



Universidade de Aveiro
2022

**SIMONE RAQUEL
NOVO PASCOAL**

**EFEITO CITOTÓXICO DE PÉPTIDOS DE VENENO DE
VESPA EM CÉLULAS DE MELANOMA**



Universidade de Aveiro
2022

**SIMONE RAQUEL
NOVO PASCOAL**

**EFEITO CITOTÓXICO DE PÉPTIDOS DE VENENO DE
VESPA EM CÉLULAS DE MELANOMA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Verónica Isabel Correia Bastos, Investigadora do Departamento de Biologia e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro, e da Doutora Helena Cristina Correia de Oliveira, Investigadora Auxiliar do Departamento de Biologia e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor Auxiliar c/ Agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Márcia Renata Mortari
Professora Associada, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade de Brasília

orientadora

Doutora Verónica Isabel Correia Bastos
Investigadora Doutorada (nível 1), CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Foram vários aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta dissertação e a quem, por isso, agradeço.

Agradeço inicialmente às minhas orientadoras, Doutora Verónica Bastos e Doutora Helena Oliveira, pela orientação e sobretudo pelo apoio e paciência durante a execução do presente trabalho.

Aos meus pais, irmão e avós por todo o carinho, apoio, conselhos e incentivos dados, indispensáveis à elaboração e conclusão desta dissertação.

Ao Fábio por todo o carinho, apoio, paciência e compreensão nas horas mais difíceis.

Às minhas amigas de todas as horas, Cecília e Miriam, pelo companheirismo, encorajamento e ajuda ao longo desta jornada.

A todos os elementos do grupo 3 C's pela interajuda e amizade criada.

A todos vocês... um Muito Obrigada!

palavras-chave

Melanoma, A375, MNT-1, Veneno de vespa, *Polybia dimorpha*, *Chartergellus communis*, Prolistarina, Chartergellus-CP1, Potencial antitumoral.

resumo

O melanoma é o tipo de cancro da pele mais agressivo e mortal, com uma incidência cada vez maior em populações caucasianas. A baixa eficiência terapêutica e a resistência do melanoma aos tratamentos convencionais indica a necessidade de investigar novas abordagens terapêuticas. Os venenos derivados de animais são misturas complexas de compostos bioativos, alguns dos quais com potencial terapêutico para o cancro. Por isso, o objetivo desta dissertação foi investigar o potencial antitumoral de dois péptidos, Prolistarina bioinspirado num péptido proveniente do veneno da vespa *Polybia dimorpha* e Chartergellus-CP1 isolado do veneno da vespa *Chartergellus communis*, em linhas celulares de melanoma humano A375 (amelanótico) e MNT-1 (pigmentado). As células foram tratadas com diferentes concentrações de Prolistarina e Chartergellus-CP1 durante 24 e 48 horas e as suas viabilidades foram avaliadas. O péptido Prolistarina revelou-se pouco citotóxico, pelo que foi excluído nos ensaios seguintes. Contudo, Chartergellus-CP1 apresentou citotoxicidade em ambas as células, diminuindo significativamente a viabilidade celular, porém não em todas as concentrações testadas, indicando que o efeito depende da concentração do péptido. A dinâmica do ciclo celular, a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a morte celular por apoptose foram analisadas por citometria de fluxo após a exposição, durante 24 horas, à IC₂₀ e IC₅₀ de Chartergellus-CP1. Os resultados mostraram que o tratamento com a IC₅₀ causou a paragem do ciclo celular em fase G2/M nas células A375, levou a um aumento não significativo dos níveis de ROS intracelulares e induziu apoptose inicial nas células A375 e MNT-1. Estes resultados mostram, pela primeira vez, que o péptido Chartergellus-CP1 possui potencial antitumoral em linhas celulares de melanoma humano.

keywords

Melanoma, A375, MNT-1, Wasp venom, *Polybia dimorpha*, *Chartergellus communis*, Prolistarin, Chartergellus-CP1, Antitumor potential.

abstract

Melanoma is the most aggressive and deadly type of skin cancer, with an increasing incidence in Caucasian populations. The low therapeutic efficiency and resistance of melanoma to conventional treatments indicates the need to investigate new therapeutic approaches. Animal-derived venoms are complex mixtures of bioactive compounds, some of which have therapeutic potential against cancer. Therefore, the aim of this dissertation was to investigate the antitumor potential of two peptides, Prolistarin bioinspired peptide from the venom of the wasp *Polybia dimorpha* and Chartergellus-CP1 isolated from the venom of the wasp *Chartergellus communis*, in human melanoma cell lines A375 (amelanotic) and MNT-1 (pigmented). Cells were treated with different concentrations of Prolistarin and Chartergellus-CP1 for 24 and 48 hours and their viability was evaluated. The Prolistarin peptide showed low cytotoxic effect, thus it was excluded in the following assays. However, Chartergellus-CP1 showed cytotoxicity in both cell lines, significantly decreasing cell viability, but not for all concentrations tested, indicating that the effects were dose-dependent. Cell cycle dynamics, production of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic cell death were analysed by flow cytometry after exposure, during 24 hours, to IC₂₀ and IC₅₀ of Chartergellus-CP1. Results showed that IC₅₀ treatment caused cell cycle arrest in G2/M phase in A375 cells, led to a non-significant increase in intracellular ROS levels and induced early apoptosis in A375 and MNT-1 cells. These findings show, for the first time, that the Chartergellus-CP1 peptide has antitumor potential in human melanoma cell lines.

Índice

I. Introdução.....	1
1. Cancro	1
1.1. Caraterísticas do cancro	1
2. Melanoma	6
2.1. Fatores de risco, genes e vias de sinalização.....	7
2.2. Tipos de melanoma.....	10
2.3. Estadiamento e tratamento do melanoma.....	10
3. Venenos de origem animal	13
3.1. Potencial terapêutico dos venenos de animais	14
3.2. Venenos de vespas.....	17
II. Objetivos.....	21
III. Materiais e métodos	22
1. Péptidos.....	22
2. Preparação dos péptidos.....	22
3. Cultura celular	22
4. Avaliação da viabilidade celular.....	23
5. Análise do ciclo celular	24
6. Análise da produção de ROS	26
7. Detecção de apoptose celular.....	26
8. Análise estatística.....	28
IV. Resultados.....	29
1. Viabilidade celular.....	29
1.1. Efeito de Prolistarina na viabilidade celular	29
1.2. Efeito de Chartergellus-CP1 na viabilidade celular	30
2. Efeito de Chartergellus-CP1 no ciclo celular	31
3. Efeito de Chartergellus-CP1 na produção de ROS intracelular	32
4. Efeito de Chartergellus-CP1 na apoptose celular	33
V. Discussão	35
VI. Conclusão.....	39
VII. Referências bibliográficas	40

Índice de Figuras

Figura 1 - Características das células cancerígenas (adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).	2
Figura 2 - Fases do melanoma (adaptado de AIM at Melanoma Foundation, 2022).....	11
Figura 3 - Vespa <i>Polybia dimorpha</i> (fotografia da autoria de Fernando B. Noll retirada de Castro, 2013).....	19
Figura 4 - Vespa <i>Chartergellus communis</i> (fotografia da autoria de Leandro Campos retirada de Lopes, 2018).....	20
Figura 5 - Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase invertida das células A375 (A) e MNT-1 (B) com ampliação de 100x.	23
Figura 6 - Viabilidade das células A375 e MNT-1 após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de Prolistarina. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (0 µg/mL) para $p < 0,05$ e estão devidamente identificadas com * (24 horas) ou # (48 horas).	30
Figura 7 - Viabilidade das células A375 e MNT-1 após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (0 µg/mL) para $p < 0,05$ e estão devidamente identificadas com * (24 horas) ou # (48 horas).	31
Figura 8 - Distribuição das células A375 e MNT-1 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de exposição a Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (sem tratamento) para $p < 0,05$ e estão identificadas com *.	32
Figura 9 - Percentagem relativa de ROS nas linhas celulares A375 e MNT-1 após 24 horas de exposição a Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de duas experiências independentes.	33
Figura 10 - Percentagem de células A375 e MNT-1 viáveis (A-PI-), em apoptose inicial (A+PI-), em apoptose tardia (A+PI+) e em necrose (A-PI+) após 24 horas de incubação com Chartergellus-CP1. A e PI representam Anexina V-FITC e iodeto de propídio, respetivamente. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (sem tratamento) para $p < 0,05$ e estão identificadas com *.	34

Índice de Tabelas

Tabela 1 - IC₅₀ (µg/mL) de Chartergellus-CP1 nas células de melanoma humano após 24 e 48 horas de tratamento.....	31
---	-----------

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

6-4PPs – Fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona

AIF – Fator indutor de apoptose

AKT – Proteína quinase B

Anexina V-FITC – Anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

ASIP – Gene que codifica a proteína de sinalização agouti

ATM – Proteína quinase serina/treonina ATM

ATP – Trifosfato de adenosina

ATR – Proteína quinase serina/treonina ATR

BAX – Proteína X associada a BCL2

BCL2 – CLL/Linfoma de célula B 2

BCL-XL – CLL/Linfoma de células B extra grandes

BIM – Mediador de morte celular que interage com BCL2

BRAF – Gene quinase serina/treonina

CCND1 – Gene ciclina D1

CDKN2A – Gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A

CPDs – Dímeros de pirimidina ciclobutano

CTLA4 – Proteína 4 de linfócitos T citotóxicos

DCF – 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA – Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPBS – Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

FBS – Soro fetal bovino

FDA – *Food and Drug Administration*

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

GLUT1 – Transportador de glicose 1

HIF1A – Fator 1 alfa induzido por hipóxia

HIF2A – Fator 2 alfa induzido por hipóxia

IC – Concentração inibitória

IFNA – Interferão alfa

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IGF2 – Fator de crescimento semelhante à insulina 2

IL – Interleucina

IL1B – Interleucina-1 beta

K_{ATP} – Canal de potássio dependente de ATP

KIT – Gene recetor de tirosina quinase

KRAS – GTPase KRAS

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MC1R – Gene que codifica o recetor 1 de melanocortina

MEK - Proteína quinase quinase ativada por mitógeno

MITF – Fator de transcrição associado à microftalmia

MTAP – Gene metiltioadenosina fosforilase

mTOR – Proteína quinase serina/treonina mTOR

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MYC – Gene que codifica o fator de transcrição bHLH MYC

NF1 – Gene neurofibromina 1

NFκB - Fator nuclear *kappa* B

NRAS – Gene que codifica a GTPase NRAS

PDGFRA – Gene que codifica o recetor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI – Iodeto de propídio

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PLA2G6 – Gene que codifica a fosfolipase A2 do grupo VI

PTEN – Gene homólogo da fosfatase e tensina

PUMA – Modulador de apoptose regulado positivamente por TP53

RB – Gene que codifica a proteína associada ao retinoblastoma

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SLC45A2 – Gene membro 2 da família 45 de transportadores de soluto

TERT – Gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase

TGFB – Fator de crescimento transformador beta

TNFA – Fatores de necrose tumoral alfa

TP53 – Gene que codifica a proteína tumoral TP53

TSP-1 – Trombospondina-1

TYR – Gene que codifica a tirosinase

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

I. Introdução

1. Cancro

O cancro caracteriza-se pelo crescimento celular descontrolado e disseminação de células anormais, incluindo um vasto grupo de patologias que podem desenvolver-se em vários tipos de tecidos (Olaku & Taylor, 2019). É atualmente uma das maiores ameaças globais à saúde pública constituindo a segunda principal causa de mortalidade, logo a seguir às doenças cardiovasculares (OECD & European Union, 2018). Segundo dados divulgados pela plataforma GLOBOCAN, referentes ao ano de 2020, estima-se que, no mundo inteiro, tenha havido cerca de 19 milhões de novos casos de cancro e cerca de dez milhões de mortes por cancro. A Europa surge a seguir à Ásia como o segundo continente mais afetado pelo cancro, registrando 22,8% do total dos casos e 19,6% das mortes (Sung et al., 2021).

Existem diversos fatores que aumentam a suscetibilidade de desenvolver cancro, tais como fatores genéticos, estilo de vida (por exemplo, consumo excessivo de álcool, tabagismo, dieta inadequada e sedentarismo), exposição a radiação (por exemplo, radiação ultravioleta [UV] e radiação ionizante), agentes infecciosos (por exemplo, bactéria *Helicobacter pylori*, vírus da imunodeficiência humana, vírus do herpes humano, papilomavírus humano e vírus da hepatite B), fatores ambientais (por exemplo, exposição ao amianto), entre outros (Olaku & Taylor, 2019).

1.1. Características do cancro

Diversos estudos evidenciaram que a tumorigénese em seres humanos é um processo constituído por múltiplas etapas que refletem alterações genéticas que impulsionam a transformação progressiva de células normais em células malignas (Hanahan & Weinberg, 2000).

Assim, Hanahan & Weinberg (2011) publicaram uma revisão intitulada por “Hallmarks of cancer: the next generation”, onde propuseram um conjunto de capacidades biológicas adquiridas pelas células durante a tumorigénese (Figura 1). De salientar que, estas características não se aplicam a todas as células cancerígenas e também não são obrigatoriamente expressas continuamente pelas células (Floor et al., 2012). Além disso, a progressão do tumor é muito influenciada pelas interações das células cancerígenas com o microambiente tumoral, ou seja, o ambiente que envolve o tumor que inclui, células do sistema imunológico, células estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular (Anderson & Simon, 2020; Kolenda et al., 2018).



Figura 1 - Características das células cancerígenas (adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

- Sustentação da sinalização proliferativa

Os tecidos normais controlam a síntese e libertação de sinais promotores de crescimento para garantir a homeostasia do número de células, preservando a estrutura e função dos tecidos. Contrariamente às células normais, em que a sinalização proliferativa é transitória, as células cancerígenas podem manter esta sinalização, permitindo sustentar a proliferação celular crónica e pouco dependente de sinais externos promotores de crescimento (Giri et al., 2001; Hanahan & Weinberg, 2011, 2017). Este aumento da capacidade de proliferação celular pode dever-se: à produção dos próprios fatores de crescimento e respetivos recetores (sinalização autócrina); à indução da produção de fatores de crescimento nas células normais do estroma tumoral, para os quais as células cancerígenas produzem moléculas recetoras específicas (sinalização parácrina); à sobreexpressão dos recetores da superfície celular; a modificações na estrutura dos recetores de sinais que facilitam o disparo independente do fator de crescimento; e à ativação constitutiva de componentes envolvidos nas vias de sinalização a jusante das moléculas recetoras (Bhowmick et al., 2004; Cheng et al., 2008; Hanahan & Weinberg, 2011). Na sustentação da sinalização proliferativa pode estar envolvida a alteração mutacional de genes que controlam o crescimento e diferenciação celular, denominados por proto-oncogenes, onde estes genes são convertidos em condutores ativos da proliferação celular, denominados por oncogenes (por exemplo, os transdutores de sinal

na via KRAS-RAF-MEK-MAPK a jusante) (Hanahan & Weinberg, 2017; Newkirk et al., 2017).

- Escape aos supressores de crescimento

As células cancerígenas podem adquirir a capacidade de evitar supressores de crescimento, os quais são responsáveis pela regulação negativa da proliferação celular (Hanahan & Weinberg, 2011). Os genes supressores de tumor codificam proteínas que estão envolvidas na regulação da divisão celular, reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e indução de apoptose (Buckingham & Flaws, 2007). Mutações que ocorrem em genes supressores de tumor (por exemplo, o gene da proteína tumoral TP53 [*TP53*] e o gene da proteína associada ao retinoblastoma [*RB*]) têm geralmente como consequência a perda de função da proteína codificada por estes genes, o que favorece a proliferação celular (Buckingham & Flaws, 2007; Hickman et al., 2002).

- Resistência à morte celular

As células cancerígenas podem adquirir a capacidade de resistir à apoptose, uma forma de morte celular programada, que pode ser desencadeada em resposta a diversos *stresses* fisiológicos (tais como, danos no DNA e níveis elevados de sinalização de oncogenes) gerados ao longo da tumorigénese (Hanahan & Weinberg, 2011). A ativação da apoptose pode acontecer através de dois circuitos principais, a via de sinalização extrínseca que recebe e processa sinais oriundos do exterior da célula que induzem a morte celular (envolve, por exemplo, o ligante Fas e o seu recetor) e a via de sinalização intrínseca que capta e integra sinais intracelulares. Ambas as vias culminam com a ativação mútua de proteases conhecidas por caspases e a célula é direcionada para apoptose na qual sofre modificações quer a nível morfológico, quer a nível bioquímico (tais como, condensação da cromatina, formação de protrusões na membrana plasmática, produção de espécies reativas de oxigénio [ROS], externalização da fosfatidilserina, proteólise, fragmentação do DNA, entre outros) (Adams & Cory, 2007; Cryns & Yuan, 1998; Hanahan & Weinberg, 2011). Contudo, as células cancerígenas podem superar este tipo de defesa celular por meio de diversos mecanismos que incluem: a perda da função supressora de tumor da proteína TP53; o aumento na expressão de reguladores antiapoptóticos (tais como, BCL2 e BCL-XL) ou de sinais de sobrevivência (tais como, IGF1 e IGF2); e a regulação negativa de fatores pró-apoptóticos (tais como, BAX, BIM e PUMA) (Fernald & Kurokawa, 2013; Hanahan & Weinberg, 2011).

