

BIANCA MENEZES TORRES ALVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM
PEPTÍDEO IDENTIFICADO NA ANÊMONA MARINHA *Bunodosoma caissarum***

São Vicente

2026

BIANCA MENEZES TORRES ALVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM
PEPTÍDEO IDENTIFICADO NA ANÊMONA MARINHA *Bunodosoma caissarum***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Biodiversidade

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

São Vicente

2026

A474c

Alves, Bianca Menezes Torres

Caracterização estrutural e atividade biológica de um peptídeo
identificado na anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* / Bianca
Menezes Torres Alves. -- , 2026

27 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, São Vicente,

Orientador: Leandro Mantovani de Castro

1. Peptídeos. 2. Toxinas biológicas. 3. Anêmonas-do-mar. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BIANCA MENEZES TORRES ALVES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 03 de março de 2026, às 9h, no(a) Salão Nobre do IB/CLP, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de BIANCA MENEZES TORRES ALVES, intitulada "Caracterização estrutural e atividade biológica de um peptídeo identificado na anêmona marinha *Bunodosoma caissarum*". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / UNESP / Instituto de Biociências - IB/CLP, Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / UNESP / Instituto de Biociências - IB/CLP, Prof. Dr. MARCELO YUDI ICIMOTO (Participação Presencial) do(a) UNIFESP, Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

Dedico este trabalho à minha avó e à minha mãe, mulheres que representam para mim a verdadeira essência da força, da garra e da perseverança. Seus exemplos de coragem, dignidade e amor incondicional moldaram quem eu sou e sustentaram minha caminhada até aqui.

Ao meu marido e à minha filha, meu alicerce e minha maior motivação. Ao meu esposo, pelo companheirismo, apoio e por estar ao meu lado em cada desafio. À minha filha, por ser a razão do meu esforço diário, minha inspiração constante e a luz que dá sentido a todas as conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me sustentar nos momentos de incerteza, por renovar minhas forças diante dos desafios e por iluminar meus caminhos ao longo de toda esta trajetória.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), minha sincera gratidão pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional, pela excelência na formação e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento desta pesquisa. Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro, agradeço pela orientação segura, pela confiança, paciência e pelos ensinamentos que ultrapassam o campo científico. Sua dedicação e rigor acadêmico foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que compartilharam conhecimento, apoio e momentos de descontração, tornando a caminhada mais leve. Em especial, agradeço ao Felipe Ricardo de Melo e à Marília Barreto Prado Luiz, pela parceria constante, pelas discussões científicas enriquecedoras, pela ajuda durante os ensaios e pela amizade construída ao longo dessa jornada.

À aluna de doutorado, Louise Oliveira Fiametti, e ao Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho, ambos da Escola de Ciências da UNESP de Araraquara, pela síntese do peptídeo de trabalho. Também agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Yudi Icimoto, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela colaboração com o ensaio de Dicroísmo Circular e por aceitar o convite como integrante titular da banca de avaliação. Toda colaboração e auxílio foram essenciais para o desenvolvimento e qualidade deste estudo.

À minha família, base de tudo. Ao meu marido, Rodson Batista Alves, por ser meu porto seguro, pelo incentivo constante e por compreender, com amor e paciência, as ausências necessárias ao longo desta jornada. À minha filha, Lívia Menezes Alves, minha maior inspiração e razão para seguir sempre em frente, que aguardou pacientemente pela minha presença nas brincadeiras e transformou cada desafio em motivação para continuar.

À minha mãe, Adriana Soares de Menezes; ao meu pai, Marcílio Torres; à minha madrastra, Adriana André Torres; à minha irmã, Ágatha André Torres; à minha avó, Maria Lúcia da Costa; à minha tia, Andrea Aparecida da Costa; ao meu primo, Alberto Soares de Menezes; à minha sogra, Marli de Fátima Batista Alves; ao meu sogro, Claudino Antônio da Silva; e à minha cunhada, Nathaly Arielli Batista Alves, por todo o amor, apoio e incentivo — especialmente nos cuidados com minha filha nos períodos de maior necessidade — e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei.

À Presidência da Fundação Lusíada, meu local de trabalho, pelas dispensas concedidas, que possibilitaram o cumprimento das atividades acadêmicas e o desenvolvimento deste mestrado da melhor forma. Agradeço também aos meus amigos de trabalho, especialmente Bianca Reimann Cañas, Luiza Satie Cardoso Itano e Luiz Carlos Gonçalves Piza Júnior, pelo incentivo desde quando o mestrado ainda era um sonho, por não me deixarem desistir e por acreditarem em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, além de todo o apoio oferecido, principalmente durante minhas ausências.

Ao meu professor e colega de trabalho, Luiz Henrique Gagliani, pela confiança, incentivo, apoio e torcida constantes, bem como por aceitar o convite para integrar, como membro suplente, minha banca de avaliação. À minha coordenadora, Amanda do Nascimento e Silva, pelo apoio, compreensão e confiança depositados em mim ao longo de toda esta trajetória.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui meu mais sincero agradecimento.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

As anêmonas marinhas são animais invertebrados exclusivamente aquáticos que apresentam uma notável diversidade bioquímica associada a mecanismos de defesa e predação, tornando-se fontes promissoras para a descoberta de moléculas com potencial terapêutico. Dentre essas, a *Bunodosoma caissarum*, espécie endêmica da costa brasileira, foi recentemente caracterizada por abordagens multiômicas, revelando um repertório complexo de polipeptídeos expressos nos tentáculos e no muco, muitos deles com similaridade estrutural a toxinas conhecidas, enquanto uma parcela significativa não apresenta homologia com sequências previamente descritas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização inicial estrutural e biológica de um peptídeo identificado em abundância no muco, que apresenta características compatíveis com toxinas peptídicas. Para isso, foram empregadas abordagens integradas de predição estrutural *in silico*, análise conformacional e ensaios biológicos. Os resultados indicaram que o peptídeo possui conformação compatível com estruturas secundárias, não apresentando efeitos hemolíticos ou citotóxicos significativos, mas promovendo alterações comportamentais em modelos experimentais aquáticos, como no microcrustáceo *Artemia salina* e no *Danio rerio* (zebrafish). Esses achados sugerem um possível papel neuroativo e reforçam o potencial das toxinas de anêmonas marinhas como candidatas para estudos funcionais e aplicações biotecnológicas futuras.

Palavras chave: Anêmonas marinhas; *Bunodossoma caissarum*; atividade biológica; peptídeos marinhos; toxinas marinhas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos diferentes preparos de amostras do tentáculo e muco de <i>B. caissarum</i> para obtenção das sequências por nanoLC-MSMS. Imagem criada no BioRender.com	9
Figura 2. Sequências peptídicas obtidas por diferentes métodos de preparo de amostra de tentáculo e muco. A: muco fração do proteoma (reduzido, alquilado e tripsinizado); B: muco fração do peptidoma (reduzido, alquilado e tripsinizado); C: muco fração do peptidoma (reduzido e alquilado, porém sem tripsinização).	18
Figura 3. Análise de similaridade da sequência peptídica candidata por BLASTp. (A) Alinhamento com proteína não caracterizada LOC116301422 isoforma X1 de <i>Actinia tenebrosa</i> ; (B) alinhamento com a isoforma X2 da mesma proteína; (C) visualização comparativa das regiões conservadas entre as sequências.	19
Figura 4. Predição da estrutura primária e secundária da sequência TLASSIQCVGKCKIKTSSGQCRTDLRCMLANKGAS, geradas respectivamente pelos softwares PepDraw e PEP-FOLD4.....	20
Figura 5. Modelo da estrutura tridimensional do peptídeo obtida pelo AlphaFold.....	21
Figura 6. Curva de absorbância do peptídeo analisado por Dicroísmo Circular (CD).....	21
Figura 7. Avaliação dos parâmetros comportamentais pelo software ToxTrac sobre as variáveis de velocidade média, distância e taxa de exploração. A: concentração de 200 μ M; B: concentração 100 μ M; C: concentração 50 μ M. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0,001$	22
Figura 8. Avaliação comportamental locomotora de zebrafish após exposição ao peptídeo PEP-1. (A) Grupo controle tratado com solução salina; (B) grupo tratado com 1 μ g/g de PEP-1; (C) grupo tratado com 10 μ g/g de PEP-1. Foram analisados os parâmetros de velocidade média (V_m , mm/s), distância percorrida (mm) e taxa de exploração (%) nos períodos pré-injeção, 24 h e 48 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	23
Figura 9. Avaliação da viabilidade celular em células Neuro2a tratadas com diferentes concentrações do peptídeo PEP-1, determinada pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas com o peptídeo nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada após 24 horas de tratamento com o peptídeo. ** $p < 0,01$	24
Figura 10. Resultados dos Testes de hemólise. A: Gráfico da relação entre concentração de componente e porcentagem de hemólise; B: Aglutinação na concentração 100 μ M.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Método de clivagem de acordo com catálogo Novabiochem (2014)	10
Tabela 2. Protocolo de purificação de cada peptídeo	11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool for Proteins
<i>B. caissarum</i>	<i>Bunodosoma caissarum</i>
CD	Dicroísmo Circular
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CO₂	Dióxido de carbono
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DP	Desvio Padrão
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonil
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
HCl	Ácido clorídrico
HOBt	Hidroxibenzotriazol
IAA	Iodoacetamida
kDa	Quilodalton
KR	Lisina-Arginina (sítio dibásico)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
MS-222	Tricaína metanosulfonato
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
nm	Nanômetro
nr	Non-redundant (banco de dados não redundante)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

PCs	Prohormone Convertases
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
pLDDT	Predicted Local Distance Difference Test
ppm	Partes por milhão
TFA	Ácido Trifluoroacético
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1 GERAL	7
2.2 ESPECÍFICOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE COBERTURA DA SEQUÊNCIA PEPTÍDICA EM DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA PROTEOMA E PEPTIDÔMICA.	8
3.2 SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS	9
3.2.1 <i>Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)</i>	10
3.3 ANÁLISES ESTRUTURAIS.....	11
3.3.1 <i>Busca de similaridade em banco de dados</i>	11
3.3.2 <i>Análises in silico da conformação estrutural do peptídeo</i>	11
3.4 DICROÍSMO CIRCULAR	12
3.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL	12
3.5.1 <i>Preparo e análise com náuplios de Artemia salina</i>	12
3.5.2 <i>Preparo e análise com Zebrafish</i>	12
3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E HEMOLÍTICO EM CÉLULAS	14
3.6.1 <i>Cultura de células</i>	14
3.6.3 <i>TESTE DE HEMÓLISE</i>	15
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS	17
4.1 EFICIÊNCIA DE COBERTURA DA SEQUÊNCIA PEPTÍDICA IDENTIFICADA UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	17
4.2 SIMILARIDADE	18
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO PEPTÍDEO.....	19
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS EM ARTÊMIA SALINA E ZEBRAFISH.....	21
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITÓXICO EM CÉLULAS NEURO2A	24
4.6 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO PEPTÍDEO	25
5. DISCUSSÃO	26

6. CONCLUSÕES.....	31
7. BIBLIOGRAFIA	32
ANEXO A.....	40

1. INTRODUÇÃO

Durante o curso da evolução, a estratégia de produção de veneno prosperou em pelo menos cem vezes de modo independente em oito filos, abrangendo desde invertebrados como anelídeos, artrópodes, cnidários, moluscos, nematoides e equinodermos, até vertebrados como serpentes, lagartos, peixes, musaranhos e ornitorrincos, sendo estimado um número em torno de 220.000 espécies venenosas no planeta, o que representa cerca de 15% da biodiversidade animal atual [1–3]. Esta vantagem funcional foi otimizada evolutivamente para desempenhar três funções principais: predação, defesa e dissuasão de competidores, juntamente com funções secundárias como imunomodulação e comunicação sexual [2].

Dentre as espécies que desenvolveram essa capacidade de produzir veneno, destacam-se as anêmonas marinhas, animais invertebrados pertencentes ao filo Cnidaria e à classe Anthozoa, que habitam estritamente ambientes aquáticos. Possuem morfologia simples e distinta, com corpo cilíndrico de tamanho variável, cuja base é formada por um disco pedal utilizado para fixação em superfícies como rochas ou substratos do fundo do mar. O corpo principal, denominado coluna, pode ser liso ou apresentar verrugas e papilas e, no topo do cilindro, ao redor da abertura oral, encontram-se numerosos tentáculos dispostos em um ou mais círculos. Esses tentáculos são dotados de células urticantes chamadas cnidócitos, que contêm nematocistos, estruturas especializadas utilizadas tanto para defesa quanto para captura de presas [4,5].

