

Ângela das Neves Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL TERAPEUTICO DE GLÂNDULAS
VENENÍFERAS DE *ECTATOMMA OPACIVENTRE* PARA TERAPIA DE TUMORES DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do título de Mestre em Oncologia
Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez
Co – Orientador: Dr. André Lopes Carvalho

Barretos, SP
2019

Ângela das Neves Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL TERAPEUTICO DE GLÂNDULAS
VENENÍFERAS DE *ECTATOMMA OPACIVENTRE* PARA TERAPIA DE TUMORES DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do título de Mestre em Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez
Co – Orientador: Dr. André Lopes Carvalho

Barretos, SP
2019

O48i Oliveira, Ângela das Neves.

Identificação de proteínas terapêuticas de glândulas veneníferas de ectatomma opaciventre para terapia de tumores de cabeça e pescoço. / Ângela das Neves Oliveira. - Barretos, SP - 2019.

70 f. : il.

Orientador: Matias Eliseo Melendez.

Coorientador: André Lopes Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Câncer de cabeça e pescoço. 2. Veneno de formigas. 3. Ectatomma opaciventre. 4. Transcriptoma. 5. Antineoplásico. 6. Proteínas terapêuticas. I. Autor. II. Melendez, Matias Eliseo. III. Carvalho, André Lopes. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

“Esta dissertação (ou tese, se for o caso) foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo”.

Dedico este trabalho a meus pais, que me ensinaram entre tantas coisas na vida, a dar sempre o meu melhor no que eu me propuser a fazer.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Marta Emiliana Neves**, e à memória do meu pai **Graciano Rodrigues Oliveira**, que sempre foram exemplo de pessoas responsáveis, honestas e batalhadoras. Mãe muito obrigada pelos esforços que garantiram que eu tivesse condições para percorrer meu caminho nos estudos. Pai muito obrigada por desde muito pequena me incentivar a estudar.

À minha irmã **Graciele das Neves Oliveira**, ao meu noivo **José Guilherme Filatieri**, por todo apoio emocional, paciência e compreensão que tiveram comigo nos momentos de ausência.

À toda a minha **família**, por serem tão maravilhosos, torcerem pela minha felicidade e me divertirem nos almoços de domingos.

Ao meu orientador e pai científico, Dr. **Matias Eliseo Melendez**, por acreditar no meu trabalho e confiar no meu potencial. Obrigada por enxergar os seus alunos como pessoas, por ter a sensibilidade de perceber quando algo não está bem e se preocupar com o bem-estar. Muito obrigada por ser um orientador presente e por permitir meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Dr. **André Lopes Carvalho**, pela oportunidade e por abrir as portas do grupo de cabeça e pescoço, para que eu pudesse fazer parte.

Ao grupo de tumores de cabeça e pescoço, por todas as reuniões engrandecedoras. Em especial a Dra. **Lídia Maria Rebolho Arantes** e a Dra. **Ana Carolina de Carvalho** pela convivência quando dividíamos bancada e ensinamentos passados.

Ao Dr. **Rui Manuel Vieira Reis** e a Dra. **Anita Mitico Tanaka Azevedo** pela atenção e disponibilidade na condução das bancas de acompanhamento. Por todas as críticas e sugestões que fizeram com que esse trabalho fosse concluído.

À Dra. **Renata Santos Rodrigues** e ao **Lucas Ian Veloso**, pela colaboração e por cederem as glândulas das formigas, as quais em ausência não seria possível a realização desse estudo.

À **Elisa Messias** e à **Bruna Sorroche**, amigas que levarei para a vida. Muito obrigada por terem sido tão importantes nessa minha caminhada.

À Dra. **Viviane Aline Oliveira Saito**, por ser tão meiga e doce nos meus momentos de desespero, e sempre me mostrar uma maneira positiva de enxergar as coisas.

Às minhas amigas da vida, em especial a **Bruna Cavalcante** e **Ana Laura Alves**, pelos 18 anos de amizade, por serem minhas verdadeiras irmãs e estarem sempre comigo em todos os momentos importantes da minha vida.

À **Maria Laura Miño** e à **Ivanna Castro**, pessoas as quais tive o prazer de conhecer, graças ao mestrado e hoje formam uma extensão da minha família na Argentina.

Aos meus amigos do CPOM, em especial **Ana Laura Alves**, **Elisa Messias**, **Bruna Sorroche**, **Cíntia Ramos**, **Murilo Bonatelli**, **Izabela Faria**, **Marcela Nunes**, **Weder Menezes**, **Anna Luiza**, **Paula**, **Renata**, **Aline**, **Ariane**, **Rhafaela Causin** e **Rodrigo Cavagna**, pelos momentos de desabafos e risadas que fizeram desse mestrado uma fase fantástica da minha vida.

Ao **Lucas Scaccia** aluno de iniciação científica, os residentes **Pamella**, **Bruno**, **Emily**, **Tiago**, **Gabriela**, **José Guilherme**, **Lázaro**, **Aline Larissa**, **Kercy**, **Eduardo** e **Helder**, e visitantes observacionais **Lara**, **Mary**, **Harshita**, **Diana**, **Francesca**, **Safia**, **Ana Rubia**, **Larissa**, **Aline**, **Isabela** que me deram a oportunidade de aprender ensinando e compartilharam sobre a cultura de diversos lugares do Brasil e do mundo.

Aos biólogos do CPOM, em especial a **Karina Pepinelli**, **Leticia Braga**, Dr. **Renato José**, Ms. **André Lengert**. Por todo apoio técnico durante a execução das técnicas.

Ao Dr. **Leandro de Mattos**, bioinformata que nos auxiliou na realização das análises *in silico*.

À Dra. **Patrícia Vianna Bonini Palma** – USP por agradavelmente ceder o seu tempo e espaço para a realização do Single Cell Sorting.

Ao grupo de pesquisa em bioquímica da Dra. **Aparecida Tanaka** – UNIFESP, em especial ao **Ricardo**, **Verônica** e **Camila** que me receberam com todo o carinho no laboratório. Muito obrigada Dra. Cida, pela contribuição na construção do desenho científico.

Ao Coral Acordes vocais, o qual pude ter a honra de participar, graças ao mestrado, em especial **Danielle Pessoa, Raphael, Cristiane Oliveira, Wellington Santos, Renata Nóvoa e André Lengert**.

À **Cintia Perin**, por todo amor, carinho e abraços reconfortantes nos momentos difíceis.

Ao **CPOM** (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular), **EPIT** (Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica) e **Departamento de Pós-Graduação** e **Biblioteca** pelo excelente trabalho prestado, são vocês que fazem do Hospital de Câncer de Barretos um lugar incrível.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse concluído, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

“Eu aprendi que a coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo.”

Nelson Mandela

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer	1
1.1.1	Câncer de cabeça e pescoço	2
1.1.2	Principais tratamentos para o câncer de cabeça e pescoço	3
1.2	Toxinas com potenciais terapêuticos derivadas de animais	4
1.3	Formigas	4
1.3.1	<i>Ectatomma opaciventre</i>	5
1.3.2	Toxinas presentes no veneno de formigas	5
1.4	Proteínas relevantes para o estudo	7
2	JUSTIFICATIVA	8
3	OBJETIVO	9
3.1	Objetivo Geral	9
3.2	Objetivo Específicos	9
4	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	Obtenção do material biológico	11
4.2	Extração do RNA total	11
4.3	Obtenção do transcriptoma (RNA-Seq) e seleção dos genes terapêuticos	11
4.4	Clonagem molecular	12
4.4.1	Reação de transcriptase reversa	12
4.4.2	Desenho dos <i>primers</i> e amplificação dos fragmentos	12
4.4.3	Clonagem no plasmídeo de clonagem	14
4.4.4	<i>Screening</i> para a seleção do clone e confirmação por Sanger	14

4.4.5	Clonagem no plasmídeo de expressão	16
4.5	Produção das proteínas em meio condicionado	16
4.5.1	Transfecção	16
4.5.2	Produção do meio condicionado	17
4.5.3	Padronização de anticorpo para detecção das proteínas por <i>western blot</i> 17	
4.5.4	Transfecção estável e seleção dos clones de maior expressão.	18
4.5.5	Produção de meio condicionado e quantificação das proteínas	19
4.6	Ensaio celulares.....	20
4.6.1	Ensaio de viabilidade celular	20
4.6.2	Ensaio de migração	20
4.6.3	Avaliação de apoptose	21
4.6.4	Avaliação de dano e estresse biológico	22
4.6.5	Ensaio do ciclo celular	22
4.7	Análise estatística dos resultados	23
5	RESULTADOS	24
5.1	Análises <i>in silico</i>	24
5.2	Clonagem molecular	27
5.3	Validação da expressão das proteínas recombinantes por <i>western blot</i> e padronização do anticorpo.	29
5.4	Ensaio de viabilidade celular	31
5.5	Ensaio com transfecção constitutiva	32
5.5.1	Seleção dos clones	32
5.5.1.1	Clone Calcineurina B (CaNB)	32
5.5.1.2	<i>Three Finger toxin</i> (3FTx).....	33
5.5.1.3	Lisofosfolipase (lysoPL).....	34

5.5.1.4	Quitinase (CHI)	35
5.5.2	Quantificação das proteínas secretadas pela linhagem estável	35
5.5.3	Viabilidade Celular	37
5.5.4	Apoptose por citometria de fluxo	39
5.6	Ensaio transfeção transiente.....	41
5.6.1	Quantificação proteínas secretadas produção transiente.....	41
5.6.2	Ensaio de viabilidade celular	42
5.6.3	Avaliação da capacidade de migração	43
5.6.4	Identificação das principais vias de sinalização induzidas pelas proteínas nas linhagens tumorais.	45
6	Discussão.....	51
7	Conclusões.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gráfico de pizza, representando a distribuição dos casos e mortes em ambos os sexos no mundo. Globocan, 2018 (Adaptada). 1
- Figura 2** – Classificação proporcional dos principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2018. Excluindo pele não melanoma. INCA, 2017. 2
- Figura 3** – Formiga *Ectatomma opaciventre* em (A) vista frontal e (B) em vista lateral. Foto: Michael Branstetter (AntWeb, CASENT0106081). 5
- Figura 4** – Fluxograma com as etapas da pesquisa e locais onde foram realizadas. 10
- Figura 5** – Número de transcritos classificados pelo *Gene Ontology* com o *software Blast2GO*. Em verde os transcritos completos envolvidos em Processo Biológico (BP), em azul Funções Moleculares (FM) e em amarelo Componentes Celulares (CC) 25
- Figura 6** – Diagrama dos marcos de leitura (ORF: *Open Reading Frame*) dos genes selecionados. A flecha verde grossa indica o marco de leitura completo do transcrito. As flechas finas, indica a região utilizada como primer e as sequencias adicionadas, Kozak, peptídeo sinal e tag de 6 histidinas. 26
- Figura 7** – Eletroforese (agarose 1%). Amplificações dos fragmentos que codificam as proteínas. 27

- Figura 8** – Simulação in silico e eletroforese (agarose 1%) dos plasmídeos digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Nas canaletas 1 a simulação da migração do Ladder, nas canaletas 2 o padrão de bandas esperado de digestão. 28
- Figura 9** – Controle de transfecção na linhagem CHO-K1. Células lipofectadas com plasmídeo pGFP.C1, para avaliar a efetividade da técnica. Microscópio Nikon Eclipse Ts2R, objetiva 20x. A) Imagem de contraste de fase. B) Filtro FITC, para a visualização das células fluorescentes. 30
- Figura 10** – Análise da expressão de proteínas: *Western blotting* feito a partir de uma transfecção transiente dos plasmídeos pCl.Neo, pCl.Neo_lysoPL, pCl.Neo_3FTx, pCl.Neo_CaNB e pCl.Neo_CHI com lipofectamine 3000 (*Thermo Scientific*) na linhagem celular CHO-K1. 30
- Figura 11** – Ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas com o sobrenadante coletado das CHO_K1 transfectadas (transiente) com os plasmídeos construídos com os genes codificante de cada proteína. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$; (***) $P < 0,0001$. Test t de Student. 31
- Figura 12** – *Western Blotting* dos clones Calcineurin B. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (*Abcam* - ab18184) diluição 1:150. 32
- Figura 13** – Densitometria das bandas dos clones da CaNB. Nível de expressão proteica clones CaNB. 33
- Figura 14** – *Western Blotting* clones *Three Finger toxin*. Marcados com anti-6xHis-tag (*Abcam* - ab18184) diluição 1:150. 33

Figura 15 –	<i>Western blotting</i> clones Lisofosfolipase. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (<i>Abcam</i> - ab18184) 1:5000.	34
Figura 16 –	Densitometria das bandas dos clones da Lisofosfolipase. Nível de expressão proteica dos clones da Lisofosfolipase.	34
Figura 17 –	<i>Western Blotting</i> clones Chitinase. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (<i>Abcam</i> - ab213204) 1:5000.	35
Figura 18 –	Densitometria das bandas dos clones da Quitinase. Nível de expressão proteica dos clones da Quitinase.	35
Figura 19 –	Gráfico da curva padrão gerado pela quantificação por ELISA - kit <i>His Tag Detection</i> .	36
Figura 20 –	Análise do ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas por 48 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado dos clones das CHO-K1, produzindo cada uma das proteínas. (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$.	37
Figura 21 –	Análise do ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas por 72 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado dos clones das CHO-K1, produzindo cada uma das proteínas. (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$.	38

- Figura 22** – Análise de apoptose por citometria de fluxo. No eixo x é verificado intensidade de marcação por anexina e no eixo y a marcação por 7-AAD. Linhagem 93-VU-120T. 40
- Figura 23** – Análise de apoptose por citometria de fluxo. No eixo x é verificado intensidade de marcação por anexina e no eixo y a marcação por 7-AAD. Linhagem HCB289. 41
- Figura 24** – Análise da expressão de proteínas: *Western blotting* a partir de transfecção transiente dos plasmídeos pCIneo, pCI.Neo_CaNB, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_lysoPL, e pCI.Neo_CHI com Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) na linhagem celular CHO-K1. 42
- Figura 25** – Efeito do tratamento das proteínas na viabilidade celular de linhagens tumorais de cabeça e pescoço. Linhagens celulares comerciais e primária, tratadas por 72 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado das células CHO-K1 transfectadas transientemente, produzindo cada uma das proteínas. Os resultados foram expressos como a percentagem média \pm SD de células viáveis relativamente ao pCI.Neo (considerado 100% de viabilidade). (*) P valor significativo $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$. 43
- Figura 26** – Análise da capacidade de migração observado na linhagem HCB289, após 24 horas de tratamento. A esquerda imagens representativas dos insertos fotos documentadas pelo microscópio Olympus SC30 – BX43, contagem das células realizada pelo software ImageJ. A direita, gráfico da porcentagem de células migrantes, normalizadas pelo controle pCI.Neo. 44

- Figura 27** – Análise da capacidade de migração observado na linhagem UMSCC47, após 24 horas de tratamento. A esquerda imagens representativas dos insertos fotos documentadas pelo microscópio Olympus SC30 – BX43, contagem das células realizada pelo software ImageJ. A direita, gráfico da porcentagem de células migrantes, normalizadas pelo controle pCI.Neo. 44
- Figura 28** – Análise das vias de sinalização ativadas nas células UDSCC2, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina. 46
- Figura 29** – Análise das vias de sinalização ativadas nas células UMSCC47, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina. 47
- Figura 30** – Análise das vias de sinalização ativadas nas células SCC25, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina. 48

Figura 31 – Análise das vias de sinalização ativadas nas células HCB289, após 24 44 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes na biblioteca de cDNA.	13
Tabela 2 –	Anticorpos utilizado para as identificações das vias de sinalização.	23
Tabela 3 –	Genes selecionados no transcriptoma. Nome das dez proteínas e o tamanho do marco de leitura clonado.	26
Tabela 4 –	Quantificação de síntese das proteínas dos clones por ELISA	36
Tabela 5 –	Análise estatística de Test t do ensaio de MTS 48 horas. Test t realizado comparando cada clone das proteínas em relação ao controle pCl.Neo. P valor significativo menor que <0,05.	38
Tabela 6 –	Análise estatística de Test t do ensaio de MTS 72 horas. Test t realizado comparando cada clone das proteínas em relação ao controle pCl.Neo. P valor significativo menor que <0,05.	39
Tabela 7 –	Porcentagem de células marcadas pelo anticorpo Anexina e 7-AAD. Linhagem HCB289 tratadas durante 48 horas.	39
Tabela 8 –	Porcentagem de células marcadas pelo anticorpo Anexina e 7-AAD. Linhagem 93-VU-120T tratadas durante 48 horas.	40
Tabela 9 –	Quantificação proteínas a partir da transfecção transiente, 48 horas de produção.	41
Tabela10 -	Análise estatística de Test t, do ensaio de MTS 48 horas. Test t realizado comparando cada proteína (transfecção transiente) em relação ao controle pCl.Neo. Valores em negrito P valor significativo menor que <0,05.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
HPV	Vírus do Papiloma Humano
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
SAV	Veneno da formiga <i>Samsum</i>
CaNB	Calcineurina B
3FTx	Three finger toxin
lysoPL	Lisofosfolipase
CHI	Quitinase
CPOM	Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CO₂	Dióxido de carbono
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
PS	Penicilina / estreptomicina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
MTS	Ensaio de viabilidade celular
RNA-seq	RNA Sequencing
Nt	Nuclide
ORF	Open Reading Frame

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
α	Alfa
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
M	molar
%	Porcentagem
mA	Miliampere

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo mais frequente no mundo. A busca de potenciais alvos terapêuticos em recursos naturais, tem levado ao desenvolvimento de grande parte dos agentes antineoplásicos utilizados atualmente no tratamento desta doença. Com os avanços da tecnologia e a evolução de novos métodos de análises, o estudo de peçonhas está se tornando viável. **JUSTIFICATIVA:** Animais peçonhentos são excelentes reservatórios naturais de moléculas com ação terapêutica. Desta forma, as glândulas veneníferas de formigas, que possuem moléculas bioativas, tais como peptídeos/proteínas e alérgenos, que podem apresentar relevância terapêutica para a oncologia. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo é identificar potenciais proteínas terapêuticas expressas em glândulas veneníferas de formigas *Ectatomma opaciventre*, para o tratamento de tumores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para isso, foi realizado o RNA-Seq de glândulas veneníferas de *Ectatomma opaciventre*. A montagem *de novo* do transcriptoma de *E. opaciventre* com o software Velvet e Blast2GO Após a análise, foram selecionados 4 genes que codificam proteínas de interesse terapêutico, os quais foram clonados em vetores de expressão e transfectadas em CHO-K1, para sua posterior análise em células CECP, avaliando e caracterizando as vias de atividade das proteínas, por meio da análise de viabilidade celular, proliferação, apoptose e ciclo celular. **RESULTADOS:** Após a análise do transcriptoma, foram selecionados os transcritos completos com potencial interesse terapêutico (i) *Calcineurina B*, (ii) *Three finger toxin*, (iii) *Lisofosfolipase* e (iv) *Quitinase*. Além de modularem vias de sinalização, importantes compreendendo as proteínas, PARP, H2AX, AKT, ERK e p21. **CONCLUSÃO:** Essas características identificam as proteínas, como potenciais proteínas de interesse terapêutico.

Palavras chaves: Câncer de cabeça e pescoço; veneno de formigas; *Ectatomma opaciventre*; transcriptoma; antineoplásico; proteínas terapêuticas.

ABSTRACT

BACKGROUND: Head and neck cancer is the sixth most common cancer site worldwide. The pursuit for potential therapeutic targets in natural resources may lead to the development of new antineoplastic agents currently used in the treatment of this disease. Through advances in technology and new methods of analysis, the study of venoms is becoming feasible. **JUSTIFICATIVE:** Venomous animals can be excellent natural reservoirs of molecules with therapeutic action. Thus, venomous glands of ants, which have bioactive molecules, such as peptides/proteins and allergens, may have therapeutic relevance for oncology. **AIM:** The objective of the present study will be to identify potential therapeutic proteins expressed in venom glands of *Ectatomma opaciventre* ants, for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **MATERIAL AND METHODS:** For this, the RNA-Seq of venomous glands of *Ectatomma opaciventre* was performed. The reassembly of the *E. opaciventre* transcriptome with the Velvet and Blast2GO software. After the analysis, 4 genes encoding proteins of therapeutic interest were cloned into expression vectors and transfected into CHO-K1, for further analysis in CECP cells, evaluating and characterizing the pathways of protein activity, through cell viability analysis, proliferation, apoptosis and cell cycle. **RESULTS:** After the transcriptome analysis, the complete transcripts with potential therapeutic interest were selected: (i) *Calcineurina B*, (ii) *three finger toxin*, (iii) *Lisofosfolipase* and (iv) *Quitinase*. In addition to modulating important signaling pathways comprising proteins, PARP, H2AX, AKT, ERK and p21. **CONCLUSION:** These characteristics identify proteins as potential proteins of therapeutic interest.

Keywords: Head and neck cancer; ant venom; *Ectatomma opaciventre*; transcriptome; antineoplastic; proteins therapeutics.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Em 2018, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (do inglês: *International Agency for Research on Cancer - IARC*), apresentou estimativa de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo 17 milhões de novos casos excluindo pele não melanoma, e aproximadamente 9,6 milhões de óbitos¹.

No mundo, são registrados como os tipos de câncer mais frequentes em homens, o câncer de pulmão, próstata, intestino, estômago e fígado. Exibindo uma variação sobre os mais ocorrentes em mulheres que são mama, intestino, pulmão, colo do útero e estômago². Ao avaliar-se ambos os sexos, é notável a grande incidência de câncer de pulmão, seguido pelo câncer de mama, tumores colo retal, próstata e estomago. Nos dados sobre a mortalidade, em alguns tipos tumorais ocorre uma inversão na ordem em que aparecem, o câncer de pulmão permanece em primeiro lugar, mas é seguido pelo câncer colo retal, estomago, fígado e em quinta posição o câncer de mama (Figura 1)¹.

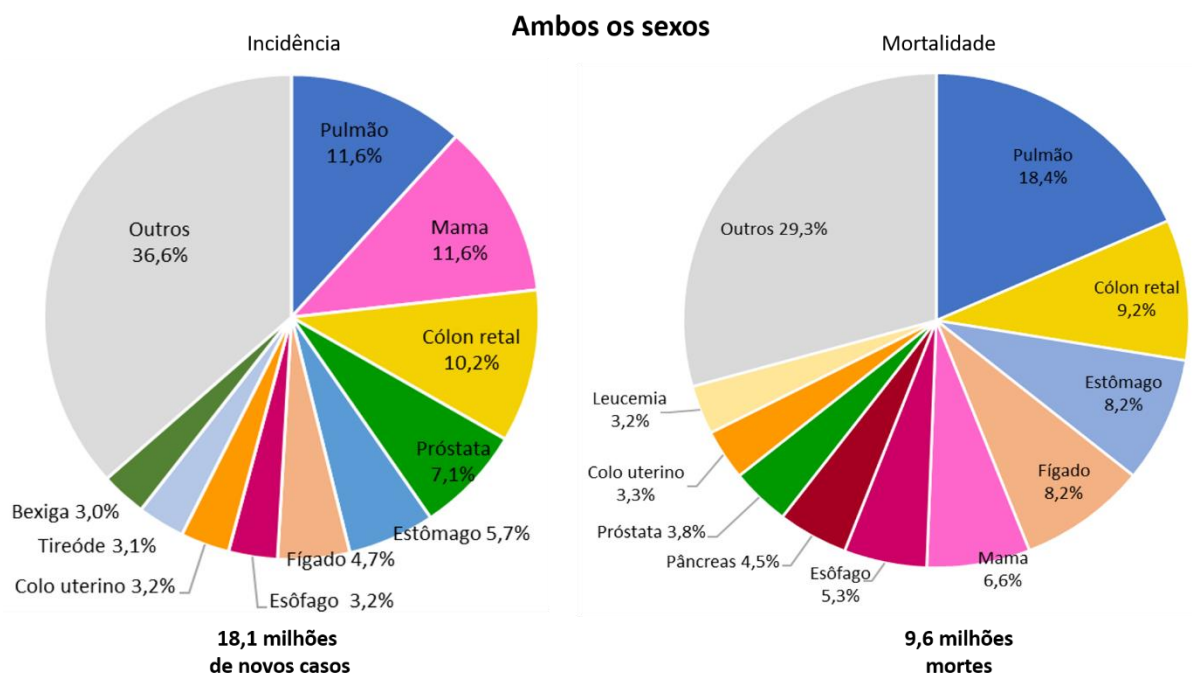


Figura 1 – Gráfico de pizza, representando a distribuição dos casos e mortes em ambos os sexos no mundo. Globocan, 2018 (Adaptada).

tireoide^{6,8}. A maioria desses tumores possuem a morfologia carcinoma das células escamosas epiteliais da mucosa^{7,8}.