- Potencial replicativo ilimitado

A maior parte das células normais tem um número limitado de divisões celulares que está associado à senescência e morte celular (Hanahan & Weinberg, 2011). A senescência celular está relacionada com a redução progressiva do comprimento de regiões de sequências repetitivas de DNA localizadas nos terminais dos cromossomas, denominadas por telômeros, em cada divisão celular. Os telômeros tem como principal função proteger as extremidades dos cromossomas impedindo a sua degradação. Quando os telômeros atingem um limite crítico de comprimento é induzida a senescência e as células perdem a capacidade proliferativa. Todavia, as células cancerígenas podem superar estas limitações adquirindo um potencial replicativo ilimitado, ou seja, a imortalidade celular. Uma forma disto acontecer é através da regulação positiva da expressão da telomerase, uma transcriptase reversa que é responsável pela adição de sequências repetitivas de DNA às extremidades do DNA telomérico (Blasco, 2005; Hanahan & Weinberg, 2011; Haycock et al., 2017; Shay & Wright, 2000, 2011).

- Indução da angiogénese

As células cancerígenas podem induzir a angiogénese, que em outras palavras, é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são criados a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, para suprir as necessidades das células de nutrientes e oxigénio, como também, remover resíduos metabólicos e CO₂ (Hanahan & Weinberg, 2011; Loizzi et al., 2017; Papetti & Herman, 2002). A angiogénese é controlada por um equilíbrio entre fatores antiangiogénicos (por exemplo, TSP-1) e pró-angiogénicos (por exemplo, VEGF e FGF), isto é, um equilíbrio fisiológico entre sinais que inibem e induzem o processo, respetivamente. Durante o desenvolvimento tumoral as vias da angiogénese estão normalmente ativadas de uma forma permanente, devido a modificações locais no equilíbrio a favor dos indutores angiogénicos (Baeriswyl & Christofori, 2009; Bergers & Benjamin, 2003; Hanahan & Folkman, 1996; Loizzi et al., 2017; Mundel & Kalluri, 2007).

- Ativação da invasão e metastização

As células cancerígenas podem invadir os tecidos adjacentes, separar-se da massa tumoral primária, podendo através de vasos sanguíneos ou linfáticos metastizar, isto é, migrar para outros tecidos ou órgãos, criando tumores secundários. A metastização representa uma das principais complicações clínicas do cancro, sendo a causa de morte de muitos pacientes (Ganguly et al., 2013; Lambert et al., 2017). A capacidade de invadir e metastizar advém de mudanças na adesão célula a célula/matriz extracelular em

consequência de modificações nas células (por exemplo, regulação negativa e/ou inativação mutacional de E-caderina, regulação positiva de N-caderina e alterações na expressão da integrina) e da ativação de proteases extracelulares (Berx & Van Roy, 2009; Cavallaro & Christofori, 2004; Ganguly et al., 2013; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

- Instabilidade genômica e mutação

A instabilidade do genoma e mutação são um pré-requisito essencial para a tumorigênese. A instabilidade genômica pode ser descrita como uma tendência progressiva do genoma em adquirir mutações (Yao & Dai, 2014). Isto pode acontecer devido a mutações inativadoras ou repressão epigenética de genes responsáveis por manter a estabilidade do genoma (por exemplo, genes envolvidos na detecção e reparação de danos do DNA e genes que inativam ou interceptam moléculas mutagênicas) (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Promoção de inflamação tumoral

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a estímulos adversos (tais como, agentes patogênicos, células danificadas e compostos tóxicos) (Chen et al., 2017). Contudo, a resposta inflamatória do organismo no combate e eliminação do tumor pode ter um efeito indesejado, favorecendo a progressão do mesmo, ao promover a libertação de diversas moléculas bioativas (tais como, fatores de crescimento, fatores de sobrevivência, fatores pró-angiogênicos e enzimas modificadoras da matriz extracelular). Adicionalmente, podem ser libertadas ROS que são altamente mutagênicas (Grivennikov et al., 2010; Hanahan & Weinberg, 2011; Marelli et al., 2017).

- Reprogramação do metabolismo energético

As células cancerígenas podem ser capazes de reprogramar o seu metabolismo energético, de forma a sustentar a proliferação celular. Em condições aeróbicas, as células normais convertem a glicose em piruvato num processo biológico denominado por glicólise que ocorre no citosol. Posteriormente, o piruvato passa para as mitocôndrias onde é convertido em CO₂. No caso de condições anaeróbicas, a glicólise é favorecida e uma quantidade reduzida de piruvato é utilizada na mitocôndria (Hanahan & Weinberg, 2011). Warburg observou que certas células cancerígenas, mesmo em condições aeróbicas, limitam o seu metabolismo energético predominantemente à glicólise, num fenómeno denominado por “glicólise aeróbica” a qual, além da produção de trifosfato de adenosina (ATP), é também responsável pela síntese de vários monómeros que formam

macromoléculas necessárias para a proliferação celular (Hanahan & Weinberg, 2011, 2017; Warburg, 1956). A glicólise é um processo menos eficiente na síntese de ATP comparativamente com a fosforilação oxidativa, pelo que as células cancerígenas compensam a menor eficiência energética aumentando a importação de glicose para o citoplasma, por exemplo, através da regulação positiva do transportador de glicose 1 (GLUT1) (DeBerardinis et al., 2008; Hanahan & Weinberg, 2011; Hsu & Sabatini, 2008; Jones & Thompson, 2009). Formas mutantes de supressores de tumor (tal como, *TP53*) e a ativação de oncogenes (tais como, *RAS* e *MYC*) estão relacionadas com o abastecimento glicolítico (DeBerardinis et al., 2008; Jones & Thompson, 2009). Além disso, a hipóxia tumoral, bem como a proteína oncogénica *RAS*, podem aumentar os níveis dos fatores de transcrição *HIF1A* e *HIF2A*, regulando positivamente a glicólise (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Semenza, 2010a, 2010b).

- Escape à destruição imunológica

O sistema imunológico é responsável por identificar, resistir ou erradicar a formação e progressão de certos tipos de cancro. No entanto, as células cancerígenas podem reduzir a sua capacidade de desencadear uma resposta imunológica, isto é, a sua imunogenicidade (Ferris, 2015; Hanahan & Weinberg, 2011). As células cancerígenas altamente imunogénicas podem escapar à destruição imunológica por meio de vários mecanismos que incluem: a secreção de fatores imunossupressores (por exemplo, *TGFB*), que inativam os linfócitos T citotóxicos infiltrantes e as células *natural killer*, e o recrutamento de células inflamatórias imunossupressoras (como, as células T reguladoras e as células supressoras derivadas de mielóides), que suprimem a atividade dos linfócitos citotóxicos (Hanahan & Weinberg, 2011; Mougiakakos et al., 2010; Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009; Shields et al., 2010; Yang et al., 2010).

2. Melanoma

O melanoma é um tipo de cancro que se origina nas células produtoras de melanina denominadas melanócitos. É a forma mais rara de cancro da pele, porém a mais letal sendo responsável por cerca de 80% das mortes por cancro cutâneo. A elevada percentagem de mortalidade desta doença deve-se à sua enorme capacidade de metastização (Jerant et al., 2000; Strickland et al., 2015). A incidência do melanoma tem vindo a aumentar de forma alarmante em populações caucasianas ao longo das últimas cinco décadas (Bélanger et al., 2014; Leiter & Garbe, 2008). Em todo o mundo, e no ano de 2020, o número de novos casos de melanoma cutâneo foi cerca de 325 mil e o número de mortes causadas por

melanoma cutâneo foi cerca de 57 mil (Sung et al., 2021). Este aumento de incidência do melanoma pode ser atribuído a alterações no estilo de vida da população e, também, à depleção da camada de ozono (Menezes et al., 2016, 2018).

2.1. Fatores de risco, genes e vias de sinalização

Diversos fatores contribuem para o aparecimento de melanoma, tais como fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais. Em indivíduos de pele clara, o risco de desenvolver melanoma cutâneo é cerca de dez vezes maior, comparativamente aos indivíduos de pele mais escura (Rastrelli et al., 2014). O melanoma é frequentemente diagnosticado em indivíduos jovens e de meia-idade. A sua incidência difere entre os gêneros. Na faixa etária dos 25 aos 40 anos é mais frequente nas mulheres, mas a partir dos 75 anos a incidência no sexo masculino triplica (Carr et al., 2020; Rastrelli et al., 2014; Rigel, 2010).

Um fator de risco importante para o desenvolvimento de melanoma é a exposição à radiação UV. De acordo com o comprimento de onda, o espectro eletromagnético de radiação UV subdivide-se em três regiões denominadas por ultravioleta C (UVC), ultravioleta B (UVB) e ultravioleta A (UVA). A radiação UVC, com um comprimento de onda de 200 a 280 nm, é em grande parte absorvida pela camada de ozono, de tal forma que os seus efeitos à saúde humana são considerados insignificantes. A radiação UVB, com um comprimento de onda de 280 a 320 nm, é parcialmente absorvida pela camada de ozono e somente cerca de 5% da radiação solar UV atinge a superfície terrestre. Já a radiação UVA, com um comprimento de onda que varia entre 320 e 400 nm, representa cerca de 95% da radiação solar UV que atinge a superfície terrestre (Brozyna et al., 2007; Dakup & Gaddameedhi, 2017; Pattison & Davies, 2006).

A capacidade energética da radiação UV é inversamente proporcional ao comprimento de onda (Dakup & Gaddameedhi, 2017). Portanto, a radiação UVA é a menos energética. Contudo, existe uma relação diretamente proporcional entre a capacidade de penetração da radiação UV na pele e o comprimento de onda (D’Orazio et al., 2013; Martens et al., 2018). Assim, a radiação UVB apresenta um menor poder de penetração na pele do que a radiação UVA, sendo que a primeira alcança a epiderme e a segunda atinge a derme (Shin, 2020).

A radiação UVB interfere diretamente com o DNA, induzindo a produção de fotoprodutos de DNA, tais como dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs), que são responsáveis por causar grandes distorções na estrutura do DNA, inibindo a progressão das polimerases durante os processos de

transcrição e replicação do DNA (Chiganças et al., 2004; Melnikova & Ananthaswamy, 2005; Mitchell et al., 2003; Rastogi et al., 2010; Seebode et al., 2016). Os CPDs são formados por um anel de ciclobutano que surge devido a ligações covalentes entre os átomos de carbono 5 e 6 de duas pirimidinas vizinhas (Pfeifer, 1997). Os 6-4PPs são formados por uma ligação covalente que conecta os átomos de carbono 6 e 4 de duas pirimidinas adjacentes (Pfeifer, 1997).

A radiação UVA interage com fotossensibilizadores endógenos levando à produção de ROS, que originam quebras de cadeia simples, ligações cruzadas entre DNA e proteína, e modificações nas bases do DNA (Melnikova & Ananthaswamy, 2005). Tal como UVB, UVA também pode induzir a formação de fotoprodutos de DNA (Rünger, 2008).

Apesar de grande parte dos fotoprodutos de DNA ser reparado, através de um mecanismo denominado por reparação por excisão de nucleótidos, danos não reparados podem causar mutações (por exemplo, mutações de transição de citosina para timina) (Alexandrov et al., 2013; Hayward et al., 2017; Sugiyama & Chen, 2019). Além disso, a radiação UV ao induzir a produção de dímeros de pirimidina pode promover a imunossupressão ao regular positivamente a expressão da citocina imunossupressora interleucina-10 (IL10), o que faz com que eleve o risco de desenvolver cancro da pele (Loser et al., 2007; Nishigori et al., 1996; Nishigori, 2015).

A presença de nevos melanocíticos também representa um fator de risco para o desenvolvimento de melanoma. Os nevos melanocíticos são lesões benignas, constituídas por aglomerados de melanócitos (Liu & Sheikh, 2014). Os nevos podem estar presentes desde o nascimento (nevo congénito) ou serem adquiridos mais tarde (nevo adquirido), sendo que aproximadamente 25% das ocorrências de melanoma estão relacionadas com um nevo pré-existente (Bevona et al., 2003; Rastrelli et al., 2014). Existe uma relação direta entre a contagem geral de nevos e a suscetibilidade de desenvolver melanoma variando consoante a quantidade, tamanho e tipo de nevo (Grob et al., 1990; Halpern et al., 1991; Holly et al., 1987; Rastrelli et al., 2014). O risco de desenvolver melanoma é maior quando existe um nevo displásico ou atípico, caracterizado por apresentar um diâmetro superior ou igual a 5 mm, coloração variada, forma assimétrica, e bordas irregulares e mal definidas (Rastrelli et al., 2014).

O risco de melanoma é maior em indivíduos com história familiar e pessoal da patologia (Ford et al., 1995; Spanogle et al., 2010). A suscetibilidade ao desenvolvimento de melanoma é maior quando relacionada com: variantes do gene que codifica o recetor 1 de melanocortina (*MC1R*) que levam à redução da função de MC1R, resultando na produção maioritariamente de feomelanina (pigmento vermelho ou amarelo); e, também,

variantes genéticas que modificam a eficácia tanto das vias de sinalização induzidas por danos celulares quanto dos mecanismos de reparação de danos no DNA causados pela radiação UV (Carr et al., 2020; Davis et al., 2019; Lehmann et al., 2014; Valverde et al., 1995).

Variantes de genes polimórficos associadas ao número de nevos (*TERT*, *PLA2G6* e *CDKN2A/MTAP*) e à pigmentação (*SLC45A2*, *TYR* e *ASIP*), contribuem para o risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo (Falchi et al., 2009; Law et al., 2015). Além disso, o melanoma cutâneo pode ocorrer associado a mutações em células somáticas, que acontecem frequentemente em genes nas vias de sinalização que regulam a proliferação celular (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*), crescimento e metabolismo celular (*PTEN* e *KIT*), controlo do ciclo celular (*CDKN2A*), resistência à apoptose (*TP53*) e tempo de vida replicativo (*TERT*) (Hayward et al., 2017; Shain & Bastian, 2016).

Em zonas do corpo expostas à radiação solar, o melanoma pode desenvolver-se como resultado de mutações induzidas pela radiação UV nos genes reguladores da via MAPK (também conhecida por cascata de transdução de sinal RAS/RAF/MEK/ERK), que conduzem à ativação do ciclo celular promovendo a proliferação do tumor (Merkel & Gerami, 2017). Por outro lado, em zonas do corpo protegidas da radiação solar UV, o melanoma pode desenvolver-se em consequência: da instabilidade cromossômica precoce, que se caracteriza por ganhos no número de cópias de oncogenes (*TERT*, *CCND1* e *KIT*) e deleções no número de cópias de genes supressores de tumor (*CDKN2A*); e, de mutações ativadoras em *KIT* e *PDGFRA*. A combinação destes dois fatores promove a proliferação tumoral (Bastian, 2014; Merkel & Gerami, 2017).

A mutação V600E (troca de valina [V] por ácido glutâmico [E] no codão 600) do gene *BRAF* dá início ao processo de carcinogénese do melanoma em pele sem danos crónicos provocados pela exposição solar (Greaves et al., 2013; Shain et al., 2015; Shain & Bastian, 2016). Esta mutação resulta na formação de um nevo comum que pode manter-se num estado semelhante à senescência, caso não ocorram mutações condutoras adicionais ou, então, adquirir características proliferativas, caso ocorram mutações na região promotora de *TERT* e perda bialélica de *CDKN2A*. Se porventura, ocorrerem mutações em *PTEN* e *TP53*, o melanoma torna-se invasivo (Shain et al., 2015; Shain & Bastian, 2016).

2.2. Tipos de melanoma

De acordo com a sua localização no corpo, o melanoma é classificado em cutâneo ou não cutâneo. O melanoma cutâneo divide-se em quatro subtipos clínico-histológicos principais, que incluem:

- Melanoma de extensão superficial - O subtipo mais frequente em indivíduos de pele clara, que caracteriza-se por apresentar uma fase inicial de crescimento radial (lateral) seguida por uma fase de crescimento vertical (invasiva), podendo surgir como uma nova lesão ou, então, desenvolver-se a partir de um nevo melanocítico pré-existente em pele intermitentemente exposta ao sol. Pode-se apresentar como uma pápula ou nódulo, com contornos irregulares e de pigmentação variada.
- Melanoma nodular - Ocorre principalmente em áreas da pele expostas de forma intermitente ao sol e caracteriza-se por apresentar uma fase inicial de crescimento vertical rápida. Pode-se manifestar como um nódulo de superfície lisa ou pólipso ulcerado ou placa elevada com margens irregulares, de cor castanha, preta, azul-escura ou, até mesmo, ausente de pigmento (melanoma amelanótico).
- Melanoma lentigo maligno - Tende a ocorrer em indivíduos de idade avançada em áreas da pele expostas cronicamente ao sol e caracteriza-se por apresentar uma fase de crescimento radial de longa duração antes de ocorrer o crescimento vertical. Pode apresentar uma superfície plana ou pápula, com contornos irregulares e coloração diversa.
- Melanoma acral lentiginoso - O subtipo mais frequente em indivíduos de pele mais escura, que desenvolve-se habitualmente nas palmas das mãos, plantas dos pés ou região subungueal (Bastian, 2014; Carr et al., 2020; Markovic et al., 2007; Rastrelli et al., 2014).

