomyopathy

Hypertrophic cardiomyopathy – also referred to as concentric hypertrophy – may be driven by increased afterload, heightened sympathetic activity within the heart, or genetic factors.

In the realm of preclinical research aimed at understanding hypertrophic cardiomyopathy, murine models treated with isoproterenol (ISO), a  $\beta$ -adrenergic agonist, provide a valuable avenue. Our research group harnessed this model to gain deeper insights into this disease. In summary, male mice underwent treatment with ISO ( $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  per day) for 7 days. Cardiomyocytes were subsequently isolated from the cardiac tissue of animals exposed to either ISO or saline solution (control group). Pathway analysis using differentially regulated cardiac proteins revealed that ISO-induced hypertrophic cells displayed a proteome consistent with the inhibition of “sirtuin signaling pathway” while concurrently activating both “actin cytoskeleton signaling” and “ILK signaling,” which may represent potential targets for therapeutic intervention. Furthermore, our study unveiled prospective early markers for hypertrophic cardiomyopathy, including APBB1, GOLGA4, HOOK1, KATNA1, KIFBP, MAN2B2, and SLC16A1 [35].

In a transcriptomic study, Cluntun et al. [36] treated H9c2 cells with phenylephrine, ISO, angiotensin II, and UK-5099. They observed an increase in MCT4 abundance and together with the hypertrophic profile. MCT4 is the main lactate exporter, with a pivotal role in tricarboxylic acid (TCA) cycle to finally produce ATP in the cardiac tissue. Due to the imbalance in ATP production, MCT4 has an important implication in cardiac hypertrophy. The authors also used a metabolomic approach