Este tipo de câncer é o sexto mais frequente afetando aproximadamente 650 mil pessoas por ano, e sendo causa de óbito em 350 mil no mundo todo^{7,9,10}. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)⁴, para o ano de 2018-2019, principalmente na América Latina e Caribe assim como no Brasil, os tumores na cavidade oral em homens será o quinto mais comum, correspondendo a 5,2% do total. Em mulheres ele não aparece nos primeiros dez tipos, pois ocorrem cerca de 4 mil casos anuais⁴. Estudos sugerem que o tabaco, o etilismo e infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) são os principais fatores de risco para o canceres de cabeça e pescoço^{7,11,12}. O tratamento normalmente inclui a conciliação de ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e/ou quimioterapia¹³.

Considerando o aumento do número de casos de câncer no mundo, alternativas antitumorais que envolvem recursos naturais como toxinas secretadas por animais, vem sendo estudadas com maior profundidade¹⁴. Nos cânceres de cabeça e pescoço, a alta recorrência loco-regional ocorre devido à presença de zonas pré-neoplásicas não extraídas na resseção cirúrgica, por não estarem dentro da margem de segurança. Portanto, o controle local e regional da doença é responsável pela maior taxa de cura¹¹.

1.1.2 Principais tratamentos para o câncer de cabeça e pescoço

O tratamento ao qual o paciente com câncer de cabeça e pescoço será submetido, decorre de uma série de fatores relacionados à doença e, para realização, é necessário comum acordo entre o paciente e o médico. Entre os elementos avaliados para traçar os protocolos que serão aplicados, estão a localização do tumor primário, a possibilidade de preservação dos órgãos afetados, a performance na escala Zubrod (ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group), objetivo da terapia e estadiamento^{15 16}. Classificações em estadio inicial (I ou II), normalmente são curados com cirurgia ou radioterapia¹⁷. Pacientes com estadio avançado (III ou IV), o tratamento depende da avaliação uma equipe multidisciplinar, e envolve combinações de cirurgia, radioterapia e quimioterapia¹⁷. Também é usual a combinação entre platinas e taxanos, sendo docetaxel, platina e fluororacil a mais utilizada nas quimioterapias de indução^{17,18}.

Apesar dos diversos tratamentos existentes, uma grande parte dos pacientes não responde bem ao tratamento, e ocorre a progressão da doença. A exploração de novas

maneiras de inibição tumoral vem sendo alvo para muitas pesquisas. A busca por potenciais terapêuticos em recursos naturais, pode levar ao desenvolvimento de uma nova era de antineoplásicos, possíveis de menores efeitos adversos que os tratamentos atuais^{19, 20}.

1.2 Toxinas com potenciais terapêuticos derivadas de animais

A utilização de toxinas com potencial terapêutico tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Entre 1981 e 2014 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 175 moléculas para a formulação de medicamentos antineoplásicos, destas 49% foram extraídas ou derivadas de partir de fontes naturais²¹.

Diversos novos compostos, vindos de animais peçonhentos estão sendo testados em ensaios clínicos, devido à sua alta seletividade e às diferentes atividades fisiológicas^{15 21}. O veneno desse tipo de animais são substâncias complexas e potentes, que podem apresentar efeitos variados como, uma simples reação alérgica e dermatites, até graves hemorragias, coagulação intravascular, necrose, parada respiratória e morte²¹. Esses compostos bioativos interagem com receptores presentes em vertebrados e invertebrados, caracterizando-se como um modo interessante de desenvolver drogas terapêuticas para diferentes tipos de doenças¹⁵. São relatados nos ensaios clínicos melhora de algumas doenças, como diabetes, disfunção erétil, doenças autoimunes, hipertensão e outros problemas cardiovasculares. Exemplo de fármacos já aprovados pelo FDA são o ziconotide, aprovado em 2004 para o tratamento de dor crônica, derivado do veneno do gastrópode *Conus* spp. (Sorbeoconcha, Conidae), e o exenatide, derivado do veneno do lagarto *Heloderma suspectum* (Sauria, Helodermatidae), aprovado em 2005 para tratar diabetes tipo 2. Outro exemplo de fármaco, é o captopril, desenvolvido a partir de uma molécula isolada de veneno da cobra *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae), que atua inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA), uma enzima essencial para a produção de angiotensina, que é associada à hipertensão por vasoconstrição¹⁵.

1.3 Formigas

As formigas são insetos cosmopolitas com grande sucesso ecológico, são reconhecidas como as verdadeiras eusociais dentro de Hymenoptera, por possuírem as maiores taxas de derivações eusociais²². Acredita-se que esses organismos surgiram no período Cretáceo na era Mesozoica^{23, 24}, atualmente existem aproximadamente 10.000 espécies descritas²⁴.

Dentro da família Formicidae, a sub família Ectatomminae abrange quatro gêneros: *Ectatomma*, *Typhlomyrmex*, *Rhytidoponera* e *Gnamptogenys*, esses gêneros são divididos em 266 espécies que possuem hábitos de aninhamento no solo, serapilheira e arbustivo de floresta ²⁵.

1.3.1 *Ectatomma opaciventre*

Ectatomma opaciventre é uma espécie de formiga que compõe o gênero *Ectatomma* composto por 15 espécies identificadas até o momento, cujo veneno é pouco estudado. Essa espécie é encontrada tipicamente na região Neotropical comuns em climas secos, úmidos e savanas, em altitudes abaixo de 1.500 m²⁵. Entre as características físicas utilizadas para a identificação da espécie, pode-se citar o tamanho que é relativamente grande, coloração predominantemente castanho escura a preta, com funículo e patas na cor ferrugem, palpos marrom amarelados, tubérculo no dorso do pronoto, além de mesonoto e propódeo formando duas convexidades diferentes^{26, 27} (Figura 3). Essas formigas são predadores generalistas e oportunistas, sua dieta inclui diversos artrópodes, anelídeos e néctar extrafloral^{25, 28}. A composição proteica do veneno dessa espécie está sendo atualmente estudada pela nossa colaboradora Prof. Dra. Renata Santos Rodrigues (Universidade Federal de Uberlândia).

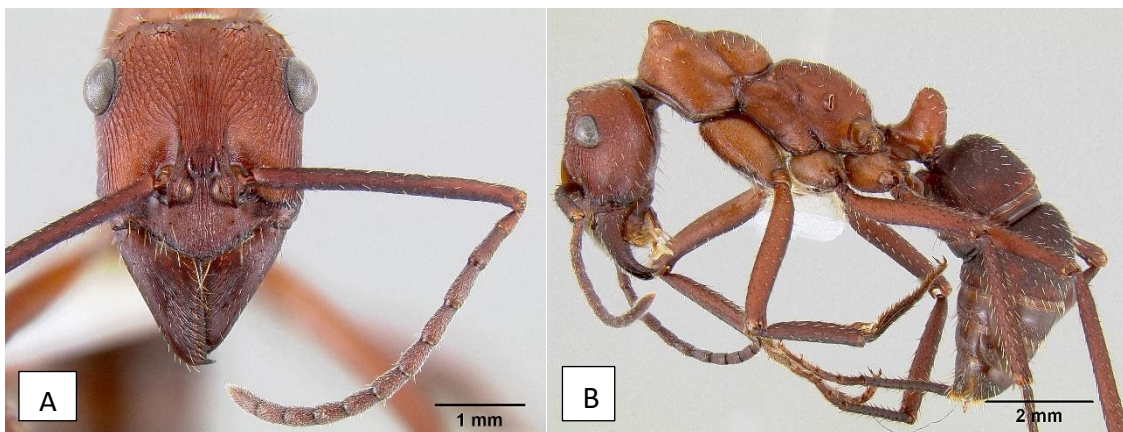


Figura 3 – Formiga *Ectatomma opaciventre* em (A) vista frontal e (B) em vista lateral. Foto: Michael Branstetter (AntWeb, CASENT0106081).

1.3.2 Toxinas presentes no veneno de formigas

O veneno produzido por formigas, é um recurso rico em moléculas bioativas que são secretadas com a finalidade de defesa e predação²⁹. A peçonha das formigas possui uma

grande e inexplorada fonte de proteínas e peptídeos, com funções farmacológicas pouco exploradas²⁹.

Do total de 9.000 espécies de formigas, que injetam secreções a partir de uma glândula venenífera, apenas 11 foram investigadas³⁰. Esse fato, deve-se à pouca quantidade de veneno que acarreta um pequeno rendimento ao trabalho³⁰. Entretanto com o avanço das técnicas venômicas e analíticas, essa área vem demonstrando as diferentes estruturas e funções das toxinas^{29, 30}.

Os venenos das formigas, possuem notável diferença entre venenos de outros animais²⁹. Além das proteínas bioativas, peptídeos ligados linearmente, diméricos e dissulfureto, estão presentes também compostos voláteis e não voláteis, como hidrocarbonetos, ácido fórmico e alcaloides^{29, 30}. Os peptídeos pequenos, normalmente apresentam menos que 35 resíduos, são lineares e desprovidos de pontes de dissulfeto²⁹.

Em um estudo realizado por Karlsson e colaboradores, foi avaliado o efeito antiproliferativo da Solenopsina A e de análogos sintetizados a partir de dimetilpiridinas, em seis diferentes linhagens A375, A2058, SVR, melanócito primário, queratinócito primário e HaCaT³¹. A Solenopsina A é componente alcaloide de piperidina presente no veneno da formiga *Solenopsis invicta*, e anteriormente já havia apresentado ação anti-angiogênica em células de carcinoma renais (786-O) deficientes de p53³¹. Ambos os análogos cis e trans da solenopsina diminuíram o consumo de oxigênio mitocondrial, aumentando o oxigênio reativo e matando assim as células tumorais com níveis elevados de fosforilação de Akt³¹. Entretanto, apenas a Solenopsina induziu a mitofagia³¹.

Badr e colaboradores, avaliaram o potencial antitumoral do veneno da formiga Samsun (SAV) *Pachycondyla sennaarensis*, em linhagens de câncer de mama MCF-7, em comparação com células epiteliais de mama sem tumor MCF-10 e células monocucleadas de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* - PBMCs) normais¹⁴. Em ambas as linhagens tratadas com o veneno da formiga SAV, durante intervalos de 6 a 48 horas, verificou-se que as células cancerígenas pararam de proliferar, enquanto as células normais não sofreram alteração na viabilidade, dado confirmado pela redução da fosforilação de AKT e ERK¹⁴. Os autores analisaram também, o impacto no ciclo celular por citometria de fluxo, e seu efeito nas vias de sinalização subjacentes de IGF-1, os resultados demonstraram que as células tratadas com o SAV apresentaram quatro vezes mais apoptoses que as não tratadas¹⁴.

Outro estudo, para avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo*, também com veneno de Samsun (SAV), foi demonstrado a diminuição significativa de interleucinas IL-1b e IL-6, a diminuição de fatores de transcrição como NF- κ B, I κ B, TNF- α , o que suspende a inflamação concomitante³². Foi verificado também o aumento da IL-10 e a indução do apoptose por meio de imunomodulação³². Esse estudo foi feito a partir da extração do veneno bruto de cerca de 2.500 exemplares da formiga, onde foram aplicadas em doses diferentes (0.1, 1, 10, 100 e 1000 ng/mL) em linhagens de tumores de mama, fígado e cólon³².

1.4 Proteínas relevantes para o estudo

Embora na literatura não tenha sido encontrado nenhum estudo sobre as proteínas selecionadas, específicas dessa espécie de formiga (o qual faz interessante o seu estudo), alguns artigos relatam a atividade de proteínas homologas, que podem possuir funções e complexidade semelhantes. O estudo pioneiro e a caracterização da atividade biológica de proteínas pouco exploradas, possibilita desvendar moléculas presentes abundantemente na natureza com grande potencial terapêutico.

Neste estudo, foi avaliado o potencial terapêutico de 4 genes identificados durante a análise do transcriptoma da glândula venenífera do artrópode *Ectatomma opaciventre*, amplificados e clonados em plasmídeos de expressão, para tratamento de tumores de cabeça e pescoço. Como será apresentado a continuação, nos resultados do transcriptoma foi identificado *(i)* uma Calcineurina B (CaNB) e *(ii)* uma proteína *Three finger toxin* (3FTx), *(iii)* uma Lisofosfolipase (lysoPL), *(iv)* uma Quitinase (CHI) descrito na literatura para transcritos homólogos.

2 JUSTIFICATIVA

Os tumores de cabeça e pescoço representam a sexta neoplasia mais frequente no mundo. Os pacientes portadores deste tipo tumoral apresentam uma sobrevida em cinco anos consideravelmente baixa. Faz-se, portanto, necessária a descoberta de novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos adversos para os pacientes.

Atualmente, cerca de metade dos medicamentos aprovados pelo FDA para o tratamento de câncer são moléculas modificadas ou derivados diretos de compostos naturais. Entretanto, a maioria desses fármacos é proveniente de plantas. Moléculas com ação antineoplásica derivadas de fontes animais ainda são pouco exploradas.

Com os avanços da tecnologia e a evolução de novos métodos de análises, o estudo de peçonhas, mesmo que secretado em pequena quantidade, está se tornando viável e reconhecido como uma fonte alternativa, com possíveis menores efeitos citotóxicos. Animais peçonhentos podem ser excelentes reservatórios naturais de moléculas com ação terapêutica, e devem receber uma atenção maior devido a potencialidade dessas peçonhas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Identificar proteínas com potencial terapêutico para tumores de cabeça e pescoço, expressas em glândulas veneníferas de *Ectatomma opaciventre*.

3.2 Objetivo Específicos

- I. Analisar o transcriptoma da glândula venenífera de *Ectatomma opaciventre*.
- II. Clonar em vetores de expressão as sequências codificantes para 4 (quatro) proteínas de interesse terapêutico.
- III. Analisar em cultura de células derivadas de tumores de cabeça e pescoço o efeito antineoplásico dos genes estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa foi desenvolvida no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII. As glândulas das formigas, foram obtidas a partir da colaboração com a Professora Doutora Renata Santos Rodrigues, pesquisadora do grupo de pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Toxinas em Animais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Para um melhor entendimento do trabalho, abaixo está esquematizado em um fluxograma as etapas da pesquisa, com distinção das partes desenvolvidas na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e no Hospital de Câncer de Barretos (Figura 4).

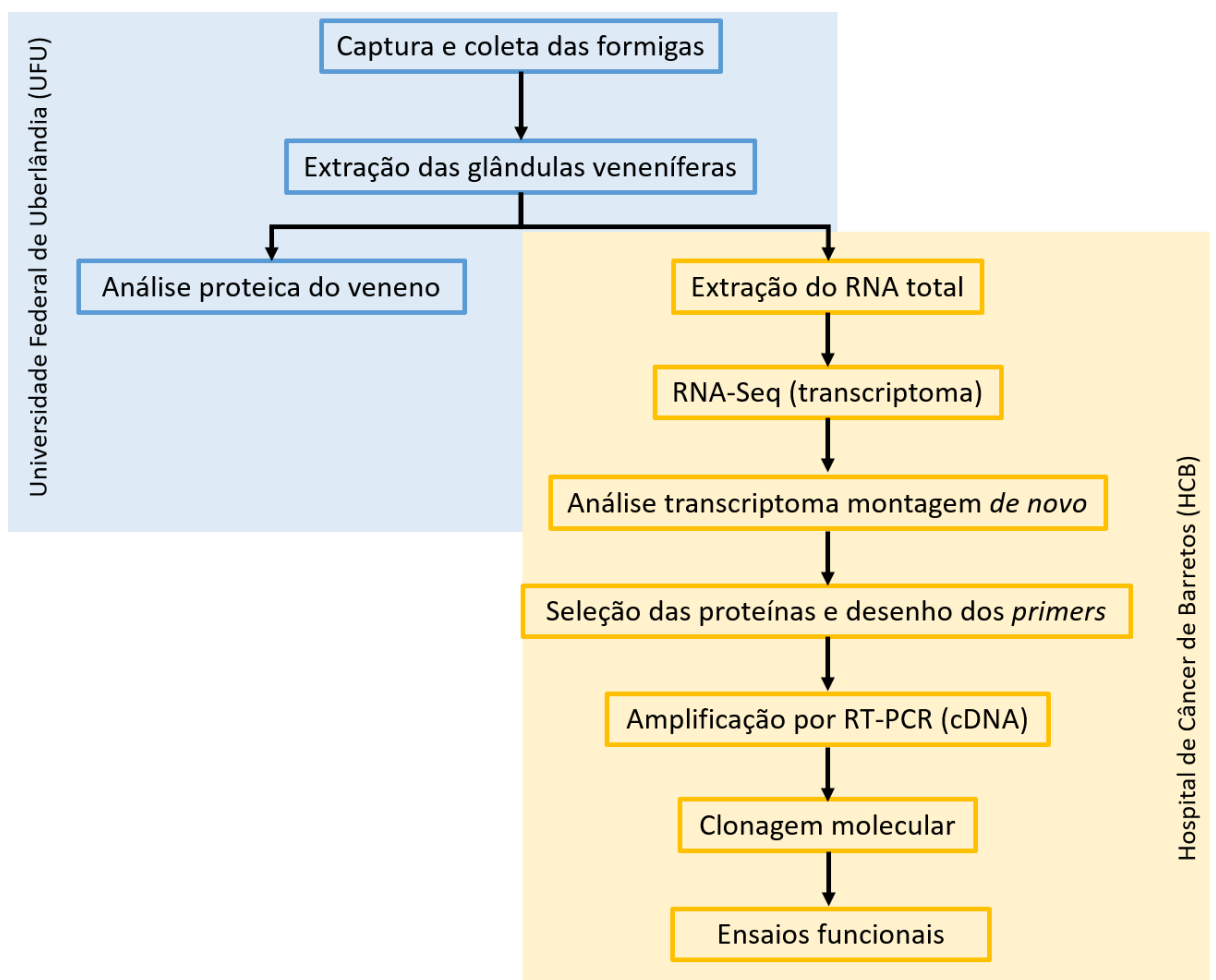


Figura 4 – Fluxograma com as etapas da pesquisa e locais onde foram realizadas.

4.1 Obtenção do material biológico

Foram capturados exemplares de formigas *Ectatomma opaciventre*, enquanto forrageavam a área de preservação no Campus da Universidade Federal de Uberlândia. Após a identificação taxonômica dos espécimes, foram extraídas as glândulas de dez formigas, entre as capturadas. Foram armazenadas cinco glândulas a -80°C . As glândulas foram fornecidas pela Dra. Renata Santos Rodrigues.

4.2 Extração do RNA total

As glândulas veneníferas foram cortadas em pedaços pequenos com auxílio de um bisturi. Depois colocadas em solução de proteinase K (*Bio Pur* – código 103840) para digestão tecidual. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo.

Para extração de RNA total, foi utilizado protocolo do RNeasy Mini Kit (*Qiagen*), que purifica RNA de células humanas ou animais. Foi adicionado ao sobrenadante, um tampão com alto teor salino contendo tianocianato de guanidina, essa substância por ser altamente desnaturante é responsável por bloquear a atividade das RNases, garantindo um RNA puro e íntegro. Foi adicionado etanol e, então, passado por uma membrana a base de sílica (*RNeasy silica membrane*) e centrifugado, o etanol condiciona de maneira adequada à ligação seletiva do RNA à membrana, que separa o RNA de todos os contaminantes. Para remoção de possíveis resíduos de DNA, foi usada uma coluna tratada com DNase. Após três ciclos de lavagens o RNA foi eluído em 30 μL de água milliQ. Esse kit oferece um enriquecimento de mRNA, pois a eficiência se dá pela purificação de moléculas acima 200 nucleotídeos, visto que a maioria dos RNAs são menores que 200 nucleotídeos.

A quantificação da amostra foi realizada no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), que permite obter medidas precisas da concentração do RNA, usando-se 1 μL do RNA total obtido na extração.

4.3 Obtenção do transcriptoma (RNA-Seq) e seleção dos genes terapêuticos

O transcriptoma do RNA extraído da glândula venenífera da *E. opaciventre* foi feito usando a plataforma *Illumina NextSeq 500* (76 pb) e *NextSeq 500/550 Mid Output v2 kit* (150 ciclos). A biblioteca foi construída usando *TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit* (*Illumina*), seguindo o protocolo *TruSeq Stranded mRNA Sample Prep HS* (*Illumina*).

A análise do transcriptoma foi realizada utilizando o programa Velvet³³, com base nos algoritmos do gráfico de Bruijn, para montar os contigs do transcriptoma. Em seguida foi feito um alinhamento com o programa Blastn do NCBI, do Blast+ suíte³⁴, para identificar os nomes dos genes ali presentes. Os transcritos completos, ou seja, aqueles que incluíam todo o marco de leitura, foram listados em uma planilha excel (Microsoft), esses genes foram classificados quanto a atividade de genes homólogos baseados em uma análise no Blas2GO³⁵, realizada pelo bioinformata Dr. Leandro de Mattos Pereira. Foram selecionados para a realização desse estudo 3 genes (*Calcineurin B*, *Three Finger* e *Lisofosfolipase*) que não possuíam um processo biológico bem definido e foi adicionado 1 gene (*Quitinase*) com propriedades bem descritas para a caracterização da atividade antitumoral. Os genes foram selecionados com a participação da Dra. Renata Santos Rodrigues, colaboradora ativa desse trabalho.

4.4 Clonagem molecular

4.4.1 Reação de transcriptase reversa

Para a obtenção da biblioteca de cDNA, foi realizada a reação de transcriptase reversa, a partir de uma concentração de 2 µg de RNA total, utilizado o protocolo do kit RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (*Thermo scientific*). Toda a superfície do fluxo laminar, bem como as pipetas foram higienizadas com RNaseZAP (*Invitrogen*), para garantir a total descontaminação de possíveis RNases. Foi adicionado ao RNA 4 µL de *5x React Buffer*, 0,5 µL *RNA inhibitor*, 2 µL de *dNTP* (10 mM), 1 µL *enzima Transcriptase* e 1 µL do *primer Oligo(dT)*. A reação foi incubada no termociclador Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) em um único ciclo de 42 °C durante 60 minutos e 70 °C por 10 minutos, segundo especificações do fabricante.