O melanoma não cutâneo, como o próprio nome indica, manifesta-se em áreas do corpo não cutâneas onde os melanócitos habitualmente estão presentes, tais como a região ocular, gastrointestinal, genit urinária e nasofaríngea (Carr et al., 2020; Wong et al., 2017).

2.3. Estadiamento e tratamento do melanoma

O grau e extensão (estádio de evolução) do melanoma nos pacientes é determinado por meio de exames de imagem, exames físicos, exames laboratoriais e relatórios de patologia (Amin et al., 2017; Honors et al., 2018). Com base no sistema Tumor-Nódulo-Metástase (sistema TNM) da *American Joint Committee on Cancer* o melanoma pode ser classificado num dos seguintes estádios (Figura 2):

- Estádio 0 - O melanoma *in situ*, ou seja, quando o cancro está restrito à epiderme.
- Estádio I - O melanoma está localizado tanto na epiderme quanto na derme, pode ter até 2 mm de espessura e apresentar ou não ulceração.
- Estádio II - O melanoma está localizado tanto na epiderme quanto na derme, tem uma espessura superior a 1 mm, podendo ultrapassar os 4 mm. O melanoma pode ter ou não ulceração.
- Estádio III - O melanoma espalhou-se para os gânglios linfáticos adjacentes ou para áreas localizadas a menos de 2 cm da massa tumoral primária (metástase satélite) ou para áreas localizadas a uma distância superior a 2 cm ao longo do percurso linfático em direção aos gânglios linfáticos (metástase em trânsito). O melanoma pode ter qualquer espessura e apresentar ou não ulceração.
- Estádio IV - O melanoma originou metástases à distância (em locais como, pele, gânglios linfáticos, fígado, pulmões e cérebro). O melanoma pode ter qualquer espessura, apresentar ou não ulceração e ter se espalhado ou não para os gânglios linfáticos adjacentes (AIM at Melanoma Foundation, 2022; American Cancer Society, 2019; Papageorgiou et al., 2021).

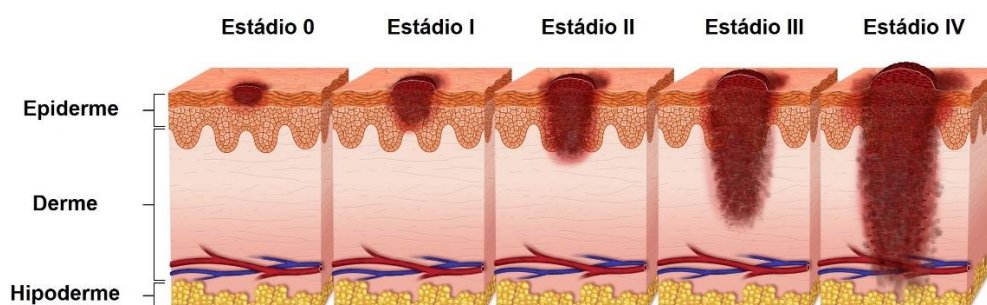


Figura 2 - Fases do melanoma (adaptado de AIM at Melanoma Foundation, 2022).

A taxa de sobrevivência do melanoma está dependente do estágio em que este cancro é diagnosticado. O melanoma diagnosticado em estágio localizado tem uma taxa de sobrevivência relativa a cinco anos de 99%, podendo ser tratado através de cirurgia, em oposição ao melanoma em estágio avançado ou metastático, cuja taxa de sobrevivência diminui consideravelmente e as opções de tratamento são restritas (American Cancer Society, 2022; Carr et al., 2020). Portanto, a escolha do tratamento vai depender das características do melanoma (estádio, volume, localização das metástases, entre outros), assim como dos riscos para o paciente. As opções de tratamento incluem a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e as terapias biológicas.

- Cirurgia

A excisão cirúrgica é a primeira opção de tratamento para o melanoma, oferecendo uma maior probabilidade de cura no caso da doença ser diagnosticada nos seus estádios iniciais e não apresentar sinais de metástase (Honors et al., 2018). O procedimento consiste na excisão da lesão juntamente com o tecido saudável envolvente (margens de segurança), a fim de garantir a remoção do tumor por completo (Swavey & Tran, 2013).

- Quimioterapia

A quimioterapia é capaz de atenuar os sintomas, controlar ou tratar o cancro da pele, estando a sua eficácia dependente da gravidade do cancro (Gogas et al., 2007). A quimioterapia consiste na administração de fármacos (por via oral, intravenosa, intraperitoneal, intra-arterial ou tópica) que reduzem a taxa de crescimento ou impedem a proliferação anormal das células cancerígenas (Kang et al., 2015; Tang et al., 2017). Existem diversos fármacos quimioterápicos que podem ser utilizados no tratamento do melanoma em estágio metastático tais como, paclitaxel, dacarbazina, temozolomida e compostos de platina (Megahed & Koon, 2014). No entanto, devido a diversos mecanismos de resistência nas células cancerígenas, o sucesso destes fármacos no tratamento do melanoma maligno é reduzido, uma vez que a taxa de resposta é inferior a 20% (Tang et al., 2017). Além disso, a quimioterapia pode afetar as células normais, gerando efeitos colaterais severos (como fadiga, náuseas, anemia e infeções secundárias) (Bhatia et al., 2009; Khusro et al., 2018).

- Radioterapia

Do mesmo modo que a quimioterapia, a radioterapia pode ser utilizada para aliviar os sintomas, controlar ou tratar o cancro, consoante a gravidade e o tipo de cancro (Liniker et al., 2016). A radioterapia utiliza radiação (proveniente de uma fonte de radiação interna ou externa ao corpo) a fim de destruir as células cancerígenas. A radiação interna é aplicada exclusivamente na zona do tumor sendo por isso mais precisa quando comparada com a radiação externa que é direcionada para uma vasta região (Honors et al., 2018). A radioterapia pode afetar as células normais e resultar em efeitos colaterais severos (como fadiga, náuseas, problemas cardiovasculares, danos cutâneos e mutação celular) (Bhatia et al., 2009; Khusro et al., 2018; G. Lee & Park, 2018). A radioterapia pode ser utilizada combinada com a quimioterapia o que, de modo geral, leva ao aparecimento de efeitos colaterais mais graves (Miller et al., 2016).

- Terapias biológicas

As terapias biológicas são muitas vezes combinadas com outros tipos de tratamento e têm como base o uso de fármacos que atacam diretamente as células cancerígenas ou auxiliam o sistema imunológico no combate ao cancro (DeSantis et al., 2014; Honors et al., 2018). Existem vários tipos de terapias biológicas que foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA).

O tratamento com o interferão alfa (IFNA) aumenta a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade classe I, estimulando a proliferação de células do sistema imunológico para atacar e combater o melanoma. Esta citocina está indicada para o tratamento adjuvante do melanoma em estágio II e III, embora esteja associada a uma elevada toxicidade (Bhatia et al., 2009; Domingues et al., 2018; Eigentler & Garbe, 2013; Roh et al., 2013).

O tratamento com o anticorpo monoclonal ipilimumab bloqueia a atividade da molécula CTLA4, uma proteína que regula negativamente as vias de ativação das células T, estimulando a proliferação destas células e consequente resposta imunológica antitumoral. Porém, o ipilimumab está associado a uma distribuição restrita e a graves efeitos adversos relacionados com o sistema imunológico (tais como, neuropatia, endocrinopatia, hepatite, enterocolite e dermatite) (Bhatia et al., 2009; Eggermont, 2010; Fellner, 2012).

Os inibidores de *BRAF* (tais como, vemurafenib e dabrafenib) estão indicados para o tratamento de pacientes com melanoma com mutação no gene *BRAF* (Eggermont, 2010; Eigentler & Garbe, 2013). Estes inibidores embora forneçam um benefício clínico significativo em pacientes com melanoma portadores de mutação *BRAF*, podem levar ao desenvolvimento de lesões (tais como, carcinoma espinocelular e ceratoacantomas) que tem sido associado à ativação paradoxal da via MAPK em células saudáveis sem mutação *BRAF*. Além disso, foi descrito que os pacientes podem adquirir resistência aos inibidores de *BRAF*, que acontece por meio de diversos mecanismos, que induzem a ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR (Chapman et al., 2011; Muñoz-Couselo et al., 2015).

3. Venenos de origem animal

Os tratamentos empregues até ao momento no combate ao melanoma estão constantemente relacionados com efeitos colaterais indesejados e desenvolvimento de resistência (Ma & Armstrong, 2014; Patel et al., 2021; Shannan et al., 2016). Deste modo,

existe a necessidade de investigar novas abordagens terapêuticas que sejam mais seguras e eficazes.

Nas últimas décadas, venenos derivados de animais foram identificados como terapêuticas eficientes. Os venenos são misturas complexas de constituintes bioativos, especialmente proteínas, péptidos e outras moléculas orgânicas, produzidas por células especializadas de um animal. Estes venenos são geralmente utilizados para defesa ou predação e uma vez interagindo com o organismo alvo (por inalação, ingestão, contato direto ou injeção) são capazes de interferir nos processos fisiológicos e bioquímicos do mesmo (Benard et al., 2015; Calvete et al., 2009).

O veneno animal é rico em toxinas, muitas das quais potencialmente fatais, porém mostram um elevado grau de especificidade e afinidade para certos alvos (tais como, recetores, enzimas e canais iônicos), e por isso têm sido progressivamente empregues como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de fármacos (Bordon et al., 2020).

3.1. Potencial terapêutico dos venenos de animais

Animais com a capacidade de produzir veneno estão distribuídos em praticamente todos os filos do reino *Animalia*, incluindo os filos *Chordata* (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes), *Echinodermata* (estrelas-do-mar e ouriços-do-mar), *Arthropoda* (escorpiões, aracnídeos, vespas, abelhas e centopeias), *Annelida* (verme-de-fogo), *Mollusca* (cefalópodes e caracóis marinhos) e *Cnidaria* (anêmonas-do-mar, águas-vivas e hidras) (Pennington et al., 2018). Contudo, os venenos de animais pertencentes aos filos *Chordata* e *Arthropoda* são os mais reportados na literatura.

- Venenos de serpentes

Algumas serpentes produzem venenos que têm sido utilizados como base para o desenvolvimento de vários fármacos atualmente aprovados pela FDA para utilização no ser humano. Por exemplo, o captopril, produzido a partir de péptidos potenciadores do vasodilatador bradicinina isolados do veneno da víbora *Bothrops jararaca*, é um fármaco inibidor da enzima conversora de angiotensina I num agente hipertensivo, denominado angiotensina II, indicado para tratar da hipertensão (Calvete et al., 2009; Cushman et al., 1977; Koh & Kini, 2012). Outros como o tirofiban, produzido a partir da Equistatina derivada do veneno da víbora *Echis carinatus*, e o eptifibatide, produzido a partir da Barbourina derivada do veneno da víbora *Sistrurus miliarius barbouri*, são fármacos com elevada afinidade pela integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ das plaquetas, impedindo a ligação do fibrinogénio a este

recetor e inibindo de modo reversível a agregação plaquetária, o que, por consequência, diminui o processo de coagulação sanguínea em pacientes com eventos tromboembólicos cardiovasculares (Hashemzadeh et al., 2008; Koh & Kini, 2012; Pennington et al., 2018).

Além disso, existem alguns estudos que reportam o potencial antitumoral dos venenos de serpentes. Como é o caso de Lebeína, uma desintegrina isolada do veneno da víbora *Macrovipera lebetina*, que exibiu efeito antiproliferativo nas linhas celulares de melanoma humano (SK-MEL-28 e LU-1205) por meio da diminuição da fosforilação de ERK e regulação positiva de MITF, interrupção da capacidade de invadir pela regulação positiva de E-caderina, perda de adesão celular e ativação da morte celular apoptótica independente de caspases, com sobreexpressão de proteínas pró-apoptóticas (AIF, BAX e BIM) juntamente com regulação negativa da proteína antiapoptótica BCL2 (Hammouda et al., 2016).

Também Jararagina, uma metaloproteinase do tipo desintegrina isolada do veneno da víbora *Bothrops jararaca*, exibiu citotoxicidade em células de melanoma murino (B16F10) demonstrada pela redução da viabilidade celular, inibição da proliferação celular, diminuição significativa da percentagem de células na fase G0/G1 e um aumento subsequente na fase sub-G1, aumento da atividade da caspase-3 e indução da apoptose. Num modelo murino *in vivo*, Jararagina inibiu o crescimento tumoral e metástase dorsal (Maria et al., 2014).

- Venenos de rãs e sapos

Os anfíbios (tais como, rãs e sapos) secretam venenos através da pele que contêm diversas substâncias farmacologicamente ativas. Por exemplo, o esteroide cardiotônico Bufalina, extraído do veneno de sapo, exibiu atividade antiasmática mediante resposta anti-inflamatória num modelo murino de asma induzida por ovalbumina, possivelmente através da supressão da atividade do fator nuclear *kappa* B (NFkB), reduzindo a hiperresponsividade e inibindo a ativação de células inflamatórias (tais como, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos) e citocinas (tais como, IL4, IL5 e IL13) (Zhakeer et al., 2017).

Também Himenoquirina-1b, um péptido catiónico α -helicoidal obtido do veneno da rã *Hymenochirus boettgeri*, mostrou atividade antidiabética em células β -pancreáticas de rato (BRIN-BD11), promovendo a secreção de insulina mediada pela via independente do canal de potássio dependente de ATP (K_{ATP}). Além disso, este péptido pode aumentar a concentração plasmática de insulina após administração intraperitoneal em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura (Owolabi et al., 2016).

Noutro estudo relataram que Brevivin-1RL1, um péptido catiónico α -helicoidal isolado do veneno da rã *Rana limnocharis*, apresentou citotoxicidade seletiva para linhas celulares tumorais (B16F10, A549, HCT116, MDA-MB-231, SW480, SMMC-7721) e reduzida atividade hemolítica. Este péptido pode interagir com componentes da membrana celular (como, lípidos e proteínas), desencadeando apoptose dependente de caspases e necrose, que contribuem para a inibição do crescimento tumoral (Ju et al., 2021).

Também foi descrito que Cinobufagina, um esteroide cardiotónico extraído do veneno de sapo, foi capaz de inibir a proliferação de células de melanoma humano (A375), pois levou à paragem do ciclo celular na fase G2/M através da ativação da via de sinalização ATM/ATR, e promoveu a apoptose através da via intrínseca e regulação negativa da via de sinalização PI3K/AKT (Pan et al., 2019).

- Venenos de escorpiões

Os escorpiões também possuem venenos com elevado potencial terapêutico. Por exemplo, os péptidos catiónicos, Hp1036 e Hp1239, do veneno do escorpião *Heterometrus petersii* foram eficazes contra a infeção causada pelo vírus herpes simples tipo 1 *in vitro*, mostrando efeitos viricidas extracelulares e forte potencial inibitório quando adicionados nos estágios de ligação e entrada viral. Após a infeção, estes péptidos inativaram partículas virais intracelulares e, assim, inibiram a proliferação viral (Hong et al., 2014).

Outro estudo mostra que o veneno do escorpião *Heterometrus bengalensis* exerceu efeitos antiosteoporóticos envolvendo osteoclastos em ratos albinos fêmeas ovariectomizadas, através do aumento dos depósitos minerais ósseos, com as ações coordenadas de hormonas, citocinas e enzimas (Gomes et al., 2009).

Alguns estudos também reportam o potencial antitumoral dos venenos de escorpiões em diversas linhas celulares. A expressão e atividade modificadas anormais dos canais iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- estão relacionadas aos processos e patologia do cancro (Arcangeli et al., 2009; Prevarskaya et al., 2010). Estudos revelaram que a Caribdotoxina, um péptido isolado do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, bloqueou os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , inibindo a migração de células de melanoma humano e fibroblastos murinos (NIH3T3) de forma dependente da dose em até 61%, possivelmente despolarizando o potencial de membrana celular e diminuindo a força eletroquímica para a entrada de Ca^{2+} (Schwab et al., 1999). Um estudo mais recente mostrou que um péptido denominado RK1 do veneno do escorpião *Buthus occitanus tunetanus* foi capaz de inibir a proliferação, migração e angiogénese das células de melanoma humano (IGR-39) e de glioblastoma humano (U-87) (Khamessi et al., 2018).

- Venenos de abelhas

Os venenos de abelhas contém poderosas propriedades terapêuticas para uma variedade de condições. Por exemplo, os péptidos Panurginas, isolados do veneno da abelha *Panurgus calcaratus*, mostraram ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos, exibindo efeito hemolítico reduzido em eritrócitos humanos (Čujová et al., 2013).

Foi evidenciado que o tratamento com o veneno da abelha *Apis mellifera* e com um dos seus constituintes peptídicos (Apamina) mostrou efeitos anti-inflamatórios na artrite gotosa induzida por urato monossódico num modelo de camundongo. O tratamento com o veneno e Apamina suprimiu a inflamação associada ao edema do pé do animal, inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (como, TNFA, IL1B e IL6), inibiu a formação de inflamassomas e reduziu a formação de cristais de urato monossódico (Lee et al., 2020).