Devido a essa morfologia, a locomoção das anêmonas é geralmente limitada e lenta. Elas podem se deslocar por meio de contrações musculares associadas à secreção de muco pelo disco pedal. Em determinadas condições ambientais, algumas espécies podem se desprender do substrato e nadar utilizando movimentos ondulantes dos tentáculos e da coluna, embora esse comportamento seja raro. Outras estratégias incluem a inflação do corpo com água para flutuação e deslocamento pela correnteza, ou a contração rápida do corpo para pequenas mudanças de posição [6,7].

Nesse contexto, o veneno das anêmonas desempenha papel crucial em sua sobrevivência, sendo fundamental para a imobilização de presas e facilitando sua ingestão. Além disso, o veneno atua como importante mecanismo de defesa contra predadores, podendo causar dor, paralisia ou até morte, o que desencoraja ataques. O veneno também está envolvido na competição por espaço e recursos em ambientes marinhos densamente povoados, sendo

utilizado para afastar competidores e garantir áreas favoráveis ao crescimento e à reprodução [5,7].

Entre essas espécies produtoras de venenos, destaca-se a anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* (*B. caissarum*), espécie endêmica da costa brasileira. Apesar de sua relevância ecológica e biológica, apenas nove toxinas dessa espécie haviam sido previamente caracterizadas por métodos considerados mais tradicionais de extração, separação, sequenciamento e avaliação de atividade biológica [8,9].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa utilizou uma abordagem molecular integrada para a caracterização do transcriptoma, proteoma e peptidoma de *B. caissarum*. A partir dessa estratégia multiômica, foi demonstrada a presença de um número elevado de potenciais toxinas, confirmadas tanto pela detecção dos transcritos quanto pela identificação das sequências polipeptídicas, incluindo modificações pós-traducionais [10].

A análise do transcriptoma dos tentáculos de *B. caissarum* resultou na anotação de 23.444 genes, dos quais aproximadamente 1% dos transcritos apresentaram similaridade com genes de toxinas ou proteínas relacionadas à atividade tóxica. A análise proteômica quantitativa confirmou consistentemente a identificação de 430 polipeptídeos, sendo 316 mais abundantes nos tentáculos e 114 no muco, o qual apresentou elevada abundância de toxinas, principalmente aquelas com ação neurotóxica, enzimática e citolítica. Esses achados indicam que o veneno dessa espécie apresenta composição complexa e potencial funcional diversificado, reforçando a necessidade de investigações mecanísticas mais aprofundadas [10].

De maneira geral, os principais componentes de venenos animais são proteínas e peptídeos, frequentemente ricos em pontes dissulfeto, o que lhes confere elevada estabilidade estrutural e resistência à degradação proteolítica. Essas características, associadas à alta especificidade por alvos moleculares, tornam essas moléculas particularmente eficientes na modulação de processos fisiológicos. No caso de *B. caissarum*, a identificação de peptídeos com similaridade a toxinas previamente descritas sugere que mecanismos semelhantes de interação molecular possam estar envolvidos em sua atividade biológica [11].

Entre esses mecanismos, destaca-se a modulação de canais iônicos, que representam um dos principais alvos de toxinas peptídicas. Esses canais são proteínas transmembrana responsáveis pelo controle do fluxo de íons, regulando processos fundamentais como a excitabilidade celular, a transmissão sináptica e a manutenção do potencial de membrana. A presença de peptídeos com características neurotóxicas em *B. caissarum* sugere

que a interação com esses canais possa constituir um dos principais mecanismos de ação de suas toxinas [10,12,13].

Os canais iônicos podem ser classificados em diferentes tipos, sendo os mais relevantes os canais de sódio, potássio, cálcio e cloreto, cada um desempenhando funções específicas na dinâmica celular. Os canais de sódio estão envolvidos na despolarização inicial do potencial de ação, enquanto os canais de potássio atuam na repolarização e na manutenção do potencial de repouso. Já os canais de cálcio participam de processos de sinalização intracelular, incluindo a liberação de neurotransmissores, e os canais de cloreto contribuem para a estabilização do potencial de membrana e o equilíbrio osmótico. A modulação desses canais por toxinas pode resultar em alterações significativas na atividade celular, como mudanças na excitabilidade neuronal e no padrão de resposta fisiológica [14–16].

As toxinas peptídicas frequentemente se ligam a esses canais e modulam funções biológicas importantes, afetando sinapses e junções neuromusculares. Entre os principais alvos desses peptídeos estão os canais dependentes de voltagem e os receptores nicotínicos. Dependendo do mecanismo de interação, essas toxinas podem alterar o potencial elétrico celular ou competir pelos sítios de ligação, atuando como agonistas ou antagonistas [17,18].

Nesse sentido, estudos com toxinas de outras anêmonas marinhas têm demonstrado que peptídeos podem interagir com canais dependentes de voltagem e receptores específicos, atuando como moduladores da atividade elétrica celular. Em *B. caissarum*, a identificação de sequências com similaridade a toxinas que atuam sobre canais de potássio, como aquelas do tipo BDS, bem como peptídeos com domínio do tipo Kunitz e Kazal, reforça a hipótese de que esses canais constituem alvos relevantes para a atividade biológica dessa espécie. Esses achados destacam a importância de investigar experimentalmente os efeitos desses peptídeos sobre a função celular, visando elucidar seus mecanismos de ação [10,17,19–21].

A relevância funcional dessas toxinas torna-se ainda mais evidente quando se considera seu potencial biotecnológico e farmacológico, especialmente no contexto de espécies como *Bunodosoma caissarum*, cujo veneno apresenta uma diversidade significativa de peptídeos ainda pouco explorados. A investigação de compostos peptídicos oriundos de venenos animais tem sido conduzida há décadas e já resultou no desenvolvimento de fármacos aplicados no tratamento de diversas doenças. Nesse sentido, um exemplo relevante é o Dalazatide, um peptídeo sintético composto por 37 aminoácidos, originalmente derivado do veneno de uma anêmona-do-mar do Caribe, que atua como inibidor do canal de potássio Kv1.3

em células T de memória efetora, apresentando atividade imunomoduladora em patologias como artrite, lúpus e psoríase [22,23].

O Prialt (ziconotida) também é um exemplo de fármaco sintetizado a partir da ω -conotoxina isolada do caracol *Conus magus*, utilizado no tratamento da dor crônica por bloqueio de sinais nervosos, sendo um analgésico não narcótico de aplicação intratecal [24,25]. Destaca-se ainda a Byetta (Exenatida), um análogo sintético da exendina-4, hormônio encontrado na saliva do lagarto *Heloderma suspectum*, utilizada no tratamento do diabetes tipo 2 por sua ação agonista do receptor GLP-1 [26,27]. Por fim, o captopril, derivado do veneno da jararaca brasileira (*Bothrops jararaca*), é amplamente empregado no tratamento da hipertensão, cardiopatias crônicas e nefropatia diabética, atuando como inibidor da enzima conversora de angiotensina [28,29].

Apesar dessa diversidade de aplicações, a composição dos venenos de anêmonas marinhas permanece menos explorada quando comparada à de outros animais peçonhentos [8,30]. Entretanto, nas últimas décadas, o avanço de técnicas moleculares em larga escala, como o sequenciamento de nova geração (NGS) para ácidos nucleicos [31], a espectrometria de massas para o sequenciamento de proteínas e peptídeos [32] e o uso de ferramentas bioinformáticas, impulsionou o desenvolvimento das ciências ômicas, ampliando significativamente o conhecimento sobre organismos não modelos, incluindo os cnidários [31,33].

De forma complementar a essas abordagens, avanços recentes em inteligência artificial têm contribuído de maneira significativa para o estudo estrutural de proteínas e peptídeos, destacando-se o *AlphaFold*, um modelo computacional baseado em aprendizado profundo desenvolvido para a predição de estruturas tridimensionais de proteínas a partir de suas sequências primárias. Essa ferramenta tem demonstrado elevada acurácia na previsão de dobramentos proteicos, inclusive para proteínas ricas em pontes dissulfeto, característica comum às toxinas peptídicas. O uso do *AlphaFold* permite inferir informações estruturais relevantes, como conformação espacial, acessibilidade de resíduos e possíveis regiões de interação com alvos moleculares, contribuindo para a compreensão funcional das toxinas e auxiliando na seleção de candidatos para estudos experimentais e aplicações biotecnológicas [34].

Como resultado da integração dessas abordagens ômicas e computacionais, o aumento das pesquisas envolvendo animais marinhos, incluindo *B. caissarum*, tem ampliado as possibilidades de compreensão de seus mecanismos predatórios e de defesa [30]. Ademais, a

elevada complexidade do conjunto de peptídeos identificados nessa espécie sugere um expressivo potencial para aplicações terapêuticas e para o desenvolvimento de novos fármacos.

Nesse cenário, diferentes ensaios podem ser empregados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, para a confirmação da atividade biológica dessas moléculas, abrangendo análises bioquímicas, moleculares, comportamentais e fisiológicas. Entre os ensaios *in vivo*, destacam-se os comportamentais, uma vez que toxinas frequentemente afetam o sistema nervoso, ocasionando alterações de movimento e de resposta a estímulos, o que permite inferir seus possíveis mecanismos de ação. A associação dessas análises com avaliações fisiológicas contribui para uma compreensão mais abrangente das alterações induzidas pelas toxinas em organismos vivos [35–37].

Diversos modelos experimentais podem ser utilizados em estudos *in vivo*, incluindo Artêmia (*Artemia salina*) e o zebrafish (*Danio rerio*). O uso da artêmia (*Artemia salina*) e de outros modelos experimentais invertebrados têm sido amplamente empregados como ferramentas complementares em estudos de triagem toxicológica e avaliação de atividade biológica. A artêmia é um microcrustáceo amplamente utilizado e destaca-se por seu baixo custo, facilidade de cultivo, rápido ciclo de vida e elevada sensibilidade a compostos bioativos, sendo considerada um modelo eficiente para análises preliminares de toxicidade e bioatividade [35,38–40].

Paralelamente, modelos experimentais vertebrados como o zebrafish (*Danio rerio*) apresentam maior complexidade fisiológica e neurológica, possibilitando a avaliação de efeitos sistêmicos, comportamentais e mecânicos em níveis mais próximos à organização dos vertebrados superiores. Dessa forma, a utilização combinada de artêmia e zebrafish configura uma abordagem integrada e racional, na qual ensaios iniciais em invertebrados orientam a seleção de compostos para análises mais aprofundadas em vertebrados, otimizando a avaliação biológica das toxinas [36,38,39].

As análises bioquímicas e moleculares envolvem uma série de ensaios aplicáveis a extratos proteicos de órgãos ou linhagens celulares, permitindo a avaliação de diferentes vias de sinalização, como estresse oxidativo, morte celular e alterações metabólicas. Após a exposição às toxinas, é possível investigar efeitos celulares em múltiplos níveis, desde a expressão gênica e proteica até a atividade enzimática e a quantificação de neurotransmissores e metabólitos [4,8].

Dessa forma, pesquisas voltadas à caracterização estrutural e à avaliação da atividade biológica de toxinas extraídas da anêmona marinha *B. caissarum* apresentam elevada

relevância científica e potencial aplicação biotecnológica. Essas toxinas possuem propriedades bioativas que podem ser exploradas no desenvolvimento de novos fármacos, agentes terapêuticos ou como ferramentas para estudos em neurobiologia e farmacologia molecular. A compreensão de sua estrutura molecular e de suas interações biológicas não apenas amplia o conhecimento sobre a biologia marinha, mas também abre novas perspectivas para a biotecnologia marinha sustentável e para a descoberta de compostos bioativos inovadores.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo a caracterização inicial da estrutura e atividade biológica de um peptídeo identificado em abundância no proteoma e peptidoma dos tentáculos e do muco da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum*, visando explorar seu possível potencial terapêutico, com ênfase em sua possível ação neuronal.

2.2 Específicos

- a) Confirmar a representatividade do peptídeo candidato a partir da integração de dados ômicos previamente obtidos nos tentáculos e muco de *B. caissarum*.
- b) Caracterizar estruturalmente o peptídeo, visando à compreensão de aspectos conformacionais associados à sua atividade biológica.
- c) Avaliar a atividade biológica e o potencial tóxico/neuroativo do peptídeo em modelos biológicos experimentais através de análises comportamentais.
- d) Investigar os efeitos citotóxicos do peptídeo em células neuronais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise da eficiência de cobertura da sequência peptídica em diferentes métodos de preparo de amostra para proteoma e peptidômica.