4.4.2 Desenho dos primers e amplificação dos fragmentos

Foram desenhados primers específicos para cada uma das proteínas selecionadas (Tabela 1). Para isso, foi utilizado uma sequência de ancoragem na extremidade 5' primer forward, com aproximadamente 19 a 23 nucleotídeos sendo terminado em sítios C ou G, para maior estabilidade do primer. Uma sequência de Kozak e um peptídeo sinal de exportação celular foram adicionados, afim de potencializar a expressão e secreção das proteínas sintetizadas, respectivamente. Utilizou-se o mesmo princípio para o desenho do primer

reverse extremidade 3', entretanto, foi incorporado um tag de Histidina (6xHis-tag), para auxiliar o reconhecimento da expressão das proteínas recombinantes.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes na biblioteca de cDNA.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>
Calcineurin Forward	CACCATGCGCCGCATGCAGCTGCTGCTGATTGCGCTGAGCC TGGCGCTGGTGACCAACAGCGGTAACAGGTCAAGTCTTC
Calcineurin Reverse	GTCCATAAGATTTCTTAGTCATCACCATCACCATCACTAG
<i>Three Finger</i> Forward	CACCATGCGCCGCATGCAGCTGCTGCTGATTGCGCTGAGCC TGGCGCTGGTGACCAACAGCCCGAATTTTCATGAAATGGC
<i>Three Finger</i> Reverse	CTAGGCATATCAAAGTTTCAACATCACCATCACCATCACTGA
Lisofosfolipase Forward	CACCATGCGCCGCATGCAGCTGCTGCTGATTGCGCTGAGCC TGGCGCTGGTGACCAACAGCGCGAGCGTAAAAATTTTGC
Lisofosfolipase Reverse	GGTTTTACCGATACATACACATCACCATCACCATCACTAG
Chitinase Forward	CACCATGCGCCGCATGCAGCTGCTGCTGATTGCGCTGAGCC TGGCGCTGGTGACCAACAGCGCCTCGAAACCGATCGTTTCG
Chitinase Reverse	CAACAGACAAAGCTTTTTTCATCACCATCACCATCACTAG

Os marcadores de leitura dos genes escolhidos foram amplificados por RT-PCR com os *primers* específicos (Tabela 1), utilizando a enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*). O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% para eletroforese e verificação dos fragmentos amplificados. As bandas amplificadas foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi e purificadas com o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*).

4.4.3 Clonagem no plasmídeo de clonagem

Os fragmentos purificados, foram clonados no plasmídeo de entrada comercial pCR-Blunt II TOPO (Thermo Scientific), utilizando 0,25 µL do vetor, 1 µL de salt solution (1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl₂) e 4,75 µL do inserto (fragmento purificado), para que a ligação ocorresse, após a homogeneização foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as ligações foram transformadas em bactérias *NEB*[®] *5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) (Promega)*. Para que o plasmídeo penetrasse na bactéria foram abertos poros na membrana por meio de choques térmicos, 30 minutos no gelo 30 segundos a 42 °C seguido de mais 2 minutos no gelo, após esse estresse as bactérias foram recuperadas em meio SOC e incubadas a 37 °C, em placas de meio ágar LB (*Invitrogen*) com Kanamicina (50 µg/mL), overnight para o crescimento dos clones.

Os clones isolados, foram selecionados e cultivados em meio LB líquido (*Invitrogen*) com Kanamicina (50 µg/mL), após o crescimento bacteriano, foi realizado a extração do DNA por meio da técnica de lise alcalina. Para essa extração foram utilizados reagentes preparados no laboratório. Primeiramente é feito uma alíquota de 1 mL com a suspensão de bactérias em meio LB, é aplicado uma centrifugação 14.000 rpm à 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet formado é ressuspendido em 200 µL de solução P1 (50 mM Tris HCl + 10 mM EDTA + 100 µg/mL RNase), adiciona-se 200 µL de solução P2 (SDS 10 %, NaOH 0,2 M) reagente responsável pela lise das bactérias, após uma incubação por 5 minutos, adicionar 200 µL P3 (Acetato de Potássio 3 M) que irá neutralizar o buffer de lise. É feita uma centrifugação nas mesmas condições citadas acima durante 15 minutos. Nesse passo, os restos celulares devem aderir no tubo e o sobrenadante contendo o DNA de interesse é transferido para um outro tubo para as etapas de purificação. É adicionado 600 µL de isopropanol, e centrifugado por 10 minutos, o DNA fica precipitado e o isopropanol é descartado, esse passo é repetido utilizando 500 µL de etanol 70 %. Após a evaporação do etanol, o DNA finalmente é eluído em 30 µL de água MilliQ.

4.4.4 *Screening* para a seleção do clone e confirmação por Sanger

Após a extração do DNA, os clones foram testados quanto a orientação de inserção do fragmento, com enzimas selecionadas para a digestão, baseadas na análise *in silico*.

Para o *screening*, foram selecionadas enzimas, que possuíam regiões de corte dentro do inserto, assim foi possível inferir se o fragmento havia sido ligado na direção *sense* ou na

direção *antisense* dentro do plasmídeo. Após essa digestão, foi feita uma eletroforese com gel de agarose 1% e selecionado um clone para a amplificação das bactérias, novamente em meio LB (*Invitrogen*) com Kanamicina (50 µg/ mL).

Depois da incubação overnight para o crescimento bacteriano, foi realizado a extração do DNA dessa vez com o kit *NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel)* que por meio de uma filtração em coluna a base de sílica, oferece uma maior pureza do DNA extraído. Foi feito um pellet das bactérias com uma centrifugação de 30 segundos sob a velocidade de 14.000 rpm, o sobrenadante foi eliminado por meio de inversão e adicionado 250 µL de buffer A1 para a ressuspensão do pellet das bactérias por vortex rigoroso. Foram adicionados 250 µL de tampão A2 (Hidróxido de sódio 0,5-2 %) para a lise, o tubo foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e, após o tempo de incubação, foi adicionado 250 µL do tampão de neutralização A3 (Cloridrato de guanidina 36-50 %). Posteriormente, todo o volume foi transferido para a coluna a base de sílica e centrifugado por 30 segundos. Foram realizadas duas lavagens com 500 µL do tampão AW (Hidróxido de sódio 0,5-2 % + 2-propanol 20-50 %), após as lavagens o DNA foi eluído com 30 µL água MilliQ.

A integridade das sequências codificantes foi verificada por sequenciamento sanger, por purificação por etanol e acetato de sódio no sequenciador *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Para cada plasmídeo utilizado foram feitas duas reações, em cada uma delas foi utilizado um *primer* para a verificação do fragmento completo em ambas orientações. Os *primers* utilizados foram: Seq_pCR2.1_F (5' TGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3') para sequenciamento *forward*, e o *primer* Seq_T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), para o sequenciamento *reverse*. Esses *primers*, possuem ancoragem em algumas bases anteriores as regiões de clonagem do plasmídeo pCR-Blunt II TOPO (*Thermo Scientific*), de modo a permitir a verificação total do fragmento, bem como a correta orientação e região de ligação no plasmídeo.

O protocolo utilizado já padronizado pelo grupo, seguiu primeiramente pela reação de sequenciamento com 0,5 µL *Big Dye*, 2 µL *Buffer de sequenciamento*, 1 µL de *primer* (3,2 M) e 200 ng de DNA plasmidial. Para a reação foi utilizado o termociclador Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) com temperaturas de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 4 minutos, em 30 ciclos. Após a ciclagem completada, foi iniciada a purificação onde a placa contendo as amostras, foi centrifugada 180 g por 1 minuto. Foi adicionado 25 µL de etanol 100 %, 1 µL de EDTA (125 mM), 1 µL acetato de sódio (3 M), homegeinizado por 2

minutos em agitador orbital e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, foi centrifugado a 2.000 g por 45 minutos, e o sobrenadante descartado por inversão imediatamente. Foram adicionados 35 µL de etanol 70 % e centrifugado por 15 minutos a 1.650 g o sobrenadante foi eliminado e a placa foi incubada por 15 minutos para a evaporação do etanol. A amostra foi ressuspensa em 10 µL de formamida *HiDye (ABI)* e levada ao termociclador para ciclo único de 5 minutos a 90 °C para a desnaturação do DNA.

Após o sequenciamento, foi feita a análise do eletroferograma por meio de alinhamento utilizando o *software* Clustal X³⁶, que compara a sequência montada *in silico* com a sequência gerada pelo sequenciamento de Sanger.

4.4.5 Clonagem no plasmídeo de expressão

Após confirmação por sequenciamento capilar, os genes recombinantes selecionados foram retirados do plasmídeo de entrada por meio de digestão com enzimas específicas para cada gene. Foi realizado uma eletroforese, as bandas com os fragmentos foram cortadas e purificadas, como já descrito anteriormente.

Os fragmentos foram subclonados no plasmídeo de expressão pCl.Neo (*Promega*), com a enzima modificação, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, onde foi utilizado 8 µL do inserto (DNA purificado da banda), 0,5 µL *enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific)*, 1 µL *buffer T4*, 0,5 µL vetor pCl.Neo. As etapas de transformação e seleção dos clones corretos (*screening*), foram idênticas ao item anterior, exceto pelo antibiótico utilizado, pois o plasmídeo pCl.Neo (*Promega*) confere resistência a Ampicilina (100 µg/mL).

4.5 Produção das proteínas em meio condicionado

4.5.1 Transfecção

Para a expressão das proteínas foi selecionada uma linhagem celular comumente utilizada para este fim. A linhagem celular CHO-K1 (ECACC – *European Collection of Authenticated Cell Cultures*) é uma linhagem retirada do tecido epitelial de ovário de hamster chinês. Por meio de lipofecção, foram transfectados os plasmídeos de expressão construídos com as sequências gênicas codificantes das proteínas selecionadas.

A linhagem CHO-K1 foi plaqueada 24 horas antes da transfecção, $5,8 \times 10^5$ células foram semeadas por poço em placa de 6 poços, devendo atingirem confluência celular entre 90-100 % no momento da transfecção. O protocolo seguido foi o recomendado pela empresa da

Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific), onde é aconselhado a otimização da reação para a transfecção de dois poços. Primeiramente identifica-se dois tubos, em cada um deles são adicionados 125 µL de meio de transfecção *Opti-MEM (Thermo Scientific)*. Em um dos tubos foram adicionados 10 µL de reagente *P3000 (Thermo Scientific)* e 8 µg do DNA de interesse. No outro tubo já contendo o meio de transfecção, a lipofectamine foi hidratada por 5 minutos. Após esse período de incubação os tubos foram combinados, *vortexados* por 3 segundos e incubados por 20 minutos para a formação das esferas lipossomais englobadas no DNA. Essa mistura foi gotejada sobre as células CHO-K1 plaqueadas anteriormente e levadas para a incubadora novamente.

4.5.2 Produção do meio condicionado

Após o período de incubação *overnight*, o meio de transfecção foi substituído por 2 mL por poço de meio *RPMI – 1640 Medium With L-Glutamine And Sodium Bicarbonate (Sigma Aldrich)* 1 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco – cód. 12657-029) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS) (*Sigma Aldrich* – cód. P4333) e mantidas em estufa de CO₂ (5 %), a 37 °C. Os sobrenadantes (meio condicionado) foram coletados 48 horas após a troca de meio e filtrados com filtro de 0,22 µm, para a retenção de restos celulares. Os meios condicionados foram aplicados e utilizados para o tratamento das linhagens de tumores de cabeça e pescoço, para verificar a atividade das proteínas secretadas.

4.5.3 Padronização de anticorpo para detecção das proteínas por *western blotting*

As proteínas secretadas pelas células CHO-K1 a partir da transfecção transiente foram extraídas com tampão de lise contendo 50 mM de Tris (pH 7,6-8,0), 150 mM NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de Na₃VO₄, 10 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio, 1% NP-40, e inibidores de proteases 10 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de aprotinina, 1 mM de DTT, 0,01 M de EDTA e 1 mM de PMSF. As células foram incubadas por 60 minutos no gelo e centrifugadas a 1.300 rpm, 4 °C por 15 minutos. O conteúdo proteico foi quantificado por Bradford Reagent (*Sigma Aldrich*), reagente utilizado para quantificar concentrações entre 0,1 a 1,4 mg/mL de proteínas, através de espectrofotometria.

A análise de *Western blotting* foi realizada utilizando um gel de SDS-PAGE (acrilamida/bis-acrilamida 29:1) em uma concentração de 15%, com espessura de 1,5 mm. Para a

padronização do anticorpo, bem como a concentração necessária de proteínas, foram feitas sucessivas incubações até encontrar as melhores condições para a marcação.

As amostras foram preparadas em *4x Laemmli Sample Buffer* com Betamercapto (*Bio RAD*) e desnaturadas por 5 minutos a 90 °C. A eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 2 horas. Após a eletroforese, as proteínas separadas por peso foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (*Amersham Protram supported 0,45 µm NC, GE Healthcare*) utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semi-seca por 4 horas, 70 mA. Após a transferência das bandas proteicas, a membrana de nitrocelulose foi incubada 1 hora em uma solução constituída de leite em pó sem gordura 5%+TBS-t, (Tris Buffered Saline, 10 mM de tris-HCl pH 7,4, 0,9% de NaCl, Tween 0,2%), a temperatura ambiente sob agitação leve e depois, lavada duas vezes em tampão TBS-t, por 5 minutos.

O anticorpo primário utilizado para a marcação das proteínas recombinantes foi o Anti-6xHis-tag (*Abcam – ab213204*), incubado a uma concentração de 1:5000 em leite em pó sem gordura 5%+TBS-t. O anticorpo secundário utilizado foi Anti-Mouse (*Cell Signaling*) sob diluição 1:2000. A detecção das bandas marcadas foi feita por quimioluminescência utilizando *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)* em diluição de 1:1 ou com *SuperSignal West Femto (Thermo Scientific - código 34096)*, e fotografadas posteriormente no *ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)*.

4.5.4 Transfecção estável e seleção dos clones de maior expressão.

Depois da confirmação da expressão das proteínas, iniciou-se o processo de estabelecimento de linhagem estável, produtora das proteínas. Foi feito uma lipofecção similar ao descrito no ponto **4.5.1**. Após 24 horas da transfecção, as células CHO-K1 começaram a ser selecionadas com o antibiótico G418 (*Sigma Aldrich*), a uma concentração de 0,5 mg/mL.

Após a morte completa do controle negativo de transfecção (células CHO-K1 não transfectadas com pCI.Neo, portanto sem resistência ao antibiótico), as células foram individualizadas através da técnica de *Single Cell Sorting* por citometria de fluxo (*BD FACS ARIA II*), essa técnica foi realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto na Universidade de São Paulo - USP, em colaboração com a pesquisadora Patrícia Vianna Bonini Palma. As células foram individualizadas em poços na placa de 96 poços, e cultivadas

em condições meio RPMI – 1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate (*Sigma Aldrich*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Gibco* – cód. 12657-029) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS) (*Sigma Aldrich* – cód. P4333). As células foram mantidas em atmosfera úmida, contendo de CO₂ (5 %), a 37 °C, até 90 % de confluência. As passagens foram realizadas com tripsina 0,25 % *Tryplex express* (*Gibco* – código. 12604021), quando as células atingiam confluência total da superfície plaqueada. As células que foram capazes de formar clones, e foram expandidas até uma garrafa T25 (*TPP*). Os clones foram cultivados sob constante seleção com antibiótico G418 (*Sigma Aldrich*) e analisados por *western blotting*, para identificação dos clones que apresentavam maior expressão das proteínas de interesse.

4.5.5 Produção de meio condicionado e quantificação das proteínas

Uma vez selecionados os clones com maior expressão de cada uma das proteínas, foi feito um plaqueamento de $2,5 \times 10^6$ de células em uma T25 (*TPP*). Para a quantificação foi reduzido a quantidade de soro fetal bovino no meio para 1 %, pois o protocolo sugere que seja minimizado a concentração de reagentes excessivos. O meio condicionado foi coletado e filtrado da maneira já descrita acima, para a eliminação de restos celulares ou possíveis células mortas.

A quantificação foi feita a partir do teste de imunoabsorção enzimática por ELISA competitivo, com o kit *His Tag ELISA Detection Kit* (*GenScript*), onde as proteínas contendo o Tag de histidina são os antígenos que se ligam no anticorpo aderido no poço do kit. Portanto o antígeno livre presente na amostra de meio condicionado, compete a ligação aos anticorpos com substancia adicionada no ensaio que possui o antígeno marcado com enzima. Os antígenos que não tiveram nenhuma ligação são removidos por um passo de lavagem e após a adição de um substrato da enzima, a atividade enzimática é medida.

Quanto maior a quantidade de antígeno presente na amostra, menor a quantidade de antígeno marcado, então, a atividade enzimática é inversamente proporcional a quantidade de antígeno presente na amostra.

Foi realizado uma cinética para verificar os índices de síntese das proteínas pelas células, para isso o sobrenadante foi coletado após 12 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o plaqueamento. Para a quantificação foi utilizado o *His Tag ELISA Detection Kit* (*GenScript*), o kit oferece alcance de detecção 1-729 ng/mL, e é capaz de detectar 4 x His /5 x His /6 x His.

4.6 Ensaios celulares

As linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço selecionadas para o estudo foram UDSCC2, SCC25, UMSCC47, VU147T, 93-VU120T, HCB289 e HCB289 ++ (aumento da expressão dos marcadores de células tronco tumorais CD44 e ALDH1), sendo essas duas últimas, linhagens primárias derivadas de tumor de cavidade oral estabelecidas no próprio laboratório (caracterização ainda não publicada). As linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Gibco* – cód. 12657-029) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS) (*Sigma Aldrich* – cód. P4333). As linhagens foram mantidas em atmosfera úmida, contendo de CO₂ (5%), a 37 °C, até 90% de confluência. As passagens foram realizadas com tripsina 0,25% *Tryplex express* (*Gibco* – código. 12604021), quando as células atingiam confluência total da superfície plaqueada. Para a realização dos experimentos todas as linhagens foram utilizadas entre terceira e quinta passagem.

4.6.1 Ensaios de viabilidade celular

Para determinar a diminuição da viabilidade celular, as células de tumores de cabeça e pescoço foram semeadas na concentração de 5×10^3 células em placas de 96 poços, em triplicatas. Essas células foram tratadas com o meio condicionado, produzido 48 horas antes a partir de transfecção transiente, como descrito no tópico 4.5.2.

A quantificação do número de células viáveis foi feita utilizando o corante MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]) (*Promega*) o composto é biorreduzido em tetrazólio, liberando uma coloração castanho-avermelhada. A leitura foi realizada 48 e 72 horas pós-tratamento, por absorbância, medida pelo *Varioskan Flash* (*Thermo Scientific*), um leitor de placa de ELISA, a 490nm. Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, no qual as células parentais foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. A análise foi feita por regressão não-linear, utilizando o programa *GraphPad Prism version 5.00* (*La Jolla California USA*).

4.6.2 Ensaio de migração

Para verificar se as proteínas possuíam capacidade de inibir a migração das linhagens tumorais. Em placa de 12 poços, foi adicionado 750 µL de meio DMEM 10% SFB e 1% PS,

dentro de cada poço foi colocado um inserto com poros de 0,8 μm e no interior do inserto foram semeadas 4×10^5 ressuspendidas em 500 μL do meio condicionado de cada uma das proteínas. As células tumorais possuem a capacidade de aderir a membrana do inserto e migrar, através dos poros para manterem o contato com o meio suplementado. Após 24 horas foram preparadas sucessivas placas de 12 poços para a lavagem, fixação e coloração dos insertos. Uma placa foi preparada com 500 μL de DPBS1X (*Sigma Aldrich*), uma outra com 500 μL de metanol (*Merck*) gelado, outra com 500 μL de hematoxilina (*EasyPath* – código C023271), e outra com 500 μL de eosina (*EasyPath* – código EP101061).

O meio condicionado foi removido de dentro dos insertos, e os mesmos lavados na placa de contendo DPBS1X (*Sigma Aldrich*) por 2 minutos, posteriormente foram adicionados ao metanol (*Merck*) por 2 minutos. Com o auxílio de um cotonete as células do interior do inserto foram removidas cuidadosamente. Os insertos foram então adicionados aos poços com hematoxilina por 5 minutos, lavados com água destilada, incubadas na eosina por 5 minutos, e lavadas novamente com água destilada. Para a evaporação total da água, no dia seguinte a membrana dos insertos foram removidas com o auxílio de um bisturi e colocadas entre lâminas e lamínulas com glicerol para a análise no microscópio. As imagens foram fotodocumentadas no microscópio confocal *Olympus SC30 – BX43* e analisadas pelo software ImageJ³⁷.

4.6.3 Avaliação de apoptose

A apoptose foi avaliada por duas metodologias, citometria de fluxo e por *western blotting*. Para a avaliação de apoptose, as linhagens celulares tumorais foram plaqueadas em placas de 6 poços em duplicatas.

Para o ensaio por citometria de fluxo, foram utilizadas 6×10^5 células por poço, das linhagens HCB289 e 93-VU120T. O sobrenadante das células após o tempo de tratamento foi recuperado em um tubo de citometria, juntamente com o DPBS1X (*Sigma Aldrich*) utilizado para a lavagem das células ainda aderidas. As células foram desagregadas com 0,5 mL de accutase (*Sigma Aldrich*), foi inativado com meio DMEM 10% SFB e todo o conteúdo foi transferido para o tubo. Foi aplicado uma centrifugação de 1.500 rpm por 5 minutos.

Posteriormente, essas células foram submetidas à marcação com anexina V e 7AAD, utilizando o *PE Annexin V apoptosis detection kit I* (*BD Biosciences*). A aquisição dos dados foi realizada no equipamento Accuri C6 (*BD Biosciences*).

A análise de apoptose também foi feita utilizando a técnica de *Western blotting* (ver em item **4.5.3**) com 6 µg de proteína total por poço, onde foram avaliadas incubadas com os anticorpos primários referentes as vias de sinalização de apoptose tais como; anti-PARP total (1:1000) e anti-caspase 3 clivada (1:1000) (*Cell signalling*). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-mouse ou anti-rabbit) e as membrana foram reveladas pelo método de quimioluminescência, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)* em diluição de 1:1 ou com *SuperSignal West Femto (Thermo Scientific – cód. 34096)*.

4.6.4 Avaliação de dano e estresse biológico

Para avaliar o dano e o estresse decorrente do tratamento, as células tratadas com as proteínas após 24h foram processadas e analisadas por *western blotting* utilizamos 6 µg de proteína, processadas e corridas conforme descrito no item **4.5.3**. Foi utilizado o anticorpo primário referente a via de sinalização de estresse e dano celular o anti-pH2AX (1:500), e anti-p21 (1:1000) (*Cell Signaling*) para avaliar ciclo e morte celular. A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada no sistema de foto documentação ImageQuant LAS 4000 mini (*GE Healthcare*).e posteriormente as bandas marcadas foram analisadas e quantificadas utilizando o software Image J³⁷.

4.6.5 Ensaio de proliferação e sobrevivência celular

Para a avaliação do ciclo celular, após a marcação das membranas de nitrocelulose com os anticorpos para a avaliação do apoptose. As membranas foram submetidas ao reprobe com o *Stripping buffer (Invitrogen)*, por 5 minutos. Foi feito a etapa de lavagem e bloqueio novamente e então, as membranas foram incubadas em anticorpos para a avaliação de proteínas relacionadas à proliferação e sobrevivência celular, anti-AKT e anti-ERK, na diluição de (1:1000) e posteriormente incubadas no secundário e reveladas conforme descrito no item **4.6.4**.