Noutro estudo também foi relatado que o veneno da abelha *Apis mellifera* e um dos seus componentes peptídicos (Melitina) apresentaram potencial antitumoral em várias linhas celulares de melanoma (B16F10, A375SM e SK-MEL-28) inibindo o crescimento, a sobrevivência clonogénica, o potencial metastático e a melanogénese. Ambos induziram apoptose dependente de caspases, associada à regulação negativa das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR (Lim et al., 2019).

3.2. Venenos de vespas

As vespas pertencem à subordem *Apocrita* da ordem *Hymenoptera* e dependendo do seu estilo de vida no contexto da sociabilidade podem ser classificadas como sociais ou solitárias, sendo o seu veneno utilizado para defesa e predação em ambas as situações (Lee et al., 2016). A composição do veneno de vespa varia muito entre espécies, abrangendo uma mistura de diversos compostos químicos, tais como proteínas, péptidos, enzimas e outras moléculas pequenas (Moreno & Giralt, 2015).

Os compostos isolados do veneno de vespa apresentam diversas atividades biológicas, nomeadamente ação antitumoral. Por exemplo, os péptidos catiónicos Polybia-MP1 do veneno da vespa *Polybia paulista*, Mastoparano X do veneno da *Vespa xanthoptera* e Mastoparano HR1 do veneno da *Vespa orientalis* mostraram efeito antitumoral potente em células de glioblastoma humano (T98G), pela formação de poros na membrana celular, levando ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular em repouso, induzindo morte celular por necrose (da Silva et al., 2018).

Outro estudo demonstrou que os péptidos Ano-3/3s bioinspirados no péptido Anoplina, derivado do veneno da vespa *Anoplius samariensis*, induziram rápida rutura da

membrana celular em células de cancro da mama murino (4T1) e células de melanoma murino (B16F10). Além disso, os péptidos Ano-3/3s mostraram atividade antitumoral pronunciada num modelo murino *in vivo* de melanoma através do efeito oncolítico e subsequente indução da morte celular imunogénica, fortemente relacionada com a infiltração significativa de células T CD8+ no melanoma (Wu et al., 2021).

Além disso, no estudo desenvolvido por de Azevedo et al. (2015) foi demonstrado que o péptido Mastoparano obtido do veneno da vespa *Vespula lewisii* exerceu atividade citotóxica mais seletiva para células cancerígenas, por exemplo, para linhas celulares de melanoma humano e murino (A2058 e B16F10-Nex2, respetivamente).

Apesar de resultados promissores para alguns péptidos isolados de venenos de vespa, o seu potencial na terapia tumoral está ainda pouco estudado.

- Venenos das vespas *Polybia dimorpha* e *Chartergellus communis*

Polybia dimorpha (Figura 3) é uma vespa social neotropical que pode ser encontrada no Cerrado brasileiro. Esta vespa é interessante, porque tem um péptido bioinspirado denominado Prolistarina que ainda não tem estudos reportados na literatura. Possui ainda no seu veneno um péptido catiónico denominado Polydim-I que é conhecido por apresentar atividade antimicrobiana promissora contra diversos microrganismos. Num estudo, Polydim-I provocou a rutura da parede celular da micobactéria patogénica *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*, reduziu a carga bacteriana tanto em macrófagos infetados, como nos pulmões, baço e fígado de camundongos suscetíveis a infeções por micobactérias, demonstrando baixa citotoxicidade para células de mamíferos (das Neves et al., 2016). Noutro estudo, Polydim-I inibiu quase 100% do crescimento de bactérias multirresistentes numa concentração, bastante baixa, de 1 µg/mL. Além disso, Polydim-I mostrou ser mais eficiente do que os fármacos convencionais e apresentou um espetro mais largo contra bactérias multirresistentes. Estes autores propuseram a ideia de que Polydim-I liga-se aos lípidos da membrana plasmática em consequência da atração eletrostática, acumula-se parcialmente, neutralizando as cargas opostas e induz a formação de poros na membrana (Rangel et al., 2017).



Figura 3 - Vespa *Polybia dimorpha* (fotografia da autoria de Fernando B. Noll retirada de Castro, 2013).

Atualmente sabe-se que vários péptidos antimicrobianos demonstram, tanto atividade antimicrobiana, como atividade anticancerígena (Felício et al., 2017; Tornesello et al., 2020). Além disso, venenos de vespas que contenham péptidos antimicrobianos possivelmente têm outros compostos que apresentam igualmente propriedades antimicrobianas ou antitumorais.

Chartergellus communis (Figura 4) é uma vespa social neotropical pouco abundante, que pode ser encontrada maioritariamente no Cerrado brasileiro e no bioma da Caatinga (Felippotti, 2010; Richards, 1978; Somavilla et al., 2017). O interesse por esta vespa, deve-se ao facto de que no seu veneno foi descoberto o péptido Chartergellus-CP1, que apresenta várias atividades biológicas. Num estudo, Chartergellus-CP1 mostrou um elevado potencial na área da farmacoterapia da epilepsia. No modelo onde as crises foram induzidas por pilocarpina, Chartergellus-CP1 exibiu efeitos benéficos quanto à latência, quantidade e percentual de proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas em camundongos. Além disso, Chartergellus-CP1 não provocou ataxia e alterações na atividade geral espontânea dos animais (Lopes et al., 2021). Os mesmos autores verificaram ainda que Chartergellus-CP1 demonstra 92% de semelhança estrutural com o péptido quimiotático *Polybia*-CP, isolado do veneno da vespa *Polybia paulista*, que além de mostrar potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também apresenta atividade antitumoral contra células de cancro da bexiga humano (BIU-87) e células de cancro da próstata humano (PC-3), mediante a desestabilização e rutura da membrana plasmática (Lopes et al., 2021; Souza et al., 2005; Wang et al., 2011, 2012). E, recentemente, foi descoberto por Soares et al. (2022) que Chartergellus-CP1 foi citotóxico para duas linhas celulares humanas de cancro da mama (MCF-7 e MDA-MB-231), causou alterações na progressão do ciclo celular (aumentando o número de células na fase S), promoveu a produção de ROS intracelular e induziu apoptose inicial.



Figura 4 - Vespa *Chartergellus communis* (fotografia da autoria de Leandro Campos retirada de Lopes, 2018).

Assim, com base em todo o potencial dos péptidos destas duas vespas, vale a pena explorar os seus eventuais efeitos antitumorais no melanoma, uma vez que ainda não foram realizados estudos com estes péptidos para este tipo de cancro.

II. Objetivos

O principal objetivo desta dissertação foi investigar o potencial antitumoral de dois péptidos, Prolistarina bioinspirado num péptido do veneno da vespa *Polybia dimorpha* e Chartergellus-CP1 isolado do veneno da vespa *Chartergellus communis*, em células de melanoma humano, nomeadamente células de melanoma amelanótico (A375) e células de melanoma altamente pigmentado (MNT-1). Assim, para atingir esta meta foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito dos péptidos na viabilidade das células de melanoma humano.
- Analisar a influência do péptido Chartergellus-CP1 na dinâmica do ciclo celular.
- Investigar a capacidade do péptido Chartergellus-CP1 de induzir *stress* oxidativo e apoptose.

III. Materiais e métodos

1. Péptidos

No presente estudo, foram utilizados os péptidos Prolistarina e Chartergellus-CP1 gentilmente cedidos pela Prof.^a Márcia Mortari da Universidade de Brasília. Prolistarina foi bioinspirado num péptido proveniente do veneno da vespa *Polybia dimorpha*, enquanto Chartergellus-CP1 foi isolado do veneno da vespa *Chartergellus communis*. Ambos os péptidos apresentavam um grau de pureza superior a 99% e tiveram as suas sequências confirmadas. Os péptidos foram sintetizados utilizando a estratégia de Fmoc. Prolistarina é um péptido composto por uma sequência de 14 resíduos de aminoácidos (DKPRWNVKKPPRLL - NH₂), com uma massa molecular de 1746,14 Da. Chartergellus-CP1 é um péptido possivelmente pertencente à classe dos quimiotáticos constituído por uma sequência de 12 resíduos de aminoácidos (IIGTILGLLKSL - NH₂), com uma massa molecular de 1239,9 Da.

2. Preparação dos péptidos

Cada péptido foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, ≥99,5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), obtendo-se soluções *stock* na concentração de 20 mg/mL, que foram armazenadas a -20°C. No momento da exposição, as soluções *stock* foram diluídas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), tendo-se obtido as concentrações pretendidas para cada ensaio.

3. Cultura celular

Este estudo foi realizado na linha celular de melanoma humano amelanótico (A375; Figura 5A), obtida através da *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, e na linha celular de melanoma humano altamente pigmentado (MNT-1; Figura 5B), gentilmente cedida pela Dra. Manuela Gaspar (iMed.Ulisboa, Portugal). As células cresceram em frascos de cultura (SPL Life Sciences, Gyeonggi, Coreia do Sul) contendo meio de cultura DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 2 mM de L-glutamina (Grisp, Porto, Portugal), 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina; Grisp, Porto, Portugal) e 2,5 µg/mL de fungizona (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), e foram mantidas em incubadora a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂. Rotineiramente, as células foram rastreadas quanto à confluência, morfologia e presença de contaminação, usando para tal, um microscópio de contraste de fase invertido Eclipse TS100 (Nikon, Tóquio, Japão).

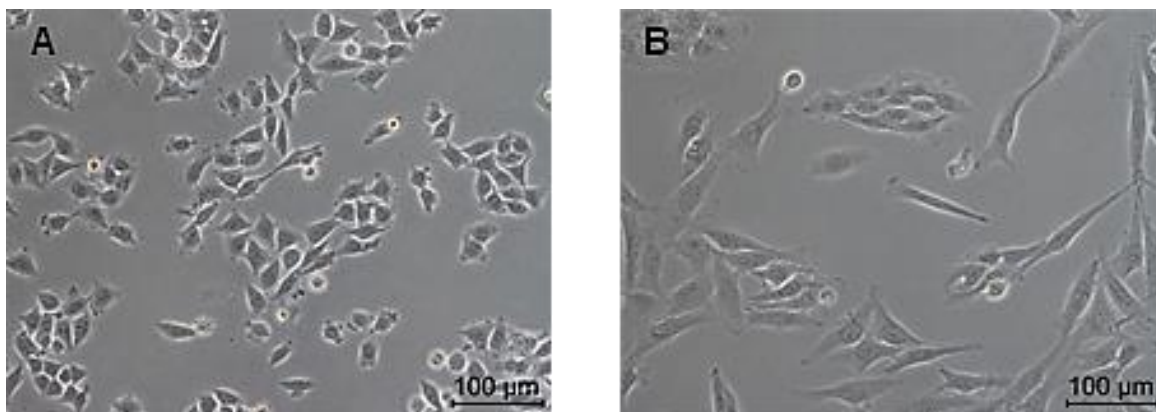


Figura 5 - Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase invertida das células A375 (A) e MNT-1 (B) com ampliação de 100x.

As subculturas foram realizadas, quando as células estavam com a confluência entre aproximadamente 70 e 90%. De modo a reduzir a possibilidade de contaminações, as manipulações inerentes à subcultura foram executadas em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar. No processo de subcultura, o meio de cultura foi removido e, em seguida, as células foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS [1x]; Grisp, Porto, Portugal), com o intuito de retirar o excedente de meio que contém inibidores da atividade da tripsina. De modo a destacar as células do fundo do frasco, foi adicionada uma solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 1 mM de EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o frasco de cultura foi incubado a 37°C e 5% de CO₂. Após cerca de 5 minutos de incubação, a tripsina foi inativada com a adição do dobro do volume de meio de cultura ao frasco. A suspensão celular foi transferida para um tubo *falcon*, sendo em seguida realizada a contagem das células num hemocítmetro. Por último, o número pretendido de células foi transferido para um novo frasco de cultura já contendo o volume adequado de meio DMEM completo.

4. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada com recurso ao ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; 98%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Neste ensaio enzimas metabólicas, como a succinato desidrogenase (desidrogenase mitocondrial), presentes em células viáveis metabolicamente ativas, convertem o MTT (sal de tetrazólio de cor amarela e solúvel em água), através da clivagem do anel de tetrazólio, a cristais de formazano de coloração arroxeadada e insolúveis em água (Fotakis & Timbrell, 2006). Estabelece-se assim uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de MTT reduzido e o número de células viáveis (Mosmann, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços nas concentrações de 35 mil células/mL (A375 e MNT-1) e 20 mil células/mL (A375) ou 25 mil células/mL (MNT-1) para exposições de 24 e 48 horas, respetivamente, num volume final de 100 µL por poço. Uma incubação a 37°C e 5% de CO₂ foi realizada durante 24 horas (tempo suficiente para ocorrer a adesão das células às placas). Após a adesão celular, o meio de cultura foi retirado e as células foram expostas a 100 µL das diferentes diluições dos péptidos em estudo (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; e 200 µg/mL). Como controlo utilizaram-se células sem tratamento (100 µL de meio DMEM completo por poço). Além disso, o perfil de citotoxicidade do DMSO foi estudado, usando para tal células tratadas com 100 µL de meio DMEM completo contendo 1% de DMSO (equivalente à concentração de 200 µg/mL). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de exposição, 50 µL da solução de MTT (1 mg/mL em DPBS [1x]) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Seguidamente, o meio de cultura com MTT foi removido e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazano. Foram acrescentados os brancos, isto é, poços sem células contendo apenas DMSO. As placas foram colocadas num agitador orbital, protegidas da luz, durante cerca de 2 horas. A absorbância (*A*) da solução resultante foi lida no comprimento de onda de 570 nm num leitor de microplacas (Synergy HT® Multi-Mode, BioTek®, Winooski, VT, EUA), sendo a intensidade da coloração arroxeadada diretamente proporcional à concentração de cristais de formazano que, como mencionado atrás, reflete a quantidade de células viáveis. A percentagem de viabilidade celular foi obtida através da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A_{570} \text{ da amostra} - A_{570} \text{ do branco}}{A_{570} \text{ do controlo} - A_{570} \text{ do branco}} \times 100$$

Diferentes concentrações inibitórias (IC) de Chartergellus-CP1 foram determinadas, mais concretamente a IC₂₀ (concentração que induz uma redução de 20% na viabilidade celular) e a IC₅₀ (concentração que induz uma redução de 50% na viabilidade celular).

5. Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI, ≥94%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para marcar o DNA nuclear estequiometricamente. Como efeito, a intensidade da fluorescência emitida pelo PI é diretamente proporcional à quantidade de DNA presente no núcleo celular que, por sua vez, permite distribuir as células em distintas subpopulações, correspondentes às fases

G0/G1 (células pré-replicativas), S (células replicativas) e G2/M (células pós-replicativas e mitóticas) do ciclo celular (Babes et al., 2018; Nunez, 2001). Este ensaio exigiu a permeabilização prévia da membrana celular, uma vez que o PI é impermeável à membrana celular íntegra (Deitch et al., 1982). Além disso, dado que o PI é capaz de se intercalar tanto com o DNA como com o ácido ribonucleico (RNA), foi adicionada a ribonuclease (RNase) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para degradar o RNA e, assim, garantir apenas a marcação do DNA (Darzynkiewicz, 2011; Deitch et al., 1982).

As células foram semeadas em placas de 12 poços nas concentrações de 60 mil células/mL (A375) ou 40 mil células/mL (MNT-1), num volume final de 1 mL por poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Seguidamente, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas a 1 mL de soluções correspondentes à IC₂₀ (17,41 µg/mL [A375, 24 horas] ou 20,03 µg/mL [MNT-1, 24 horas]) e à IC₅₀ (40,50 µg/mL [A375, 24 horas] ou 51,55 µg/mL [MNT-1, 24 horas]) de Chartergellus-CP1. As células usadas como controlo foram apenas tratadas com meio DMEM completo. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as células foram lavadas com 500 µL de DPBS (1x). As placas foram incubadas durante cerca de 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂ com 150 µL de tripsina-EDTA em cada poço. A tripsina foi inativada, adicionando-se 300 µL de meio de cultura e as células foram colhidas para tubos *ependorf*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 700 g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e os *pellets* de células foram ressuspensos em 800 µL de DPBS (1x). As amostras foram centrifugadas de novo nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram removidos e as células foram fixadas e permeabilizadas com 1 mL de etanol 85% a 4°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem analisadas.