As sequências de interesse do peptídeo, foram previamente identificadas em trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo [10]. Neste estudo, analisou-se a eficiência de cobertura da sequência do gene e de seu produto proteico por diferentes estratégias de preparo de amostras, com o objetivo de definir a melhor versão da sequência a ser sintetizada. Para isso, foram utilizadas frações proteicas e peptídicas obtidas a partir de tentáculo e muco, por meio de extração térmica, centrifugação e filtração por membranas de ultrafiltração com ponto de corte de 10 kDa. Três protocolos distintos foram comparados: (1) a fração proteoma (retida >10 kDa), submetida à redução com DTT, alquilação com IAA e digestão com tripsina; (2) a fração peptidoma (filtrado <10 kDa), também tratada com redução, alquilação e digestão com tripsina; e (3) a fração peptidoma reduzida e alquilada, mas sem digestão enzimática, preservando os peptídeos endógenos.

As amostras resultantes foram analisadas por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (nanoLC-MS/MS) e os dados obtidos processados no software PEAKS para identificação e avaliação da cobertura das sequências (Figura 1). A partir das imagens espectrais geradas, foi possível comparar a eficiência dos diferentes métodos de preparo na identificação do peptídeo PEP-1 e, assim, selecionar a sequência mais adequada para síntese.

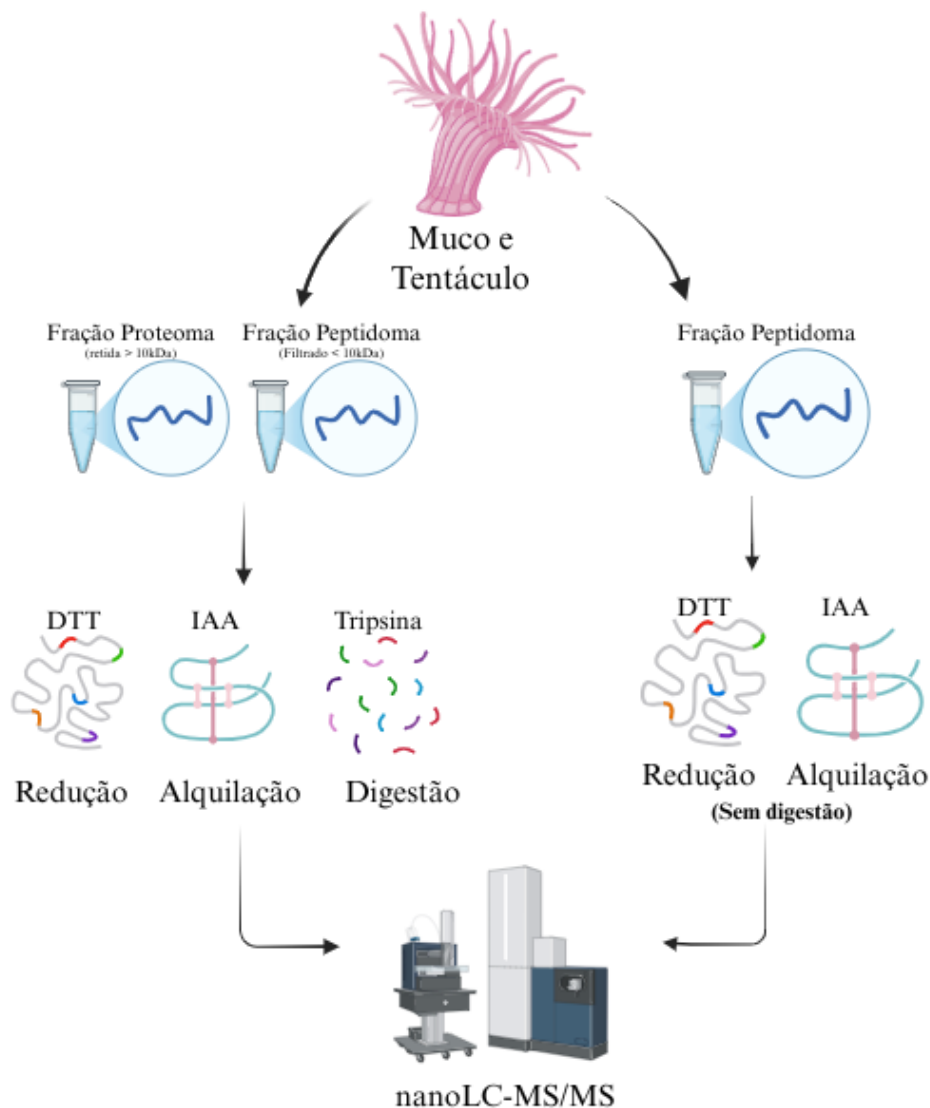


Figura 1. Esquema dos diferentes preparos de amostras do tentáculo e muco de *B. caissarum* para obtenção das sequências por nanoLC-MSMS. Imagem criada no BioRender.com

3.2 Síntese química dos peptídeos

O peptídeo foi sintetizado em fase sólida pelo método Fmoc, com desproteção do grupo amina em solução de 20% 4-metilpiperidina em DMF por 20 minutos e lavagens subsequentes. O acoplamento foi realizado pela ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido com DIC/HOBt sob agitação por 2 h. Após cada etapa, foi efetuado um teste de ninidrina para confirmação da reação esperada (Kaiser et al., 1970). Utilizou-se resina Rink Amida com grau de substituição de 0,61 mmol/g, em escala de 0,2 mmol e excesso de duas vezes para cada aminoácido. A clivagem dos peptídeos foi realizada em solução de TFA

(Merck®), conforme catálogo Novabiochem (2014) (Tabela 1), sob agitação branda por 2 h, na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois, foi feita a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado. Ao final, o peptídeo foi dissolvido com uma solução contendo Solução A (0,045% de TFA em água ultrapura) e Solução B (0,036% de TFA em acetonitrila) e proporção 1:1 e a mistura foi centrifugada para separar a resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

Tabela 1. Método de clivagem de acordo com catálogo Novabiochem (2014)

Código	Sequência	Método de Clivagem
LF2502	TLASSIQCVGKCKIKTSSGQCRTDLR CMLANKGAS	94% TFA 2,5% EDODT 2,5% água deionizada 1% TIS

3.2.1 Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)

O peptídeo foi inicialmente analisado em cromatógrafo Shimadzu, em coluna analítica C18 de fase reversa (0,46 × 25 cm, Kromassil), em gradiente de 5%–95% de Solução B por 30 min, com fluxo de 1 mL/min, permitindo determinar o tempo de retenção e a afinidade do peptídeo pela fase móvel; essas informações foram utilizadas para definir o método de purificação, variando aproximadamente de 20% a menos até 20% a mais da porcentagem de Solução B indicada pelo tempo de retenção, em no mínimo 90 min. As purificações foram realizadas em modo semipreparativo em CLAE Shimadzu, com coluna C18 de fase reversa (2,1 × 25 cm, Phenomenex) e fluxo de 5 mL/min, conforme descrito na Tabela 2. O grau de pureza das frações foi avaliado em cromatógrafo Shimadzu, em coluna analítica C18 de fase reversa (0,46 × 25 cm, Kromassil), seguindo o mesmo protocolo utilizado para análise das frações brutas. Foi considerado como puro as frações com 90% ou mais do material de interesse. As soluções empregadas na purificação e verificação da pureza foram Solução A (0,045% de TFA em água ultrapura) e Solução B (0,036% de TFA em acetonitrila).

Tabela 2. Protocolo de purificação de cada pepetídeo

Código	Tempo de Retenção (min)	% de Solução B	Método de Purificação
LF2502	13,7	~ 41	10 a 45% de Solução B em 150 min

3.3 Análises Estruturais

3.3.1 Busca de similaridade em banco de dados

A sequência peptídica selecionada foi submetida a análises de similaridade utilizando a ferramenta BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool for Proteins*), disponível na plataforma online do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As buscas foram realizadas contra o banco de dados não redundante (nr) de proteínas, utilizando os parâmetros padrão do algoritmo. Foram consideradas significativas as similaridades com valores de identidade superiores a 30% e com $e\text{-value} \leq 1e5$. Esta abordagem teve como objetivo investigar homologia com proteínas conhecidas, permitindo inferir possíveis funções biológicas associadas às sequências analisadas.

3.3.2 Análises *in silico* da conformação estrutural do peptídeo

Primeiramente, para a predição da estrutura primária do peptídeo foi utilizado o software *PepDraw* (Freeman, 2015), considerando como parâmetros o N-terminal na forma NH_2 , o C-terminal na forma CONH_2 e pH 7,0. Já a estrutura secundária foi conduzida por meio do software *PEP-FOLD4* (Rey et al., 2023), adotando-se as seguintes condições: pH do solvente igual a 7, força iônica de 1 mM e sem bloqueio das extremidades.

Adicionalmente, a título de comparação a sequência peptídica também foi submetida ao servidor *AlphaFold* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Esse sistema utiliza redes neurais profundas treinadas com dados estruturais do banco Protein Data Bank (PDB) e é capaz de prever com alta acurácia a conformação 3D de proteínas e peptídeos com base apenas na sequência de aminoácidos. A qualidade do modelo gerado foi avaliada por meio do escore pLDDT, que indica a confiabilidade da predição resíduo a resíduo, e pela matriz de erro posicional esperado (Predicted Aligned Error). Essas métricas foram complementadas com

validação estereoquímica por meio de *Ramachandran plot*, permitindo confirmar a qualidade conformacional da estrutura predita.

3.4 Dicroísmo circular

O experimento foi conduzido em colaboração com o Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O espectro de dicroísmo circular do peptídeo sintético foram obtidos utilizando o espectropolarímetro Jasco J-710. As análises foram realizadas a 25 °C, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. As leituras espectrais foram registradas no intervalo de 190 a 260 nm, com incremento de 1 nm e tempo de integração de dois segundos por ponto. Foram realizadas quatro medições, cujos espectros foram posteriormente promediados com subtração do background correspondente. A estimativa do conteúdo de estruturas secundárias foi realizada por meio da deconvolução dos espectros utilizando o software CDNN [41].

3.5 Análise Comportamental

3.5.1 Preparo e análise com náuplios de *Artemia salina*

Para o ensaio *in vivo* também foram utilizados náuplios de *Artemia*. Os cistos dessa espécie foram cultivados em água artificial com uma salinidade de 15‰ e aeração constante. Após 24 horas, os indivíduos eclodidos foram separados em uma placa de 96 poços contendo 50 µl do meio de cultivo e filmados por 3 minutos. Os mesmos indivíduos foram expostos a diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos (50µM, 100 µM e 200 µM) e filmados novamente para realizar análise de comportamento através de parâmetros como: distância percorrida, área explorada e velocidade de nado, utilizando o software ToxTrac.

3.5.2 Preparo e análise com Zebrafish

3.5.2.1 Manutenção dos Zebrafish

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob o protocolo nº 07/2025 (Anexo A), e conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e da legislação brasileira vigente.

Peixes zebra adultos foram mantidos no Laboratório de Peptídeos e Proteínas Marinhos da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em aquários de vidro com capacidade de 3 e 20 litros, equipados com sistemas de filtração biológica e mecânica. A temperatura da água foi mantida constante a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, e o fotoperíodo controlado (14 horas de luz e 10 horas no escuro). Parâmetros da qualidade da água, incluindo pH (7.0-7.5), níveis de amônia (< 0.01 ppm) e temperatura, foram monitorados diariamente para assegurar um ambiente adequado. Quando necessário foram realizados monitoramento de cloro e salinidade.

3.5.3 Registro da Análise Comportamental

A atividade locomotora dos modelos experimentais e controle foi monitorada individualmente por 5 minutos utilizando um sistema de rastreamento automatizado, o *ToxTrac* [42]. Parâmetros como distância percorrida, velocidade média, taxa de exploração foram registrados antes e após a exposição às soluções. Para gravação dos vídeos, cada animal foi transferido cuidadosamente aos aquários de 3 L com água na temperatura e pH iguais ao do ambiente prévio de teste, no mesmo período do dia para que não houvesse variação cronobiológica. As imagens obtidas foram armazenadas em formato MP4 para posterior análise de comportamento geral dos animais, exploração do ambiente e locomoção através do ToxTrac.