Tabela 2 – Anticorpos utilizado para as identificações das vias de sinalização

Anticorpo	Código/Fabricante	Diluição	Incubação
Anti- α -Tubulina	3873S (DM1A) / Cell Signaling	1:2000	4 °C - overnight
Anti-Parp	9542S / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-Caspase 3 clivada	9662S / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-p-H2AX	9718S / Cell Signaling	1:500	4 °C - overnight
Anti-p21 Walf1/cip1	2947S (12D1) / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-p-ERK (1/2)	43705 / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-p-AKT	2965 / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-AKT (total)	4691S / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-ERK (1/2) (total)	4695S / Cell Signaling	1:1000	4 °C - overnight
Anti-rabbit IgG HPR	7076/ Cell Signaling	1:5000	TA – 1 hora
Anti-mouse IgG HPR	7074/ Cell Signaling	1:5000	TA – 1 hora

4.7 Análise estatística dos resultados

A análise dos resultados foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.01. Para as comparações simples foi utilizado o teste *t* de *Student*. Os resultados serão considerados significativos quanto o valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análises *in silico*

O transcriptoma foi realizado por RNA-Seq, junto a empresa Idengen. Esse sequenciamento de nova geração foi capaz de gerar 55.131.904 sequências de 35-76 bases.

Após a análise de qualidade do RNA-Seq, realizamos a análise com a montagem *de novo* do transcriptoma, gerando 23.254 *contigs* ou nodos. A partir destes *contigs* submetemos as sequências ao alinhamento contra a base de dados *nt* (nucore) completa do NCBI-Blast, identificando 12.061 *contigs* homólogos à transcritos já existentes na base de dados. Destes 12.061 *contigs*, 437 representavam transcritos completos (incluindo os marcos de leitura inteiros). A maioria das sequências com o marco de leitura completo lidas pelo transcriptoma, foram proteínas estruturais, além da sequência parcial de um vírus nunca antes descrito em formigas.

Simultaneamente a essa análise, foi realizada a análise com o programa *TransDecoder-3.0.1*, onde foram gerados 270.247 ORFs. Esses ORFs foram posteriormente analisados com o programa *Blast2GO*, onde foram avaliados os processos biológicos, as funções moleculares e os componentes celulares dos mesmos.

Dentre os 270.247 ORFs identificados, limitamos a análise subsequente a 53.701 ORFs cujos transcritos eram completos (continham um Start e um Stop códon). Posteriormente, selecionamos nodos cujos transcritos possuíam um tamanho de 500 a 1.100 nucleotídeos, gerando uma lista de 22.239 nodos. Dentre esses nodos, selecionamos os transcritos que apresentaram ORFs cujo tamanho proteico era de 140 a 270 aminoácidos, obtendo assim 9.434 nodos, que foram classificados segundo análise do Gene Ontology com o software *Blast2GO* (Figura 5). Essa última filtragem foi selecionada para facilitar o processo de clonagem de transcritos pequenos.

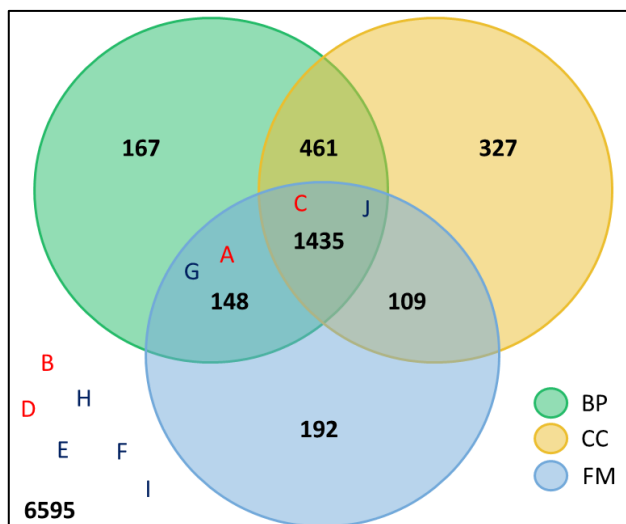


Figura 5 – Número de transcritos classificados pelo *Gene Ontology* com o software *Blast2GO*. Em verde os transcritos completos envolvidos em Processo Biológico (BP), em azul Funções Moleculares (FM) e em amarelo Componentes Celulares (CC). Os 6.595 transcritos restantes não estavam envolvidos em nenhum desses *Gene Ontology*. As letras representam a localização de cada transcrito selecionado para o projeto. (A) PLA₂-secretora; (B) Lisofosfolipase; (C) Calcineurin B; (D) Lisozima; (E) PLA₂-ativadora de proteína; (F) Plancitoxina; (G) Hialuronidase; (H) *ThreeFinger*; (I) ATPase; (J) Quitinase.

Dentre esses 9.434 nodos, inicialmente foram selecionados para o estudo 10 transcritos com potencial biotecnológico, representados pelas letras azuis e vermelhas na Figura 5. A seleção desses 10 transcritos foi feita em colaboração com a Universidade Federal de Uberlândia, que possui ampla expertise no estudo da glândula venenífera do modelo animal em estudo a *E. opaciventre*, baseada em conhecimentos previamente adquiridos. Esses 10 transcritos também estavam presentes na filtragem feita pela análise anteriormente descrita, por estarem em concordância, foram eles os selecionados para o estudo.

As 10 proteínas com possível potencial terapêutico, que possuíam o ORF completo (Tabela 3) foram usadas no estudo. Delas, foi possível amplificar quatro com os primers específicos desenhados (Figura 6). Embora não tenha sido encontrado nenhum estudo na literatura sobre as proteínas selecionadas, específicas dessa espécie de formiga, alguns artigos relatam a atividade de proteínas homologas, que podem possuir funções e complexidade semelhantes.

Tabela 3 – Genes selecionados no transcriptoma. Nome das dez proteínas e o tamanho do marco de leitura clonado.

Proteína	Node de identificação	ORF
<i>PLA₂_ActProtein</i>	NODE_32556_length_2583_cov_34.193573	2322pb
<i>PLA₂_XIIA_Secretora</i>	NODE_64253_length_1033_cov_32.048401	627pb
<i>Plancitoxina</i>	NODE_13997_length_1338_cov_37.233932	1149pb
<i>Hialuronidase</i>	NODE_22836_length_1467_cov_85.337425	1074pb
<i>ThreeFinger</i>	NODE_24265_length_541_cov_21.497227	444pb
<i>ATPase</i>	NODE_4222_length_481_cov_661.607056	315pb
<i>Calcineurin B</i>	NODE_6899_length_1036_cov_123.822395	570pb
<i>Quitinase</i>	NODE_6826_length_877_cov_111.604332	789pb
<i>Lisozima</i>	NODE_33608_length_509_cov_44.045185	468pb
<i>Lisofosfolipase</i>	NODE_40073_length_979_cov_77.824310	699pb

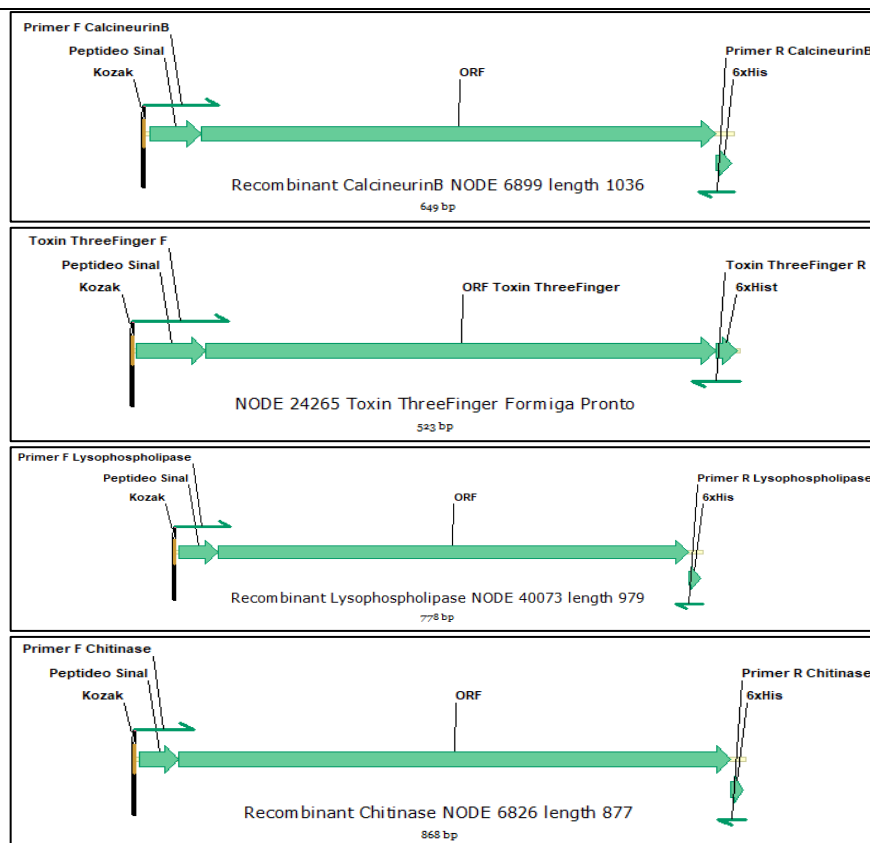


Figura 6 - Diagrama dos marcos de leitura (ORF: *Open Reading Frame*) dos genes selecionados. A flecha verde grossa indica o marco de leitura completo do transcrito. As flechas finas, indica a região utilizada como primer e as sequencias adicionadas, Kozak, peptídeo sinal e tag de 6 histidinas.

5.2 Clonagem molecular

Foi feito o RT-PCR para a amplificação dos genes no cDNA utilizando primers específicos desenhados para cada uma das proteínas, nos genes *Calcineurina B*, *Three Finger*, *Lisofosfolipase* e *Quitinase*, foi verificado a amplificação de fragmentos com os tamanhos correspondentes aos ORF (marco de leitura) somados as sequencias recombinantes como Kozak, peptídeo sinal e *tag* de histidina (Figura 7). As bandas amplificadas foram cortadas do gel de agarose e purificadas com o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clen-up* (Macherey-Nagel).

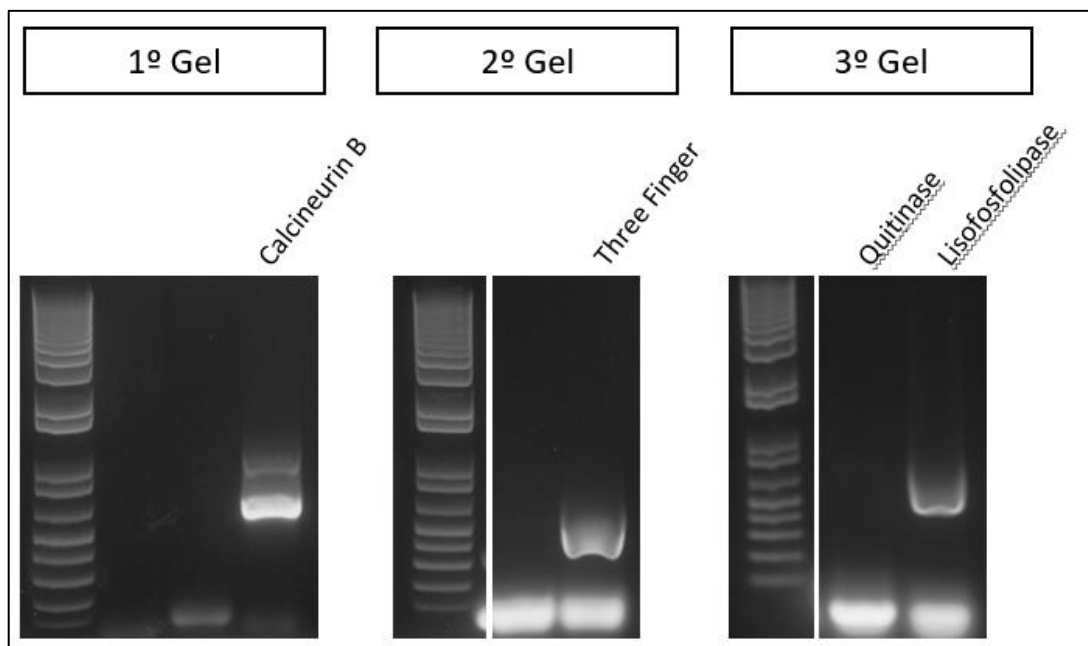


Figura 7 – Eletroforese (agarose 1%). Amplificações dos fragmentos que codificam as proteínas.

Posteriormente, clonamos os produtos amplificados e purificados no plasmídeo pCR-Blunt II - TOPO (*Thermo Scientific*), os plasmídeos foram transformados em bactérias *E. coli*. Foi feita a simulação da digestão do plasmídeo, com a enzima *EcoRI* (*Thermo Scientific*). Verificado o padrão de bandas que correspondiam ao plasmídeo com a sequência inserida, foi feita a digestão e aplicado em gel de agarose 1% para seleção do clone (Figura 8). Após o *screening* inicial, confirmamos a estrutura dos genes clonados (previamente amplificados por RT-PCR) por sequenciamento Sanger *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

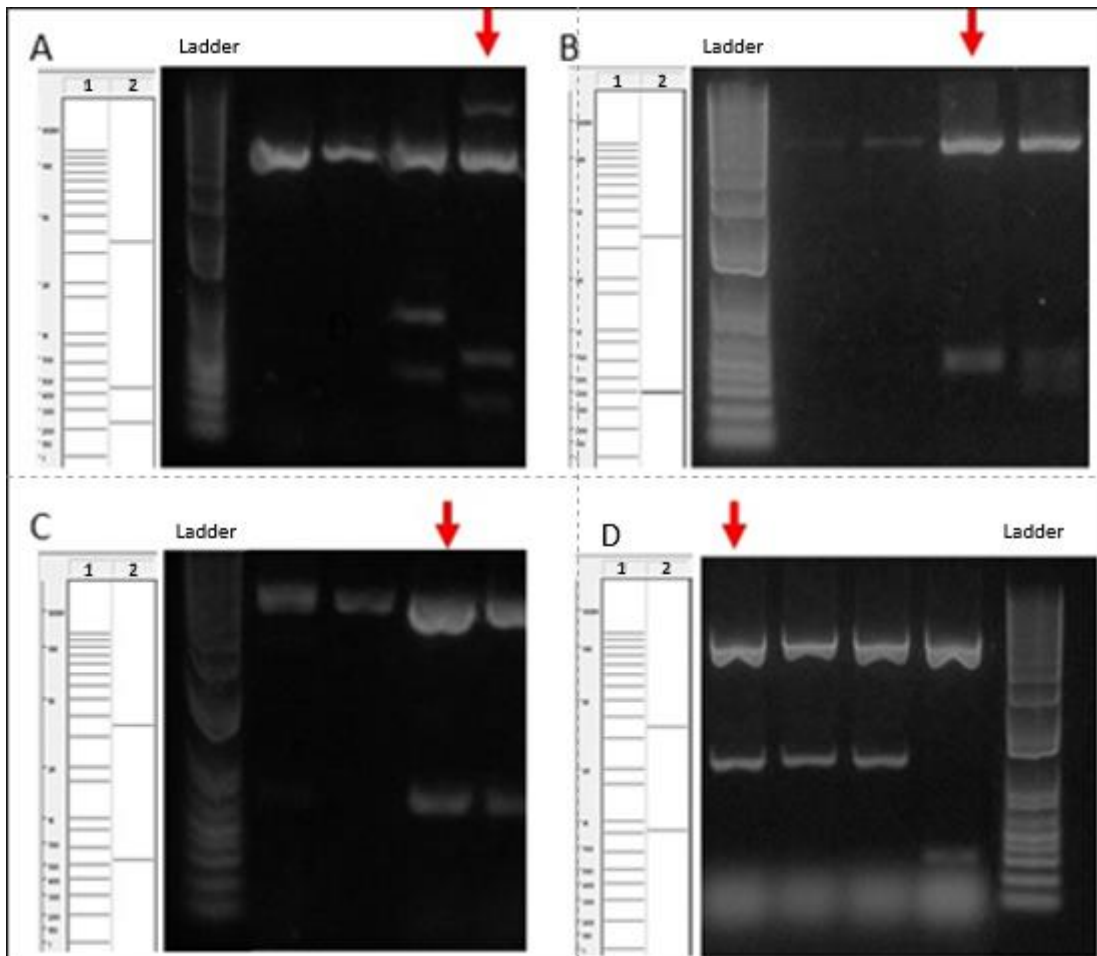


Figura 8 – Simulação *in silico* e eletroforese (agarose 1%) dos plasmídeos digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Nas canaletas 1 a simulação da migração do ladder, nas canaletas 2 o padrão de bandas esperado de digestão. A) Calcineurina B, B) Lisofosfolipase, C) *Three finger toxin* e D) Quitinase. O DNA ladder utilizado foi o 1KB⁺ (*Thermo Scientific*). A flecha vermelha indica o clone selecionado em cada clonagem.

Os clones selecionados a partir do *screening* (Figura 8) foram nomeados, da seguinte maneira: Nome do plasmídeo_Nome da proteína. Portanto, nessa clonagem foram gerados os plasmídeos pCR-Blunt_CaNB, pCR-Blunt_3FTx, pCR-Blunt_lysoPL e pCR-Blunt_CHI.

A estratégia de subclonagem, partindo do vetor de clonagem (pCR-Blunt) e migrando para o vetor de expressão (pCI.Neo), de cada plasmídeo construído foi diferente e está descrita a continuação:

- O fragmento contendo o gene *Calcineurin B* (CaNB) foi clonado digerindo o plasmídeo pCR-Blunt_CaNB com a combinação das enzimas SpeI e XhoI. Após purificação, o fragmento foi clonado nos sítios XbaI e XhoI do plasmídeo pCI.Neo, produzindo o plasmídeo pCI.Neo_CaNB.
- O fragmento contendo o gene *Three finger* (3FTx) foi clonado digerindo o plasmídeo pCR-Blunt_3FTx com a enzima EcoRI. Após purificação, o fragmento foi clonado no sítio EcoRI do plasmídeo pCI.Neo, produzindo o plasmídeo pCI.Neo_3FTx.
- O fragmento contendo o gene *Lisofosfolipase* (lysoPL) foi clonado digerindo o plasmídeo pCR-Blunt_lysoPL com a combinação das enzimas SpeI e XhoI. Após purificação, o fragmento foi clonado nos sítios XbaI e XhoI do plasmídeo pCI.Neo, produzindo o plasmídeo pCI.Neo_lysoPL.
- O fragmento contendo o gene *Quitinase* (CHI) foi clonado digerindo o plasmídeo pCR-Blunt_CHI com a enzima EcoRI. Após purificação, o fragmento foi clonado nos sítios EcoRI do plasmídeo pCI.Neo, produzindo o plasmídeo pCI.Neo_CHI.

5.3 Validação da expressão das proteínas recombinantes por *western blot* e padronização do anticorpo.

Para validação da expressão das proteínas recombinantes, foi feita a transfecção transiente dos plasmídeos pCI.Neo_CaNB, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_lysoPL, pCI.Neo_CHI e pCI.Neo (vetor vazio – controle negativo), utilizando *Lipofectamine3000* (*Thermo Scientific*) na linhagem CHO_K1. O plasmídeo pCI.Neo_EGFP foi utilizado como controle de transfecção (Figura 9).

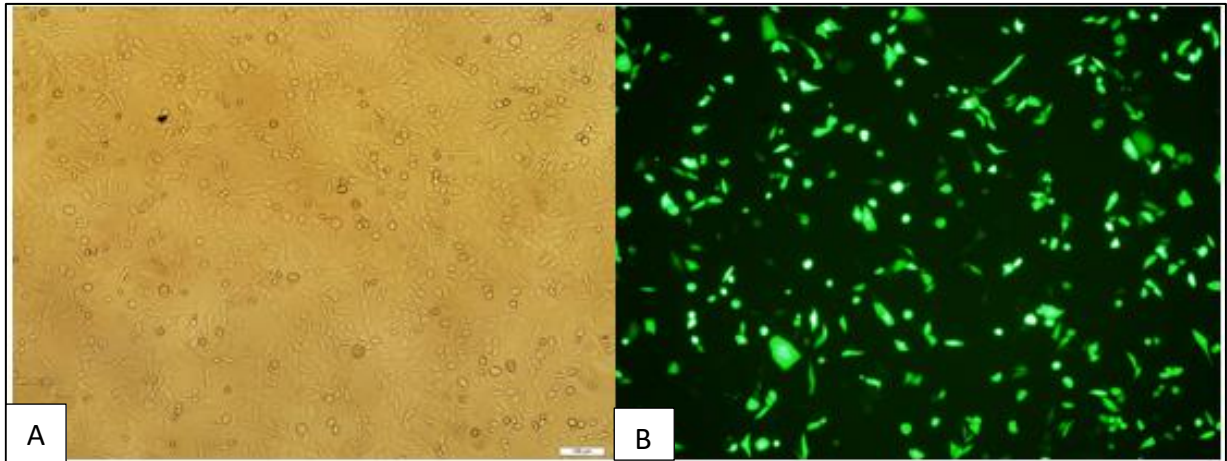


Figura 9 – Controle de transfecção na linhagem CHO-K1. Células lipofectadas com plasmídeo pEGFP.C1, para avaliar a efetividade da técnica. Microscópio Nikon Eclipse Ts2R, objetiva 20x. A) Imagem sem filtro. B) Filtro FITC, para a visualização das células fluorescentes.

Após 48 horas da transfecção, realizamos o *western blotting* utilizando o anticorpo primário Anti-6xHis (*Abcam* -ab18184) com diluição 1:150 em solução de Molico 5%+TBS-T e como anticorpo secundário Anti-Mouse (*Sigma-Aldrich*). α -tubulina (52 kDa) foi utilizada como controle interno da técnica. Nesse ensaio, confirmamos a expressão das proteínas Calcineurina B, *Three Finger toxin*, Lisofosfolipase e Quitinase que apresentaram os tamanhos de 25 kDa, 20 kDa, 29 kDa e 32 kDa respectivamente (Figura 10).

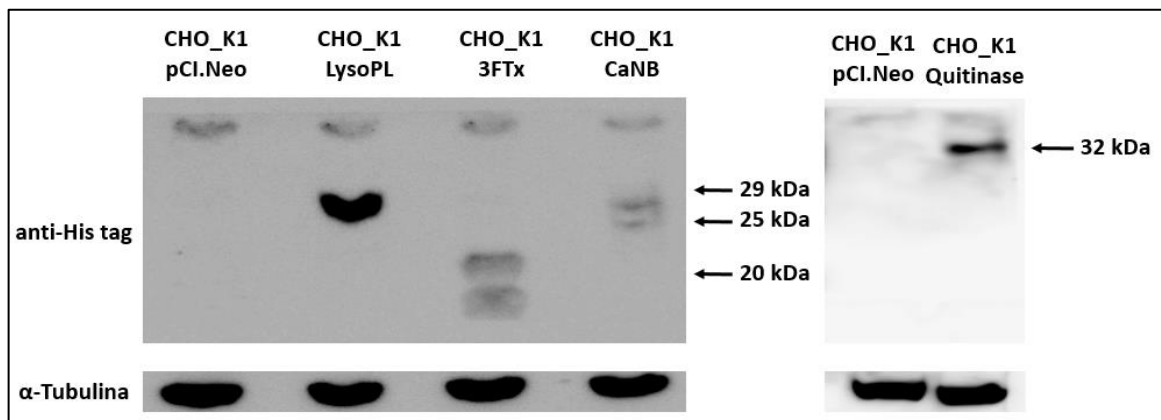


Figura 10 - Análise da expressão de proteínas: *Western blotting* feito a partir de uma transfecção transiente dos plasmídeos pCI.Neo (vetor vazio), pCI.Neo_lysoPL, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_CaNB e pCI.Neo_CHI com lipofectamine 3000 (*Thermo Scientific*) na linhagem celular CHO-K1.