No momento da análise, as amostras foram centrifugadas durante 6 minutos a 4°C na velocidade angular de 3600 rpm (A375) ou 3000 rpm (MNT-1). O etanol foi removido e os *pellets* de células foram ressuspensos em 800 µL de DPBS (1x). Para separar os agregados de células, filtrou-se cada uma das amostras para tubos *ependorf* utilizando uma malha de *nylon*. Em cada amostra adicionou-se 50 µL de RNase e, 10 minutos depois, acrescentou-se 50 µL de PI. As amostras foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. A intensidade de fluorescência do PI foi medida num citómetro de fluxo de focalização acústica Attune® (Applied Biosystems, Termo Fischer Scientific, Agawam, MA, EUA) no qual foram analisados cerca de 5 mil eventos por amostra. Para determinar a percentagem de células presentes nas diferentes fases do ciclo celular recorreu-se ao *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

6. Análise da produção de ROS

A produção intracelular de ROS foi detetada por citometria de fluxo usando a sonda DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Neste ensaio esterases intracelulares clivam os grupos acetato da sonda DCFH-DA originando um composto não fluorescente, que na presença de ROS é oxidado a DCF (2',7'-diclorofluoresceína), um composto altamente fluorescente (Rhee et al., 2010). Desta forma, a intensidade da fluorescência emitida pelo DCF é diretamente proporcional à quantidade de ROS intracelular (Ciapetti et al., 1998).

As células foram semeadas em placas de 12 poços nas concentrações de 60 mil células/mL (A375) ou 90 mil células/mL (MNT-1), num volume final de 1 mL por poço e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com 1 mL de meio de cultura DMEM contendo Chartergellus-CP1 nas concentrações de IC₂₀ e IC₅₀ para uma exposição de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células correspondentes ao controlo e branco foram apenas tratadas com meio DMEM completo. Após o período de incubação, o meio de cultura de cada poço foi retirado, as células foram lavadas com 500 µL de DPBS (1x) e tratadas com 500 µL de meio DMEM contendo 2% de FBS e DCFH-DA a 10 µM. Aos brancos foi adicionado 500 µL de meio DMEM suplementado com 2% de FBS, porém sem DCFH-DA. Depois de 30 minutos de incubação no escuro a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas com 500 µL de DPBS (1x) e a cada poço foi adicionado 150 µL de tripsina-EDTA. Após cerca de 5 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO₂, inativou-se a tripsina, adicionando-se 500 µL de meio DMEM com 2% de FBS e colheram-se as células para tubos *ependorf*. As amostras foram armazenadas em gelo, protegidas da luz e analisadas num citómetro de fluxo de focalização acústica Attune® (Applied Biosystems, Termo Fischer Scientific, Agawam, MA, EUA) num intervalo de 45 minutos. No citómetro de fluxo foram analisados cerca de 5 mil eventos por amostra. Os dados foram analisados no *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

7. Detecção de apoptose celular

A apoptose celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o *kit* de deteção de apoptose Anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) obtido a partir de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EUA). A Anexina V é uma proteína que, na presença de iões de Ca²⁺, é capaz de se associar à fosfatidilserina, um componente fosfolipídico que, em células viáveis, se encontra na face interna da membrana celular e é translocado para a face externa no início do processo apoptótico

(Brumatti et al., 2008; Cao et al., 2011). Juntamente com a Anexina V-FITC foi utilizado o fluorocromo PI, cuja marcação depende da perda da integridade da membrana celular, conforme descrito anteriormente (Deitch et al., 1982). O uso combinado de Anexina V-FITC e PI permite identificar e quantificar células viáveis (negativas para Anexina V-FITC e PI), células em apoptose inicial (positivas só para Anexina V-FITC), células em apoptose tardia (positivas para Anexina V-FITC e PI) e células em necrose (positivas só para PI) (Koopman et al., 1994).

A375 e MNT-1 foram semeadas em placas de 6 poços na concentração de 60 mil células/mL, num volume final de 2 mL por poço e incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de meio DMEM com Chartergellus-CP1 nas concentrações de IC₂₀ e IC₅₀ (relativas a 24 horas de exposição). Como controlo foram utilizadas células apenas tratadas com meio DMEM completo. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as células foram lavadas com 1 mL de DPBS (1x). A cada poço foi adicionado 300 µL de tripsina-EDTA e, após cerca de 5 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO₂, a tripsina foi inativada com 600 µL de meio de cultura. As células foram coletadas para tubos *ependorf* e quantificadas num hemocítmetro. As amostras foram centrifugadas a 300 g durante 5 minutos a 4°C com aceleração e desaceleração gradual. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de células foi solto com a adição de 1 mL de DPBS (1x) frio. Repetiu-se a centrifugação e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em tampão de ligação (tampão que contém Ca²⁺) ficando na concentração final de 1×10⁶ células/mL. A 100 µL de suspensão celular foram adicionados 5 µL de Anexina V-FITC e 5 µL de PI, e as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após o período de incubação, 400 µL de tampão de ligação foram adicionados a cada *ependorf* e as amostras foram analisadas num citómetro de fluxo de focalização acústica Attune® (Applied Biosystems, Termo Fischer Scientific, Agawam, MA, EUA) num espaço de 1 hora. No citómetro de fluxo foram analisados cerca de 10 mil eventos por amostra. Os dados foram analisados no *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

8. Análise estatística

Para todas as experiências foram realizados pelo menos dois ensaios independentes. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e estatisticamente analisados com auxílio do programa SigmaPlot versão 14.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EUA). Os dados do ensaio de viabilidade celular foram analisados através do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste paramétrico de Dunnett ou pelo teste não paramétrico de Dunn. Os dados dos ensaios de citometria de fluxo foram comparados utilizando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

IV. Resultados

1. Viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade de Prolistarina e de Chartergellus-CP1 foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT, no qual as células de melanoma humano A375 e MNT-1 foram expostas durante 24 e 48 horas a concentrações crescentes de ambos os péptidos (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; e 200 $\mu\text{g/mL}$). Nas Figuras 6 e 7 estão representados sob a forma de gráfico os resultados obtidos. Os resultados dos grupos experimentais foram comparados com os resultados do grupo de controlo (0 $\mu\text{g/mL}$). De salientar ainda que, 1% de DMSO (equivalente à concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$) não exibiu citotoxicidade relevante e, por isso, estes resultados não foram apresentados nos gráficos das Figuras 6 e 7.

1.1. Efeito de Prolistarina na viabilidade celular

Como se pode observar na Figura 6, no ensaio de 24 horas, as células A375 apresentaram resultados estatisticamente significativos, em relação ao controlo, nas concentrações 3,125, 6,25, 12,5, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de Prolistarina (88,0, 88,9, 90,6, 89,2 e 76,8%, respetivamente). A exposição a Prolistarina por 48 horas, diminuiu significativamente a viabilidade de A375 nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (88,1 e 64,5%, respetivamente) (Figura 6).

Após 24 horas de incubação das células MNT-1, na presença de Prolistarina, observou-se que a viabilidade celular diminuiu significativamente, quando comparada com o controlo, a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ (93,9%), atingindo na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ um valor de viabilidade celular de 86,3%. Já no ensaio de 48 horas, observou-se uma redução da viabilidade de MNT-1, em comparação com o controlo, porém sem significado estatístico (Figura 6).

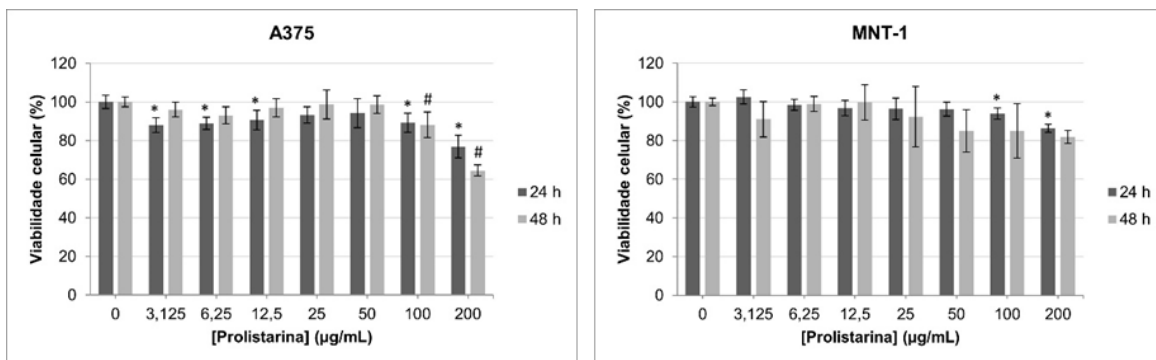


Figura 6 - Viabilidade das células A375 e MNT-1 após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de Prolistarina. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (0 $\mu\text{g/mL}$) para $p < 0,05$ e estão devidamente identificadas com * (24 horas) ou # (48 horas).

1.2. Efeito de Chartergellus-CP1 na viabilidade celular

Segundo a Figura 7, as células A375 tratadas por 24 horas com concentrações de Chartergellus-CP1 no intervalo de 6,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ tiveram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular, relativamente ao controlo, de 90,4 a 21,6%, respetivamente. No ensaio de 48 horas, observou-se que para concentrações de Chartergellus-CP1 superiores ou iguais a 25 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade de A375 diminuiu significativamente, quando comparada com o controlo (85,2, 18,6, 20,5 e 17,0% para as concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente) (Figura 7).

No que diz respeito à linha celular MNT-1 verificou-se que, após 24 horas de tratamento com Chartergellus-CP1, ocorreu um decréscimo estatisticamente significativo na viabilidade celular, relativamente ao controlo, desde 50 $\mu\text{g/mL}$, com valores de viabilidade celular de 33,9, 24,8 e 23,1%. Uma resposta análoga foi observada no ensaio de 48 horas, com resultados estatisticamente significativos nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de Chartergellus-CP1 (33,1, 30,4 e 26,3%, respetivamente) (Figura 7).

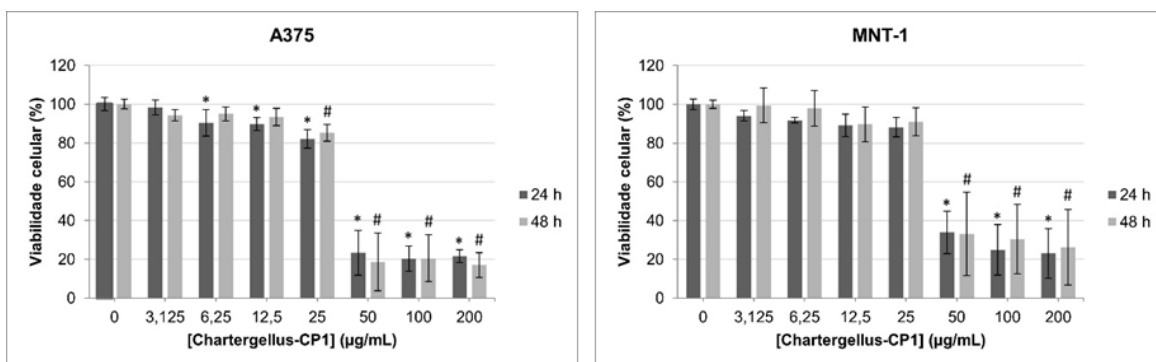


Figura 7 - Viabilidade das células A375 e MNT-1 após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (0 $\mu\text{g/mL}$) para $p < 0,05$ e estão devidamente identificadas com * (24 horas) ou # (48 horas).

A partir do programa SigmaPlot versão 14.0, foi determinada a IC_{50} de Chartergellus-CP1 em ambas as células para as 24 e 48 horas de tratamento (Tabela 1). Contudo, apenas o período de exposição de 24 horas foi utilizado nos ensaios subsequentes de avaliação dos mecanismos de citotoxicidade devido à semelhança existente nos resultados obtidos nos dois tempos de exposição.

Tabela 1 - IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de Chartergellus-CP1 nas células de melanoma humano após 24 e 48 horas de tratamento.

Linha celular	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	24 horas	48 horas
A375	40,50 \pm 4,01	37,88 \pm 2,50
MNT-1	51,55 \pm 5,48	51,99 \pm 8,56

Adicionalmente, através dos valores de IC_{50} de Chartergellus-CP1 foram determinados os valores de IC_{20} em cada linha celular para as 24 horas de exposição (17,41 $\mu\text{g/mL}$ ou 20,03 $\mu\text{g/mL}$, no caso de A375 ou MNT-1, respetivamente).

2. Efeito de Chartergellus-CP1 no ciclo celular

O efeito de Chartergellus-CP1 na progressão do ciclo celular foi investigado como possível causa da citotoxicidade observada no ensaio do MTT. Para tal, as células A375 e MNT-1 foram incubadas durante 24 horas com as suas respetivas IC_{20} e IC_{50} de Chartergellus-CP1 e os perfis do ciclo celular foram analisados por citometria de fluxo utilizando a sonda PI. Os resultados obtidos estão representados na Figura 8. O grupo de controlo (sem tratamento) serviu para comparação com os restantes grupos (IC_{20} e IC_{50}).

Após 24 horas de incubação com Chartergellus-CP1, a percentagem de células A375 em fase G0/G1 aumentou ligeiramente de 49,2% (controlo) para 49,7% (IC₂₀), diminuindo em seguida para 42,2% (IC₅₀). Na fase S, observou-se um ligeiro decréscimo de 37,9% (controlo) para 36,9% (IC₂₀), seguido por um acréscimo para 41,4% (IC₅₀). Contudo, apenas na fase G2/M foi possível observar diferenças estatisticamente significativas, relativamente ao controlo (13,0%), tendo-se verificado um aumento com significado estatístico na proporção de células A375 em fase G2/M quando expostas à IC₅₀ (16,4%) (Figura 8).

Na linha celular MNT-1 não se verificaram diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo ($p > 0,05$). Após 24 horas de exposição a Chartergellus-CP1, uma redução na percentagem de células MNT-1 ocorreu na fase G0/G1 de 54,1% (controlo) para 51,1% (IC₅₀). A percentagem de células MNT-1 em fase S aumentou de 32,4% (controlo) para 34,6% (IC₂₀) e diminuiu para 29,8% (IC₅₀). Além disso, um ligeiro acúmulo de células MNT-1 em fase G2/M foi observado do controlo (14,4%) para a IC₅₀ (15,3%) (Figura 8).

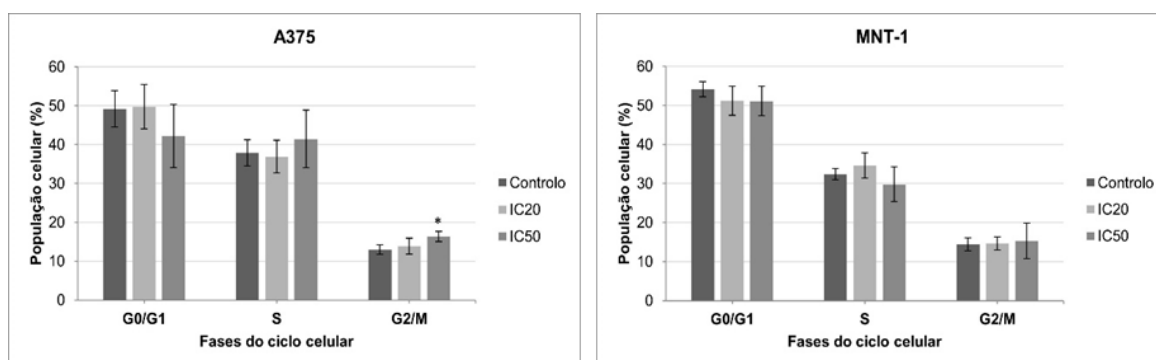


Figura 8 - Distribuição das células A375 e MNT-1 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de exposição a Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (sem tratamento) para $p < 0,05$ e estão identificadas com *.

3. Efeito de Chartergellus-CP1 na produção de ROS intracelular

Com o intuito de analisar se o mecanismo de ação de Chartergellus-CP1 dependia da produção de ROS, as células A375 e MNT-1 foram incubadas por 24 horas com concentrações correspondentes à IC₂₀ e IC₅₀ de Chartergellus-CP1 e a presença de ROS intracelular foi detetada por citometria de fluxo, através do uso da sonda DCFH-DA. Os resultados que se obtiveram estão demonstrados na Figura 9. O grupo de controlo (sem tratamento) serviu para comparação com os grupos experimentais (IC₂₀ e IC₅₀).

Para ambas as linhas celulares, verificou-se que os níveis de ROS intracelulares mostraram uma tendência de aumento com a concentração de Chartergellus-CP1, embora sem significado estatístico (alcançando na IC₅₀ o valor de 1,5%) (Figura 9).

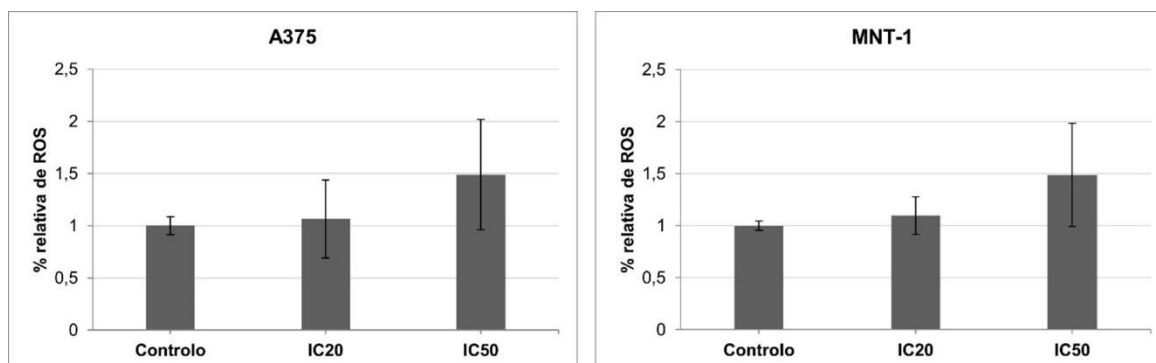


Figura 9 - Percentagem relativa de ROS nas linhas celulares A375 e MNT-1 após 24 horas de exposição a Chartergellus-CP1. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de duas experiências independentes.