Para avaliação foram removidos ou suavizados artefatos e dados inválidos. Foi realizado o cálculo da distância total percorrida, da velocidade média e taxa de exploração dos animais durante o período de observação. As medidas obtidas foram planilhadas para um comparativo do basal vs. após exposição entre grupo controle e grupo exposto. Conjuntamente, a análise dos trajetos de natação, incluindo frequência e duração de comportamentos como exploração do fundo do aquário ou permanência na superfície foram anotados. A quantificação do tempo total em que os zebrafish permanecerem imóveis também foi calculada a fim de indicar possível sedação ou letargia.

Todos os dados obtidos passaram para a Análise Estatística. A aparência física, como coloração, forma corporal e presença de lesões, foram observadas e registradas diariamente em todos os grupos durante o período de Análise.

3.5.4 Injeções, monitoramento e eutanásia

Os zebrafish foram divididos aleatoriamente em grupos controle e experimentais (1 $\mu\text{g/g}$ e 10 $\mu\text{g/g}$), cada grupo foi composto por 12 peixes. Os grupos foram colocados em

aquários separados e, primeiramente, monitorados para delinear sua atividade natural e a distância média percorrida por cada grupo, como citado acima. Em seguida, os grupos experimentais foram injetados com suas respectivas soluções de teste nas doses determinadas.

O grupo controle foi exposto apenas ao veículo (Solução Fisiológica). Para a injeção das soluções os peixes foram anestesiados por imersão em 90-100 mg/L de Tricaína (MS-222). Aos sinais de anestesia, como perda do nado e ausência de resposta a estímulo tátil, os peixes foram retirados dos aquários e colocados em cima de uma esponja embebida com água e pesados para cálculo e aplicação da injeção intraperitoneal com agulha 30–33G, administrando-se 3,16 µL do peptídeo diluído em solução fisiológica na região ventral, posterior às nadadeiras peitorais. Após a injeção, os peixes foram imediatamente transferidos para aquários com água limpa e oxigenada para recuperação e monitoramento por 1–2 horas (avaliação aguda) e até 48 horas (efeitos subletais). A cada 24 horas após injeção, foi feito o registro de comportamento através de filmagens de 5 min de cada peixe de cada grupo.

Os peixes que não apresentaram mortalidade nesse período, foram submetidos à eutanásia – após último registro de imagens com 48 horas – por imersão em solução de tricaína a 0,003% (300mg/L) com pH ajustado, por no mínimo 10 minutos após parada opercular. Confirmação por ausência de reflexo.

3.6 Avaliação do efeito citotóxico e hemolítico em células

3.6.1 Cultura de células

Células Neuro2A foram mantidas em estufa a 37°C (atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂) em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco®, Grand Island, NY, USA) acrescido de 100.000 unidades/L de penicilina, 0,1 g/L de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA).

3.6.2 Ensaio de Viabilidade Celular do MTT

Ao atingirem 60 a 80% de confluência (24 horas), as células foram lavadas com PBS e incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos diluídos em meio DMEM, sem soro com antibióticos (100.000 u/L de penicilina e 0,1 g/L de estreptomicina) de 6 a 24 horas. Após este período, foi acrescido uma solução estoque de MTT 5 mg/ml equivalente a 10% do volume do meio e incubadas em estufa a 37 °C por 1 hora. O meio foi removido e substituído por solução de álcool isopropílico/HCl no mesmo volume, para dissolução dos cristais. As

placas foram agitadas vigorosamente em shaker por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado em placas transparentes de 96 poços. A leitura da absorbância a 570 nm foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M2e (Molecular Devices, EUA). O teste MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível.

3.6.3 Teste de Hemólise

As amostras de sangue periférico de humanos foram coletadas, utilizando um dispositivo de coleta à vácuo com adaptador e agulha 22G e tubos de Citrato de Sódio 3,2%. Em seguida, centrifugadas a $1700\times g$ por 5 minutos [43]. Pós centrifugação, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 2 mL de PBS com pH 7. A lavagem foi repetida três vezes até que o sobrenadante ficar limpo. Após a última aspiração, o pellet resultante foi diluído na proporção de 1:100 em PBS com pH 7 para obter uma suspensão de eritrócitos a 1%.

As células foram expostas a diferentes concentrações do peptídeo (50 , 25, 12,5, 6,25 μM), em triplicata, e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Após a incubação, as placas ou tubos foram centrifugados a $1700\times g$ por 5 minutos e, posteriormente, 50 μL dos sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços transparentes de fundo plano. Por fim, a absorbância foi medida a 405 nm em um espectrofotômetro. Para controle positivo foi utilizado solução Triton X-100 a 10% e como controle negativo PBS pH~7. Os valores obtidos das amostras tratadas com o composto de ensaio (OD teste) foram normalizados em relação aos controles positivo (100% lise; OD positivo) e negativo (não tratado; OD negativo), a fim de calcular a razão de hemólise. Os resultados das razões passaram por Análise Estatística.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos nos ensaios comportamentais em zebrafish e artêmia, citotoxicidade em linhagem de célula neuronal e teste de hemólise em hemácias foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism (versão 8, GraphPad

Software, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), sendo adotado $p < 0,05$ como nível de significância.

Para o zebrafish, os parâmetros locomotores (velocidade média, aceleração média, distância percorrida e taxa de exploração) foram analisados considerando o desenho longitudinal do experimento, no qual cada animal foi avaliado nos tempos pré-injeção, 24 h e 48 h pós-injeção. Devido à variabilidade basal interindividual, cada animal foi considerado como seu próprio controle.

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com medidas repetidas, considerando o tempo como fator intra-sujeito, com correção de Geisser–Greenhouse quando necessário, seguida do teste de Dunnett para comparação em relação ao valor basal.

Para a artêmia, os mesmos parâmetros comportamentais foram avaliados antes e após a adição do peptídeo ao meio de cultivo, no mesmo dia experimental, sendo o grupo salina utilizado como controle. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com medidas repetidas, considerando o tempo como fator intra-sujeito, seguida do teste de Dunnett para comparação com o respectivo valor basal.

No ensaio de viabilidade celular e ensaio de hemólise, os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, comparando os grupos tratados com o grupo controle. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (definido como 100%).

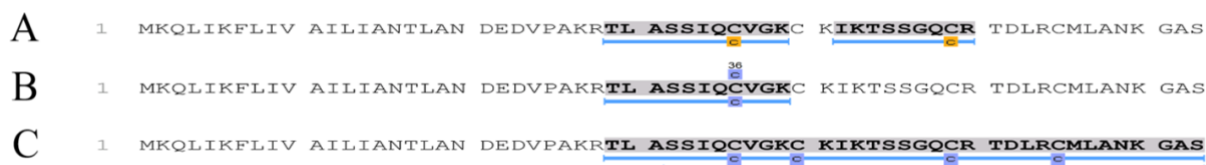
4. RESULTADOS

4.1 Eficiência de cobertura da sequência peptídica identificada utilizando diferentes métodos de preparo de amostras

A sequência gênica obtida a partir da análise do transcriptoma, composta por 63 aminoácidos, foi avaliada quanto à extensão da cobertura por espectrometria de massas em diferentes condições experimentais. Inicialmente, observou-se a ausência de fragmentos correspondentes à porção N-terminal da sequência, compreendendo aproximadamente os primeiros 26 a 28 aminoácidos, tanto nas amostras de tentáculo quanto nas de muco. Além disso, o número de fragmentos peptídicos identificados nas amostras de tentáculo foi inferior ao observado no muco (Figura 2, peptídeos destacados com uma linha azul), indicando que, após o estímulo, o muco apresentou maior enriquecimento de fragmentos peptídicos derivados desse transcrito.

A análise das sequências peptídicas identificadas por espectrometria de massas nas frações do proteoma e peptidoma de tentáculos e muco, previamente reduzidas com DTT, alquiladas com IAA e digeridas com tripsina, revelou cobertura incompleta, com predominância de fragmentos curtos (Figura 2, A e B). Em contraste, nas frações de proteoma e peptidoma que foram apenas reduzidas e alquiladas, sem digestão por tripsina, foi possível observar cobertura completa da região C-terminal, com identificação de fragmentos maiores, que correspondem às sequências naturalmente geradas *in vivo* (Figura 2, C).

Tentáculos



Muco



Figura 2. Sequências peptídicas obtidas por diferentes métodos de preparo de amostra de tentáculo e muco. A: muco fração do proteoma (reduzido, alquilado e tripsinizado); B: muco fração do peptidoma (reduzido, alquilado e tripsinizado); C: muco fração do peptidoma (reduzido e alquilado, porém sem tripsinização).

Assim, o método utilizando apenas redução e alquilação, sem clivagem enzimática, foi o mais eficaz para a detecção da sequência completa do peptídeo alvo. Para as análises seguintes, foi escolhido o maior fragmento detectado com 35 aminoácidos de tamanho (sequência: TLASSIQCVGKCKIKTSSGQCR TDLRCMLANK GAS).

4.2 Similaridade

A análise de similaridade realizada por meio da ferramenta BLASTp demonstrou alinhamento da sequência peptídica candidata com proteínas não caracterizadas do cnidário *Actinia tenebrosa*. Os melhores alinhamentos foram observados com as isoformas X1 e X2 da proteína LOC116301422, apresentando aproximadamente 55% de identidade, 69% de resíduos positivos e baixo número de gaps, conforme demonstrado na Figura 3A e Figura 3B.

Observou-se ainda a conservação de resíduos de cisteína ao longo das regiões alinhadas, evidenciada na Figura 3C, sugerindo manutenção de elementos estruturais potencialmente associados à estabilização conformacional. Apesar da similaridade moderada,

as proteínas correspondentes encontram-se anotadas como “não caracterizadas” em banco de dados, não sendo possível inferir função biológica direta a partir desses alinhamentos.



Figura 3. Análise de similaridade da sequência peptídica candidata por BLASTp. (A) Alinhamento com proteína não caracterizada LOC116301422 isoforma X1 de *Actinia tenebrosa*; (B) alinhamento com a isoforma X2 da mesma proteína; (C) visualização comparativa das regiões conservadas entre as sequências.

4.3 Caracterização estrutural do peptídeo

A análise *in silico* no software PEP-FOLD4 sugere que o peptídeo apresenta estruturação majoritariamente randômica, com pequenas porções em hélice em ambas as extremidades (Figura 4).

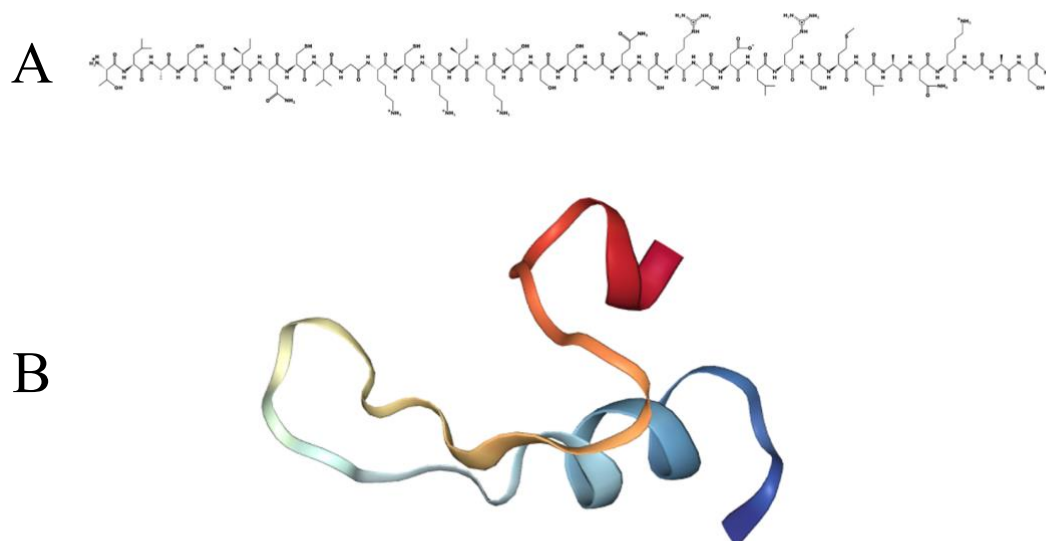


Figura 4. Predição da estrutura primária e secundária da sequência TLASSIQCVGKCKIKTSSGQCRTDLRCMLANKGAS, geradas respectivamente pelos softwares *PepDraw* e PEP-FOLD4.