5.4 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a toxicidade das proteínas recombinantes construídas, fizemos uma nova transfecção transiente dos plasmídeos pCI.Neo_CaNB, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_lysoPL e pCI.Neo (controle negativo), de maneira similar a anteriormente descrita. Após 48 horas de transfecção, os sobrenadantes das culturas celulares transfectadas (meio condicionado) foram coletados e filtrados (0,22 μ m), para serem posteriormente utilizados no tratamento das células derivadas de tumores de cabeça e pescoço. Como pode ser observado na Figura 11, a lysoPL foi capaz de induzir uma diminuição significativa da viabilidade celular, em 5 das 6 linhagens testadas. A proteína *Three finger* diminuiu significativamente as linhagens HCB289, UMSCC47 e UDSCC2. No tratamento com a proteína Calcineurin B foi verificado uma tendência a redução da viabilidade celular, no entanto somente na linhagem HCB289 essa redução foi significativa. Na linhagem SCC25, Calcineurin B aumentou a viabilidade.

Nesse experimento não foi analisado o efeito citotóxico da proteína Quitinase, pois não haviam sido terminadas as etapas de clonagens.

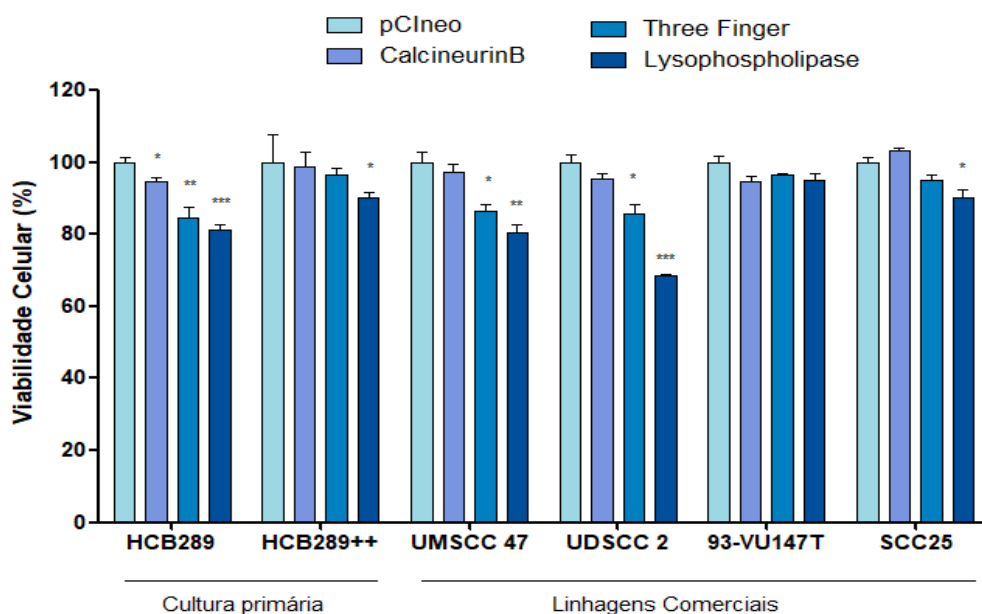


Figura 11 – Ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas com o sobrenadante coletado das CHO_K1 transfectadas (transiente) com os plasmídeos construídos com os genes codificantes de cada proteína. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$; (***) $P < 0,0001$. Test t de Student.

5.5 Ensaios com transfecção constitutiva

5.5.1 Seleção dos clones

Para estabelecer uma linhagem com a síntese constitutiva das proteínas de interesse, foi feita uma nova transfecção dos plasmídeos pCI.Neo_CaNB, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_lysoPL, pCI.Neo_CHI e pCI.Neo (vetor vazio), de maneira similar a anteriormente descrita. Após 48 horas de transfecção as células foram tratadas com 0,5 mg/mL de antibiótico G418 continuamente, até a seleção completa, ou seja, a morte completa do controle negativo de transfecção. Após a amplificação das células positivamente transfectadas, as mesmas foram submetidas a individualização por citometria de fluxo (*Single Cell Sorting*). As células individualizadas foram cultivadas formando clones, e cada clone foi testado, para avaliar o nível de expressão das proteínas. Para verificar a expressão das proteínas foi realizado um *Western blotting*, conforme descrito abaixo.

5.5.1.1 Clone Calcineurina B (CaNB)

Entre as células individualizadas transfectadas com o plasmídeo construído com o gene codificante para a proteína CaNB, 22 células foram capazes de gerar clones, o clone 2 apresentou maior nível de expressão (Figura 12 e 13). Este clone foi o selecionado para dar continuidade ao trabalho.

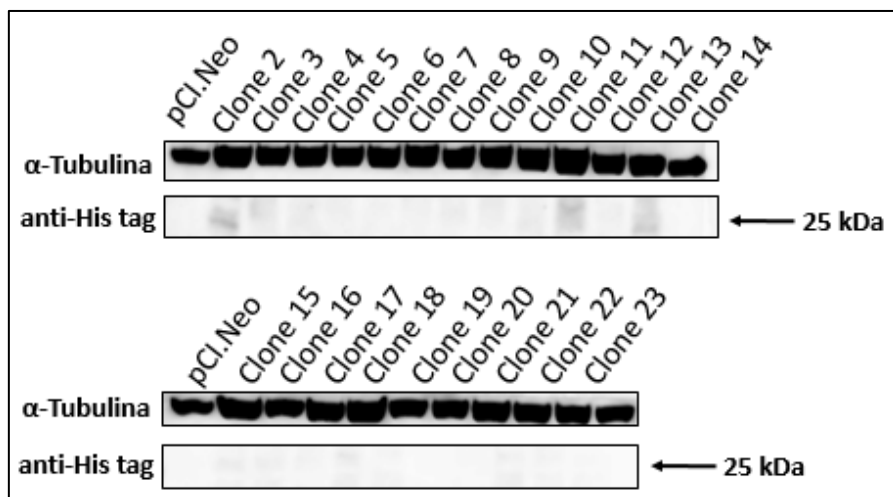


Figura 12 – *Western Blotting* dos clones Calcineurin B. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (Abcam - ab18184) diluição 1:150.

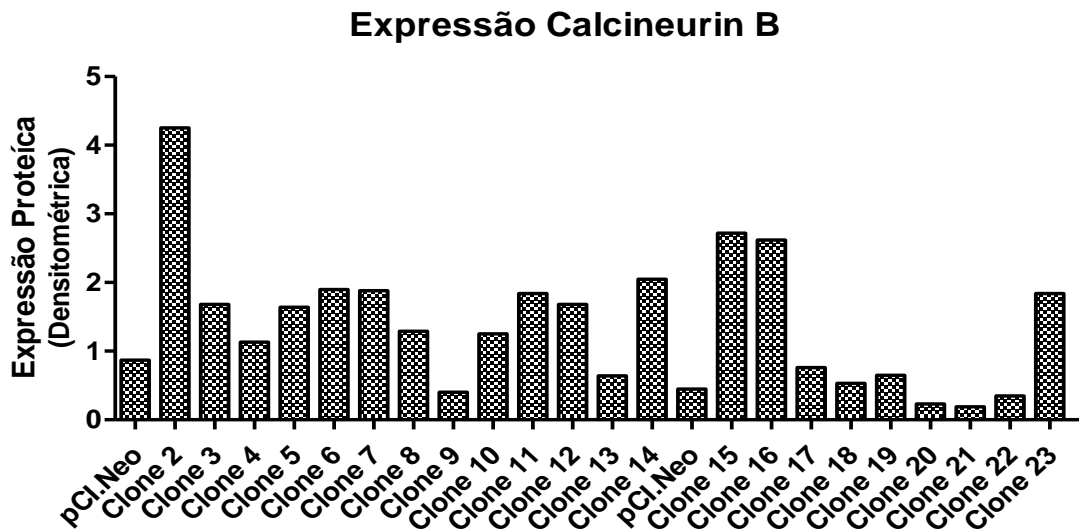


Figura 13 – Densitometria das bandas dos clones da CaNB. Nível de expressão proteica clones CaNB.

5.5.1.2 *Three Finger toxin (3FTx)*

Somente 9 células foram capazes de gerar clones da proteína 3FTx. Entre os mesmos, nenhum apresentou expressão (Figura 14).

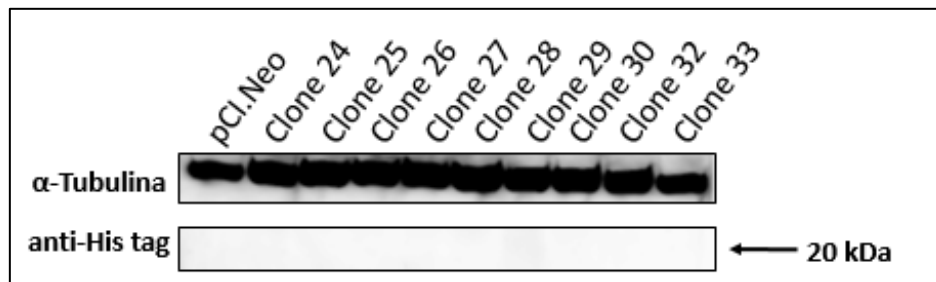


Figura 14 – Western Blotting clones *Three Finger toxin*. Marcados com anti-6xHis-tag (Abcam - ab18184) diluição 1:150.

Como não foi possível confirmar, se a ausência de marcação no *Western Blotting* ocorreu devido à ausência de expressão do plasmídeo ou à níveis de expressão muito baixos, o clone 24 foi selecionado aleatoriamente para a realização dos ensaios funcionais.

5.5.1.3 Lisofosfolipase (lysoPL)

As células da lysoPL geraram 22 clones. Entre os clones gerados expressando a Lisofosfolipase, o clone 39 demonstrou uma maior expressão da proteína conforme evidenciado nas figuras 15 e 16.

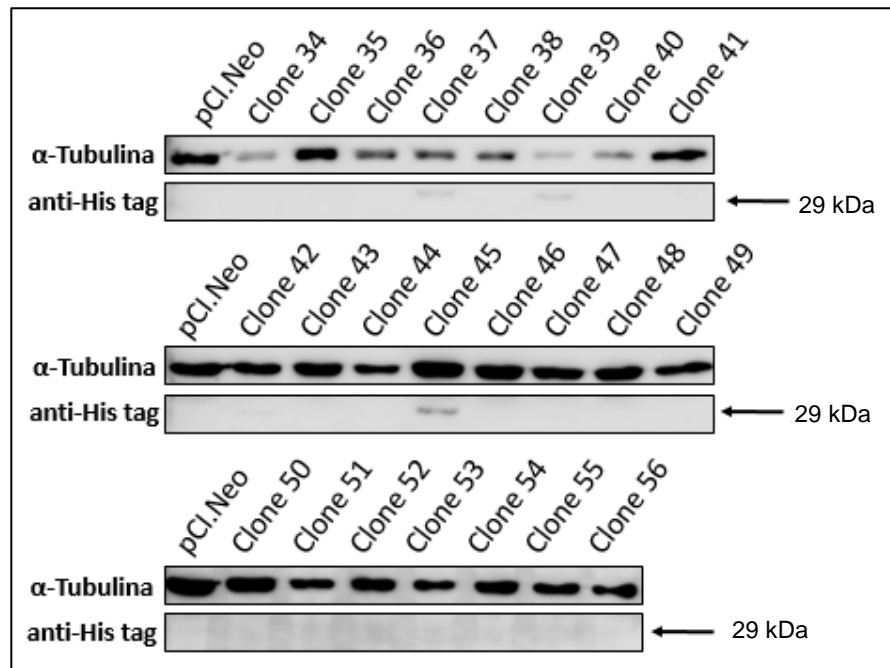


Figura 15 – *Western blotting* clones Lisofosfolipase. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (Abcam - ab18184) 1:5000.

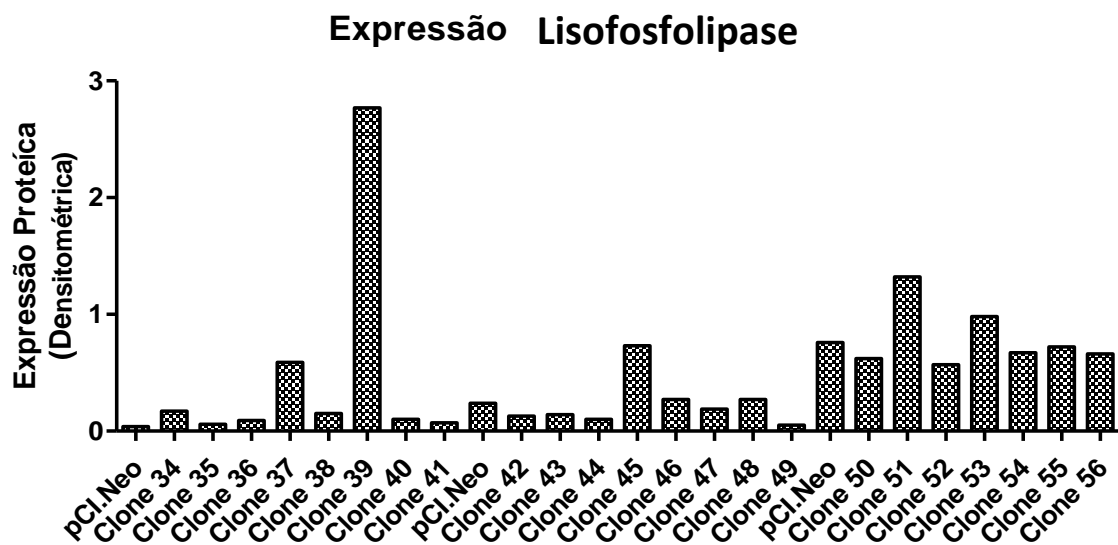


Figura 16 – Densitometria das bandas dos clones da Lisofosfolipase. Nível de expressão proteica dos clones da Lisofosfolipase.

5.5.1.4 Quitinase (CHI)

Entre os 23 clones da Quitinase (Figura 17 e 18), o clone 76 apresentou maior nível de expressão, entretanto, ao descongelar esse clone para a realização dos ensaios funcionais, as células não estavam viáveis. Dessa forma, o clone 61, o segundo de maior expressão da Quitinase, foi selecionado para dar continuidade ao trabalho.

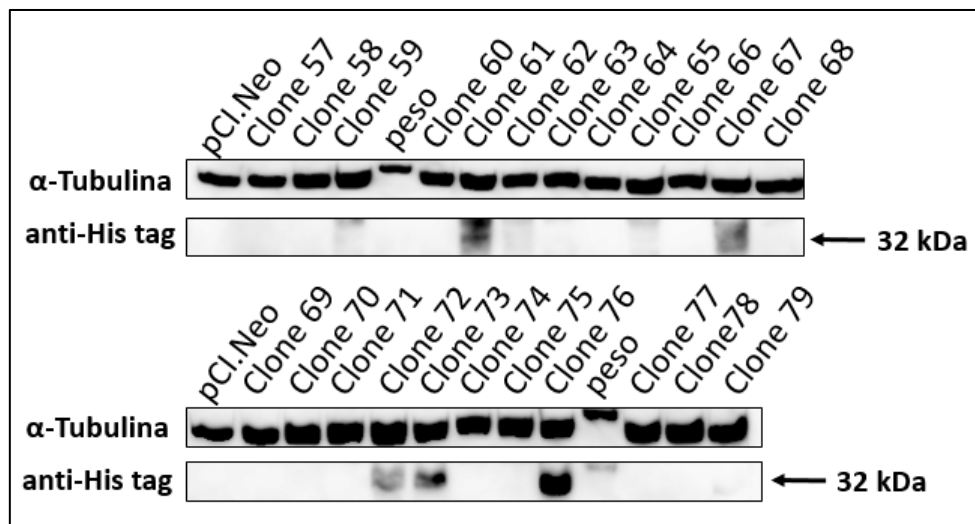


Figura 17 – Western Blotting clones Chitinase. Marcados com anticorpo anti-6xHis-tag (Abcam - ab213204) 1:5000.

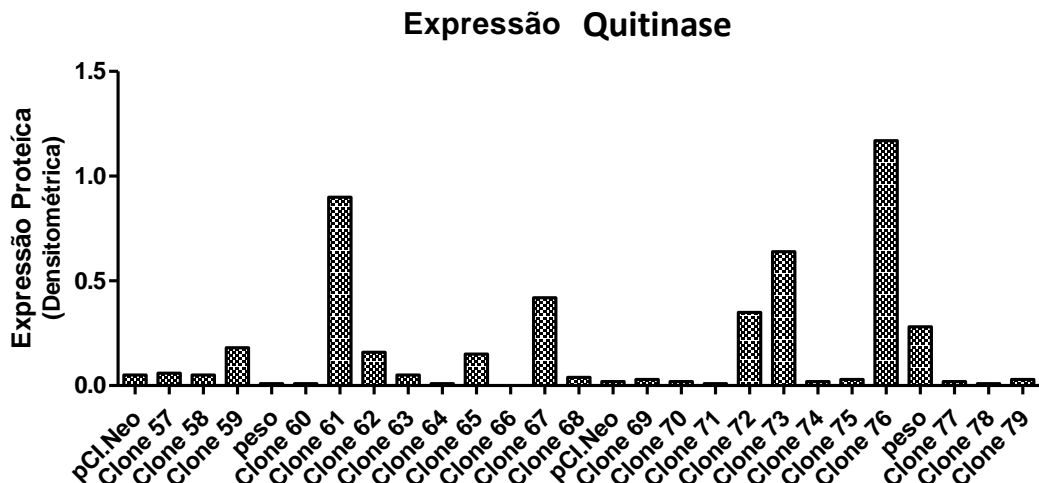


Figura 18 – Densitometria das bandas dos clones da Quitinase. Nível de expressão proteica dos clones da Quitinase.

5.5.2 Quantificação das proteínas secretadas pela linhagem estável

O meio condicionado contendo as proteínas foram coletados e quantificados, para a realização da cinética química das proteínas. As coletas aconteceram 12, 24, 48 e 72 horas

após o plaqueamento. A quantificação foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit em um ELISA competitivo, foi feita uma curva padrão com His Tag standards do próprio kit com concentração 1 a 729 ng/mL (Figura 19).

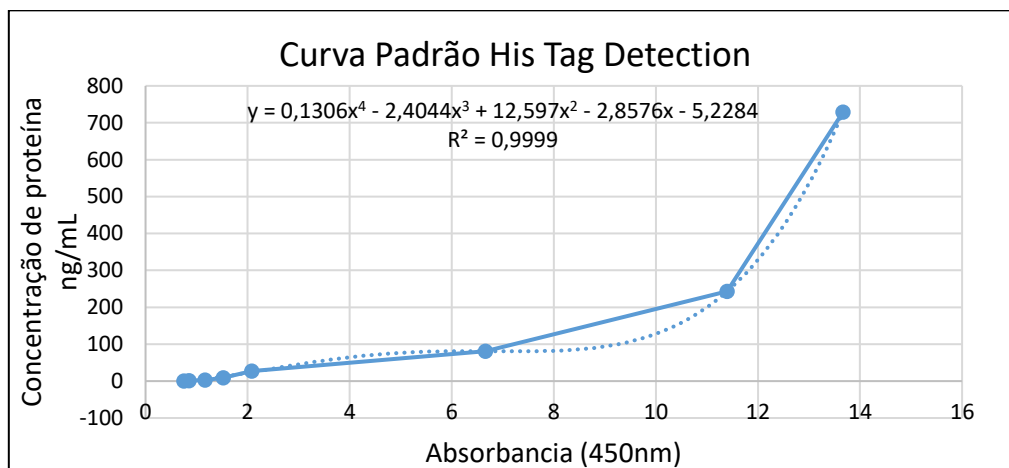


Figura 19 – Gráfico da curva padrão gerado pela quantificação por ELISA - kit *His Tag Detection*.

Na análise dos resultados do ELISA com o sobrenadante coletado para a cinética, verificou-se uma baixa produção de proteína, ou uma quantidade inferior a 1 ng/mL, externo ao range de detecção do kit (Tabela 4). Foi possível a quantificação da proteína Lisofosfolipase e Quitinase, quando produzidas por 72 horas.

Tabela 4 – Quantificação de síntese das proteínas dos clones por ELISA.

Coleta meio condicionado	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
pCI.Neo	-2,1270	-1,9021	-1,7218	-1,3193
CaNB clone 2	-2,6165	-2,1454	-1,5555	-1,3262
3FTx clone 24	-1,9668	-1,6489	-2,0268	-1,9285
lysoPL clone 39	-2,3690	-1,8929	-0,0828	0,5194
CHI clone 61	-0,9976	-1,7975	-0,6508	0,1951

As unidades dos dados estão em ng/mL.

5.5.3 Viabilidade Celular

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, os sobrenadantes dos clones das células CHO-K1 expressando cada uma das proteínas foram coletados filtrados e aplicados das linhagens de tumores de cabeça e pescoço plaqueadas no dia anterior. Foram realizados dois tempos de tratamento.

No ensaio de viabilidade tratado por 48 horas, notou-se uma diminuição significativa da viabilidade das células primárias HCB289 e das células comerciais UDSCC2 quando tratadas com o sobrenadante contendo a proteína 3FTx e lysoPL (Figura 20). No entanto, foi observado um aumento da viabilidade nas células HCB289 e VU120T tratadas com o sobrenadante contendo a CHI (Figura 20). Na tabela 5 está representado o p valor e a significância do test t com amostras pareadas de cada clone em relação ao controle pCI.Neo.

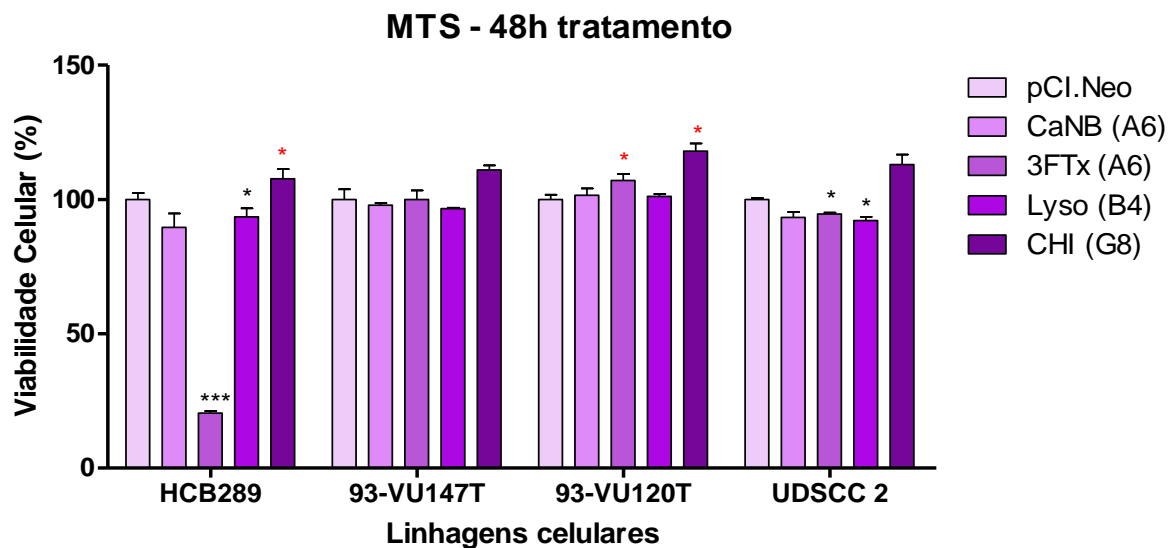


Figura 20 – Análise do ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas por 48 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado dos clones das CHO-K1, produzindo cada uma das proteínas. (*) P valor significativo $p < 0,05$ $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$.