4. Efeito de Chartergellus-CP1 na apoptose celular

A fim de analisar o possível envolvimento da apoptose celular no mecanismo de citotoxicidade de Chartergellus-CP1, as células A375 e MNT-1 foram expostas por 24 horas a este péptido nas concentrações de IC₂₀ e IC₅₀ e as populações de células viáveis, em apoptose e necrose foram detetadas por citometria de fluxo, utilizando para tal a combinação de Anexina V-FITC e PI. Na Figura 10 estão representados graficamente os resultados obtidos para ambas as células. Os resultados dos grupos experimentais (IC₂₀ e IC₅₀) foram comparados com os resultados do grupo de controlo (sem tratamento).

Segundo a Figura 10, após 24 horas de tratamento com Chartergellus-CP1, verificou-se que a percentagem de células A375 viáveis (A-PI-) diminuiu à medida que a concentração de Chartergellus-CP1 aumentou, ou seja, de 89,9% (controlo) para 86,7% (IC₂₀) e 83,0% (IC₅₀), todavia só as células tratadas com a IC₅₀ exibiram um resultado estatisticamente significativo em relação ao controlo. Foi ainda possível observar que após o tratamento com Chartergellus-CP1, a percentagem de células A375 em apoptose inicial (A+PI-) aumentou significativamente, relativamente ao controlo (3,0%) nas células expostas à IC₅₀ (8,1%). Também, a percentagem de células A375 em apoptose tardia (A+PI+) mostrou uma tendência de aumento de 7,2% (controlo) para 8,9% (IC₂₀) e 8,4% (IC₅₀), contudo a diferença não foi estatisticamente significativa comparativamente com o controlo (Figura 10).

No que diz respeito à linha celular MNT-1, a percentagem de células viáveis (A-PI-) reduziu conforme a dose de Chartergellus-CP1 aumentou, tal como as células A375, com diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo (76,1%), na IC₅₀ (53,0%). Verificou-se ainda que o aumento da concentração de Chartergellus-CP1 induziu o aumento da percentagem de células MNT-1 em apoptose inicial (A+PI-), apresentando na IC₅₀ (34,2%), um resultado estatisticamente significativo em relação ao controlo (7,2%). Foi também observado uma tendência de aumento sem significado estatístico, em relação ao grupo de controlo (11,5%), da percentagem de células em apoptose tardia (A+PI+) na IC₂₀ (15,8%) e IC₅₀ (11,7%) de Chartergellus-CP1 (Figura 10).

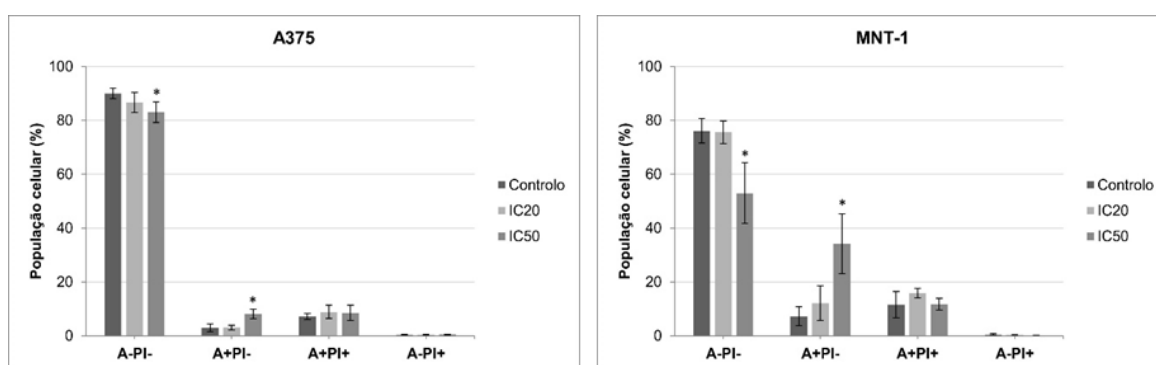


Figura 10 - Percentagem de células A375 e MNT-1 viáveis (A-PI-), em apoptose inicial (A+PI-), em apoptose tardia (A+PI+) e em necrose (A-PI+) após 24 horas de incubação com Chartergellus-CP1. A e PI representam Anexina V-FITC e iodeto de propídio, respetivamente. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de duas experiências independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas relativamente ao controlo (sem tratamento) para $p < 0,05$ e estão identificadas com *.

V. Discussão

Resultados de diversos estudos demonstraram o potencial antitumoral de muitos venenos de origem animal. Assim, no presente estudo, foram investigados os efeitos de dois péptidos de venenos de vespas, Prolistarina e Chartergellus-CP1, em células de melanoma humano A375 e MNT-1.

A375 é uma linha celular de melanoma cutâneo amelanótico primário que apresenta mutações nos genes *BRAF* e *CDKN2*, associadas a danos no DNA induzidos pela radiação UV (Avram et al., 2017; Candido et al., 2014). MNT-1 corresponde a uma linha celular de melanoma pigmentado metastático que possui melanossomas maduros em estágio III e IV (Chen et al., 2006, 2009; Cuomo et al., 1991).

Para avaliar os efeitos na viabilidade celular, as células A375 e MNT-1 foram tratadas com diferentes concentrações de Prolistarina e Chartergellus-CP1 por 24 e 48 horas.

Prolistarina mostrou reduzida atividade citotóxica nas duas linhas celulares, pois não foi possível obter uma curva de dose resposta para concentrações inferiores ou iguais à concentração máxima em estudo (200 µg/mL) que permitisse calcular a IC_{50} e, portanto, este péptido foi excluído nos ensaios de avaliação dos mecanismos de citotoxicidade (Figura 6).

Por outro lado, Chartergellus-CP1 apresentou citotoxicidade significativa nas células A375 e MNT-1, de maneira dependente da dose e praticamente independente do tempo de exposição, diminuindo de forma drástica a viabilidade celular, até cerca de 20%, nas concentrações mais altas em estudo (50, 100 e 200 µg/mL) (Figura 7). Além disso, de acordo com a Tabela 1, os valores de IC_{50} para as células A375 foram de 40,50 µg/mL para as 24 horas e 37,88 µg/mL para as 48 horas (correspondendo a 32,66 e 30,55 µM, respetivamente) e para as células MNT-1 foram de 51,55 µg/mL para as 24 horas e 51,99 µg/mL para as 48 horas (correspondendo a 41,58 e 41,93 µM, respetivamente). Portanto, as células A375 apresentaram valores de IC_{50} inferiores àqueles que se observam para as células MNT-1, demonstrando por isso ser mais sensíveis ao tratamento com Chartergellus-CP1. Isto pode ser explicado pela falta de melanina nas células A375, já que a resistência à terapêutica no melanoma também tem sido associada à presença de melanina (Pawlikowska et al., 2021). Estes resultados estão de acordo com Soares et al. (2022), onde Chartergellus-CP1 exibiu atividade citotóxica significativa de forma dependente da dose em duas linhas celulares de cancro da mama humano, MCF-7 (luminal A) e MDA-MB-231 (triplo-negativo), com valores de IC_{50} de 37,89 e 44,36 µg/mL, respetivamente, após 24 horas de exposição (correspondendo a 30,56 e 35,78 µM,

respetivamente). Os mesmos autores observaram ainda que Chartergellus-CP1 reduziu significativamente e radicalmente a viabilidade das células MDA-MB-231 a partir da concentração de 50 µg/mL (Soares et al., 2022).

Como supracitado, na introdução, existe uma grande possibilidade de que Chartergellus-CP1 seja um composto da classe dos quimiotáticos, dada a sua semelhança estrutural com Polybia-CP, um péptido quimiotático isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* (Lopes et al., 2021). Os péptidos quimiotáticos possuem, geralmente, a capacidade de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Souza et al., 2005). Os péptidos quimiotáticos podem ainda desempenhar um papel importante na terapia antitumoral, dado que em concentrações mais elevadas podem estimular os leucócitos e os macrófagos a desenvolverem citotoxicidade (Li et al., 2005). Além disso, já foram realizados alguns estudos sobre o potencial antitumoral de Polybia-CP. Wang et al. (2011) investigaram o potencial antitumoral de Polybia-CP em linhas celulares humanas de cancro da bexiga (BIU-87) e de cancro da próstata (PC-3), obtendo valores de IC₅₀ de 17,84 e 11,01 µM, respetivamente, após 24 horas de exposição. Torres et al. (2020) avaliaram a atividade anticancerígena de Polybia-CP e de seus derivados sintéticos em linhas celulares humanas de cancro da mama (MCF-7), de cancro do fígado (HepG2), de melanoma (SK-MEL) e de neuroblastoma (SH-SY5Y). Torres et al. (2020) relataram que as propriedades físico-químicas responsáveis pela atividade antitumoral de Polybia-CP e de seus derivados foram a helicidade, a carga líquida e a hidrofobicidade.

Estudos anteriores também mostraram a eficácia citotóxica e antitumoral de outros péptidos de veneno de vespa. O péptido Mastoparano obtido do veneno da vespa *Vespa lewisii*, mostrou atividade citotóxica de maneira dependente da dose em várias células cancerígenas, inclusive em células de melanoma metastático humano (A2058) e células de melanoma murino (B16F10-Nex2), com valores de IC₅₀ de 140 e 165 µM, respetivamente, após 24 horas de exposição, observando-se uma maior resistência ao tratamento em células não tumorais (de melanócitos murinos [Melan-a] e de queratinócitos humanos [HaCaT]) que apresentaram valores de IC₅₀ de 411,5 e 428 µM, respetivamente (de Azevedo et al., 2015). Wang et al. (2008) relataram que o péptido Polybia-MPI do veneno da vespa *Polybia paulista* apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa de maneira dependente da concentração em linhas celulares humanas de cancro da próstata (PC-3) e cancro da bexiga (BIU-87 e EJ), com valores de IC₅₀ de 64,68, 52,16 e 75,51 µM, respetivamente, após 24 horas de exposição, sem demonstrar citotoxicidade na linha celular não tumoral de fibroblastos murinos NIH3T3.

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos citotóxicos de Chartergellus-CP1 foram investigados, utilizando a citometria de fluxo para analisar o ciclo celular, a produção de ROS e a apoptose nas células A375 e MNT-1 após o tratamento com a IC₂₀ e IC₅₀ durante 24 horas.

O ciclo celular é um processo constituído por duas fases, a interfase (G₀, G₁, S e G₂) e a mitose, que culminam na divisão das células (Fang et al., 2019). O ciclo celular é regulado por mecanismos moleculares específicos que preservam a integridade do genoma, induzindo a paragem do ciclo celular quando são detetados danos no DNA. Dependendo do tipo de dano e fase do ciclo celular em que o dano é detetado, é feita a reparação do DNA ou então é desencadeada a morte celular (Pavey et al., 2013; Sánchez & Dynlacht, 2005). Contudo, as células cancerígenas apresentam um ciclo celular desregulado que é responsável pela proliferação celular descontrolada (Hanahan & Weinberg, 2011). Assim, a paragem do ciclo celular é considerada uma estratégia eficaz para o tratamento do cancro (Diaz-Moralli et al., 2013).

O tratamento com a IC₅₀ de Chartergellus-CP1 aumentou significativamente o número de células A375 acumuladas na fase G₂/M do ciclo celular, em relação ao controlo, indicando que o péptido induziu a paragem da fase G₂/M, possivelmente devido à existência de danos no DNA (Figura 8). Estudos anteriores relataram um efeito semelhante. Por exemplo, Guo et al. (2022) observaram que o péptido Smp24 derivado do escorpião *Scorpio maurus palmatus* causou a paragem do ciclo celular nas fases S e G₂/M em células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549). Também Elrefay et al. (2019) mencionaram que o veneno da abelha *Apis mellifera* e os seus constituintes (Fosfolipase A2 e o péptido Melitina) pararam o ciclo celular na fase G₂/M em células de adenocarcinoma da próstata humano (PC-3). No entanto, Soares et al. (2022) relataram que Chartergellus-CP1 induziu a paragem do ciclo celular na fase S em células de cancro da mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231), após exposição à IC₅₀. No presente estudo, o tratamento com Chartergellus-CP1 não causou efeito significativo nas células MNT-1 (Figura 8).

Existe uma relação entre o cancro e o *stress* oxidativo (excesso de ROS) (Prasad et al., 2017). O aumento dos níveis de ROS nas células cancerígenas pode ocorrer em consequência de diversos mecanismos, tais como ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, metabolismo elevado e mau funcionamento mitocondrial (Waris & Ahsan, 2006). Porém, quando os níveis de ROS nas células cancerígenas atingem um certo valor incompatível com a sobrevivência celular, podem induzir danos celulares graves e morte celular (de Sá Junior et al., 2017; Dharmaraja, 2017; Perillo et al.,

2020). Assim, potenciar o aumento dos níveis de ROS intracelulares pode ser uma estratégia no tratamento do cancro (Trachootham et al., 2009).

No estudo atual, verificou-se que as linhas celulares A375 e MNT-1 tratadas com Chartergellus-CP1 exibiram um aumento na produção de ROS intracelular, visivelmente maior no tratamento com a IC₅₀, contudo sem significado estatístico (Figura 9). Resultados semelhantes com Chartergellus-CP1 foram obtidos por Soares et al. (2022), em que foi verificado um aumento significativo, dependente da concentração, dos níveis de ROS intracelulares em células de cancro da mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231). Também o veneno da víbora *Vipera latastei* aumentou os níveis de ROS intracelulares na linha celular de melanoma humano (MNT-1) (da Silva, 2019). Um outro estudo mostrou que uma toxina do veneno da víbora *Vipera lebetina turanica* promoveu a produção de ROS e, conseqüentemente a ativação da apoptose em células de cancro do cólon humano (HCT116 e HT-29) (Park et al., 2012).

A morte celular por apoptose é um processo que envolve várias alterações fisiológicas (entre as quais, a externalização da fosfatidilserina), e pode ser ativado, por exemplo, em resposta ao *stress* oxidativo (Elmore, 2007; Lin et al., 2018).

Aqui, tanto as células A375 como as células MNT-1 mostraram um aumento significativo nas células em apoptose inicial, em comparação com o controlo, após o tratamento com a IC₅₀ de Chartergellus-CP1 (Figura 10). Resultados semelhantes com este péptido foram observados por Soares et al. (2022) em linhas celulares humanas de cancro da mama (MCF-7 e MDA-MB-231). A ativação de apoptose é também demonstrada em outros estudos na área dos venenos de origem animal. O péptido Nubein6.8 isolado do veneno da cobra *Naja nubiae* induziu apoptose em células de melanoma humano (A375) e células de carcinoma do ovário humano (A2780) (Abdel-Ghani et al., 2019). Wu et al. (2018) demonstraram que o péptido VACP1 isolado do veneno da *Vespa ducalis* induziu apoptose na linha celular humana de osteossarcoma MG-63.

VI. Conclusão

Resumidamente, o péptido Prolistarina apresentou uma baixa citotoxicidade em linhas celulares humanas de melanoma (A375 e MNT-1). Já o péptido Chartergellus-CP1 mostrou uma elevada citotoxicidade dependente da concentração nas células A375 e MNT-1. A citotoxicidade de Chartergellus-CP1 está refletida na paragem do ciclo celular em fase G2/M nas células A375, na tendência de aumento da produção de ROS intracelular e na apoptose observada nas células A375 e MNT-1.

Embora seja necessário realizar estudos *in vivo*, o péptido Chartergellus-CP1 pode representar uma nova estratégia terapêutica e desempenhar um papel potencial no tratamento do melanoma. No entanto, devem ser realizados mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade de Chartergellus-CP1, bem como estudos utilizando linhas celulares não tumorais de forma a estudar a especificidade de Chartergellus-CP1 e, adicionalmente, estudos sobre o potencial antimetastático e antiangiogénico de Chartergellus-CP1.