Já predição da estrutura tridimensional do peptídeo realizada utilizando o servidor *AlphaFold*, apresentou uma conformação com a presença de α -hélices e folhas β (Figura 5), que são elementos estruturais típicos de peptídeos bioativos. A estrutura predita apresenta uma α -hélice na região C-terminal, bem como duas folhas β antiparalelas posicionadas no centro da cadeia polipeptídica. A extremidade N-terminal da molécula apresenta uma região mais flexível, caracterizada por conformação desorganizada, com potencial mobilidade funcional. A presença de resíduos de cisteína em posições estratégicas também sugere a possível formação de pontes dissulfeto na conformação nativa.

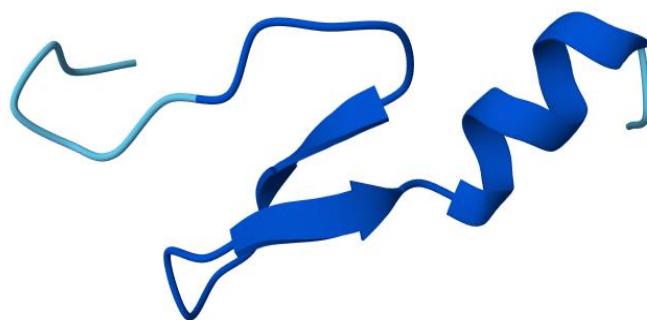


Figura 5. Modelo da estrutura tridimensional do peptídeo obtida pelo *AlphaFold*.

Para validar experimentalmente a estrutura secundária do peptídeo, foi realizada análise por Dicroísmo Circular (CD) no intervalo de 190 a 260 nm (Figura 6). O espectro obtido apresentou um mínimo acentuado em aproximadamente 204 nm, característico de estruturas β . Adicionalmente, foi observado um pico positivo próximo de 194 nm, o qual é compatível com a presença de α -hélices. Um segundo pico positivo, embora mais discreto, foi detectado por volta de 220 nm, reforçando a sugestão de conteúdo helicoidal parcial.

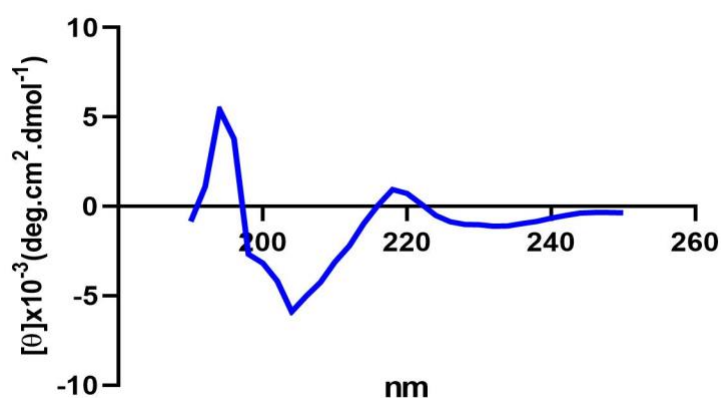


Figura 6. Curva de absorvância do peptídeo analisado por Dicroísmo Circular (CD).

4.4 Testes comportamentais em *Artêmia salina* e *zebrafish*

Os ensaios comportamentais em *Artêmia salina* foram realizados em triplicata, utilizando placas de 96 poços contendo meio salino artificial suplementado com o peptídeo nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos biológicos dependentes da dose.

Após a análise das imagens e aplicação de fórmula estatística, foi possível observar que as concentrações de 100 μM e 200 μM resultaram em alterações estatisticamente significativas na velocidade média e distância percorrida dos náuplios, quando comparado ao grupo controle (Figura 7, A e B). Já a concentração de 50 μM , não houve alteração estatística significativa (Figura 7, C).

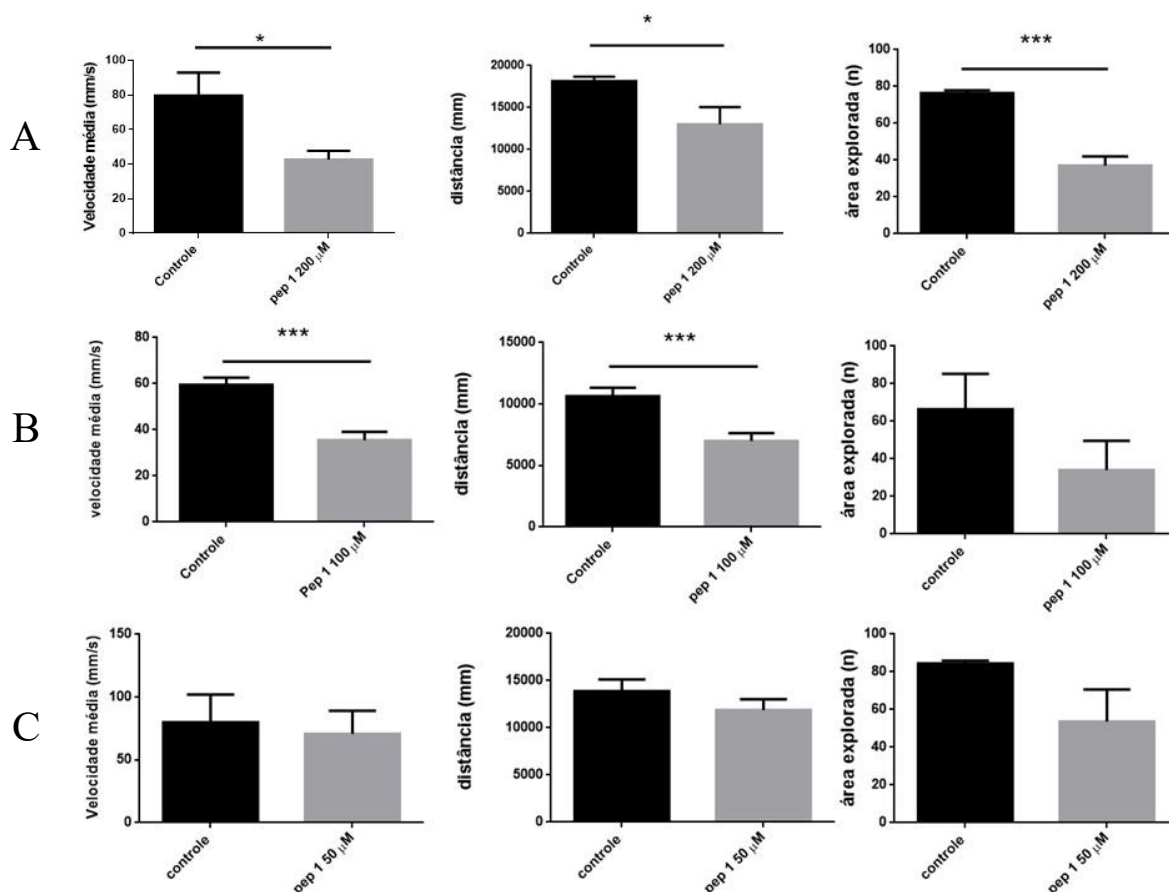


Figura 7. Avaliação dos parâmetros comportamentais pelo software *ToxTrac* sobre as variáveis de velocidade média, distância e taxa de exploração. A: concentração de 200 μM ; B: concentração 100 μM ; C: concentração 50 μM . *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

Nos ensaios com zebrafish a avaliação comportamental demonstrou que o grupo controle tratado com solução salina não apresentou alterações estatisticamente significativas nos parâmetros de velocidade média (V_m), distância percorrida e taxa de exploração ao longo dos períodos avaliados (pré-injeção, 24 h e 48 h), conforme observado na Figura 8A. Os dados indicam estabilidade locomotora basal, sugerindo ausência de interferência do procedimento de injeção ou do veículo experimental.

No grupo tratado com 1 $\mu\text{g/g}$ de PEP-1, observou-se aumento significativo da velocidade média e da distância percorrida no período de 24 h quando comparado ao momento

pré-injeção ($p < 0,05$), seguido de redução desses parâmetros em 48 h, conforme demonstrado na Figura 8B. A taxa de exploração, entretanto, não apresentou diferença estatística relevante entre os tempos analisados, indicando que a modulação comportamental esteve predominantemente associada à atividade locomotora e não ao padrão exploratório global.

Já no grupo exposto à dose de 10 $\mu\text{g/g}$ de PEP-1, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados para velocidade média, distância percorrida ou taxa de exploração, conforme ilustrado na Figura 8C. Esses achados sugerem ausência de efeito locomotor expressivo nessa concentração nas janelas temporais analisadas.

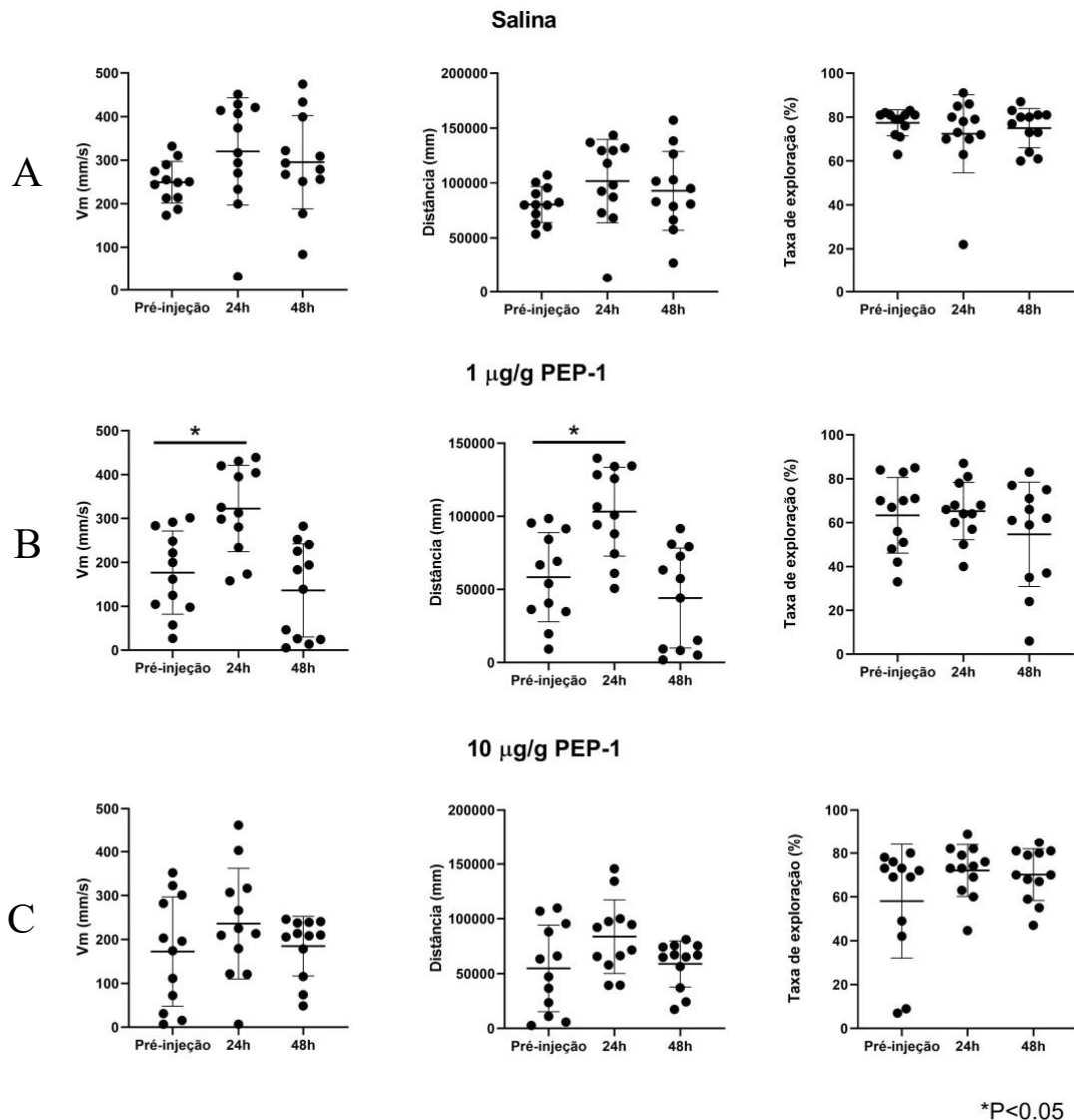


Figura 8. Avaliação comportamental locomotora de zebrafish após exposição ao peptídeo PEP-1. (A) Grupo controle tratado com solução salina; (B) grupo tratado com 1 $\mu\text{g/g}$ de PEP-1; (C) grupo tratado com 10 $\mu\text{g/g}$ de PEP-1. Foram analisados os parâmetros de velocidade

média (Vm, mm/s), distância percorrida (mm) e taxa de exploração (%) nos períodos pré-injeção, 24 h e 48 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

De maneira geral, os resultados indicam que a resposta comportamental apresentou perfil dose-dependente, com efeito transitório observado apenas na menor concentração testada.

4.5 Avaliação do efeito citotóxico em células Neuro2A

Após tratamento com o peptídeo PEP-1 em diferentes concentrações demonstraram variações dependentes da dose na viabilidade celular, com valores médios variando de 114,6% a 68,80% em relação ao controle (100%). Observou-se que determinadas concentrações promoveram redução significativa da viabilidade celular ($p = 0,01$), atingindo valores médios em torno de 72,41% e 68,80%, o que corresponde a aproximadamente 30% de morte celular quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

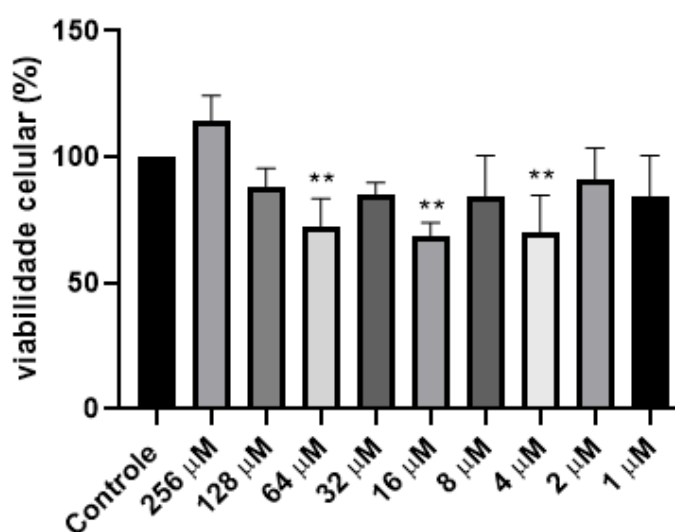


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular em células Neuro2a tratadas com diferentes concentrações do peptídeo PEP-1, determinada pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas com o peptídeo nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada após 24 horas de tratamento com o peptídeo. ** $p < 0,01$.

4.6 Atividade hemolítica do peptídeo

A Figura 10 A demonstra que o peptídeo não causou hemólise significativa, apresentando uma taxa inferior a 2% em todas as concentrações testadas. Entretanto, na concentração de 100 μM foi observado aglutinação (Figura 10 B).

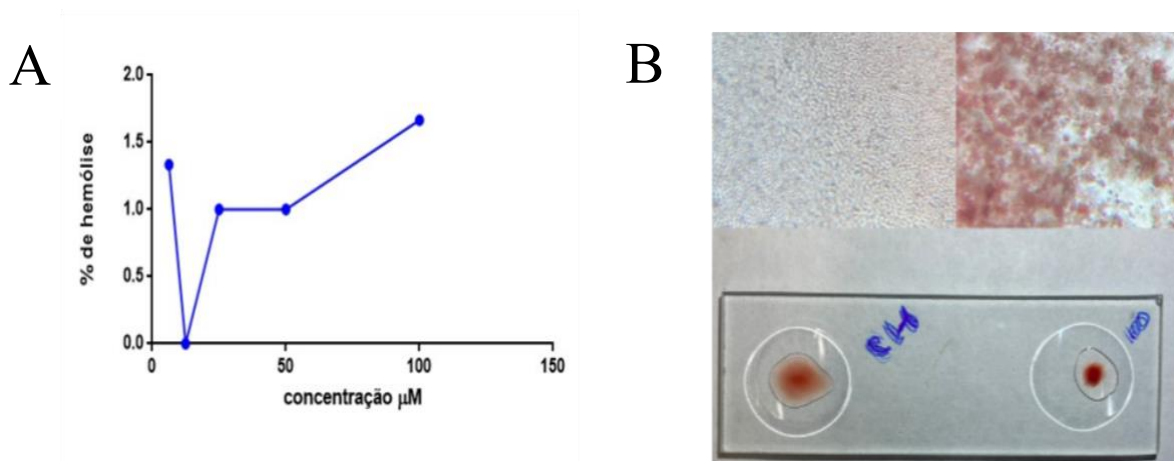


Figura 10. Resultados dos Testes de hemólise. A: Gráfico da relação entre concentração de componente e porcentagem de hemólise; B: Aglutinação na concentração 100 μM .

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem interpretações preliminares acerca do possível processamento, organização estrutural e atividade biológica de um peptídeo identificado em abundância no muco de *B. cassairum*. A identificação de motivos compatíveis com clivagem proteolítica, aliada à conservação de resíduos estruturais e à similaridade parcial com proteínas de cnidários ainda não caracterizadas, sugere que o peptídeo possa integrar uma classe de moléculas secretórias potencialmente bioativas.

Os dados obtidos na análise da eficiência de cobertura demonstraram que a ausência de fragmentos correspondentes à primeira metade da sequência, em ambas as amostras, pode indicar a ocorrência de processamento proteolítico rápido nessa região. A presença de um sítio dibásico (KR) logo após esse trecho inicial reforça essa hipótese, uma vez que essa é uma marca característica de clivagem por endoproteases da via secretória. Nesse contexto, sabe-se que peptídeos e proteínas destinados à secreção geralmente possuem um peptídeo sinal na porção N-terminal, que direciona a molécula para o retículo endoplasmático [44]. Após a remoção deste sinal, o pró-peptídeo é transportado para o complexo de Golgi, onde sofre cortes específicos mediados por uma classe de serino proteases conhecidas como prohormone convertases (PCs), incluindo isoformas como PC3 e furina. Essas enzimas reconhecem sequências dibásicas, como KR ou RR, promovendo a clivagem do pró-domínio e originando a forma madura e biologicamente ativa do peptídeo [44–46].

Esse padrão de processamento já foi documentado em toxinas de cnidários, nas quais o pró-domínio atua na estabilização e no armazenamento da molécula até a sua liberação, sendo rapidamente removido durante a secreção para ativar a função biológica. Em hydra, por exemplo, já foi identificada uma proteína homóloga da pró-hormônio convertase 3 (PC3), com alta similaridade à PC3 de mamíferos e à furina humana, reforçando a conservação evolutiva desse mecanismo [47]. Estudos mostram que a presença do sítio dibásico é essencial não apenas para a clivagem proteolítica, mas também para o correto direcionamento de peptídeos à via secretória regulada, como observado para o neuropeptídeo Y e seus precursores [48]. Assim, a identificação do KR na sequência estudada sugere que o peptídeo possa passar por um processamento pós-traducional específico antes de exercer sua função bioativa, possivelmente envolvendo clivagem controlada e modificações adicionais para aquisição de sua conformação ativa.

A comparação entre os fragmentos obtidos a partir das amostras de tentáculo e muco evidencia um enriquecimento seletivo de peptídeos bioativos no muco após o estímulo, sugerindo que a dinâmica de liberação dos peptídeos pode ser regulada em resposta a fatores fisiológicos ou ambientais [10]. A diferença no número de fragmentos detectados entre as amostras pode refletir uma resposta adaptativa, na qual o muco, atuando como uma matriz de secreção, permite a proteção e a mobilização de peptídeos bioativos que desempenham funções específicas de defesa imunológica ou de sinalização intercelular, como previamente descrito para outras espécies com secreção mucosa especializada [49].

A análise dos métodos de preparo demonstra que a digestão com tripsina, apesar de ser amplamente utilizada, resultou na fragmentação excessiva do peptídeo. Esse processo compromete a detecção de regiões maiores e contínuas, como apontado em estudos que discutem que a especificidade da tripsina pode não ser suficiente para preservar peptídeos intactos em análises complexas, como a espectrometria de massas [50]. No entanto, a abordagem que envolveu apenas redução e alquilação mostrou-se mais eficaz na recuperação de fragmentos maiores, apresentando estruturas que podem corresponder às sequências geradas. Isso reforça a adequação dessa abordagem para a recuperação de peptídeos intactos com potencialidade biológica.

Adicionalmente, a análise de similaridade por BLAST evidenciou alinhamento moderado (~55% de identidade) com proteínas não caracterizadas de cnidários, acompanhado da conservação de resíduos de cisteína em posições equivalentes. Embora não permita inferência funcional direta, esse achado sugere preservação de motivos estruturais possivelmente relacionados à estabilidade conformacional e à manutenção de dobramentos tridimensionais típicos de peptídeos secretórios. Um estudo do arsenal de veneno na anêmona marinha *Stichodactyla haddoni*, por meio de uma abordagem integrada envolvendo transcriptômica e proteômica, também permitiu a identificação de 12 famílias inteiramente novas de peptídeos e proteínas ricos em pontes dissulfeto [51]. A predominância de peptídeos com estes aminoácidos é particularmente relevante, uma vez que essas estruturas conferem resistência à degradação proteolítica e, frequentemente, especificidade por alvos moleculares como canais iônicos.

A anotação dessas proteínas como “não caracterizadas” em bancos de dados reforça o potencial de novidade molecular da sequência estudada, ao mesmo tempo em que indica proximidade evolutiva com famílias peptídicas ainda pouco descritas.

Em relação às análises estruturais, a combinação dos dados experimentais de dicroísmo circular com a modelagem computacional fortalece a hipótese de que o peptídeo possa apresentar estabilidade conformacional capaz de suportar transições estruturais, auxiliando em sua atividade biológica. A estrutura obtida do peptídeo sugere que ele tem a capacidade de interagir com alvos biológicos, como receptores, canais iônicos ou membranas celulares [52–55].

Além disso, essa organização estrutural híbrida, composta por alpha hélices e folhas beta e regiões de loop, confere ao peptídeo uma arquitetura tridimensional compatível com outros peptídeos de venenos marinhos conhecidos, como os do tipo *Kunitz* ou porinas de ação citolítica. A presença de resíduos de cisteína em posições estratégicas também sugere a possível formação de pontes dissulfeto na conformação nativa, o que pode contribuir para a manutenção da integridade estrutural em meio fisiológico [53,55,56].

Peptídeos com características estruturais semelhantes têm apresentado propriedades neuroativas. Essa semelhança pode indicar um possível mecanismo de ação do peptídeo estudado [57,58].

Complementando os resultados obtidos *in silico*, os testes comportamentais sugerem que o peptídeo apresenta um potencial efeito neuroativo e citotóxico, afetando diretamente o sistema locomotor como observado nos dois modelos experimentais testados. Em *Artemia salina*, foi observada uma redução da atividade locomotora, enquanto em zebrafish ocorreu aumento significativo desse parâmetro. Essa resposta divergente sugere que a ação dessas moléculas pode estar relacionada à modulação diferencial da excitabilidade celular, possivelmente mediada por canais iônicos.

A diminuição da atividade locomotora em *Artemia* pode indicar um efeito inibitório sobre a excitabilidade neuronal ou muscular, potencialmente associado à modulação de canais de sódio ou potássio. Esse tipo de efeito já foi descrito para toxinas de anêmonas-do-mar, que podem atuar bloqueando ou alterando a cinética de canais iônicos, resultando em redução da atividade motora [49,54,55,59].

Já os testes comportamentais em zebrafish demonstraram modulação locomotora transitória na menor dose testada, caracterizada por aumento significativo da velocidade média e da distância percorrida em 24 horas, seguido de redução em 48 horas, enquanto a maior dose não apresentou alterações estatisticamente relevantes. Esse padrão sugere um efeito dose-dependente não linear e possível interação com vias neuromodulatórias.

Esse aumento da atividade locomotora observado em zebrafish sugere um efeito excitatório, possivelmente decorrente do prolongamento do potencial de ação ou da inibição de correntes repolarizantes. Esse comportamento é compatível com a ação de toxinas que modulam canais de sódio dependentes de voltagem ou que inibem canais de potássio, levando ao aumento da excitabilidade neuronal [60].