Tabela 5– Análise estatística de Test t, do ensaio de MTS 48 horas. Test t realizado comparando cada clone das proteínas em relação ao controle pCl.Neo. Valores em negrito P valor significativo menor que <0,05.

48h	HCB289 P Valor	93-VU147T P Valor	93-VU120T P Valor	UDSCC2 P Valor
CaNB vs pCl.Neo	0,0721	0,5622	0,5764	0,0512
3FTx vs pCl.Neo	0,0008	0,9934	0,0433	0,0045
lysoPL vs pCl.Neo	0,0135	0,4758	0,6739	0,0295
CHI vs pCl.Neo	0,0276	0,1557	0,0214	0,0707

No ensaio realizado com as células tratadas por 72 horas, foi observado uma diminuição significativa da viabilidade na linhagem HCB289 tratadas com o sobrenadante da CaNB e 3FTx, e, um aumento na 93-VU120T tratadas com 3FTx, lysoPL e CHI (Figura 21). Na tabela 6 está representado o p valor e a significância do test t com amostras pareadas de cada clone em relação ao controle pCl.Neo.

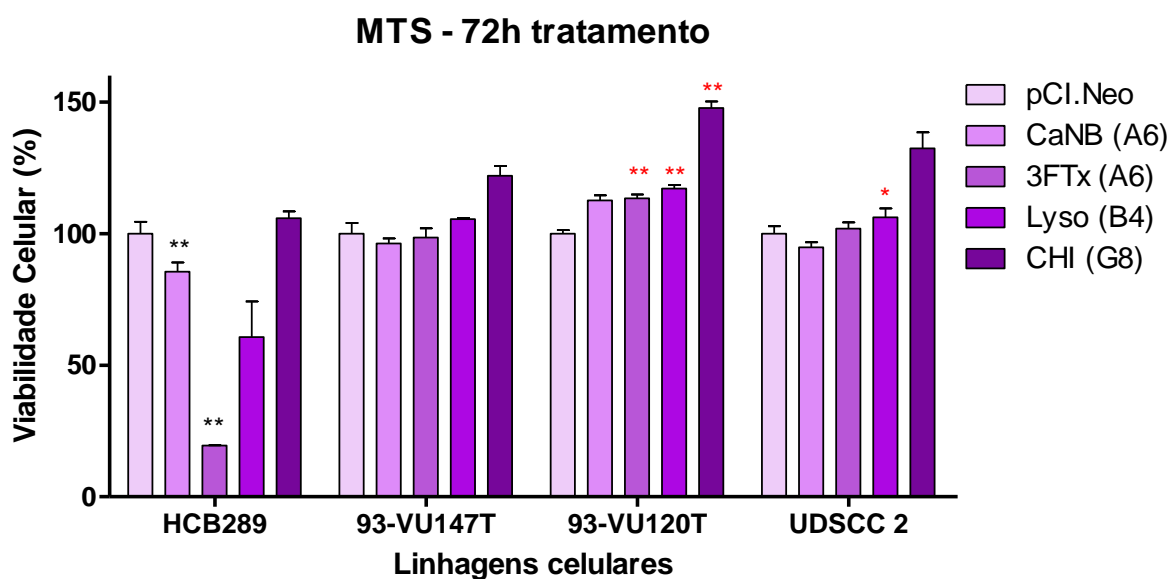


Figura 21 - Análise do ensaio de viabilidade celular. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas por 72 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado dos clones das CHO-K1, produzindo cada uma das proteínas. (*) P valor significativo $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$.

Tabela 6 – Análise estatística de Test t, do ensaio de MTS 72 horas. Test t realizado comparando cada clone das proteínas em relação ao controle pCl.Neo. Valores em negrito P valor significativo menor que <0,05.

72h	HCB289 P Valor	93-VU147T P Valor	93-VU120T P Valor	UDSCC2 P Valor
CaNB vs pCl.Neo	0,0049	0,4735	0,0513	0,3459
3FTx vs pCl.Neo	0,0030	0,7571	0,0019	0,3512
lysoPL vs pCl.Neo	0,0569	0,3384	0,0035	0,0195
CHI vs pCl.Neo	0,4697	0,1014	0,0050	0,0629

5.5.4 Apoptose por citometria de fluxo

Foi analisado utilizando o meio condicionado a partir dos clones, o efeito biológico sofrido pelas linhagens HCB289 e 93-VU120T mediante a 48 horas de tratamento. Para garantir a eficiência da técnica, evidenciando as marcações pelos anticorpos, as linhagens foram tratadas também com cisplatina. Para esse ensaio foi utilizado os marcadores Anexina e 7-AAD que indicam fases da apoptose inicial, tardia ou necrose (Figura 22 e 23). Com esse experimento pode ser notado que a Lisofosfolipase, promove um aumento dos eventos de apoptose tardia em ambas as linhagens. Este resultado é mais evidente na linhagem HCB289, onde a proteína em questão promoveu 29,7% de apoptose tardia ou necrose, uma porcentagem maior que o controle pCl.Neo, que obteve 11,08% (Tabela 7).

Tabela 7 – Porcentagem de células marcadas pelo anticorpo Anexina e 7-AAD. Linhagem HCB289 tratadas durante 48 horas.

Plot 7C (FL2-A/FL3-A)				
	Células Viáveis % por Plot	Apoptose Inicial % por Plot	Apoptose Tardia/ Necrose % por Plot	Não viáveis % por Plot
Sem tratamento	92,59%	1,88%	4,96%	0,57%
pCl.Neo	84,11%	3,48%	11,08%	1,32%
CaNB_A6	89,44%	2,01%	6,82%	1,73%
3FTx_A6	91,17%	2,23%	5,48%	1,12%
lysoPL_B4	49,13%	2,31%	29,07%	19,49%
CHI_G8	83,66%	6,79%	8,63%	0,93%
Cisplatina	48,43%	11,92%	28,35%	11,30%

Vale a pena ressaltar que na linhagem 93-VU-120T, a proteína *Three finger* aumentou a porcentagem de apoptose inicial para cerca de 10,33% (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de células marcadas pelo anticorpo Anexina e 7-AAD. Linhagem 93-VU-120T tratadas durante 48 horas.

Plot 7 (FL2-A/FL3-A)				
	Células Viáveis % por Plot	Apoptose Inicial % por Plot	Apoptose Tardia ou Necrose % por Plot	Não viáveis % por Plot
Sem tratamento	77,28%	8,75%	12,64%	1,33%
pCl.Neo	77,50%	5,95%	14,54%	2,01%
CaNB_A6	79,60%	7,99%	11,31%	1,10%
3FTx_A6	72,64%	10,33%	15,92%	1,11%
lysoPL_B4	75,83%	6,32%	16,54%	1,32%
CHI_G8	74,32%	7,29%	16,67%	1,72%
Cisplatina	8,97%	14,72%	70,27%	6,04%

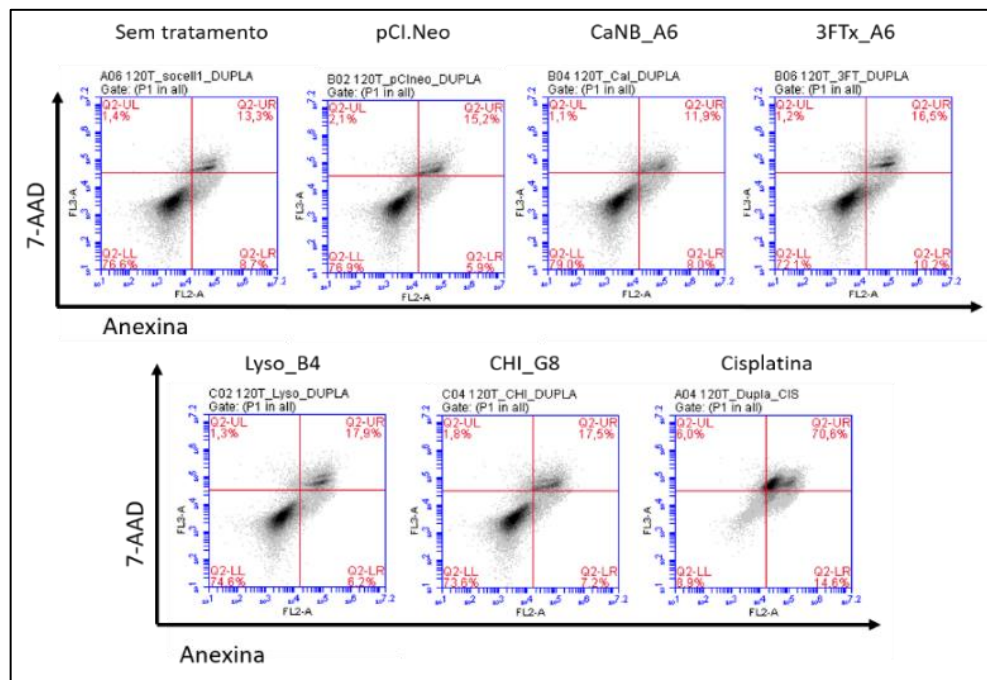


Figura 22 – Análise de apoptose por citometria de fluxo. No eixo x é verificado intensidade de marcação por anexina e no eixo y a marcação por 7-AAD. Linhagem 93-VU-120T.

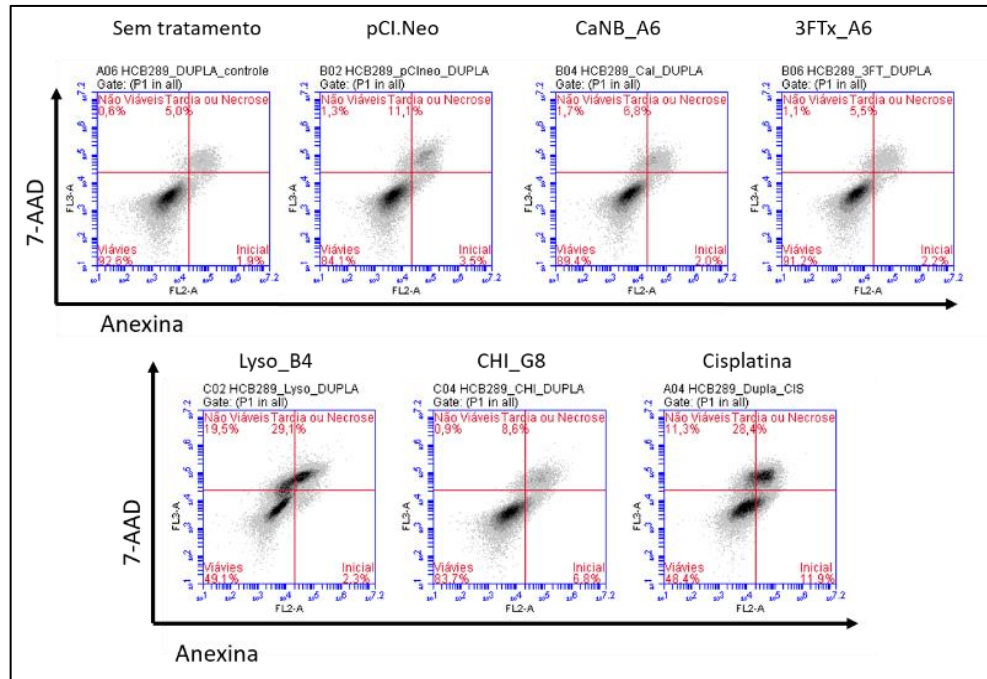


Figura 23 – Análise de apoptose por citometria de fluxo. No eixo x é verificada intensidade de marcação por anexina e no eixo y a marcação por 7-AAD. Linhagem HCB289.

5.6 Ensaios transfeção transiente

5.6.1 Quantificação proteínas secretadas produção transiente

Após a seleção dos clones, estabelecimento e realização do ensaio de viabilidade celular com o sobrenadante coletado a partir dos clones, foi verificada uma diminuição da capacidade de redução da viabilidade celular. Portanto, para a caracterização da atividade das proteínas, foi necessária a realização dos experimentos a partir do sobrenadante coletado das CHO-K1 transfectadas transientemente.

Tabela 9 – Quantificação proteínas a partir da transfeção transiente, 48 horas de produção.

Coleta meio condicionado	48 horas (Transfeção transiente)
pCI.Neo	-8,341222595 ng/mL.
CalcineurinB	3,780443185 ng/mL.
<i>Three Finger</i>	0,465875508 ng/mL
Lisofosfolipase	7,634726041 ng/mL
Quitinase	11,62245985 ng/mL

A produção das proteínas foi padronizada, de acordo com a quantidade de células plaqueadas, a concentração de DNA transfectado, o volume de meio utilizado para a secreção e o tempo de produção dessas proteínas. Na quantificação pelo método de ELISA (Tabela 9), foi verificado que as proteínas mesmo que transfectadas nas mesmas condições e concentrações eram secretadas em quantidades diferentes. A proteína Quitinase foi secretada em maior quantidade 11,62 ng/mL, seguida da Lisofosfolipase com 7,63 ng/mL, a Calcineurin B com 3,78 ng/mL e na última posição a *Three Finger toxin*, que apresentou uma quantificação de apenas 0,46 ng/mL. Esses resultados foram confirmados por meio da técnica de *Western blotting* seguindo o protocolo padronizado para a transfecção transiente (Figura 24), utilizando 70 µg de proteínas a partir do lisado das células. No entanto, devido à baixa capacidade de detecção da técnica, somente as proteínas Quitinase e Lisofosfolipase foram capazes de serem detectadas.

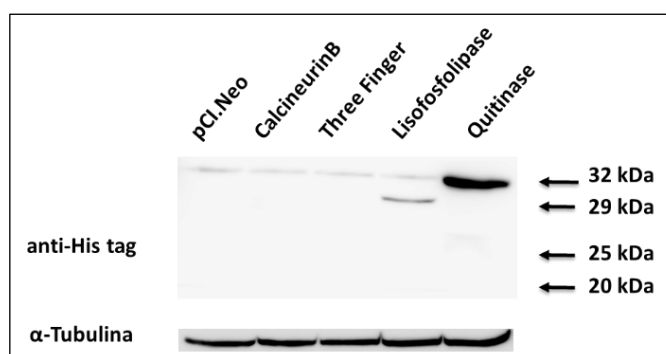


Figura 24 – Análise da expressão de proteínas: *Western blotting* a partir de transfecção transiente dos plasmídeos pCIneo (vetor vazio), pCI.Neo_CaNB, pCI.Neo_3FTx, pCI.Neo_lysoPL, e pCI.Neo_CHI com Lipofectamine 3000 (*Thermo Scientific*) na linhagem celular CHO-K1.

5.6.2 Ensaio de viabilidade celular

No ensaio de viabilidade, realizado com as linhagens HCB289, UMSCC47, UDSCC2 e SCC25, onde as mesmas foram submetidas ao tratamento por 72 horas. Notou-se uma diminuição significativa da viabilidade das células primárias HCB289 e das células comerciais SCC25 quando tratadas com o sobrenadante de todas as proteínas estudadas (Figura 25). No entanto, foi observado um resultado mais acentuado, com o tratamento da proteína Lisofosfolipase, quando relacionada ao controle pCI.Neo.

As linhagens UMSCC47 e UDSCC2 demonstraram uma resistência ao tratamento.

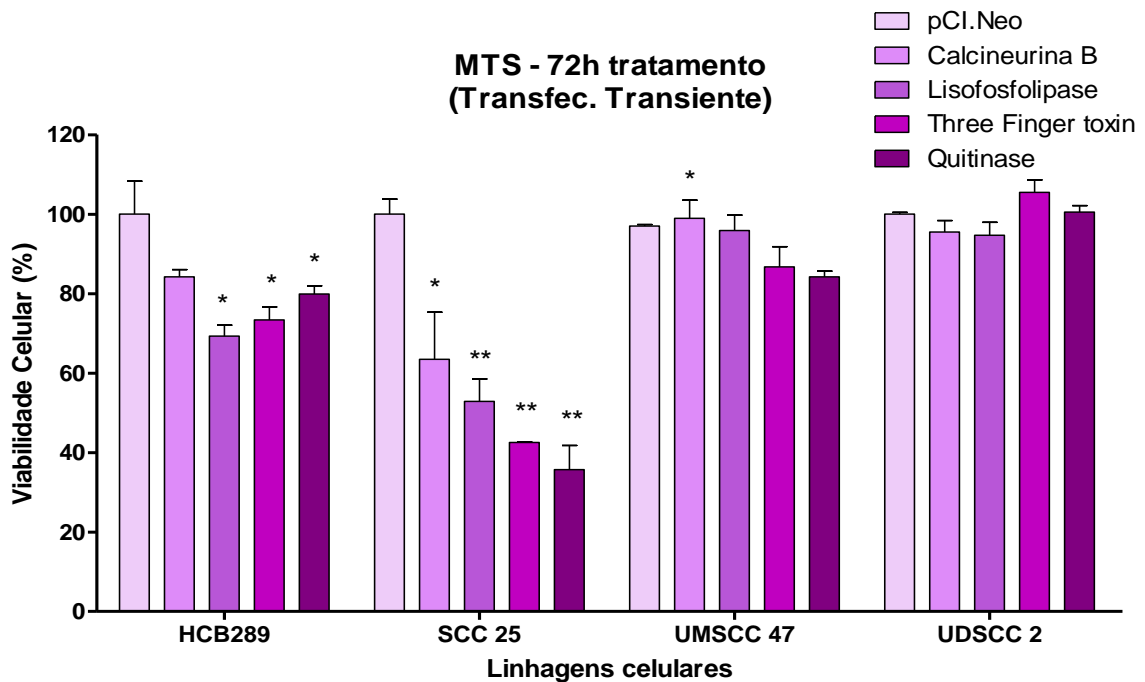


Figura 25 – Efeito do tratamento das proteínas na viabilidade celular de linhagens tumorais de cabeça e pescoço. Linhagens celulares comerciais e primárias, tratadas por 72 horas, com o sobrenadante coletado e filtrado das CHO-K1 transfectadas transientemente, produzindo cada uma das proteínas. Os resultados foram expressos como a percentagem média \pm SD de células viáveis relativamente ao pCI.Neo (considerado 100% de viabilidade). (*) P valor significativo $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$.

Tabela 6 – Análise estatística de Test t, do ensaio de MTS 48 horas. Test t realizado comparando cada clone das proteínas em relação ao controle pCI.Neo. Valores em negrito P valor significativo menor que $< 0,05$.

48h	HCB289 P Valor	SCC25 P Valor	UMSCC47 P Valor	UDSCC2 P Valor
CaNB vs pCI.Neo	0,1373	0,0364	0,8548	0,1998
3FTx vs pCI.Neo	0,0405	0,0013	0,0911	0,1592
lysoPL vs pCI.Neo	0,0248	0,0053	0,4568	0,1858
CHI vs pCI.Neo	0,0787	0,0024	0,0293	0,7776

5.6.3 Avaliação da capacidade de migração

Uma das características marcantes das células tumorais, é a capacidade de migrar do seu local de origem para outras partes do organismo. Esse mecanismo é mimetizado por meio

do ensaio de migração. Para esse experimento, foram utilizadas duas linhagens, HCB289 linhagem que no ensaio de viabilidade celular se mostrou sensível ao tratamento e UMSCC47 que se mostrou resistente.

Na linhagem HCB289, todas as proteínas, principalmente a Lisofosfolipase e Quitinase diminuíram a capacidade de migração das células em relação ao controle (Figura 26).

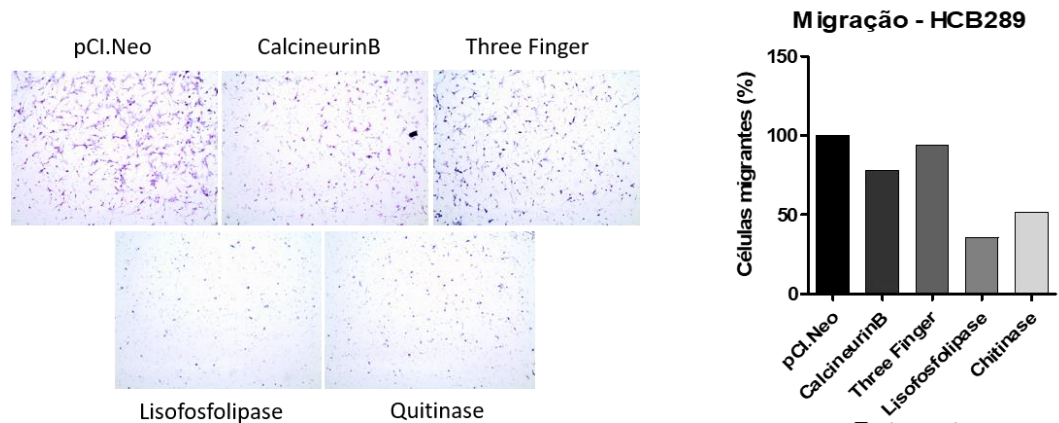


Figura 26 – Análise da capacidade de migração observado na linhagem HCB289, após 24 horas de tratamento. A esquerda imagens representativas das membranas com as células migrantes foto documentadas pelo microscópio *Olympus SC30 – BX43*, contagem das células realizada pelo software ImageJ. A direita, gráfico da porcentagem de células migrantes, normalizadas pelo controle pCl.Neo.

A linhagem UMSCC47 obteve uma pequena diminuição da capacidade de migração das células, esse resultado foi mais evidente nas células tratadas com as proteínas *Three Finger* e Quitinase (Figura 27).

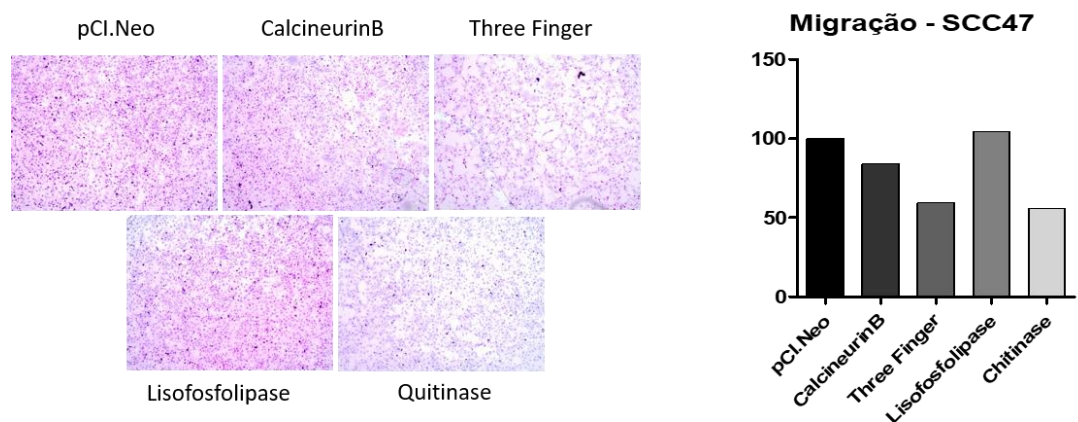


Figura 27 - Análise da capacidade de migração observado na linhagem UMSCC47, após 24 horas de tratamento. A esquerda imagens representativas das membranas com as células migrantes fotos documentadas pelo microscópio *Olympus SC30 – BX43*, contagem das células realizada

pelo software ImageJ. A direita, gráfico da porcentagem de células migrantes, normalizadas pelo controle pCI.Neo.