VII. Referências bibliográficas

- Abdel-Ghani, L. M., Rahmy, T. R., Tawfik, M. M., Kaziri, I., Al-Obaidi, A., Rowan, E. G., Plevin, R., & Abdel-Rahman, M. A. (2019). Cytotoxicity of Nubein6.8 peptide isolated from the snake venom of *Naja nubiae* on melanoma and ovarian carcinoma cell lines. *Toxicon*, 168, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.220>
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- AIM at Melanoma Foundation. (2022). *Stages of melanoma*. <https://www.aimatmelanoma.org/stages-of-melanoma/>
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415–421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- American Cancer Society. (2019). *Melanoma skin cancer stages*. https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html#written_by
- American Cancer Society. (2022). *Survival rates for melanoma skin cancer*. <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html>
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The eighth edition AJCC cancer staging manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S., & Becchetti, A. (2009). Targeting ion channels in cancer: A novel frontier in antineoplastic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 16(1), 66–93. <https://doi.org/10.2174/092986709787002835>
- Avram, S., Coricovac, D.-E., Pavel, I. Z., Pinzaru, I., Ghiulai, R., Baderca, F., Soica, C., Muntean, D., Branisteanu, D. E., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Dehelean, C. A. (2017). Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncology Reports*, 38(1), 89–99. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5658>

- Babes, R. M., Tofolean, I. T., Sandu, R. G., Baran, O. E., Cosoreanu, V., Ilie, M. T., Duta, A. I., Ceausescu, M. C., Ciucur, P. M., Costache, S., Ganea, C., & Baran, I. (2018). Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. *Cell Cycle*, *17*(6), 766–779. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1426415>
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *19*(5), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology*, *9*, 239–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104658>
- Bélanger, F., Rajotte, V., & Drobetsky, E. A. (2014). A majority of human melanoma cell lines exhibits an S phase-specific defect in excision of UV-induced DNA photoproducts. *PLOS ONE*, *9*(1), e85294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085294>
- Benard, M., Neri, E., Fry, B. G., Boyer, L., Cochran, C., Alam, M., Jackson, T. N. W., Paniagua, D., Olvera-Rodríguez, F., Koludarov, I., Sunagar, K., & Alagón, A. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: Evolution, pathophysiology and biodiscovery* (B. Fry (ed.); 1st ed.). Oxford University Press. https://www.researchgate.net/publication/277719111_Venomous_Reptiles_and_Their_Toxins_Evolution_Pathophysiology_and_Biodiscovery
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, *3*(6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Berx, G., & Van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(6), a003129. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>
- Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., & Tsao, H. (2003). Cutaneous melanomas associated with nevi. *Archives of Dermatology*, *139*(12), 1620–1624. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.12.1620>
- Bhatia, S., Tykodi, S. S., & Thompson, J. A. (2009). Treatment of metastatic melanoma: An overview. *Oncology*, *23*(6), 488–496. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737459/>
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, *432*(7015), 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nature*

- Reviews Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Bordon, K. D. C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiesel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreira, I. G., Oliveira, I. S. de, Boldrini-França, J., Pucca, M. B., Baldo, M. A., & Arantes, E. C. (2020). From animal poisons and venoms to medicines: Achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1132. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>
- Brozyna, A., Zbytek, B., Granese, J., Carlson, J. A., Ross, J., & Slominski, A. (2007). Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Review of Dermatology*, 2(4), 451–469. <https://doi.org/10.1586/17469872.2.4.451>
- Brumatti, G., Sheridan, C., & Martin, S. J. (2008). Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, 44(3), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.010>
- Buckingham, L., & Flaws, M. L. (2007). *Molecular diagnostics: Fundamentals, methods, & clinical applications* (1st ed.). F.A. Davis.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736–1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>
- Candido, S., Rapisarda, V., Marconi, A., Malaponte, G., Bevelacqua, V., Gangemi, P., Scalisi, A., McCubrey, J. A., Maestro, R., Spandidos, D. A., Fenga, C., & Libra, M. (2014). Analysis of the B-RAFV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncology Reports*, 31(3), 1079–1082. <https://doi.org/10.3892/or.2014.2977>
- Cao, P., Cai, X., Lu, W., Zhou, F., & Huo, J. (2011). Growth inhibition and induction of apoptosis in SHG-44 glioma cells by Chinese medicine formula “Pingliu Keli.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/958243>
- Carr, S., Smith, C., & Wernberg, J. (2020). Epidemiology and risk factors of melanoma. *Surgical Clinics of North America*, 100(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>
- Castro, F. F. D. S. (2013). *Identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de um novo peptídeo isolado da peçonha da vespa social Polybia dimorpha contra bactérias multirresistentes* [Master’s thesis, Universidade de Brasília, Repositório Institucional da Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/13103>

- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., ... McArthur, G. A. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Chen, K. G., Leapman, R. D., Zhang, G., Lai, B., Valencia, J. C., Cardarelli, C. O., Vieira, W. D., Hearing, V. J., & Gottesman, M. M. (2009). Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(18), 1256–1271. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp259>
- Chen, K. G., Valencia, J. C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J. K., Rouzaud, F., Berens, W., Wincovitch, S. M., Garfield, S. H., Leapman, R. D., Hearing, V. J., & Gottesman, M. M. (2006). Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9903–9907. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600213103>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1521–1533. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
- Chiganças, V., Sarasin, A., & Menck, C. F. M. (2004). CPD-photolyase adenovirus-mediated gene transfer in normal and DNA-repair-deficient human cells. *Journal of Cell Science*, 117(16), 3579–3592. <https://doi.org/10.1242/jcs.01241>
- Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Cenni, E., Savioli, F., & Pizzoferrato, A. (1998). Fluorescent microplate assay for respiratory burst of PMNs challenged in vitro with orthopedic metals. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), 455–460. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19980905\)41:3<455::aid-jbm15>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19980905)41:3<455::aid-jbm15>3.0.co;2-h)
- Cryns, V., & Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes & Development*, 12(11), 1551–1570. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1551>
- Čujová, S., Slaninová, J., Monincová, L., Fučík, V., Bednářová, L., Štokrová, J., Hovorka,

- O., Voburka, Z., Straka, J., & Čeřovský, V. (2013). Panurgines, novel antimicrobial peptides from the venom of communal bee *Panurgus calcaratus* (Hymenoptera: Andrenidae). *Amino Acids*, *45*(1), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1482-4>
- Cuomo, M., Nicotra, M. R., Apollonj, C., Fraioli, R., Giacomini, P., & Natali, P. G. (1991). Production and characterization of the murine monoclonal antibody 2G10 to a human T4-tyrosinase epitope. *Journal of Investigative Dermatology*, *96*(4), 446–451. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12470092>
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, *16*(25), 5484–5491. <https://doi.org/10.1021/bi00644a014>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- da Silva, A. J. T. (2019). *Avaliação do potencial antitumoral e antibacteriano do veneno de Vipera latastei* [Master’s thesis, Universidade de Aveiro, Repositório Institucional da Universidade de Aveiro]. <https://ria.ua.pt/handle/10773/30050>
- da Silva, A. M. B., Silva-Gonçalves, L. C., Oliveira, F. A., & Arcisio-Miranda, M. (2018). Pro-necrotic activity of cationic mastoparan peptides in human glioblastoma multiforme cells via membranolytic action. *Molecular Neurobiology*, *55*(7), 5490–5504. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0782-1>
- Dakup, P., & Gaddameedhi, S. (2017). Impact of the circadian clock on UV-induced DNA damage response and photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, *93*(1), 296–303. <https://doi.org/10.1111/php.12662>
- Darzynkiewicz, Z. (2011). Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Current Protocols in Cytometry*, *56*(1), 7.2.1-7.2.8. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0702s56>
- das Neves, R. C., Trentini, M. M., de Castro e Silva, J., Simon, K. S., Bocca, A. L., Silva, L. P., Mortari, M. R., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2016). Antimycobacterial activity of a new peptide Polydim-I isolated from neotropical social wasp *Polybia dimorpha*. *PLOS ONE*, *11*(3), e0149729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149729>
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, *20*(11), 1366–1379.

- <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- de Azevedo, R. A., Figueiredo, C. R., Ferreira, A. K., Matsuo, A. L., Massaoka, M. H., Girola, N., Auada, A. V. V., Farias, C. F., Pasqualoto, K. F. M., Rodrigues, C. P., Barbuto, J. A., Levy, D., Bydlowski, S. P., De Sá-Junior, P. L., Travassos, L. R., & Lebrun, I. (2015). Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo. *Peptides*, *68*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.024>
- de Sá Junior, P. L., Câmara, D. A. D., Porcacchia, A. S., Fonseca, P. M. M., Jorge, S. D., Araldi, R. P., & Ferreira, A. K. (2017). The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 12. <https://doi.org/10.1155/2017/2467940>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, *7*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Deitch, A. D., Law, H., & White, R. D. (1982). A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *30*(9), 967–972. <https://doi.org/10.1177/30.9.6182188>
- DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Alteri, R., Robbins, A. S., & Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *64*(4), 252–271. <https://doi.org/10.3322/caac.21235>
- Dharmaraja, A. T. (2017). Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(8), 3221–3240. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01243>
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., & Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, *138*(2), 255–271. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., & Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, *7*, 35–49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
- Eggermont, A. M. M. (2010). Advances in systemic treatment of melanoma. *Annals of Oncology*, *21*(SUPPL. 7), vii339–vii344. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq364>
- Eigentler, T. K., & Garbe, C. (2013). New landscape in the treatment of melanoma: A 2012 update. *Oncologie*, *15*(2), 71–77. <https://doi.org/10.1007/s10269-013-2258-x>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Elrefay, M. I., Elfiky, A. A., Sayed, R. H., & Zaki, H. F. (2019). Snake venom, bee venom and their components exert an anti-cancer effect by triggering apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 57(2), 148–156. <https://doi.org/10.21608/BFPC.2019.101875>
- Falchi, M., Bataille, V., Hayward, N. K., Duffy, D. L., Bishop, J. A. N., Pastinen, T., Cervino, A., Zhao, Z. Z., Deloukas, P., Soranzo, N., Elder, D. E., Barrett, J. H., Martin, N. G., Bishop, D. T., Montgomery, G. W., & Spector, T. D. (2009). Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. *Nature Genetics*, 41(8), 915–919. <https://doi.org/10.1038/ng.410>
- Fang, H.-S., Lang, M.-F., & Sun, J. (2019). New methods for cell cycle analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 47(9), 1293–1301. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61186-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61186-2)
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in Chemistry*, 5, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- Felippotti, G. T. (2010). *Composição de enxames de vespas sociais Neotropicais (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae: Epiponini) e suas implicações com a evolução do comportamento social* [Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, Repositório da Produção USP]. <https://repositorio.usp.br/item/001964722>
- Fellner, C. (2012). Ipilimumab (Yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: Serious side effects and a hefty price tag may limit its use. *P&T*, 37(9), 503–511, 530. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462607/>
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Ferris, R. L. (2015). Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3293–3304. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.1509>
- Floor, S. L., Dumont, J. E., Maenhaut, C., & Raspe, E. (2012). Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine*, 18(9), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.06.005>
- Ford, D., Bliss, J. M., Swerdlow, A. J., Armstrong, B. K., Franceschi, S., Green, A., Holly, E. A., Mack, T., Mackie, R. M., Østerlind, A., Walter, S. D., Peto, J., & Easton, D. F. (1995). Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. *International Journal of Cancer*, 62(4), 377–381. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910620403>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral

- red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S., & Chatterjee, A. (2013). Integrins and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*, 7(3), 251–261. <https://doi.org/10.4161/cam.23840>
- Giri, D., Ozen, M., & Ittmann, M. (2001). Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, 159(6), 2159–2165. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63067-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63067-2)
- Gogas, H. J., Kirkwood, J. M., & Sondak, V. K. (2007). Chemotherapy for metastatic melanoma: Time for a change? *Cancer*, 109(3), 455–464. <https://doi.org/10.1002/cncr.22427>
- Gomes, A., Haldar, S., Giri, B., Mishra, R., Saha, A., Dasgupta, S., & Gomes, A. (2009). Experimental osteoporosis induced in female albino rats and its antagonism by Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* C.L.Koch) venom. *Toxicon*, 53, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.011>
- Greaves, W. O., Verma, S., Patel, K. P., Davies, M. A., Barkoh, B. A., Galbincea, J. M., Yao, H., Lazar, A. J., Aldape, K. D., Medeiros, L. J., & Luthra, R. (2013). Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 15(2), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.10.002>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grob, J. J., Gouvernet, J., Aymar, D., Mostaque, A., Romano, M. H., Collet, A. M., Noe, M. C., Diconstanzo, M. P., & Bonerandi, J. J. (1990). Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer*, 66(2), 387–395. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900715\)66:2<387::aid-cncr2820660232>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900715)66:2<387::aid-cncr2820660232>3.0.co;2-j)
- Guo, R., Chen, X., Nguyen, T., Chai, J., Gao, Y., Wu, J., Li, J., Abdel-Rahman, M. A., Chen, X., & Xu, X. (2022). The strong anti-tumor effect of Smp24 in lung adenocarcinoma A549 cells depends on its induction of mitochondrial dysfunctions and ROS accumulation. *Toxins*, 14(9), 590. <https://doi.org/10.3390/toxins14090590>
- Halpern, A. C., Guerry, D., Elder, D. E., Clark, W. H., Synnestvedt, M., Norman, S., & Ayerle, R. (1991). Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (nonfamilial) melanoma. A case-control study. *Archives of Dermatology*, 127(7), 995–999. <https://doi.org/10.1001/archderm.1991.01680060069006>

- Hammouda, M. B., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Zakraoui, O., Aloui, Z., Riahi-Chebbi, I., Karoui, H., Rodríguez-López, J. N., & Essafi-Benkhadir, K. (2016). Lebein, a snake venom disintegrin, induces apoptosis in human melanoma cells. *Toxins*, *8*(7), 206. <https://doi.org/10.3390/toxins8070206>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2017). Biological hallmarks of cancer. In R. C. Bast Jr., C. M. Croce, W. N. Hait, W. K. Hong, D. W. Kufe, M. Piccart-Gebhart, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, H. Wang, & J. F. Holland (Eds.), *Holland-Frei cancer medicine* (9th ed., pp. 1–10). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119000822.hfcm002>
- Hashemzadeh, M., Furukawa, M., Goldsberry, S., & Movahed, M. R. (2008). Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review. *Experimental & Clinical Cardiology*, *13*(4), 192–197. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663484/>
- Haycock, P. C., Burgess, S., Nounu, A., Zheng, J., Okoli, G. N., Bowden, J., Wade, K. H., Timpson, N. J., Evans, D. M., Willeit, P., Aviv, A., Gaunt, T. R., Hemani, G., Mangino, M., Ellis, H. P., Kurian, K. M., Pooley, K. A., Eeles, R. A., Lee, J. E., ... Davey Smith, G. (2017). Association between telomere length and risk of cancer and non-neoplastic diseases: A mendelian randomization study. *JAMA Oncology*, *3*(5), 636–651. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5945>
- Hayward, N. K., Wilmott, J. S., Waddell, N., Johansson, P. A., Field, M. A., Nones, K., Patch, A. M., Kakavand, H., Alexandrov, L. B., Burke, H., Jakrot, V., Kazakoff, S., Holmes, O., Leonard, C., Sabarinathan, R., Mularoni, L., Wood, S., Xu, Q., Waddell, N., ... Mann, G. J. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*, *545*(7653), 175–180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- Hickman, E. S., Moroni, M. C., & Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, *12*(1), 60–66. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(01\)00265-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(01)00265-9)
- Holly, E. A., Kelly, J. W., Shpall, S. N., & Chiu, S.-H. (1987). Number of melanocytic nevi as

- a major risk factor for malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 17(3), 459–468. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(87\)70230-8](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(87)70230-8)
- Hong, W., Li, T., Song, Y., Zhang, R., Zeng, Z., Han, S., Zhang, X., Wu, Y., Li, W., & Cao, Z. (2014). Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 102, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.013>
- Honors, C. N., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2018). Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17, 1–15. <https://doi.org/10.1177/1533033818791795>
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Jerant, A. F., Johnson, J. T., Sheridan, C. D., & Caffrey, T. J. (2000). Early detection and treatment of skin cancer. *American Family Physician*, 62(2), 357–368. <https://www.aafp.org/afp/2000/0715/p357.html#afp20000715p357-b3>
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes and Development*, 23(5), 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
- Ju, X., Fan, D., Kong, L., Yang, Q., Zhu, Y., Zhang, S., Su, G., & Li, Y. (2021). Antimicrobial peptide Brevinin-1RL1 from frog skin secretion induces apoptosis and necrosis of tumor cells. *Molecules*, 26(7), 2059. <https://doi.org/10.3390/molecules26072059>
- Kang, L., Gao, Z., Huang, W., Jin, M., & Wang, Q. (2015). Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.03.001>
- Khamessi, O., Ben Mabrouk, H., Elfessi-Magouri, R., & Kharrat, R. (2018). RK1, the first very short peptide from *Buthus occitanus tunetanus* inhibits tumor cell migration, proliferation and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.133>
- Khusro, A., Aarti, C., Barbabosa-Pliego, A., Rivas-Cáceres, R. R., & Cipriano-Salazar, M. (2018). Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: A systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS. *Microbial Pathogenesis*, 125, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.003>
- Koh, C. Y., & Kini, R. M. (2012). From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon*, 59(4), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.017>
- Kolenda, T., Przybyła, W., Kapałczyńska, M., Teresiak, A., Zajączkowska, M., Bliźniak, R., & Lamperska, K. M. (2018). Tumor microenvironment - Unknown niche with powerful

- therapeutic potential. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 23(3), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2018.01.004>
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., & van Oers, M. H. J. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415–1420. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1415.1415>
- Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Law, M. H., Bishop, D. T., Lee, J. E., Brossard, M., Martin, N. G., Moses, E. K., Song, F., Barrett, J. H., Kumar, R., Easton, D. F., Pharoah, P. D. P., Swerdlow, A. J., Kypreou, K. P., Taylor, J. C., Harland, M., Randerson-Moor, J., Akslén, L. A., Andresen, P. A., Avril, M. F., ... Iles, M. M. (2015). Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nature Genetics*, 47(9), 987–995. <https://doi.org/10.1038/ng.3373>
- Lee, G., & Park, Y. I. (2018). Lanthanide-doped upconversion nanocarriers for drug and gene delivery. *Nanomaterials*, 8(7), 511. <https://doi.org/10.3390/nano8070511>
- Lee, S. H., Baek, J. H., & Yoon, K. A. (2016). Differential properties of venom peptides and proteins in solitary vs. social hunting wasps. *Toxins*, 8(2), 32. <https://doi.org/10.3390/toxins8020032>
- Lee, Y. M., Cho, S. N., Son, E., Song, C. H., & Kim, D. S. (2020). Apamin from bee venom suppresses inflammation in a murine model of gouty arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 257, 112860. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112860>
- Lehmann, J., Schubert, S., & Emmert, S. (2014). Xeroderma pigmentosum: Diagnostic procedures, interdisciplinary patient care, and novel therapeutic approaches. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12(10), 867–872. <https://doi.org/10.1111/ddg.12419>
- Leiter, U., & Garbe, C. (2008). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer - the role of sunlight. In J. Reichrath (Ed.), *Sunlight, vitamin D and skin cancer* (Vol. 624, pp. 89–103). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_8
- Li, Z., Li, Y., & Zhen, Y. (2005). Potentiation of boanmycin antitumor activity by chemotactic peptide. *Chinese Journal of Cancer Research*, 17(2), 79–83.

- <https://doi.org/10.1007/s11670-005-0048-8>
- Lim, H. N., Baek, S. B., & Jung, H. J. (2019). Bee venom and its peptide component melittin suppress growth and migration of melanoma cells via inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways. *Molecules*, *24*(5), 929. <https://doi.org/10.3390/molecules24050929>
- Lin, S., Li, Y., Jr., A. A. Z., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2018). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(7), 5119–5132. <https://doi.org/10.1002/jcp.26356>
- Liniker, E., Menzies, A. M., Kong, B. Y., Cooper, A., Ramanujam, S., Lo, S., Kefford, R. F., Fogarty, G. B., Guminski, A., Wang, T. W., Carlino, M. S., Hong, A., & Long, G. V. (2016). Activity and safety of radiotherapy with anti-PD-1 drug therapy in patients with metastatic melanoma. *Oncoimmunology*, *5*(9), e1214788. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1214788>
- Liu, Y., & Sheikh, M. S. (2014). Melanoma: Molecular pathogenesis and therapeutic management. *Molecular and Cellular Pharmacology*, *6*(3), 228. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346328/>
- Loizzi, V., del Vecchio, V., Gargano, G., de Liso, M., Kardashi, A., Naglieri, E., Resta, L., Cicinelli, E., & Cormio, G. (2017). Biological pathways involved in tumor angiogenesis and bevacizumab based anti-angiogenic therapy with special references to ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1967. <https://doi.org/10.3390/ijms18091967>
- Lopes, K. S. (2018). *Estudo do potencial antiepiléptico de peptídeos isolados da peçonha da vespa social Chartergellus communis (Hymenoptera: Vespidae)* [Doctoral dissertation, Universidade de Brasília, Repositório Institucional da Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41728>
- Lopes, K. S., Quintanilha, M. V. T., de Souza, A. C. B., Zamudio-Zuñiga, F., Possani, L. D., & Mortari, M. R. (2021). Antiseizure potential of peptides from the venom of social wasp *Chartergellus communis* against chemically-induced seizures. *Toxicon*, *194*, 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.02.009>
- Loser, K., Apelt, J., Voskort, M., Mohaupt, M., Balkow, S., Schwarz, T., Grabbe, S., & Beissert, S. (2007). IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *The Journal of Immunology*, *179*(1), 365–371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.365>
- Ma, C., & Armstrong, A. W. (2014). Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: A systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine and interleukin-2. *Journal of*

- Dermatological Treatment*, 25(5), 401–408.
<https://doi.org/10.3109/09546634.2013.813897>
- Marelli, G., Sica, A., Vannucci, L., & Allavena, P. (2017). Inflammation as target in cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 35, 57–65.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.05.007>
- Maria, D. A., da Silva, M. G. L., Junior, M. C. C., & Ruiz, I. R. G. (2014). Antiproliferative effect of the Jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 446. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-446>
- Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., Vachon, C. M., Schild, S. E., McWilliams, R. R., Hand, J. L., Laman, S. D., Kottschade, L. A., Maples, W. J., Pittelkow, M. R., Pulido, J. S., Cameron, J. D., Creagan, E. T., & Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. (2007). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(3), 364–380.
<https://doi.org/10.4065/82.3.364>
- Martens, M. C., Seebode, C., Lehmann, J., & Emmert, S. (2018). Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: An update. *Anticancer Research*, 38(2), 1153–1158.
<https://doi.org/10.21873/anticancer.12334>
- Megahed, A. I., & Koon, H. B. (2014). What is the role of chemotherapy in the treatment of melanoma? *Current Treatment Options in Oncology*, 15(2), 321–335.
<https://doi.org/10.1007/s11864-014-0277-5>
- Melnikova, V. O., & Ananthaswamy, H. N. (2005). Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research*, 571(1–2), 91–106.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.015>
- Menezes, A. C., Carvalheiro, M., Ferreira de Oliveira, J. M. P., Ascenso, A., & Oliveira, H. (2018). Cytotoxic effect of the serotonergic drug 1-(1-Naphthyl)piperazine against melanoma cells. *Toxicology in Vitro*, 47, 72–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.011>
- Menezes, A. C., Raposo, S., Simões, S., Ribeiro, H., Oliveira, H., & Ascenso, A. (2016). Prevention of photocarcinogenesis by agonists of 5-HT1A and antagonists of 5-HT2A receptors. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1145–1164. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9068-z>
- Merkel, E. A., & Gerami, P. (2017). Malignant melanoma of sun-protected sites: A review of clinical, histological, and molecular features. *Laboratory Investigation*, 97(6), 630–635. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.147>

- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., Stein, K. D., Alteri, R., & Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271–289. <https://doi.org/10.3322/caac.21349>
- Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H. J., & Niedernhofer, L. J. (2003). Divide and conquer: Nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 232–240. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00018-8)
- Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7(4), 1126–1150. <https://doi.org/10.3390/toxins7041126>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., & Johansson, C. C. (2010). Regulatory T cells in cancer. In G. Woude & G. Klein (Eds.), *Advances in Cancer Research* (Vol. 107, pp. 57–117). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)07003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)07003-X)
- Mundel, T. M., & Kalluri, R. (2007). Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. *Microvascular Research*, 74(2–3), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.05.005>
- Muñoz-Couselo, E., García, J. S., Pérez-García, J. M., Cebrián, V. O., & Castán, J. C. (2015). Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors. *Annals of Translational Medicine*, 3(15), 207. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.13>
- Newkirk, K. M., Brannick, E. M., & Kusewitt, D. F. (2017). Neoplasia and tumor biology. In J. F. Zachary (Ed.), *Pathologic basis of veterinary disease* (6th ed., pp. 286-321.e1). Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00006-0>
- Nishigori, C., Yarosht, D. B., Ullrich, S. E., Vink, A. A., Bucana, C. D., Roza, L., & Kripke, M. L. (1996). Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19), 10354–10359. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10354>
- Nishigori, C. (2015). Current concept of photocarcinogenesis. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(9), 1713–1721. <https://doi.org/10.1039/c5pp00185d>
- Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 67–70. <https://doi.org/10.21775/cimb.003.067>

- OECD & European Union. (2018). *Health at a Glance: Europe 2018*. OECD. https://doi.org/10.1787/health_glance_eur-2018-en
- Olaku, O. O., & Taylor, E. A. (2019). Cancer in the medically underserved population. *Physician Assistant Clinics*, 4(1), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.cpha.2018.08.011>
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4499–4506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Owolabi, B. O., Ojo, O. O., Srinivasan, D. K., Conlon, J. M., Flatt, P. R., & Abdel-Wahab, Y. H. A. (2016). In vitro and in vivo insulinotropic properties of the multifunctional frog skin peptide Hymenochirin-1B: A structure-activity study. *Amino Acids*, 48(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2107-x>
- Pan, Z., Zhang, X., Yu, P., Chen, X., Lu, P., Li, M., Liu, X., Li, Z., Wei, F., Wang, K., Zheng, Q., & Li, D. (2019). Cinobufagin induces cell cycle arrest at the G2/M phase and promotes apoptosis in malignant melanoma cells. *Frontiers in Oncology*, 9, 853. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00853>
- Papageorgiou, C., Apalla, Z., Manoli, S.-M., Lallas, K., Vakirlis, E., & Lallas, A. (2021). Melanoma: Staging and follow-up. *Dermatology Practical & Conceptual*, 11(Suppl 1), e2021162S. <https://doi.org/10.5826/dpc.11S1a162S>
- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282(5), C947–C970. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Park, M. H., Jo, M., Won, D., Song, H. S., Song, M. J., & Hong, J. T. (2012). Snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* sensitizes cancer cells to TRAIL through ROS- and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins. *Apoptosis*, 17(12), 1316–1326. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0759-5>
- Patel, M., Eckburg, A., Gantiwala, S., Hart, Z., Dein, J., Lam, K., & Puri, N. (2021). Resistance to molecularly targeted therapies in melanoma. *Cancers*, 13(5), 1115. <https://doi.org/10.3390/cancers13051115>
- Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. In *Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability* (Vol. 96, pp. 131–157). Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/3-7643-7378-4_6
- Pavey, S., Spoerri, L., Haass, N. K., & Gabrielli, B. (2013). DNA repair and cell cycle checkpoint defects as drivers and therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 26(6), 805–816. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12136>
- Pawlikowska, M., Jędrzejewski, T., Słominski, A. T., Brożyna, A. A., & Wrotek, S. (2021).

- Pigmentation levels affect melanoma responses to *Coriolus versicolor* extract and play a crucial role in melanoma-mono-nuclear cell crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5735. <https://doi.org/10.3390/ijms22115735>
- Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2738–2758. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: Effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and Photobiology*, 65(2), 270–283. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08560.x>
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>
- Rangel, M., Castro, F. F. D. S., Mota-Lima, L. D., Clissa, P. B., Martins, D. B., Cabrera, M. P. D. S., & Mortari, M. R. (2017). Polydim-I antimicrobial activity against MDR bacteria and its model membrane interaction. *PLOS ONE*, 12(6), e0178785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785>
- Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. (2014). Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28(6), 1005–1011. <https://iv.iijournals.org/content/28/6/1005.long>
- Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W., & Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells*, 29(6), 539–549. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0082-3>
- Richards, O. W. (1978). *The social wasps of the Americas excluding the Vespinae*. British Museum (Natural History).
- Rigel, D. S. (2010). Epidemiology of melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and*

- Surgery*, 29(4), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2010.10.005>
- Roh, M. R., Zheng, Z., Kim, H. S., Jeung, H.-C., Rha, S. Y., & Chung, K. Y. (2013). Difference of interferon- α and interferon- β on melanoma growth and lymph node metastasis in mice. *Melanoma Research*, 23(2), 114–124. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32835e7713>
- Rünger, T. M. (2008). C→T transition mutations are not solely UVB-signature mutations, because they are also generated by UVA. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(9), 2138–2140. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.165>
- Sánchez, I., & Dynlacht, B. D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(3), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.02.007>
- Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S. W., Gassner, B., & Schuricht, B. (1999). K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 9, 126–132. <https://doi.org/10.1159/000016309>
- Seebode, C., Lehmann, J., & Emmert, S. (2016). Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer Research*, 36(3), 1371–1378. <https://ar.iijournals.org/content/36/3/1371.long>
- Semenza, G. L. (2010a). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29(5), 625–634. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.441>
- Semenza, G. L. (2010b). HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., Rickaby, W., D'Arrigo, C., Robson, A., & Bastian, B. C. (2015). The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *The New England Journal of Medicine*, 373(20), 1926–1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
- Shannan, B., Perego, M., Somasundaram, R., & Herlyn, M. (2016). Heterogeneity in melanoma. In H. Kaufman & J. Mehnert (Eds.), *Melanoma* (Vol. 167, pp. 1–15). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_1
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars*

- in Cancer Biology*, 21(6), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2011.10.001>
- Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., & Swartz, M. A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 328(5979), 749–752. <https://doi.org/10.1126/science.1185837>
- Shin, D. W. (2020). Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: Implications for phototherapy. *Animal Cells and Systems*, 24(4), 181–188. <https://doi.org/10.1080/19768354.2020.1808528>
- Soares, S., Lopes, K. S., Mortari, M., Oliveira, H., & Bastos, V. (2022). Antitumoral potential of Chartergellus-CP1 peptide from Chartergellus communis wasp venom in two different breast cancer cell lines (HR+ and triple-negative). *Toxicon*, 216, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.07.004>
- Somavilla, A., Oliveira, M. L., & Rafael, J. A. (2017). Social wasps (Vespidae: Polistinae) from two national parks of the caatinga biome, in Brazil. *Sociobiology*, 64(3), 334–338. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v64i3.1593>
- Souza, B. M., Mendes, M. A., Santos, L. D., Marques, M. R., César, L. M. M., Almeida, R. N. A., Pagnocca, F. C., Konno, K., & Palma, M. S. (2005). Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, 26(11), 2157–2164. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.026>
- Spanogle, J. P., Clarke, C. A., Aroner, S., & Swetter, S. M. (2010). Risk of second primary malignancies following cutaneous melanoma diagnosis: A population-based study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(5), 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.07.039>
- Strickland, L. R., Pal, H. C., Elmets, C. A., & Afaq, F. (2015). Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. *Cancer Letters*, 359(1), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.016>
- Sugiyama, T., & Chen, Y. (2019). Biochemical reconstitution of UV-induced mutational processes. *Nucleic Acids Research*, 47(13), 6769–6782. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz335>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swavey, S., & Tran, M. (2013). Porphyrin and phthalocyanine photosensitizers as PDT agents: A new modality for the treatment of melanoma. In L. Davids (Ed.), *Recent*

- advances in the biology, therapy and management of melanoma*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/54940>
- Tang, J.-Q., Hou, X.-Y., Yang, C.-S., Li, Y.-X., Xin, Y., Guo, W.-W., Wei, Z.-P., Liu, Y.-Q., & Jiang, G. (2017). Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment. *International Journal of Cancer*, *141*(4), 646–653. <https://doi.org/10.1002/ijc.30708>
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, *25*(12), 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
- Torres, M. D. T., Silva, A. F., Andrade, G. P., Pedron, C. N., Cerchiaro, G., Ribeiro, A. O., Oliveira, V. X., & de la Fuente-Nunez, C. (2020). The wasp venom antimicrobial peptide Polybia-CP and its synthetic derivatives display antiplasmodial and anticancer properties. *Bioengineering and Translational Medicine*, *5*(3), e10167. <https://doi.org/10.1002/btm2.10167>
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(7), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L., & Thody, A. J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics*, *11*(3), 328–330. <https://doi.org/10.1038/ng1195-328>
- Wang, K., Yan, J., Chen, R., Dang, W., Zhang, B., Zhang, W., Song, J., & Wang, R. (2012). Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(6), 3318–3323. <https://doi.org/10.1128/AAC.05995-11>
- Wang, K., Yan, J., Liu, X., Zhang, J., Chen, R., Zhang, B., Dang, W., Zhang, W., Kai, M., Song, J., & Wang, R. (2011). Novel cytotoxicity exhibition mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Toxicology*, *288*(1–3), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.06.014>
- Wang, K., Zhang, B., Zhang, W., Yan, J., Li, J., & Wang, R. (2008). Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides*, *29*(6), 963–968. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.015>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, *123*(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, *5*, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>

- Wong, V. K., Lubner, M. G., Menias, C. O., Mellnick, V. M., Kennedy, T. A., Bhalla, S., & Pickhardt, P. J. (2017). Clinical and imaging features of noncutaneous melanoma. *American Journal of Roentgenology*, *208*(5), 942–959. <https://doi.org/10.2214/AJR.16.16800>
- Wu, R., Li, D., Tang, Q., Wang, W., Xie, G., & Dou, P. (2018). A novel peptide from *Vespa ducalis* induces apoptosis in osteosarcoma cells by activating the p38 MAPK and JNK signaling pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *41*(4), 458–464. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00449>
- Wu, Y., Lu, D., Jiang, Y., Jin, J., Liu, S., Chen, L., Zhang, H., Zhou, Y., Chen, H., Nagle, D. G., Luan, X., & Zhang, W. (2021). Stapled wasp venom-derived oncolytic peptides with side chains induce rapid membrane lysis and prolonged immune responses in melanoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, *64*(9), 5802–5815. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02237>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF- β and immune cells: An important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, *31*(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>
- Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic instability and cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, *5*, 1000165. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>
- Zhakeer, Z., Hadeer, M., Tuerxun, Z., & Tuerxun, K. (2017). Bufalin inhibits the inflammatory effects in asthmatic mice through the suppression of nuclear factor-kappa B activity. *Pharmacology*, *99*(3–4), 179–187. <https://doi.org/10.1159/000450754>