Até o presente momento, o peptídeo foi avaliado na faixa de $\mu\text{g/g}$ por injeção intraperitoneal em animais adultos de *Danio rerio* e na faixa micromolar (100–200 μM) em ensaios com náuplios de *Artemia salina*. Em toxinas peptídicas clássicas de anêmonas marinhas, especialmente aquelas ricas em pontes dissulfeto e altamente estruturadas, como ShK de *Stichodactyla helianthus* e BgK de *Bunodosoma granulifera*, a atividade sobre canais de potássio é tipicamente observada na faixa nanomolar [61–63]. De forma semelhante, APETx2 de *Anthopleura elegantissima* apresenta potência na ordem de dezenas de nanomolar sobre canais ASIC3 [64]. Por outro lado, estudos com peptídeos derivados de cnidários avaliados em zebrafish demonstram efeitos biológicos na faixa micromolar, incluindo alterações comportamentais e neurofisiológicas [60]. Assim, embora as concentrações testadas neste estudo sejam preliminares e estejam na faixa superior comumente utilizada para peptídeos sintéticos, a observação de efeitos comportamentais significativos em 1 $\mu\text{g/g}$ indica que o peptídeo apresenta atividade sistêmica detectável, sugerindo estabilidade *in vivo* e potencial interação com alvos fisiológicos relevantes.

A diferença entre os modelos pode ser explicada por fatores como a complexidade do sistema nervoso, a diversidade de subtipos de canais iônicos expressos e diferenças farmacocinéticas. Enquanto *Artemia* apresenta um sistema nervoso mais simples, zebrafish possui maior complexidade neuronal, o que pode resultar em respostas fisiológicas distintas frente à mesma substância. Assim, é plausível que os peptídeos de *Bunodosoma caissarum* apresentem múltiplos alvos moleculares ou efeitos dependentes do contexto biológico.

Do ponto de vista da segurança biológica, especialmente considerando a aplicação do peptídeo como agente terapêutico ou bioativo, a baixa atividade hemolítica é um achado positivo, uma vez que a hemólise pode ser um marcador de toxicidade inespecífica [49]. No entanto, a aglutinação observada indica que o peptídeo interage com a superfície dos eritrócitos, promovendo rearranjos ou agregação, o que pode refletir atividade de ligação inespecífica a componentes da membrana, alteração do potencial zeta ou mesmo a presença de domínios de reconhecimento na estrutura do peptídeo. Outra hipótese é que esse comportamento esteja

relacionado a interações eletrostáticas ou hidrofóbicas entre o peptídeo e fosfolípidios ou proteínas de membrana [65,66]. Também já foram descritos peptídeos com atividade semelhante à de lectinas, que reconhecem carboidratos específicos da superfície celular e causam hemaglutinação, sendo uma possibilidade a ser investigada.

Em relação ao efeito citotóxico em células Neuro2a tratadas por 24 horas com o peptídeo, embora determinadas concentrações tenham resultado em redução estatisticamente significativa da viabilidade ($p = 0,01$), atingindo aproximadamente 70% do controle, o efeito observado pode ser considerado moderado sob a perspectiva de citotoxicidade clássica. Em ensaios do tipo MTT, reduções inferiores a 50% da viabilidade geralmente indicam um impacto biológico detectável, porém não necessariamente um perfil fortemente citotóxico. Assim, os dados sugerem que PEP-1 exerce um efeito celular mensurável, mas de magnitude limitada nas condições experimentais avaliadas. Esses resultados indicam a necessidade de investigações adicionais, como avaliação de mecanismos específicos de morte celular, para confirmar se o efeito observado reflete citotoxicidade direta, modulação metabólica transitória ou alterações proliferativas.

Em suma, a modelagem estrutural *in silico*, quando combinada com dados experimentais, não apenas valida a hipótese de estabilidade conformacional do peptídeo, mas também aponta caminhos promissores para a exploração de novas estratégias terapêuticas, especialmente em contextos relacionados a distúrbios neuropatológicos [53,67,68].

6. CONCLUSÕES

Com a utilização dos métodos integrados de proteômica, modelagem estrutural, bioensaios in vivo foi possível caracterizar a estrutura e avaliar de forma preliminar a atividade biológica do peptídeo de interesse. Inicialmente, foi possível determinar o protocolo eficaz para visualizar a sequência peptídica, sendo que os melhores resultados foram utilizando somente os processos de redução e alquilação, sem tripisinização.

A modelagem tridimensional revelou que o peptídeo apresenta arquitetura compatível com compostos bioativos com regiões envolvidas nas interações moleculares. O uso do dicroísmo circular confirmou essa conformação, reforçando este potencial do peptídeo.

Os ensaios comportamentais indicaram atividade biológica do peptídeo, sugerindo um possível efeito neuroativo ou citotóxico, o que pode estar relacionado à modulação de vias neuronais, canais iônicos ou processos celulares essenciais. Além disso, os resultados dos ensaios biológicos apontam para uma provável interação do peptídeo com a membrana celular, embora os mecanismos envolvidos ainda necessitem de investigação adicional.

Em conjunto, os achados sugerem que o peptídeo apresenta potencial como molécula bioativa, considerando suas características estruturais parcialmente compatíveis com toxinas marinhas descritas na literatura e os efeitos biológicos observados em organismos modelo, devendo, entretanto, ser explorado em estudos complementares para melhor elucidação de seu mecanismo de ação.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Holford, M., Daly, M., King, G.F. and Norton, R.S. (2018) Venoms to the Rescue. *Science*, **361**, 842–844. <https://doi.org/10.1126/science.aau7761>.
- 2 Schendel, V., Rash, L.D., Jenner, R.A. and Undheim, E.A.B. (2019, November 14) The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution. *Toxins*, MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins11110666>.
- 3 Herzig, V., Cristofori-Armstrong, B., Israel, M.R., Nixon, S.A., Vetter, I. and King, G.F. (2020, November 1) Animal Toxins — Nature’s Evolutionary-Refined Toolkit for Basic Research and Drug Discovery. *Biochemical Pharmacology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114096>.
- 4 Orts, D.J.B. and Bicudo, J.E.P.W. (2013) Neurotoxinas de Anêmonas Do Mar Como Ferramentas Para o Estudo Da Fisiologia de Canais Voltagem - Dependentes de Potássio 1.
- 5 Silva, D.L. da, Pimenta, D.C. and Sciani, J.M. (2022) Identificação e Caracterização Bioquímica de Inibidores de Serinopeptidases Isolados a Partir Da Peçonha Das Anêmonas-Do-Mar Anthopleura Cascaia e Aulactinia Veratra.
- 6 Santos, H.B. and Júnior, M.N. (2020) Distribuição Espaço-Temporal e Estresse Termo-Salino Da Anêmona-Do-Mar Anthopleura Krebsi. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/18472>.
- 7 Hemeterio, R.J. da S. and Rabelo, E.F. (2021) Dinâmica Populacional e Deslocamento de Bunodosoma Canguçu (Cnidaria, Actiniaria) Belém & Preslcravo, 1973 Em Um Recife de Arenito Do Litoral Do Estado Do Rio Grande Do Norte. <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/9228>.
- 8 Martins, R.D., Alves, R.S., Martins, A.M.C., Barbosa, P.S.F., Evangelista, J.S.A.M., Evangelista, J.J.F., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J.F., Orts, D.J.B., Marangoni, S., de Menezes, D.B., Fonteles, M.C. and Monteiro, H.S.A. (2009) Purification and Characterization of the Biological Effects of Phospholipase A2 from Sea Anemone Bunodosoma Caissarum. *Toxicon*, **54**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.005>.
- 9 Salceda, E., López, O., Zaharenko, A.J., Garateix, A. and Soto, E. (2010) The Sea Anemone Bunodosoma Caissarum Toxin BcIII Modulates the Sodium Current Kinetics

- of Rat Dorsal Root Ganglia Neurons and Is Displaced in a Voltage-Dependent Manner. *Peptides*, **31**, 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.005>.
- 10 Mazzi Esquinca, M.E., Correa, C.N., Marques de Barros, G., Montenegro, H. and Mantovani de Castro, L. (2023) Multiomic Approach for Bioprospection: Investigation of Toxins and Peptides of Brazilian Sea Anemone *Bunodosoma Caissarum*. *Marine Drugs*, **21**. <https://doi.org/10.3390/md21030197>.
 - 11 King, G.F. (2011) Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **11**, 1469–1484. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.621940>.
 - 12 Madio, B., King, G.F. and Undheim, E.A.B. (2019) Sea Anemone Toxins: A Structural Overview. *Marine Drugs*, **17**, 325. <https://doi.org/10.3390/md17060325>.
 - 13 Oliveira, R. de and Troncone, L.R.P. (2020) Toxinas Animais Seletivas a Canais Iônicos.
 - 14 Camargo, F.V. de A. and Levin, Y. (2012) Estudo Da Dinâmica de Íons Em Canais Iônicos *.
 - 15 Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2023) *Biologia Celular e Molecular*. 10th ed.
 - 16 Cruz, É.F. Da and Oliveira, M.J. de. (2006) Modelos Markovianos Para Canais Iônicos Em Membranas Celulares.
 - 17 Yeung, S.Y.M., Thompson, D., Wang, Z., Fedida, D. and Robertson, B. (2005) Modulation of Kv3 Subfamily Potassium Currents by the Sea Anemone Toxin BDS: Significance for CNS and Biophysical Studies. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 8735–8745. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-05.2005>.
 - 18 Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L. and Lazdunski, M. (1998) Sea Anemone Peptides with a Specific Blocking Activity against the Fast Inactivating Potassium Channel Kv3.4. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 6744–6749. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6744>.
 - 19 An, D., Pinheiro-Junior, E.L., Béress, L., Gladkikh, I., Leychenko, E., Undheim, E.A.B., Peigneur, S. and Tytgat, J. (2022) AsKC11, a Kunitz Peptide from *Anemonia Sulcata*, Is a Novel Activator of G Protein-Coupled Inward-Rectifier Potassium Channels. *Marine Drugs*, **20**. <https://doi.org/10.3390/md20020140>.
 - 20 Schlott, B., Wöhnert, J., Icke, C., Hartmann, M., Ramachandran, R., Gührs, K.H., Glusa, E., Flemming, J., Görlach, M., Große, F. and Ohlenschläger, O. (2002) Interaction of Kazal-Type Inhibitor Domains with Serine Proteinases: Biochemical and Structural

- Studies. *Journal of Molecular Biology*, **318**. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00014-1).
- 21 Jia, J., Ga, L., Liu, Y., Yang, Z., Wang, Y., Guo, X., Ma, R., Liu, R., Li, T., Tang, Z. and Wang, J. (2022) Serine Protease Inhibitor Kazal Type 1, A Potential Biomarker for the Early Detection, Targeting, and Prediction of Response to Immune Checkpoint Blockade Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Immunology*, **13**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.923031>.
 - 22 Stevens, A.M., Yuasa, M., Peckham, D., Olsen, C., Iadonato, S.P. and Probst, P. (2016) THU0285 Dalazatide, An Inhibitor of The Kv1.3 Channel on Activated Effector Memory T Cells, Has Immunotherapy Potential in Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **75**. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-eular.5866>.
 - 23 Tarcha, E.J., Olsen, C.M., Probst, P., Peckham, D., Muñoz-Elías, E.J., Kruger, J.G. and Iadonato, S.P. (2017) Safety and Pharmacodynamics of Dalazatide, a Kv1.3 Channel Inhibitor, in the Treatment of Plaque Psoriasis: A Randomized Phase 1b Trial. *PLoS ONE*, **12**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180762>.
 - 24 Fisher, R., Hassenbusch, S., Krames, E., Leong, M., Minehart, M., Prager, J., Staats, P., Webster, L. and Willis, K.D. (2005) A Consensus Statement Regarding the Present Suggested Titration for Prialt (Ziconotide). *Neuromodulation*. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1403.2005.05232.x>.
 - 25 Löschner, D., Dries, R., Kalff, R., Walter, J. and Reichart, R. (2021) Was Wurde Eigentlich Aus Prialt®? *Der Schmerz*, **35**. <https://doi.org/10.1007/s00482-021-00531-y>.
 - 26 Fernández Landó, L. and Casellini, C.M. (2009) Ensayos Clínicos de Exenatida y Su Rol En El Tratamiento de La Diabetes Tipo 2 TT - Exenatide Trials for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Medicina (B.Aires)*, **69**.
 - 27 Carlo, A., Munari, F. and Valdés, E.M. (2006) La Exenatida: Un Nuevo Antidiabético. *Medicina Interna de México*, **22**.
 - 28 Mohamed Abd El-Aziz, T., Soares, A.G. and Stockand, J.D. (2019) Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins*, **11**, 564. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>.
 - 29 Koh, C.Y. and Kini, R.M. (2012) From Snake Venom Toxins to Therapeutics – Cardiovascular Examples. *Toxicon*, **59**, 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.017>.

- 30 Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L. and Tytgat, J. (2011) A Bifunctional Sea Anemone Peptide with Kunitz Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. *Biochemical Pharmacology*, **82**. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>.
- 31 Pham, C.A., Ngo, A.D., Le Bui, N. and Chu, D.-T. (2024) Bioinformatics Databases and Tools for Analysis of Multi-Omics. *Multi-Omics Analysis of the Human Microbiome*, Springer Nature Singapore, Singapore, 77–88. https://doi.org/10.1007/978-981-97-1844-3_4.
- 32 Manes, N.P. and Nita-Lazar, A. (2018) Application of Targeted Mass Spectrometry in Bottom-up Proteomics for Systems Biology Research. *Journal of Proteomics*, **189**, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.008>.
- 33 Gacesa, R., Chung, R., Dunn, S.R., Weston, A.J., Jaimes-Becerra, A., Marques, A.C., Morandini, A.C., Hranueli, D., Starcevic, A., Ward, M. and Long, P.F. (2015) Gene Duplications Are Extensive and Contribute Significantly to the Toxic Proteome of Nematocysts Isolated from *Acropora Digitifera* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *BMC Genomics*, **16**, 774. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1976-4>.
- 34 Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. and Hassabis, D. (2021) Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature, Nature Research*, **596**, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- 35 Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>.
- 36 Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J.L., Gamse, J.T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R.T., Van Cruchten, S. and Zon, L.I. (2020) Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, **33**, 95–118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>.

- 37 Patton, E.E., Zon, L.I. and Langenau, D.M. (2021) Zebrafish Disease Models in Drug Discovery: From Preclinical Modelling to Clinical Trials. *Nature Reviews Drug Discovery*, **20**, 611–628. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8>.
- 38 Chakraborty, C., Hsu, C., Wen, Z., Lin, C. and Agoramoorthy, G. (2009) Zebrafish: A Complete Animal Model for In Vivo Drug Discovery and Development. *Current Drug Metabolism*, **10**. <https://doi.org/10.2174/138920009787522197>.
- 39 Vargas, R.A., Sarmiento, K. and Vásquez, I.C. (2015) Zebrafish (Danio Rerio): A Potential Model for Toxinological Studies. *Zebrafish*. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1102>.
- 40 Fernandes Salgueiro, A.C., Goulart, A.S., Viçosa, D.L., Viçosa, C.S.C.L. and Folmer, V. (2018) Resolução de Problemas No Ensino de Ciências: Utilização de Artêmia Salina Como Modelo Experimental Para o Estudo de Plantas Medicinais Na Escola Básica. *Revista de Ensino de Bioquímica*, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, **16**, 31–47. <https://doi.org/10.16923/reb.v16i2.814>.
- 41 Bakshi, K., Liyanage, M.R., Volkin, D.B. and Middaugh, C.R. (2014) Circular Dichroism of Peptides. 247–253. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3_17.
- 42 Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P.L. and Andersson, M. (2018) ToxTrac: A Fast and Robust Software for Tracking Organisms. *Methods in Ecology and Evolution*, **9**. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12874>.
- 43 Sæbø, I.P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E. and Booth, J.A. (2023) Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**. <https://doi.org/10.3390/ijms24032914>.
- 44 Tinoco, A.D. and Saghatelian, A. (2011) Investigating Endogenous Peptides and Peptidases Using Peptidomics. *Biochemistry*, **50**, 7447–7461. <https://doi.org/10.1021/bi200417k>.
- 45 Seidah, N.G. and Prat, A. (2002) Precursor Convertases in the Secretory Pathway, Cytosol and Extracellular Milieu. *Essays in Biochemistry*, **38**, 79–94. <https://doi.org/10.1042/bse0380079>.
- 46 Cendron, L., Rothenberger, S., Cassari, L., Dettin, M. and Pasquato, A. (2023) Proprotein Convertases Regulate Trafficking and Maturation of Key Proteins within the Secretory Pathway. 1–54. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2022.10.001>.
- 47 Chan, S.J., Oliva, A.A., LaMendola, J., Grens, A., Bode, H. and Steiner, D.F. (1992) Conservation of the Prohormone Convertase Gene Family in Metazoa: Analysis of

- CDNAs Encoding a PC3-like Protein from Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 6678–6682. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6678>.
- 48 Brakch, N., Allemandou, F., Cavadas, C., Grouzmann, E. and Brunner, H.R. (2002) Dibasic Cleavage Site Is Required for Sorting to the Regulated Secretory Pathway for Both Pro- and Neuropeptide Y. *Journal of Neurochemistry*, **81**, 1166–1175. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00919.x>.
 - 49 Anand, P., Filipenko, P., Huaman, J., Lyudmer, M., Hossain, M., Santamaria, C., Huang, K., Ogunwobi, O.O. and Holford, M. (2019) Selective Inhibition of Liver Cancer Cells Using Venom Peptide. *Marine Drugs*, **17**, 587. <https://doi.org/10.3390/md17100587>.
 - 50 Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B. and Aebersold, R. (2009) Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. Cerevisiae* by Targeted Proteomics. *Cell*, **138**, 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.051>.
 - 51 Madio, B., Undheim, E.A.B. and King, G.F. (2017) Revisiting Venom of the Sea Anemone *Stichodactyla Haddoni*: Omics Techniques Reveal the Complete Toxin Arsenal of a Well-Studied Sea Anemone Genus. *Journal of Proteomics*, **166**, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.007>.
 - 52 Cardoso, F.C., Walker, A.A., King, G.F. and Gomez, M. V. (2023) Holistic Profiling of the Venom from the Brazilian Wandering Spider *Phoneutria Nigriventer* by Combining High-Throughput Ion Channel Screens with Venomics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1069764>.
 - 53 Kvetkina, A., Pisyagin, E., Menchinskaya, E., Yurchenko, E., Kalina, R., Kozlovskiy, S., Kaluzhskiy, L., Menshov, A., Kim, N., Peigneur, S., Tytgat, J., Ivanov, A., Ayvazyan, N., Leychenko, E. and Aminin, D. (2022) Kunitz-Type Peptides from Sea Anemones Protect Neuronal Cells against Parkinson’s Disease Inductors via Inhibition of ROS Production and ATP-Induced P2X7 Receptor Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 5115. <https://doi.org/10.3390/ijms23095115>.
 - 54 Nguyen, P.T. and Yarov-Yarovoy, V. (2022) Towards Structure-Guided Development of Pain Therapeutics Targeting Voltage-Gated Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology*, **13**. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842032>.
 - 55 Pinheiro-Junior, E.L., Kalina, R., Gladkikh, I., Leychenko, E., Tytgat, J. and Peigneur, S. (2022) A Tale of Toxin Promiscuity: The Versatile Pharmacological Effects of Hcr 1b-2 Sea Anemone Peptide on Voltage-Gated Ion Channels. *Marine Drugs*, **20**, 147. <https://doi.org/10.3390/md20020147>.

- 56 Tran, H.N.T., Tran, P., Deuis, J.R., McMahon, K.L., Yap, K., Craik, D.J., Vetter, I. and Schroeder, C.I. (2021) Evaluation of Efficient Non-Reducing Enzymatic and Chemical Ligation Strategies for Complex Disulfide-Rich Peptides. *Bioconjugate Chemistry*, **32**, 2407–2419. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00452>.
- 57 Galleano, I., Harms, H., Choudhury, K., Khoo, K., Delemotte, L. and Pless, S.A. (2021) Functional Cross-Talk between Phosphorylation and Disease-Causing Mutations in the Cardiac Sodium Channel Na_v 1.5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025320118>.
- 58 Pham, D.L., Niemi, A., Blank, R., Lomenzo, G., Tham, J., Ko, M.L. and Ko, G.Y.-P. (2023) Peptide Lv Promotes Trafficking and Membrane Insertion of KCa3.1 through the MEK1–ERK and PI3K–Akt Signaling Pathways. *Cells*, **12**, 1651. <https://doi.org/10.3390/cells12121651>.
- 59 Mitchell, M.L., Shafee, T., Papenfuss, A.T. and Norton, R.S. (2019) Evolution of Cnidarian *Trans*-defensins: Sequence, Structure and Exploration of Chemical Space. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **87**, 551–560. <https://doi.org/10.1002/prot.25679>.
- 60 Wang, X., Liao, Q., Chen, H., Gong, G., Siu, S.W.I., Chen, Q., Kam, H., Ung, C.O.L., Cheung, K.-K., Rádis-Baptista, G., Wong, C.T.T. and Lee, S.M.-Y. (2021) Toxic Peptide From *Palythoa Caribaeorum* Acting on the TRPV1 Channel Prevents Pentylentetrazol-Induced Epilepsy in Zebrafish Larvae. *Frontiers in Pharmacology*, **12**. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.763089>.
- 61 Cotton, J., Crest, M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E., Karlsson, E., Castaneda, O., Harvey, A.L., Vita, C. and Ménez, A. (1997) A Potassium-Channel Toxin From the Sea Anemone *Bunodosoma Granulifera*, An Inhibitor for Kv1 Channels — Revision of the Amino Acid Sequence, Disulfide-Bridge Assignment, Chemical Synthesis, and Biological Activity. *European Journal of Biochemistry*, **244**, 192–202. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00192.x>.
- 62 Kalman, K., Pennington, M.W., Lanigan, M.D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W.R., Grissmer, S., Gutman, G.A., Christian, E.P., Cahalan, M.D., Norton, R.S. and Chandy, K.G. (1998) ShK-Dap22, a Potent Kv1.3-Specific Immunosuppressive Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 32697–32707. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32697>.

- 63 Pennington, M., Chang, S., Chauhan, S., Huq, R., Tajhya, R., Chhabra, S., Norton, R. and Beeton, C. (2015) Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK. *Marine Drugs*, **13**, 529–542. <https://doi.org/10.3390/md13010529>.
- 64 Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M. and Lazdunski, M. (2004) A New Sea Anemone Peptide, APETx2, Inhibits ASIC3, a Major Acid-sensitive Channel in Sensory Neurons. *The EMBO Journal*, **23**, 1516–1525. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600177>.
- 65 Morgenstern, T.J., Nirwan, N., Hernández-Ochoa, E.O., Bibollet, H., Choudhury, P., Laloudakis, Y.D., Ben Johny, M., Bannister, R.A., Schneider, M.F., Minor, D.L. and Colecraft, H.M. (2022) Selective Posttranslational Inhibition of CaV β 1-Associated Voltage-Dependent Calcium Channels with a Functionalized Nanobody. *Nature Communications*, **13**, 7556. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35025-7>.
- 66 Sintsova, O., Gladkikh, I., Kalinovskii, A., Zelepuga, E., Monastyrnaya, M., Kim, N., Shevchenko, L., Peigneur, S., Tytgat, J., Kozlovskaya, E. and Leychenko, E. (2019) Magnificamide, a β -Defensin-Like Peptide from the Mucus of the Sea Anemone *Heteractis Magnifica*, Is a Strong Inhibitor of Mammalian α -Amylases. *Marine Drugs*, **17**, 542. <https://doi.org/10.3390/md17100542>.
- 67 Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R. and Fu, C. (2022) Therapeutic Peptides: Current Applications and Future Directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **7**, 48. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.
- 68 Vaidya, B. and Sharma, S.S. (2020) Transient Receptor Potential Channels as an Emerging Target for the Treatment of Parkinson's Disease: An Insight Into Role of Pharmacological Interventions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584513>.

ANEXO A

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Caracterização estrutural e atividade biológica de uma possível toxina extraída da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum***", registrada com o nº **07/2025**, sob a responsabilidade de Bianca Menezes Torres Alves e Leandro Mantovani de Castro – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, DO CAMPUS DO LITORAL PAULISTA, UNESP, em reunião de 19/08/2025.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/07/2025 a 04/03/2026
Espécie/linhagem/raça	<i>Danio rerio</i>
Nº de animais	120
Peso/Idade	Adulto: 0,2 a 0,5 g
Sexo	Machos: 60; fêmeas: 60
Origem	Selvagem

São Vicente, 28 de agosto de 2025

Documento assinado digitalmente
 **LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO**
Data: 28/08/2025 14:55:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Instituto de Biociências – Câmpus do Litoral Paulista (IB/CLP)

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7173 - staepe.clp@unesp.br