5.6.4 Identificação das principais vias de sinalização induzidas pelas proteínas nas linhagens tumorais.

A fim de avaliar quais os mecanismos foram responsáveis pela diminuição da viabilidade e inibição da capacidade de migração das células, foram realizados experimentos para a identificação das principais vias de sinalização as quais as proteínas podem estar envolvidas.

As células UDSCC2, UMSCC47, SCC25 e HCB289 foram tratadas com o meio condicionado das transfecções transiente. Após 24h de tratamento, foi avaliado a expressão e atividade de algumas proteínas relacionadas ao metabolismo funcional da célula. Essa avaliação foi feita por meio da técnica de *Western Blotting*, utilizando 6 µg totais de proteína para cada uma das marcações (Figuras 28, 29, 30 e 31).

Para a avaliação da proliferação e sobrevivência celular, foram marcadas as proteínas AKT e ERK. A proteína quinase B (PKB/AKT) assume um papel central na regulação metabólica e na progressão do ciclo celular. As proteínas Lisofosfolipase e Quitinase demonstraram participar da regulação dessa proteína, nas linhagens UDSCC2, SCC25 e HCB289 ocorreu um aumento da fosforilação de AKT em relação ao controle pCI.Neo. De modo geral, as proteínas em questão não tiveram impacto direto na fosforilação de ERK. No entanto, Calcineurin B foi responsável pelo aumento dessa ativação nas linhagens SCC25 e HCB289.

Foram utilizados anticorpos para a marcação de proteínas envolvidas no dano e estresse biológico como H2AX e p21. A proteína Calcineurin B foi responsável por diminuir drasticamente a expressão de p21, na linhagem UMSCC47. Na linhagem UDSCC2 nenhuma das proteínas foram capazes de modificar a expressão de p21 consideravelmente, já a proteína Lisofosfolipase aumentou a expressão de p21 em relação ao controle pCI.Neo, nas linhagens UMSCC47 e HCB289.

Para avaliar se Calcineurin B, *Three Finger toxin*, Lisofosfolipase e Quitinase estavam envolvidas no processo de apoptose. Foi utilizado anticorpos para a marcação das proteínas PARP e caspase 3. Em nenhuma das linhagens, foi observado a clivagem de caspase 3, quando tratadas por 24 horas com o meio condicionado contendo as proteínas de interesse. Ao avaliar a proteína PARP, os tratamentos foram capazes de induzir a clivagem, nas linhagens

UMSCC47, SCC25 e HCB289. Esse resultado, na linhagem UDSCC2 é notado, apenas na proteína Quitinase.

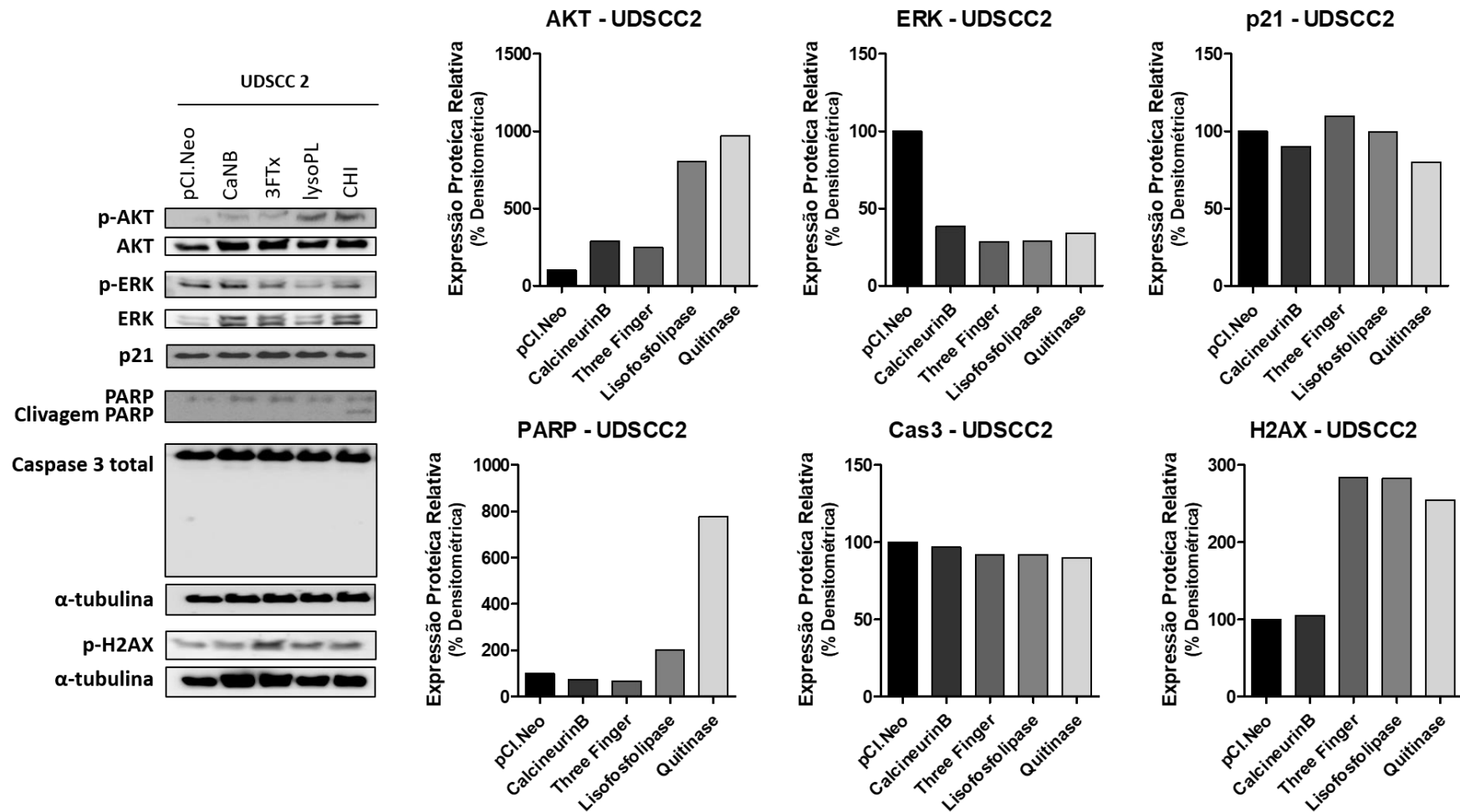


Figura 28 – Análise das vias de sinalização ativadas nas células UDSCC2, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina.

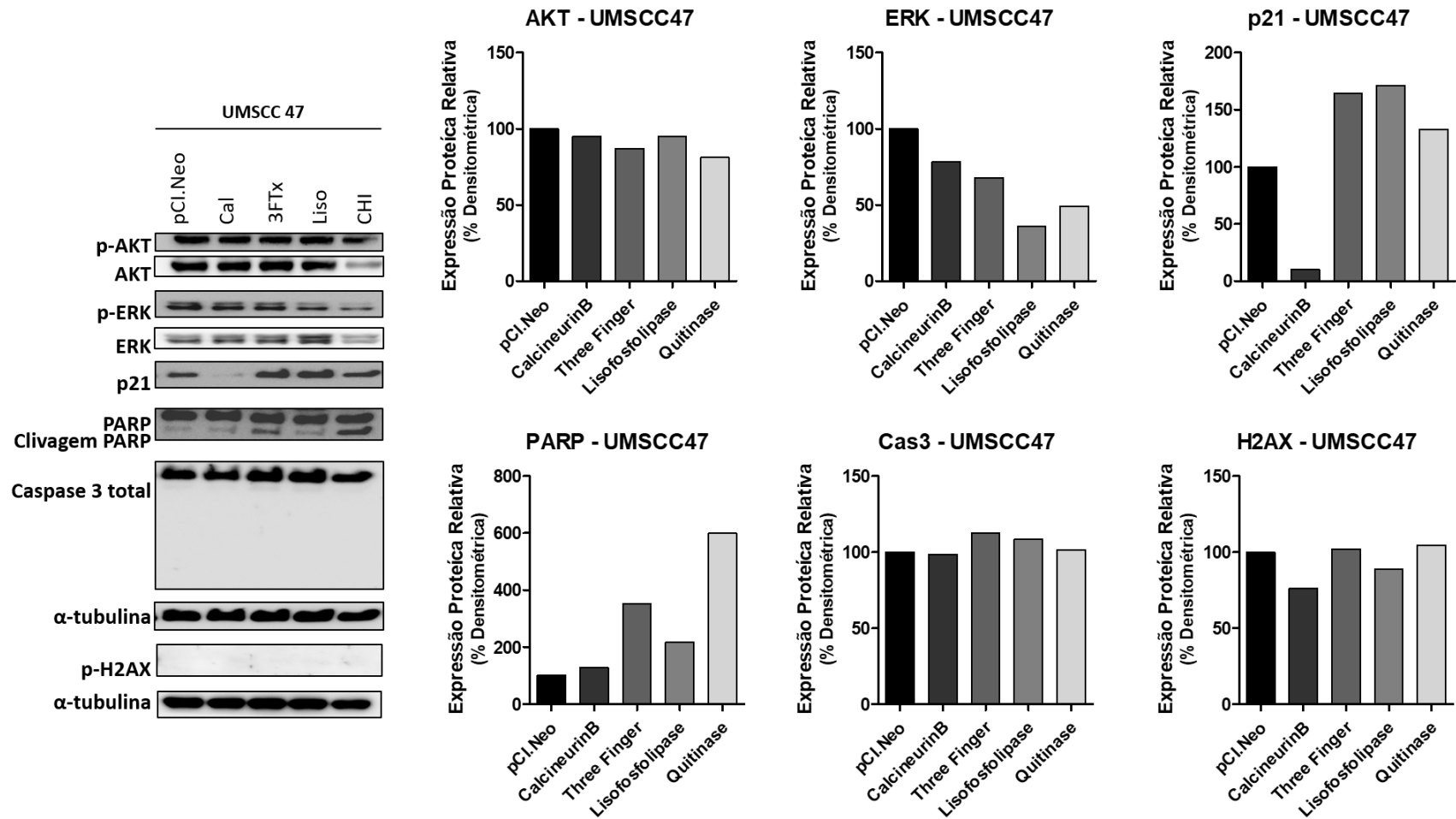


Figura 29 – Análise das vias de sinalização ativadas nas células UMSCC47, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina.

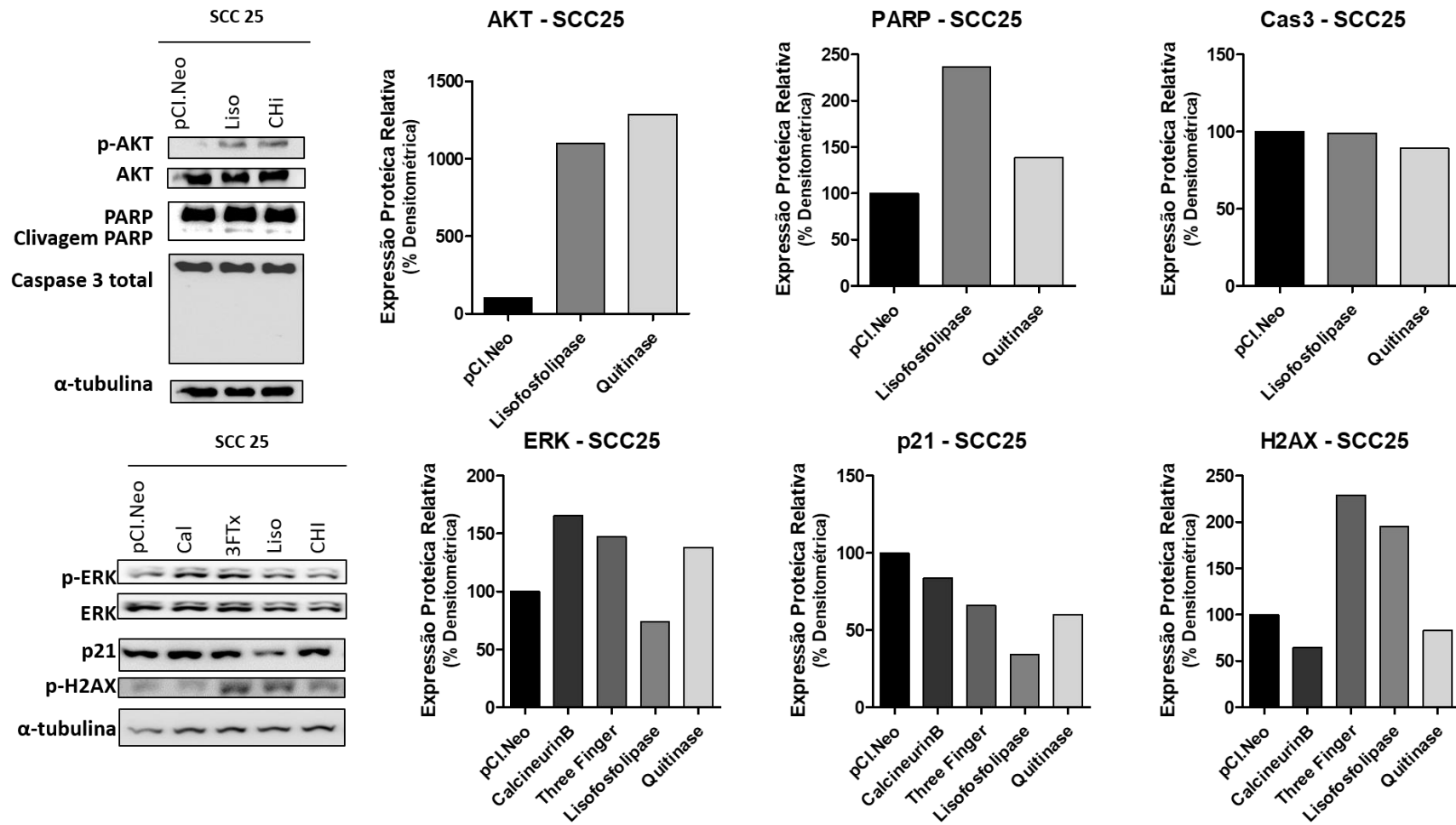


Figura 30 – Análise das vias de sinalização ativadas nas células SCC25, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina.

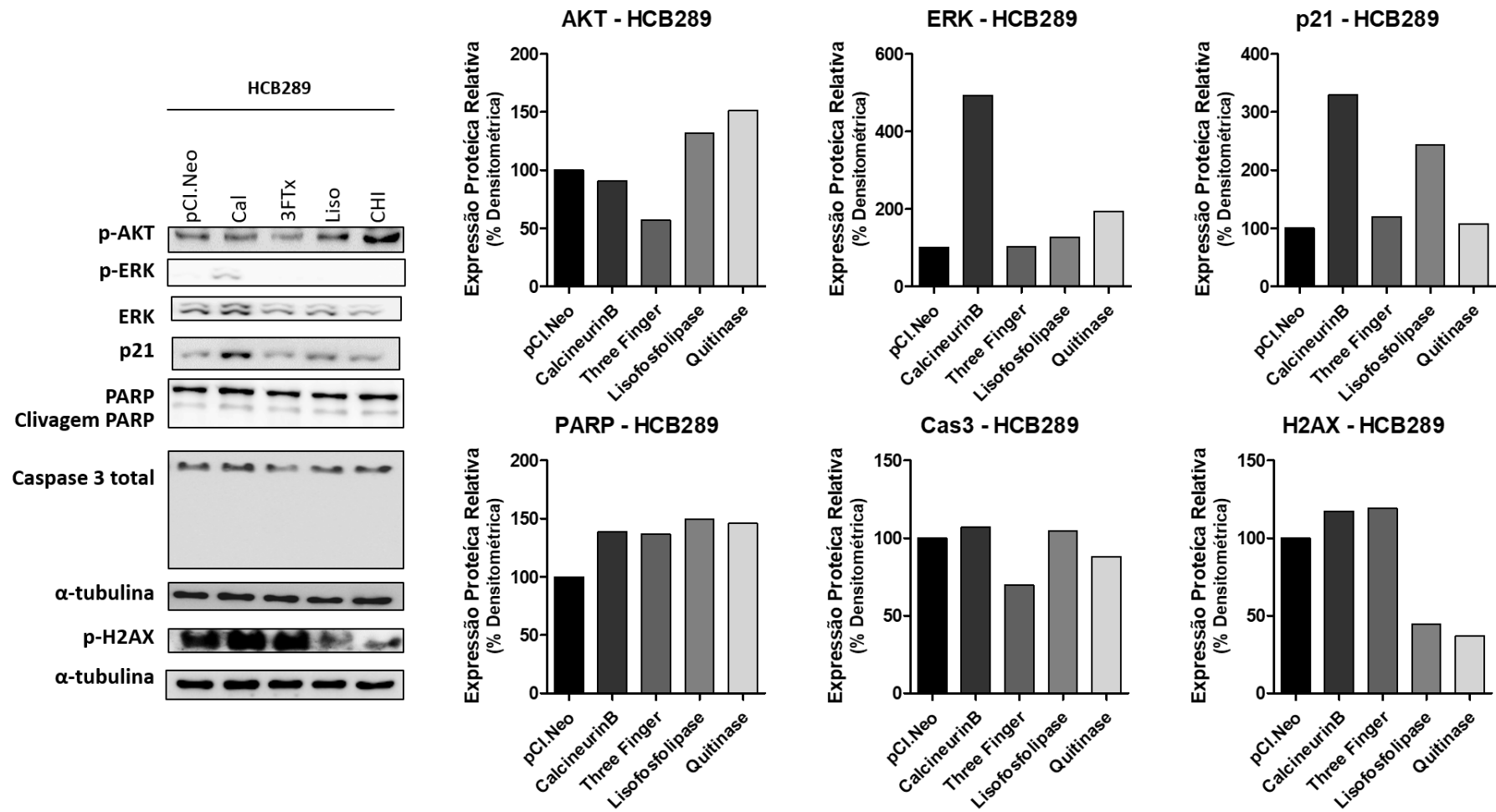


Figura 31 – Análise das vias de sinalização ativadas nas células HCB289, após 24 horas de tratamento com o meio condicionado de cada uma das proteínas. A quantificação das bandas foi feita pelo programa ImageJ. Os gráficos representam a análise de densitometria. Normalizações de AKT e ERK fosforilados pelos totais; p21 e caspase 3 pela primeira tubulina. PARP normalizado clivado pelo total e H2AX fosforilado pela segunda tubulina.

6 Discussão

O nosso estudo é uma investigação de cunho exploratório, a fim de buscar em recursos naturais novos fármacos de inibição tumoral. Como descrito em diversos artigos, animais peçonhentos são ricos reservatórios de moléculas bioativas, com efeitos biológicos específicos para estimular processos fisiológicos indesejáveis em suas presas^{38,39}. Na maioria dos animais, essas moléculas são secretadas em quantidade e qualidade variáveis, de acordo com fatores genéticos e ambientais⁴⁰, o que torna laborioso a maneira como esses venenos eram estudados durante décadas, por meio de purificação de frações do veneno bruto^{41,42}. Nosso estudo apresentou uma abordagem que otimiza de forma fidedigna a produção de componentes do veneno, por meio da clonagem dos transcritos. O estudo pioneiro e a caracterização da atividade biológica de proteínas pouco exploradas, possibilita desvendar moléculas presentes abundantemente na natureza com grande potencial terapêutico.

Na literatura já está bem descrito o processo de expressão de proteínas recombinantes em seres procariotos e fungos. De acordo com as exigências e complexidade das proteínas, é selecionado o tipo de microrganismo para a expressão bactérias ou leveduras, e o plasmídeo mais adequado para a utilização^{43,44}. Devido às várias opções, esse modelo de expressão se tornou difundido, além de dispor de um baixo custo para a praticabilidade. No entanto, uma significativa parcela de estudos relata sobre falhas, principalmente quanto à atividade biológica das proteínas sintetizadas⁴⁵. Para diminuir essa desvantagem, recomenda-se a utilização de sistemas eucariotos para a expressão⁴⁵. Baseado nesses dados, e no fato de que algumas proteínas necessitam de regulações pós-traducionais complexas para serem ativadas⁴⁶. Em nosso estudo escolhemos, para a expressar as proteínas, uma célula eucariota. A célula selecionada não exige a purificação, posterior à secreção das proteínas, visto que a pesquisa possuiu caráter exploratório.

Apesar da expressão de proteínas recombinantes não estar bem estabelecida, as células CHO-K1 estão há um tempo no mercado realizando esse papel em maior frequência que células como HEK⁴⁷. Alterações foram feitas na linhagem CHO, para que as células tivessem uma baixa taxa de morte em cultura e sobrevivessem em um meio de cultura quimicamente diferente do padrão utilizado para cultivo celular. O meio deve conter insulina e ser isento de albumina e componentes advindos de fontes animais, para otimizar o passo de purificação utilizando um ligante sintético^{48,49}. A linhagem rCHO, CHO modificada, melhora significativamente a expressão das proteínas⁵⁰. Entretanto, com a linhagem CHO-K1, não

obtivemos concentrações expressivas das proteínas. A proteína Quitinase foi secretada em maior quantidade 11,62 ng/mL, seguida da Lisofosfolipase com 7,63 ng/mL, a Calcineurin B com 3,78 ng/mL e na última posição a Three Finger toxin, que apresentou uma quantificação de apenas 0,46 ng/mL. Uma falha relatada durante a expressão em eucariotos⁴⁵.

O peptídeo sinal utilizado para a expressão de proteínas recombinantes, é um importante fator que pode interferir diretamente na secreção⁵¹. O fato do peptídeo sinal utilizado no estudo, ser derivado de uma sequência humana, utilizada em uma célula de ovário de hamster chinês não foi o fator agravante para a baixa expressão. Essa é uma prática comum em expressão em eucariotos^{51, 52}. O peptídeo sinal que utilizamos foi a IL2-ILco2 – MRRMQLLLLIALSLALVTNS^{53, 54}. Ramezani e colaboradores, relatam que a utilização do peptídeo sinal da albumina humana associado a uma otimização das cadeias pesadas e leves da proteína Pertuzumab, foi eficiente para o aumento da produção estável em CHO-K1⁵².

Em diversos estudos o veneno de formigas, tem demonstrado potencial terapêutico, em diferentes tipos tumorais^{14, 31, 32}. Acreditamos que as proteínas desse estudo possuem potencial antineoplásico, demonstrado pela a redução de viabilidade celular das linhagens tumorais SCC25 e HCB289. Essa diminuição de viabilidade celular pode estar relacionada a redução da taxa de proliferação das células. As linhagens UDSCC2 e UMSCC47 se demonstraram resistentes ao tratamento com as proteínas da formiga.

Para a avaliação e caracterização das vias de sinalização as quais compreendiam o envolvimento das proteínas, foram analisados marcadores para verificar a possibilidade de implicação das proteínas no mecanismo de apoptose. A apoptose é um sistema que pode ocorrer por duas vias, a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca inicia-se na mitocôndria, e é desencadeada normalmente por fatores internos, como estresse ou dano ao DNA⁵, ou ainda amplo desequilíbrio no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)⁵⁵. Estudos sugerem que a despolarização do potencial de membrana mitocondrial provoca a liberação de citocromo c, considerada proteína chave na via intrínseca. Assim, no citoplasma, essa proteína se liga ao fator 1 de ativação da protease pró apoptótica Apaf1 que recrutam caspases iniciadoras da via intrínseca, como caspase 9^{5, 56, 57}.

Já na via extrínseca, o processo de apoptose, acontece inteiramente no citoplasma da célula, e é iniciada pela ligação de proteínas nos receptores de morte na membrana citoplasmática. Na cauda citosólica desses receptores, encontram-se domínios que se ligam em proteínas que ativam as caspases iniciadoras, especialmente na caspase 8⁵. No final de

ambas as vias, comumente, a via intrínseca e extrínseca ativa a caspase 3, uma das caspase executora. Essa proteína também foi avaliada no presente estudo, no entanto, nenhum dos tratamentos com as proteínas de interesse apresentou marcação da clivagem de caspase 3, em nenhuma das linhagens avaliadas no estudo. Nesse estudo avaliamos a clivagem de PARP, proteína localizada no final da via apoptótica. A Poly (ADP-ribose) Polymerases (PARP) está envolvida em vários processos biológicos, além de morte celular, como proliferação e reparo do DNA^{58, 59 59}.

Para inferir se as proteínas provocavam alteração no ciclo celular, após as 24 horas de tratamento, foi verificado o nível de expressão de p21. Essa proteína, regula negativamente o ciclo celular⁶⁰, constituindo um dos checkpoints do ciclo que mediante alguma falha no DNA, promove a interrupção do ciclo⁶⁰. O ciclo pode ser impedido na fase inicial da interfase de G1 para S, ou na fase G2 para M, bloqueando a entrada na mitose⁵. Além do envolvimento em mecanismos de morte celular levando a célula à apoptose, p21 também está associado a mecanismos intracelulares de proliferação celular, onde a falta dessa proteína pode aumentar o processo de tumorigênese⁶⁰. A H2AX, é uma proteína ativada em resposta ao dano no DNA, o ciclo celular é paralisado para restauração do DNA⁶¹. Quando o processo de reparação, por algum motivo é impossibilitado, ocorre a ativação da apoptose⁶².

Uma maneira de avaliar se a diminuição da viabilidade celular, ocorreu devido a redução da taxa proliferativa das células, é verificar a fosforilação diminuída de AKT e ERK. A proteína quinase B (PKB/AKT) é essencial na regulação do metabolismo, além de estar envolvida em processos de transcrição, progressão do ciclo e sobrevivência celular⁶³. Outra proteína responsável pela proliferação e sobrevivência da célula, é a ERK. Entretanto, alguns autores relatam que a ativação de ERK pode estar relacionada a morte celular⁶⁴.

A CaNB é uma proteína que compõe a família das fosfatases serine/ treonina dependente de Cálcio, que participa de vários processos celulares e vias de transdução de sinal dependentes de Ca (2+)⁶⁵. Fruman e colaboradores constataram que a CaNB pode desempenhar um papel na programação da morte celular, esse estudo foi realizado em hibridomas para a produção de células T, onde verificou-se a ligação ao receptor de células T CD3⁶⁶. Em um outro estudo onde foi aumentado o nível de CaNB em células neuronais, mediada por um adenovírus, verificou-se que essa proteína tem envolvimento na apoptose de células neuronais pela via citocromo c/caspase 3, o que foi confirmado com uma incubação das células com inibidores de calcineurin ciclosporina A e FK506, que reduziu a apoptose.⁶⁷

Analisando a CaNB da formiga *E. opaciventre*, os resultados se corroboram com os descritos na literatura, pois, a CaNB possui algum grau de envolvimento com a via apoptótica. Nas linhagens HCB289 e UMSCC47 foi verificado um aumento na clivagem de PARP em relação ao controle pCI.Neo, indicando que esta proteína provavelmente causa uma ativação de uma das vias do apoptose. Nas linhagens UDSCC2 e SCC25, não houve clivagem de PARP, quando relacionadas com o controle pCI.Neo. Entretanto, em nenhuma das linhagens foi obtida marcação da clivagem de caspase 3. Portanto consideramos necessária a realização de outros ensaios, para melhor averiguar por qual via apoptótica, a morte está ocorrendo. Nas linhagens UDSCC2, UMSCC47 e SCC25, o tratamento com Calcineurin B indicou que essa proteína provavelmente não causa dano no DNA, visto que a expressão de p21 e a fosforilação de H2AX foi menor que o controle pCI.Neo, utilizado para a normalização. Já na linhagem HCB289, a proteína CaNB, foi capaz de aumentar a expressão de p21.

Recentemente, a combinação da CaNB associada a 5-FU em tumores gástricos inibiu a proliferação das células tumorais, revertendo os efeitos imunossupressores, sem aumentar os efeitos colaterais⁶⁸. Nas linhagens consideradas sensíveis ao tratamento HCB289 e SCC25, a CaNB aumentou a fosforilação de ERK. Entretanto não houve fosforilação de ERK nas linhagens UDSCC2 e UMSCC47, estudos apontam que ERK pode estar associado a morte celular⁶⁴. A proteína AKT, não apresentou diferença relevante ao tratamento de CaNB. Estes resultados podem ser indicativos que CaNB pode levar ao aumento da taxa proliferativa das células, mediada pela via ERK.

A proteína *Three Finger*, foi expressa em uma concentração muito baixa, menor que 1 ng/mL, no entanto, para a transfecção foi utilizada a mesma concentração de DNA em todas as proteínas. Esse dado sugere que possa estar ocorrendo alguma regulação negativa, podendo ser pós-transcricional ou pós-traducional na proteína *Three Finger toxin*.

As toxinas *Three finger* (3FTx) são umas das proteínas mais abundantes em venenos de cobras e também as responsáveis pela grande toxicidade⁶⁹. As proteínas desta família possuem facilidade adaptativa específica que gera funções pleiotrópicas⁷⁰.

Segundo Munawar e colaboradores, a *Three finger* pode inibir a maquinaria catalítica vital da célula, o proteassoma 20S, que desestabiliza o sistema de homeostase celular mediada pela citotoxina 1⁷¹. Em todas as linhagens, UDSCC2, UMSCC47, SCC25 e HCB289, a proteína *Three finger* foi responsável por uma ativação da fosforilação de H2AX em relação ao controle pCI.Neo, sugerindo a existência de dano no DNA. Esta proteína é um fator importante no

processo de reparo de DNA danificado, e quando não é possível a reparação dos danos, ocorre a ativação da apoptose⁶¹. Na linhagem SCC25 tratada com o meio condicionado contendo a 3FTx, p21 não obteve uma diminuição da expressão. No entanto UDSCC2 e UMSCC47 a expressão de p21 foram aumentadas. Nas linhagens UMSCC47 e HCB289 tratadas com 3FTx, ocorreu a clivagem de PARP, indicando que os danos causados no DNA foram suficientes para ativar a via apoptótica. Apenas na linhagem HCB289, 3FTx gerou uma diferença expressiva na fosforilação de AKT em relação ao controle pCl.Neo, essa diferença foi a diminuição da fosforilação. Na linhagem SCC25, a fosforilação de AKT, não foi analisada devido a insuficiência de lisado proteico. No entanto nessa linhagem foi verificado um aumento de ERK, diferentemente das linhagens UDSCC2, UMSCC47 e HCB289, que a fosforilação de ERK foi reduzida. Esses resultados nos permitem sugerir que a proteína *Three finger*, aparentemente causa um forte efeito de dano ao DNA, evidenciado pela clivagem de PARP, fosforilação de H2AX e aumento da expressão de p21.

A Lisofosfolipase pertence à família de proteínas alfa/beta hidrolases. Lakubov e colaboradores relatam sobre sua forte atividade hemolítica em 1-acilfosfatidilcolina dentro de uma faixa estreita de pH⁷². É ressaltado ainda que a função catalítica e hemolítica é ativada na presença de íons Ca^{+2} e Mn^{+2} ⁷².

Estudos apontam que a lysoPL, pode estar relacionada com a localização e sinalização de RAS⁷³. Na via de sinalização da Ras MAP-cinase, Ras ativa diretamente Raf, que ativa Mek que ativa ERK⁵. No entanto nas linhagens, UDSCC2, UMSCC47, utilizadas em nosso estudo, ERK obteve uma diminuição da fosforilação em relação ao controle pCl.Neo. Contudo, Wang e colaboradores afirmam RAS, pode ativar direta e indiretamente a via PI3K, que ativa a fosforilação de AKT⁷⁴. Nossos resultados, podem incorporar evidências positivas a essa afirmação, pois a Lisofosfolipase, foi capaz de induzir um aumento considerável na fosforilação de AKT, nas linhagens UDSCC2, SCC25 e HCB289. Ressaltamos ainda que, ao serem tratadas com o meio condicionado contendo a Lisofosfolipase, todas as linhagens, UDSCC2, UMSCC47, SCC25 e HCB289, apresentaram clivagem em PARP. No entanto, o dano no DNA foi notado pela fosforilação de H2AX em UDSCC2 e SCC25. O aumento de p21 em UMSCC47 e HCB289, quando tratadas por 24 horas com Lisofosfolipase, mostrou que a proteína pode interferir no ciclo celular. O tratamento com a Lisofosfolipase, foi capaz de ativar duas vias, a via de proliferação induzida por AKT e o dano no DNA e ciclo celular.

A Quitinase é uma hidrolase de glicosil caracterizada pela capacidade de degradar a quitina que é o segundo componente amplamente encontrado na natureza depois da celulose⁷⁵⁻⁷⁷. A Quitinase está presente em diversos organismos como artrópodes, bactérias, fungos, plantas e humanos⁷⁵.

Pan e colaboradores, demonstraram em um estudo realizado *in vivo* em células tumorais de mama e *in vitro* em modelos xenoenxertados, que o tratamento com Quitinase leva a um dano seletivo nas células tumorais⁷⁸. Nos nossos resultados, foi notado o aumento da fosforilação de H2AX, somente na linhagem UDSCC2. Entretanto, a Quitinase foi responsável pelo aumento da fosforilação de AKT nas linhagens UDSCC2, SCC25 e HCB289, e clivagem de PARP nas quatro linhagens em estudo. Sugere que um dos efeitos do tratamento com a Quitinase seria modular/ ativar o dano no DNA.

7 Conclusões

O tratamento com as proteínas CaNB, 3FTx, lysoPL e CHI, mesmo que em baixa concentração, demonstrou que estas são capazes de modificar mecanismos metabólicos nas linhagens tumorais, notado pela diminuição da viabilidade celular e inibição da migração, características marcantes de células tumorais. Além de modularem vias de sinalização, importantes compreendendo as proteínas, PARP, H2AX, AKT, ERK e p21. Essas características identificam as proteínas, como potenciais proteínas de interesse terapêutico.

Mais estudos se fazem necessários para melhor compreensão e delineamento dos processos os quais as proteínas estejam envolvidas.

Referências Bibliográficas

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018.
2. Facina T. *Estimativa 2014–Incidência de Câncer no Brasil*. **Rev Bras Cancerol**. 2014;60:63.
3. Saúde Md. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro. **INCA RJ**; 2017.
4. *Estimativa 2016 Incidência do Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde; 2015 [cited 15 de jan]; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Biologia molecular da célula*: Artmed Editora; 2010.
6. Sobin LH, Wittekind C, Eisenberg ALA, Rebelo PADP, Rebelo MS, Chalhub T. *TNM: classificação de tumores malignos*. **TNM: classificação de tumores malignos: INCA**; 2004.
7. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. *Head and neck cancer*. **Lancet**. 2008;371(9625):1695-709.
8. Kang H, Kiess A, Chung CH. *Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2015;12(1):11-26.
9. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. **Int J Cancer**. 2013;132(5):1133-45.
10. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *Global cancer statistics, 2012*. **CA Cancer J Clin**. 2015;65(2):87-108.
11. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. *The molecular biology of head and neck cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2011;11(1):9-22.
12. Oliveira-Silva RJ, Carolina de Carvalho A, de Souza Viana L, Carvalho AL, Reis RM. *Anti-EGFR Therapy: Strategies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**. 2016;11(2):170-83.
13. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J, Group M-NC. *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. **Radiother Oncol**. 2009;92(1):4-14.
14. Badr G, Garraud O, Daghestani M, Al-Khalifa MS, Richard Y. *Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsum ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling*. **Cell Immunol**. 2012;273(1):10-6.
15. Rebello Horta CC, Chatzaki M, Rezende BA, Magalhaes Bde F, Duarte CG, Felicori LF, et al. *Cardiovascular-Active Venom Toxins: An Overview*. **Curr Med Chem**. 2016;23(6):603-22.

16. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group*. **Am J Clin Oncol**. 1982;5(6):649-55.
17. Haddad R, Annino D, Tishler RB. *Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer*. **Dent Clin North Am**. 2008;52(1):1-17, vii.
18. Budach V. *TPF sequential therapy: when and for whom?* **Oncologist**. 2010;15 Suppl 3:13-8.
19. Mukherjee AK, Saviola AJ, Burns PD, Mackessy SP. *Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production*. **Apoptosis**. 2015;20(10):1358-72.
20. Takacs Z, Nathan S. *Animal venoms in medicine*. 2014.
21. Newman DJ, Cragg GM. *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*. **J Nat Prod**. 2016;79(3):629-61.
22. Wilson EO. *The insect societies*. **The insect societies**. 1971.
23. Brandao C. *PHYLOGENETIC, BIOGEOGRAPHIC, AND EVOLUTIONARY INFERENCES FROM THE DESCRIPTION OF AN EARLY CRETACEOUS SOUTH AMERICAN MYRMECHNAE*. In: **Social Insects and the Environment: Proceedings of the 11th International Congress of IUSSI, 1990: International Union for the Study of Social Insects**; 1990. **Oxford & IBH Publishing Company**.313.
24. Hölldobler B, Wilson EO. *The ants*: **Harvard University Press**; 1990.
25. Jacques H. C. Delabie RMF, José Eduardo Serrão, Cléa S. F. Mariano, Jonathan D. Majer. *As formigas Poneromorfas do Brasil*. In: UESC, editor. *As formigas Poneromorfas do Brasil*. **Ilhéus - Bahia: Universidade Estadual de Santa Cruz**; 2015. p. 126.
26. Almeida A. *Descrição de quatro machos do gênero Ectatomma Smith, 1858 (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)*. 1986.
27. Forel A, Fiebrig, Lutz, von Ihering H. *Ameisen aus São Paulo (Brasilien), Paraguay etc*: **A. Hölder**; 1908.
28. Jiménez E, Fernández F, Arias T, Lozano-Zambrano F. *Sistemática, biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia*. **Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt**. 2008.
29. Aili SR, Touchard A, Koh JM, Dejean A, Orivel J, Padula MP, et al. *Comparisons of Protein and Peptide Complexity in Poneroid and Formicoid Ant Venoms*. **J Proteome Res**. 2016;15(9):3039-54.
30. Touchard A, Aili SR, Fox EG, Escoubas P, Orivel J, Nicholson GM, et al. *The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms*. **Toxins (Basel)**. 2016;8(1).
31. Karlsson I, Zhou X, Thomas R, Smith AT, Bonner MY, Bakshi P, et al. *Solenopsin A and analogs exhibit ceramide-like biological activity*. **Vasc Cell**. 2015;7:5.

32. Al-Tamimi J, Semlali A, Hassan I, Ebaid H, Alhazza IM, Mehdi SH, et al. *Samsum Ant Venom Exerts Anticancer Activity Through Immunomodulation In Vitro and In Vivo*. **Cancer Biother Radiopharm**. 2018;33(2):65-73.
33. Zerbino DR. *Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies*. **Curr Protoc Bioinformatics**. 2010;Chapter 11:Unit 11 5.
34. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. *BLAST+: architecture and applications*. **BMC Bioinformatics**. 2009;10:421.
35. Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, et al. *High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite*. **Nucleic Acids Res**. 2008;36(10):3420-35.
36. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. *Clustal W and Clustal X version 2.0*. **Bioinformatics**. 2007;23(21):2947-8.
37. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. **Nat Methods**. 2012;9(7):671-5.
38. Koh CY, Modahl CM, Kulkarni N, Kini RM. *Toxins Are an Excellent Source of Therapeutic Agents against Cardiovascular Diseases*. **Semin Thromb Hemost**. 2018;44(7):691-706.
39. Primon-Barros M, Jose Macedo A. *Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents*. **Curr Top Med Chem**. 2017;17(10):1119-56.
40. Bernardi RC, Firmino ELB, Mendonca A, Sguarizi-Antonio D, Pereira MC, da Cunha Andrade LH, et al. *Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy*. **J Photochem Photobiol B**. 2017;175:200-6.
41. Zainal Abidin SA, Rajadurai P, Hoque Chowdhury ME, Othman I, Naidu R. *Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptosis Activity of L-Amino Acid Oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) Venom on Human Colon Cancer Cells*. **Molecules**. 2018;23(6).
42. Lucena S, Rodriguez-Acosta A, Grilli E, Alfonso A, Goins A, Ogbata I, et al. *The characterization of trans-pecos copperhead (*Agkistrodon contortrix pictigaster*) venom and isolation of two new dimeric disintegrins*. **Biologicals**. 2016;44(4):191-7.
43. Zhang J, Zhao M, Xiao W, Chang L, Wang F, Xu P. *Recombinant expression, purification and characterization of acetylated LysargiNase from *Escherichia coli* with high activity and stability*. **Rapid Commun Mass Spectrom**. 2019.
44. Wang L, Zhao T, Wang S, Jin J, Cai Y, Wang F. *Expression, purification, and in vitro mitochondrial interaction analysis of full-length and truncated human tumor suppressor p53*. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2019:1-7.
45. Saccardo P, Corchero JL, Ferrer-Miralles N. *Tools to cope with difficult-to-express proteins*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2016;100(10):4347-55.

46. Lee JS, Kildegaard HF, Lewis NE, Lee GM. *Mitigating Clonal Variation in Recombinant Mammalian Cell Lines*. **Trends Biotechnol.** 2019.
47. Inwood S, Betenbaugh MJ, Shiloach J. *Methods for Using Small Non-Coding RNAs to Improve Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells*. **Genes (Basel)**. 2018;9(1).
48. Walsh G. *Biopharmaceutical benchmarks 2010*. **Nat Biotechnol.** 2010;28(9):917-24.
49. Dahodwala H, Sharfstein ST. *The 'Omics Revolution in CHO Biology: Roadmap to Improved CHO Productivity*. **Methods Mol Biol.** 2017;1603:153-68.
50. Kim JY, Kim YG, Lee GM. *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2012;93(3):917-30.
51. Attallah C, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. *A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species*. **Protein Expr Purif.** 2017;132:27-33.
52. Ramezani A, Mahmoudi Maymand E, Yazdanpanah-Samani M, Hosseini A, Toghraie FS, Ghaderi A. *Improving Pertuzumab production by gene optimization and proper signal peptide selection*. **Protein Expr Purif.** 2017;135:24-32.
53. Hoshino J, Skiello G, Kuhne U, Kroger H. *Evidence for the lack of response of tyrosine aminotransferase to dibutyryl cyclic AMP in regenerating rat liver*. **FEBS Lett.** 1977;79(2):409-12.
54. Goss DJ, Parkhurst LJ, Gorisch H. *Kinetic light scattering studies on the dissociation of hemoglobin from Lumbricus terrestris*. **Biochemistry.** 1975;14(25):5461-4.
55. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. *Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)*. **Biochem Biophys Res Commun.** 2010;396(1):95-100.
56. Desagher S, Martinou JC. *Mitochondria as the central control point of apoptosis*. **Trends Cell Biol.** 2000;10(9):369-77.
57. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. *Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. **Mol Cell Biol.** 2000;20(15):5680-9.
58. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. *The PARP superfamily*. **Bioessays.** 2004;26(8):882-93.
59. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. *Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases*. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** 2014;24(1):15-28.
60. Gartel AL, Tyner AL. *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*. **Mol Cancer Ther.** 2002;1(8):639-49.
61. Yuan J, Adamski R, Chen J. *Focus on histone variant H2AX: to be or not to be*. **FEBS Lett.** 2010;584(17):3717-24.

62. Kuo LJ, Yang LX. *Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks*. **In Vivo**. 2008;22(3):305-9.
63. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. *Protein kinase B/Akt at a glance*. **J Cell Sci**. 2005;118(Pt 24):5675-8.
64. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. **Endocr Rev**. 2001;22(2):153-83.
65. Rusnak F, Mertz P. *Calcineurin: form and function*. **Physiol Rev**. 2000;80(4):1483-521.
66. Fruman DA, Mather PE, Burakoff SJ, Bierer BE. *Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas*. **Eur J Immunol**. 1992;22(10):2513-7.
67. Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, et al. *High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis*. **J Biol Chem**. 1999;274(48):34450-8.
68. Zhang W, Zhong Y, Cui H, Wang L, Yang R, Su Z, et al. *Combination of calcineurin B subunit (CnB) and 5-fluorouracil reverses 5-fluorouracil-induced immunosuppressive effect and enhances the antitumor activity in hepatocellular carcinoma*. **Oncol Lett**. 2017;14(5):6135-42.
69. Castro KL, Duarte CG, Ramos HR, Machado de Avila RA, Schneider FS, Oliveira D, et al. *Identification and characterization of B-cell epitopes of 3FTx and PLA(2) toxins from Micrurus corallinus snake venom*. **Toxicon**. 2015;93:51-60.
70. Kessler P, Marchot P, Silva M, Servent D. *The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions*. **J Neurochem**. 2017;142 Suppl 2:7-18.
71. Munawar A, Trusch M, Georgieva D, Hildebrand D, Kwiatkowski M, Behnken H, et al. *Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera Naja and Notechis*. **Toxins (Basel)**. 2014;6(3):850-68.
72. Iakubov IT, Tuichibaev MU, Rakhimov MM. *[Purification and properties of lysophospholipase from the venom of the giant hornet Vespa orientalis]*. **Biokhimiia**. 1988;53(7):1093-102.
73. Wang A, Dennis EA. *Mammalian lysophospholipases*. **Biochim Biophys Acta**. 1999;1439(1):1-16.
74. Wang Z, Martin D, Molinolo AA, Patel V, Iglesias-Bartolome R, Degese MS, et al. *mTOR co-targeting in cetuximab resistance in head and neck cancers harboring PIK3CA and RAS mutations*. **J Natl Cancer Inst**. 2014;106(9).
75. Zarei M, Aminzadeh S, Zolgharnein H, Safahieh A, Daliri M, Noghabi KA, et al. *Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native Serratia marcescens B4A*. **Braz J Microbiol**. 2011;42(3):1017-29.
76. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, et al. *Chitinases: An update*. **J Pharm Bioallied Sci**. 2013;5(1):21-9.

77. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. *Bacterial chitinases: properties and potential*. **Crit Rev Biotechnol**. 2007;27(1):21-8.
78. Pan XQ, Shih CC, Harday J. *Chitinase induces lysis of MCF-7 cells in culture and of human breast cancer xenograft B11-2 in SCID mice*. **Anticancer Res**. 2005;25(5):3167-72.



Comitê de Ética em Pesquisa Parecer *Ad Referendum*

Para: André Lopes Carvalho

De: Daniel Onofre Vidal
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 23/02/2017

Projeto de pesquisa: **1346/2017**

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o estudo intitulado “**Construção e análise de vírus oncolítico expressando duas variantes de fosfolipase A2 de *Bothrops jararaca* para tratamento de tumores de cabeça e pescoço.**”, o qual foi cadastrado sob o número **1346/2017**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por se tratar de pesquisa envolvendo apenas linhagens celulares comerciais, não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,

Daniel Onofre Vidal

Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos