



# UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

VICTÓRIA GUIMARÃES SANTIAGO

Estudo de peptídeos derivados da proteínaβconglicinina da soja sobre a proliferação celular de carcinoma de mama

**UFBA** 





### VICTÓRIA GUIMARÃES SANTIAGO

# Estudo de peptídeos derivados da proteínaβconglicinina da soja sobre a proliferação celular de carcinoma de mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

UF

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Orientador

Profa. Dra. Carolina Oliveira Souza

Coorientadora

**SALVADOR** 

#### VICTÓRIA GUIMARÃES SANTIAGO

# Estudo de peptídeos derivados da proteína β-conglicinina da soja sobre a proliferação celular de carcinoma de mama

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado da candidata *Victória Guimarães Santiago*, em sessão pública realizada em 28/03/2025.

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira (Orientador)

Faculdade de Farmácia
Universidade Federal da Bahia (UFBA, Salvador, BA)

\_\_\_\_\_

#### Marcelo Santos Castilho (Membro titular)

Faculdade de Farmácia Universidade Federal da Bahia (UFBA, Salvador, BA)

\_\_\_\_\_

#### Fernando Rogério Pavan

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP, Araraquara, SP)



#### Meus agradecimentos,

À Deus, pois sem a permissão Dele nada seria possível.

Aos meus pais, Francinete e Américo Filho, por serem meu ponto de apoio e incentivo, sendo os melhores pais que alguém poderia desejar.

Aos meus avós, Américo e Hilda Maria, por todo amor e carinho fundamentais em toda minha caminhada e a Iracy e José Carlos, que mesmo não estando mais neste mundo são das minhas maiores referencias do que é amor.

À minha madrinha, Carla Andrea, por todos os conselhos dados, por estar presente em todos os momentos e me mostrar que a educação é a resposta de tudo.

A todos os demais familiares e amigos que sempre me incentivaram a sonhar e ir cada vez mais longe.

Ao Professor Ederlan Ferreira por me guiarem durante a minha jornada acadêmica À Biane Piladelpho, por todos os ensinamentos, auxílio e apoio.

Agradeço também, a todo o pessoal do LAPAAC, Cecília, Johnnie, Gabrielle, Fabiana, Tamires, Eiji, Brenda, Jaff, João, Bethânia, Alice, Lene, por todo carinho, auxílio, apoio e momentos maravilhosos dentro e fora do laboratório.

Aos professores Eduardo Maffud Cilli e Fernando Rogério Pavan, pela experiência e ensinamentos para as etapas de síntese e análise de citotoxicidade,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto (nº do processo: Projeto JCB nº 0012/2016 e Projeto INCITE nº 0006/2022), e pela bolsa de estudos concedida (nº do processo: BOL0769/2023).

E por fim, a todos os demais que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

#### **RESUMO**

Atualmente, as doenças crônicas não-transmissíveis permanecem como as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo. Entre elas, o câncer representa a segunda principal causa de morte, atrás apenas das doenças cardiovasculares; sendo que o câncer de mama se destaca como um dos tipos mais incidentes e letais, exigindo ainda, novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, estudos anteriores têm reportado o potencial anticancerígeno de peptídeos derivados de alguns grãos de leguminosas, com destaque para as proteínas da soja que têm sido extensivamente investigadas. Por isso, esta pesquisa teve como objetivo central – avaliar a ação de peptídeos derivados da proteína β-conglicinina da soja, com efeito sobre a proliferação celular de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), através de abordagem em in sílico e in vitro. Para tanto, foi realizado uma triagem para seleção de peptídeos com predição de interação molecular com a proteína Bcl-2. Doze peptídeos (ASVSVSF, OEEEH, EEOEW, GTAIL, AIVIL, VIPAGY, AIVVL, EQQQR, ATSDL, PGSAK, ASVCVSL e VIPAAY) com cinco ou mais resíduos de aminoácidos foram preditos com ação anticâncer (ACPred  $\geq 0.800$ ). Desses, sete sequências interagiram com as cavidades P2 e P4 do domínio BH3 da proteína Bcl-2, e tiveram o perfil de interação molecular estabelecido e comparado a droga comercial venetoclax. Somente os peptídeos ASVCVSL, ATSDL e EEQEW apresentaram tendências para estruturação helicoidal, condição essencial para ajuste no domínio BH3. Esses peptídeos foram sintetizados, e nos ensaios in vitro reduziram de forma dose-dependente (concentração 25–800 μM) a viabilidade celular da MDA-MB-231. O tratamento com o ASVCVSL, ATSDL e EEQEW levou ao decréscimo em 87, 69 e 42% do crescimento das células quando tratadas com a concentração de 800 µM, respectivamente, comparado ao controle. Embora, a ação do peptídeo ASVCVSL (IC<sub>50</sub> = 113.8 μM) tenha sido mais significativa, comparado ao ATSDL  $(IC_{50} = 205 \mu M)$  e EEQEW  $(IC_{50} = 1520.6 \mu M)$ , ele apresentou o menor índice de seletividade (0,35). Posteriormente, a morte celular foi analisada pela indução da apoptose. O tratamento com os peptídeos ATSDL e EEQEW mostrou um aumento na ligação da anexina V em 3.2 e 5.5-fold e 1.3 e 3.1-fold, enquanto o venetoclax aumentou em 2.1 e 5.3-fold nos tratamentos por 24 e 48 h, respectivamente. Além disso, a indução da apoptose foi acompanhada da diminuição significativa da concentração da proteína Bcl-2, nos tratamentos com o ATSDL, EEQEW e o venetoclax. No entanto, os resultados previstos in sílico sugeriram que os dois peptídeos avaliados apresentam baixa absorção e biodisponibilidade, comparados ao venetoclax. Portanto, o presente estudo apresenta evidências que os peptídeos ATSDL e EEQEW derivados da proteína β-conglicinina da soja, podem exercer ação pró-apoptótica sobre o câncer de mama, por meio modulação da proteína-alvo Bcl-2.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos. Bcl-2. BH3 miméticos. Docking Molecular. Apoptose.

#### **ABSTRACT**

Currently, non-communicable chronic diseases remain the leading causes of mortality and morbidity worldwide. Among them, cancer represents the second leading cause of death, second only to cardiovascular diseases, with breast cancer standing out as one of the most prevalent and lethal types, requiring new therapeutic approaches. In this context, previous studies have reported the anticancer potential of peptides derived from legume grains, particularly soy proteins, which have been the most extensively investigated. Therefore, this study aimed to evaluate the action of peptides derived from the soy protein β-conglycinin on the proliferation of mammary adenocarcinoma (MDA-MB-231) cells through in silico and in vitro approaches. A screening process was conducted to select peptides predicted to interact with the Bcl-2 protein. Twelve peptides (ASVSVSF, QEEEH, EEQEW, GTAIL, AIVIL, VIPAGY, AIVVL, EOOOR, ATSDL, PGSAK, ASVCVSL, and VIPAAY) containing five or more amino acid residues were predicted to have anticancer activity (ACPred  $\geq 0.800$ ). Among these, seven sequences interacted with the P2 and P4 cavities of the Bcl-2 BH3 domain and had their molecular interaction profiles established and compared to the commercial drug venetoclax. Only the peptides ASVCVSL, ATSDL, and EEQEW exhibited tendencies for helical structuring, a crucial condition for fitting into the BH3 domain. These peptides were synthesized and tested in vitro, reducing MDA-MB-231 cell viability in a dose-dependent manner (concentration 25–800 μM). A decrease of 87%, 69%, and 42% in cell growth was observed upon treatment with 800 µM of ASVCVSL, ATSDL, and EEQEW, respectively, compared to the control. Although ASVCVSL (IC<sub>50</sub> = 113.8 µM) demonstrated the most significant effect compared to ATSDL (IC<sub>50</sub> = 205  $\mu$ M) and EEQEW (IC<sub>50</sub> = 1520.6  $\mu$ M), it presented the lowest selectivity index (0.35). Subsequently, cell death was analyzed through apoptosis induction. Treatment with ATSDL and EEQEW resulted in an increase in Annexin V binding by 3.2- and 5.5-fold and 1.3- and 3.1-fold, while the venetoclax increased it by 2.1and 5.3-fold at 24 and 48 hours, respectively. Moreover, apoptosis induction was accompanied by a significant decrease in Bcl-2 protein levels upon treatment with ATSDL, EEQEW, and venetoclax. However, in silico predictions suggested that these two peptides exhibit low absorption and bioavailability compared to venetoclax. Therefore, this study provides evidence that the ATSDL and EEQEW peptides, derived from soy β-conglycinin protein, may exert proapoptotic effects on breast cancer through modulation of the Bcl-2 target protein.

**Keywords**: Bioactive peptides. Bcl-2. BH3 mimetics. Molecular docking. Apoptosis.

### LISTA DE FIGURAS

Manuscrit	o: Soybean β-Conglycinin-derived ATSDL peptide induces apoptosis by	
modulation	n of Bcl-2 in MDA-MB-231 Cells	41
Figura 1	Docking analysis of $\beta$ -conglycinin peptides with the BCL-2 BH3 domain	
	(PDB ID: 600K) using the AutoDock Vina software. Orientations of	
	QEEEH, EEQEW, GTAIL, AIVIL, VIPAGY, AIVVL, EQQQR, ATSDL,	
	PGSAK, ASVCVSL docked into the BCL-2 BH3 domain are shown (a, c,	
	e, g, i, k, m, o, q and s), respectively; their predicted binding profile (2D	
	diagram) in the active site is shown in (b, d, f, h, j, l, n, p, r and t),	
	respectively. All images were generated using PyMOL 0.99r software	70
Figura 2	Secondary structure of QEEEH (a), EEQEW (c), VIPAGY (e), EQQQR (g),	
	ATSDL (i), PGSAK (k), and ASVCVSL (m) peptides and local structure	
	prediction profile (b, d, f, h, l and m) respectively predicted on PEPFOLD4®.	
	Red, green, and blue colors indicate helical, extended, or other state	
	propensities	71
Figura 3	Cell viability (%) of MRC-5 and MDA-MB-231, treated with, ASVCVSL,	
	ATSDL, EEQEW, and Venetoclax for 24 hours (a, c, e, and g) and 48 hours	
	(b, d, f, and h), respectively. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation	
	(n = 3). The symbol (*) indicates a difference between the cell lines treated	
	(p-value < 0.05 according to t-test)	72
Figura 4	Concentration-response effect of ASVCVSL (a), ATSDL (b), and EEQEW	
	(c) peptides on cancer cell lines MDA-MB-231 treated per 48 hours (n=3)	73
Figura 5	Apoptosis levels in MDA-MB-231 cells under different treatments. ATSDL	
	(a) and EEQEW (b) peptides at concentrations of 0, 25, 50, 100, 200, 400,	
	and 800 $\mu M$ , venetoclax (c) at concentrations of 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50,	
	and 100 $\mu\text{M}$ , respectively. Apoptosis was quantified using the RealTime-	
	Glo annexin V apoptosis assay kit. Increased luminescence (RFU) indicates	
	annexin V binding to phosphatidylserine residues on the cell membrane,	
	serving as an early apoptosis marker. Data are presented as means $\pm$ SD (n	
	= 3)	74

Figura 6	Effects of ATSDL, EEQEW and venetoclax on Bcl-2 protein concentration.	
	All values are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (n = 2).	
	Results with the same letter do not differ according to Tukey's test (p $>$ 0.05).	75
Figura S1	Docking analysis of venetoclax with the Bcl-2 protein (PDB ID: 600K)	
	using AutoDock Vina software. Positioning of the crystallographic	
	navitoclax (blue) and re-docked navitoclax (green) in the Bcl-2 binding site	
	(a). Top-ranked pose of venetoclax (green) in the BCL-2 BH3 domain (b).	
	Crystallographic binding profile of Venetoclax (blue) in the active site of	
	BCL-2. (d) 2D diagram of Venetoclax interactions (c)	79
Figura S2	RP-HPLC data and mass-to-charge ratios (m/z) of ASVCVSL (a), ATSDL	
	(b), and EEQEW (c) peptides after purification	80

#### LISTA DE TABELAS

Manuscrit	o: Soybean $\beta$ -Conglycinin-derived ATSDL peptide induces apoptosis by	
modulation	of Bcl-2 in MDA-MB-231 Cells	41
Tabela 1	Growth inhibition (%) and $IC_{50}$ values of the cancer cell lines MRC-5 and	
	MDA-MB-231 treated with the peptides or drugs for 48 h	76
Tabela 2	Physicochemical and pharmacokinetic properties of ATSDL and EEQEW and	
	commercial drug venetoclax	77
Tabela 3	Evaluation of peptides as substrates for liver enzymes	78
Tabela S1	Experimental data for the syntheses of peptides and their analogs	81
Tabela S2	Prediction of anticancer peptides according to ACPred®	82

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM Ataxia Telangiectasia Mutada
BAX Proteína associada ao Bcl-2 X

BCL-2 Linfoma de Células B 2

BCL-W/BCL2L2 Proteína semelhante ao Bcl-2 W

BCL-XL Bcl-extra longo

BH3 Domínio de homologia 3 da Família Bcl-2 BH4 Domínio de homologia 4 da Família Bcl-2

BID Agonista de morte de domínio BH3-interagente

BIM Proteína semelhante ao Bcl-2 11
BR1P1 Proteína 1 interativa com BRCA1

BRCA1 Gene do câncer de mama 1
BRCA2 Gene do câncer de mama 2

Caco-2 Linha celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano.

CDK Quinase dependente de ciclina

CHEK2 Quinase de checkpoint 2

CYP Citocromo P450

DNA Ácido desoxirribonucleico

FBS Soro fetal bovino

HCT-116 Linha celular de câncer colorretal humano.

HSC-3 Linha celular de carcinoma de células escamosas humanas.

IAP Proteína inibidora de apoptose.

MCL1 Leucemia mieloide 1

MDA-MB-231 Linha celular de câncer de mama humano.

MRC-5 Linha celular de fibroblastos pulmonares humanos.

PALB2 Parceiro e localizador do BRCA2

PARP Poli (ADP-ribose) polimerase

p53 Proteína supressora tumoral (codificada pelo gene TP53)

PPB Ligação às proteínas plasmáticas

PUMA Modulador de apoptose regulado pelo p53

XIAP Proteína inibidora de apoptose ligada ao X

## SUMÁRIO

DISS	$SERTA ilde{\zeta} ilde{A}O$ – Estudo de peptídeos derivados da proteína $eta$ -conglicinina da soja	
sobre	e a proliferação celular de carcinoma de mama	1
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	1
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
3.1	Câncer	1
3.2	Fatores de risco para aparecimento e desenvolvimento	1
3.3	Estágios do desenvolvimento	1
3.4	Tipos mais comuns de canceres	1
3.5	Câncer de mama	1
3.6	Papel das proteínas da família BCL-2 no câncer de mama	2
3.7	A ação anticâncer de peptídeos bioativos	2
3.8	Peptídeos derivados da soja com propriedade anticâncer	2
3.9	Obtenção, características e funcionalidade dos peptídeos bioativos	3
4	MATERIAL E MÉTODOS	3
4.1	Sequência primária da β-conglicinina	3
4.2	Mimetização da digestão gastrointestinal	3
4.3	Predição da atividade biológica	3
4.4	Docking molecular	3
4.5	Predição da estrutura secundária	3
4.6	Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas	3
4.7	Síntese dos peptídeos	3
4.8	Ensaios de viabilidade celular	3
4.9	Ensaio de apoptose	3
4.10	Quantificação da proteína Bcl-2 (Humana)	3
4.11	Análise Estatística	3
5	RESULTADOS	4
5.1	<b>Manuscrito</b> : Soybean β-Conglycinin-derived ATSDL peptide induces apoptosis	
	by modulation of Bcl-2 in MDA-MB-231 Cells	4
6	CONCLUSÃO GERAL.	{
	REFERÊNCIAS	6
	PRODUCÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA	C

#### 1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis são patologias de longa duração, que representam globalmente a maior causa de mortalidade em pessoas em idade ativa (Unwin; Alberti, 2006). Tais doenças geram deficiência residual naqueles que sofrem com estas enfermidades e em suas famílias, levando à deterioração de suas funções físicas e sociais (Muñoz-Rodríguez; Arangoalzate; Segura-Cardona, 2018). Portanto, tais doenças possuem impacto negativo na qualidade de vida de quem por estas são acometidos. Sabe-se que a incidência de câncer e demais doenças crônicas não transmissíveis vêm crescendo com o passar dos anos, sendo esperado que o número de casos aumente à medida que a expectativa de vida também cresça (Cavazos; Mejia, 2013).

O câncer é um grande problema de saúde pública global, com um aumento de 20% na incidência na última década e uma projeção de mais de 25 milhões de casos novos até 2030 (Santos *et al.*, 2023). No Brasil, são esperados 704 mil novos casos para o triênio 2023-2025, sendo 483 mil excluindo o câncer de pele não melanoma (INCA, 2022). Os tipos mais incidentes são o câncer de mama feminina (73 mil casos) e o de próstata (71 mil), seguidos pelo câncer de cólon e reto (45 mil), pulmão (32 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (17 mil) (Santos *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, grandes progressos foram feitos no controle dos cânceres, graças a melhora de técnicas cirúrgicas, da radioterapia, aparecimento de novos medicamentos (especialmente visando o receptor ou biossíntese de testosterona), e a possibilidade de tratamentos multimodais, porém apesar dos muitos métodos clínicos avançados disponíveis para o tratamento sua taxa de recorrência ainda permanece alta (Tostivint *et al.*, 2017).

Atualmente, estudos vêm demonstrando que mudanças nos hábitos alimentares podem oferecer benefícios aos pacientes acometidos com câncer, como toxicidade reduzida, eficácia quimioterápica aprimorada e menor risco de complicações a longo prazo (Mittelman, 2020). Associações positivas têm sido relacionadas entre o consumo de grãos de leguminosas e melhoria na qualidade de vida, especialmente na redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer (Varinska *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a terapêutica baseada em peptídeos tem se destacado devido às suas inúmeras vantagens. Esses compostos são considerados seguros, altamente seletivos e apresentam boa tolerabilidade, além de possuírem um menor custo de produção em comparação a outras biomoléculas. Além disso, sua estrutura facilita modificações e sínteses, permitindo ajustes para melhorar sua eficácia e estabilidade (Schaduangrat *et al.*, 2019). Os peptídeos bioativos são fragmentos proteicos que apresentam atividade biológica no organismo, com

efeitos anticâncer, antitrombótico, antioxidante e antimicrobianos (Yu, 2018). Estes fragmentos com atividade biológica geralmente possuem entre 3 e 30 aminoácidos, sendo o método mais utilizado para a obtenção destes a hidrólise enzimática das proteínas, onde as enzimas gastrointestinais mais empregadas são pepsina e tripsina. No entanto, outras enzimas podem ser utilizadas; como pancreatina, termolisina e papaína (Cunha; Pintado, 2022).

Neste cenário, os peptídeos bioativos derivados da soja têm sido amplamente estudados (Yimit *et al.*, 2012). Atualmente estudos com peptídeos da soja e suas frações vem demonstrando atividade antiproliferativa sob linhagens de mama (Philadelpho *et al.*, 2024), próstata (Philadelpho *et al.*, 2021) cervical (González-Montoya *et al.*, 2016), entre outros.

A visão molecular sobre o modo de ação de moléculas bioativas é a chave para a compreensão dos fenótipos observados, de modo a prever efeitos colaterais potenciais ou reatividade cruzada e otimizar o composto existente. O mapeamento dos alvos simboliza um passo crucial para fornecer uma compreensão racional da bioatividade de pequenas moléculas, como os peptídeos. As previsões computacionais desempenham um papel importante em identificar o conjunto de alvos potenciais e sugerir alvos secundários para moléculas conhecidas (Wang *et al.*, 2019). As proteínas da família Bcl-2 são responsáveis por regular a morte celular programada (apoptose) e, portanto, vêm sendo alvo de estudo para a desenvolvimento de drogas para a terapia do câncer, sendo já identificadas como proteínas com ação antiapoptóticas a Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w (ou BCL2L2), e Mcl 1 (Wakui *et al.*, 2018).

A proteína Bcl-2 emerge como um alvo terapêutico de grande relevância, dada sua função central na regulação da apoptose. Sua superexpressão, frequentemente observada em múltiplos tipos de neoplasias, contribui significativamente para a resistência dos tumores aos tratamentos convencionais, permitindo que as células malignas evitem a morte programada (Qian *et al.*, 2022) Dessa forma, a inibição de Bcl-2 pode restabelecer os mecanismos apoptóticos, potencializando a eficácia das terapias antineoplásicas (Lee; Fairlie, 2021).

Portanto, neste estudo buscou-se investigar o mecanismo de ação e interação entre peptídeos derivados da β-conglicinina da soja com a proteína Bcl-2, relacionada à apoptose e sua interferência nas células de adenocarcinoma mamário da linhagem MDA-MB-231, através de abordagens *in silico* e *in vitro*.

#### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de peptídeos derivados da proteína β-conglicinina da soja (Glycine max
(L.) Merr), com efeito sobre a proliferação celular de câncer de mama da linhagem
MDA-MB-231, e a relação com modulação da proteína Bcl-2, através da abordagem
em in sílico e in vitro.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Hidrolisar a proteína β-conglicinina da soja por ação sequencial das enzimas pepsina
   (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina (EC 3.4.21.1), in sílico;
- Triar os peptídeos derivados da β-conglicinina, quanto o potencial anticancerígeno (Score ≥ 0,800);
- Selecionar os peptídeos com predição de interação molecular com a proteína relacionadas à apoptose Bcl-2, in sílico;
- Estabelecer as prováveis interações moleculares entre os peptídeos selecionados com a proteína-alvo, Bcl-2;
- Preditar a estrutura secundária e as características físico-químico dos peptídeos com potencial anticancerígeno;
- Sintetizar, purificar e confirmar a sequência primária dos peptídeos para o estudo in vitro;
- Verificar a citotoxicidade dos peptídeos, sobre linhagem de célula normal (MRC-5, ATCC CCL-171) e tumoral (MDA-MB-231, ATCC HTB-26);
- Determinar o índice de seletividade e o IC<sub>50</sub> dos peptídeos, comparado a droga (venetoclax);
- Avaliar a indução da apoptose em células MDA-MB-231, tratadas com os peptídeos comparado ao venetoclax;
- Quantificar a concentração da proteína Bcl-2 em células MDA-MB-231, tratadas com os peptídeos comparado ao venetoclax;
  - Determinar os parâmetros farmacocinéticos (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) dos peptídeos com potencial anticancerígeno.

#### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando um desafio significativo para os sistemas de saúde globais. Seu aumento deve-se, em grande parte, ao envelhecimento da população e às mudanças na prevalência dos principais fatores de risco. Em 2020, foram estimados 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de óbitos (Sung et al., 2021). E, em 2022, os números alcançaram quase 20 milhões de diagnósticos e 10 milhões de mortes, com projeções que sugerem um aumento para 35 milhões de casos anuais até 2050 (Bray et al., 2024).

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela divisão celular descontrolada, comprometendo a função tecidual e podendo se disseminar para outras regiões do organismo. Em condições normais, a proliferação celular é regulada pelo equilíbrio entre sinais de crescimento e anti-crescimento. No entanto, as células cancerosas adquirem a capacidade de gerar seus próprios sinais de crescimento e tornam-se insensíveis aos sinais de parada (Pavlova; Zhu; Thompson, 2022). Mecanismos como o reparo do DNA e a apoptose são essenciais para corrigir alterações genéticas, mas quando falham ou quando o dano ao DNA é excessivo, mutações permanentes podem ocorrer, ativando oncogenes ou inativando genes supressores de tumor, favorecendo o desenvolvimento do câncer (Gartner; Engebrecht, 2022).

A progressão do ciclo celular é um processo altamente regulado, essencial para a divisão celular correta e a manutenção da homeostase tecidual. Esse controle ocorre por meio de complexos formados por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), cuja atividade é modulada por sinais extracelulares, como os fatores de crescimento (Wang, 2021). A regulação do crescimento celular acontece nos pontos de controle das fases G1/S, S e G2/M, garantindo a integridade do material genético e a coordenação dos eventos mitóticos. As ciclinas e CDKs desempenham um papel central nesse processo, promovendo a transição ordenada entre as fases do ciclo celular (Gupta *et al.*, 2010). A apoptose, por sua vez, é um processo de morte celular programada essencial para a supressão da oncogênese, podendo ser iniciada por vias intrínsecas ou extrínsecas. A via extrínseca é mediada por receptores de morte celular, enquanto a via intrínseca é ativada por danos ao DNA, estresse oxidativo ou sinais quimioterápicos (Pfisterer *et al.*, 2011). Durante a apoptose, diversas proteínas modulam a sinalização, como as inibidoras da apoptose (IAPs) e a família Bcl-2. A proteína XIAP (Proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X), pertencente à família IAP, inibe caspases essenciais para o processo apoptótico, como as caspases 3, 7 e 9, desta forma, regula

negativamente o processo apoptótico. A XIAP impede a ativação da caspase-9 ao se ligar ao seu domínio catalítico, bloqueando sua função na apoptose via mitocôndria (caminho intrínseco). Além disso, caspases-3 e 7, que atuam como executoras da apoptose, também são inibidas por XIAP, evitando a degradação de substratos celulares essenciais para a morte programada (Cheung *et al.*, 2020).

#### 3.2 Fatores de risco para aparecimento e desenvolvimento

Os fatores de risco para o câncer podem ser categorizados em exógenos e endógenos. Os fatores exógenos são amplamente modificáveis e referem-se ao ambiente externo do organismo, incluindo infecções, estilo de vida e exposições a agentes carcinogênicos. Já os fatores endógenos estão relacionados às características individuais do hospedeiro (Weeden *et al.*, 2023). Esses fatores endógenos podem ser subdivididos em fatores extrínsecos à célula, como respostas imunológicas, estresse oxidativo, microbioma, metabolismo e regulação endócrina, e fatores intrínsecos à célula, que envolvem a resposta ao dano no DNA, fidelidade na replicação do DNA, regulação dos pontos de controle do ciclo celular, resposta ao estresse oxidativo, arquitetura da cromatina e redes transcricionais e traducionais (Wu *et al.*, 2018).

Os chamados "Hallmarks" do câncer foram propostos como um conjunto de capacidades funcionais adquiridas por células humanas à medida que passam de um estado normal para um crescimento neoplásico. Inicialmente, seis características fundamentais foram identificadas, mas com o avanço das pesquisas, esse número foi expandido para oito. Essas capacidades incluem: manutenção da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, ativação da imortalidade replicativa, indução ou acesso à vascularização, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e evasão da destruição imunológica (Hanahan; Weinberg, 2011). Esses processos são fundamentais para o desenvolvimento e progressão tumoral.

Além dos hallmarks principais, foram identificadas características "habilitadoras" que auxiliam a aquisição dessas capacidades. Duas delas são a instabilidade genômica e a inflamação promotora de tumores, que favorecem a evolução maligna ao criar mutações e modificar o microambiente tumoral. Recentemente, outros aspectos foram sugeridos como potenciais novos hallmarks ou características habilitadoras, incluindo a plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, os microbiomas polimórficos e a influência de células senescentes no microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

A plasticidade fenotípica envolve a capacidade das células cancerígenas de reverter processos diferenciais e assumir estados mais primitivos ou alternativos, permitindo adaptação

e resistência a terapias. Isso contribui para a progressão tumoral e a adaptação ao ambiente hostil do tumor (Bhat *et al.*, 2024). Outro conceito emergente é a reprogramação epigenética não mutacional, na qual mudanças no epigenoma das células tumorais regulam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. Essa plasticidade epigenética pode ser impulsionada por fatores ambientais, como hipóxia e interações microambientais, permitindo que as células tumorais adquiram propriedades agressivas e resistam a terapias sem necessidade de mutações genéticas (Costa *et al.*, 2023). Por fim, a influência dos microbiomas polimórficos e das células senescentes no microambiente tumoral tem sido amplamente estudada. O microbioma intestinal, por exemplo, pode influenciar a carcinogênese através da modulação do sistema imunológico e da produção de metabólitos que impactam o comportamento das células tumorais (Ding; Liu; Li, 2025; Wong-Rolle *et al.*, 2021). Já as células senescentes, embora normalmente associadas a uma parada do ciclo celular, podem secretar fatores inflamatórios e de crescimento que favorecem a progressão tumoral e a resistência a terapias (Hanahan, 2022).

#### 3.3 Estágios do desenvolvimento

A progressão do câncer ocorre em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação do câncer é um processo complexo que envolve a interação entre fatores exógenos e endógenos, influenciando diretamente a formação de células tumorais no organismo. Os iniciadores, também conhecidos como agentes carcinogênicos, são compostos capazes de induzir mutações no DNA, gerando alterações genéticas permanentes que aumentam o risco de transformação maligna (Liu *et al.*, 2015).

Após a iniciação, ocorre a promoção, fase caracterizada pela proliferação celular desregulada das células portadoras das mutações geradas pelo agente iniciador. Esse processo é impulsionado por promotores, que se ligam a receptores na superfície celular e desencadeiam cascatas de sinalização intracelular que favorecem a sobrevivência e expansão clonal das células transformadas (Liu *et al.*, 2015). A progressão tumoral representa a fase irreversível da carcinogênese, sendo marcada por alterações cariotípicas que resultam em crescimento acelerado, invasividade e potencial metastático, promovidos por uma intensa instabilidade genética (Hayes; Dinkova-Kostova; Tew, 2020). Essas transformações conferem às células tumorais a capacidade de resistir a mecanismos de controle do organismo, tornando-as mais agressivas e propensas a disseminação para tecidos adjacentes e distantes.

A metástase, etapa final da progressão tumoral, representa um dos principais desafios no tratamento do câncer. Esse processo envolve múltiplos eventos, desde a invasão da matriz extracelular até a intravasão na circulação sanguínea ou linfática, permitindo que as células

tumorais alcancem órgãos secundários (Meirson; Gil-Henn; Samson, 2020). Para sobreviver nesse ambiente hostil, essas células desenvolvem mecanismos adaptativos, como a secreção de fatores pró-angiogênicos que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos, garantindo o suprimento de nutrientes e oxigênio à massa tumoral em crescimento (Grasmann; Mondal; Leithner, 2021). Além disso, o microambiente tumoral exerce um papel essencial na regulação da metástase, modulando a interação das células cancerígenas com a imunidade inata e adaptativa, bem como com elementos estruturais do tecido-alvo (Grasmann; Mondal; Leithner, 2021).

#### 3.4 Tipos mais comuns de canceres

A incidência do câncer varia consideravelmente entre as regiões. Em países com alto desenvolvimento humano, embora a taxa de incidência seja maior, a mortalidade é reduzida graças ao acesso a tratamentos eficazes e a programas de rastreamento. Em contrapartida, nos países em desenvolvimento, a incidência pode ser menor, mas as taxas de mortalidade são mais elevadas devido a diagnósticos tardios e à limitação no acesso a terapias (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

Entre os tipos de câncer mais diagnosticados em 2020 destacaram-se o de mama (11,7% dos casos), seguido por pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). Quanto à mortalidade, o câncer de pulmão liderou, representando 18% dos óbitos, seguido pelo colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e mama (6,9%) (Sung *et al.*, 2021). Portanto, a prevenção, o rastreamento e o acesso a tratamentos de qualidade são essenciais para reduzir a carga global do câncer. Além disso, políticas de saúde pública focadas no controle de fatores de risco como tabagismo, obesidade e infecções podem desempenhar um papel crucial na diminuição tanto da incidência quanto da mortalidade associadas a essa doença (Bray *et al.*, 2024).

#### 3.5 Câncer de mama

#### 3.5.1 Prevalência e incidência da doença

O câncer de mama é uma das condições malignas mais comuns entre as mulheres globalmente, possuindo impacto significativo na saúde pública. Este é o tipo de câncer mais comum em 157 países do mundo, onde em 2022 mais de 2,3 milhões de pessoas foram diagnosticadas com esta patologia, gerando cerca de 670.000 mortes em todo o globo (Bray *et al.*, 2024) No Brasil, o câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em todas as regiões do país, onde se é esperado mais de 73 mil novos casos no triênio de 2023 a 2025, sendo

registrados 17.825 óbitos por esta doença no ano de 2020 (INCA, 2022). Quando diagnosticado em estágios iniciais e localizados, esta patologia possui uma taxa de cura entre 70 a 80% dos casos. No entanto, o panorama muda drasticamente para pacientes com câncer de mama avançado, onde a presença de metástases em órgãos distantes reduz drasticamente as opções terapêuticas disponíveis, tornando a doença considerada atualmente incurável (Harbeck *et al.*, 2019).

A incidência do câncer de mama está em crescimento em todas as regiões do mundo, sendo mais elevada em países industrializados. Aproximadamente metade dos casos globais ocorre em nações desenvolvidas, refletindo o impacto do estilo de vida ocidental (Smolarz; Zadrożna Nowak; Romanowicz, 2022). Fatores como alimentação inadequada, tabagismo, estresse excessivo e sedentarismo desempenham um papel significativo nesse aumento. Essas tendências reforçam a importância de medidas preventivas, incluindo a adoção de hábitos mais saudáveis, além de políticas de conscientização e rastreamento precoce para reduzir a incidência e a mortalidade associadas à doença (Seiler *et al.*, 2018).

O câncer de mama é predominantemente uma doença feminina, com cerca de 99% dos casos ocorrendo em mulheres, enquanto apenas 1% afeta os homens. Apesar de sua raridade no público masculino, a incidência da doença tem apresentado um aumento contínuo, assim como ocorre entre as mulheres. Esse crescimento pode estar relacionado a fatores como o aumento da obesidade e a maior expectativa de vida, que expõem os indivíduos a períodos mais longos a aspectos que favorecem o desenvolvimento do tumor (Lima; Kehm; Terry, 2021).

#### 3.5.2 Fatores de risco do câncer de mama

Embora a causa exata da carcinogênese no câncer de mama ainda não tenha sido completamente elucidada, diversos fatores de risco já foram identificados como influentes no seu desenvolvimento. Entre os mais relevantes estão o gênero, a idade e o nível de desenvolvimento econômico de um país, fatores esses que também se refletem nos dados epidemiológicos (Obeagu; Obeagu, 2024). Além disso, fatores hormonais desempenham um papel crucial, especialmente aqueles relacionados ao tempo de exposição aos estrogênios. Questões reprodutivas, como o número de filhos, a idade do primeiro parto e a duração da amamentação, também estão associadas ao risco de desenvolver a doença (Bonfiglio; Di Pietro, 2021).

Além dos fatores hormonais e reprodutivos, aspectos genéticos possuem grande relevância na predisposição ao câncer de mama, assim como o uso de terapia de reposição hormonal (Obeagu; Obeagu, 2024), hábitos alimentares inadequados e a obesidade (Seiler *et* 

al., 2018). Outros fatores de risco incluem o uso de contraceptivos hormonais, o consumo excessivo de álcool e a exposição precoce à radiação ionizante que podem aumentar a probabilidade do surgimento da doença (Smolarz; Zadrożna Nowak; Romanowicz, 2022).

Quando se trata dos fatores genéticos hereditários importantes para o desenvolvimento do câncer de mama, as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são as mais conhecidas. O gene BRCA1, localizado no cromossomo 17, e o BRCA2, no cromossomo 13, codificam proteínas envolvidas na reparação do DNA e na manutenção da estabilidade genômica (Sekine; Nishino; Enomoto, 2021). As mutações em BRCA1 estão associadas ao câncer de mama triplo-negativo (Abdel-Razeq *et al.*, 2021), enquanto as mutações em BRCA2 estão mais ligadas ao câncer de mama com expressão do receptor de estrogênio (Talhouet *et al.*, 2020). Genes como ATM, BRIP1, CHEK2 e PALB2 conferem um risco moderado, aumentando a predisposição ao câncer de mama em duas a três vezes (Chamseddine *et al.*, 2022). Apesar do impacto dessas mutações genéticas, mais de 90% dos casos de câncer de mama resultam de mutações somáticas esporádicas. O histórico familiar também influencia o risco: mulheres com um parente de primeiro grau afetado têm o dobro da probabilidade de desenvolver a doença, e esse risco pode ser de três a seis vezes maior se houver dois parentes próximos diagnosticados, diminuindo quando o diagnóstico ocorre em idades mais avançadas (Nardin *et al.*, 2020).

Um estudo de revisão, demonstrou que a maior parte dos estudos analisados, embora não em sua totalidade, identificou uma relação relevante entre o consumo excessivo dos produtos ricos em gorduras saturadas, carnes vermelhas e processadas, açúcares adicionados, alimentos fritos e grãos refinados contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, enquanto uma alimentação baseada no consumo elevado de vegetais, frutas, peixes, leguminosas e óleos vegetais pode ter um efeito protetor contra este tipo de câncer (Dandamudi *et al.*, 2018). Apesar disso, o nível de comprovação científica ainda é insuficiente para recomendações definitivas, mas uma dieta equilibrada pode dieta saudável e equilibrada poderia ser encorajada para reduzir a mortalidade global (Maumy *et al.*, 2019).

#### 3.5.3 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

A mamografia é amplamente reconhecida como o principal exame de rastreamento para o câncer de mama, sendo especialmente eficaz em mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos (Nardin *et al.*, 2020). Esse método apresenta uma sensibilidade variando entre 75 e 95%, enquanto sua especificidade está entre 80 e 95% (Elmore *et al.*, 2005), garantindo um alto nível de precisão na detecção da doença. Para mulheres com suspeita de câncer de mama hereditário, a ressonância magnética mamária é utilizada como teste de triagem complementar. Caso uma

lesão suspeita seja identificada na mamografia, a investigação prossegue com um exame de ultrassonografia, seguido, se necessário, por uma biópsia por agulha grossa e um exame histopatológico para confirmação do diagnóstico (Smolarz; Zadrożna Nowak; Romanowicz, 2022).

Os procedimentos cirúrgicos utilizados no tratamento do câncer de mama podem variar de acordo com o estágio da doença, as características do tumor e a escolha da paciente. As principais abordagens incluem a excisão do tumor, a mastectomia e a remoção dos linfonodos axilares (Keelan; Flanagan; Hill, 2021). A radioterapia é um componente essencial no tratamento conservador da mama, sendo recomendada para todas as pacientes submetidas a esse tipo de procedimento. Sua aplicação visa minimizar as chances de recidiva local e pode ser indicada também para pacientes que passaram por mastectomia e apresentaram metástases em linfonodos axilares (Haussmann *et al.*, 2020). A quimioterapia, por sua vez, é utilizada quando há risco de disseminação sistêmica da doença, podendo ser combinada com a radioterapia. Já a terapia hormonal é direcionada a pacientes com expressão do receptor de estrogênio, sendo utilizada para reduzir a ação dos hormônios femininos na progressão do câncer (Melo-Alvim *et al.*, 2023).

Diante do aumento da incidência e da complexidade do câncer de mama, a detecção precoce, as medidas preventivas e os avanços no tratamento continuam sendo fundamentais para melhorar os desfechos dos pacientes (Nardin *et al.*, 2020). Embora fatores genéticos e de estilo de vida desempenhem um papel significativo no desenvolvimento da doença, a adoção de hábitos mais saudáveis e a implementação de programas eficazes de rastreamento podem contribuir para a redução da morbidade e da mortalidade (Maumy *et al.*, 2019). Além disso, pesquisas contínuas sobre novas abordagens terapêuticas, incluindo terapias-alvo e imunoterapia, oferecem perspectivas promissoras para tratamentos mais personalizados e eficazes (Melo-Alvim *et al.*, 2023). Assim, uma abordagem multidisciplinar que integre prevenção, diagnóstico precoce e terapias inovadoras é essencial para enfrentar o impacto global do câncer de mama e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Haussmann *et al.*, 2020; Keelan; Flanagan; Hill, 2021).

#### 3.6 Papel das proteínas da família BCL-2 no câncer de mama

A família de proteínas BCL-2 é composta por membros estruturalmente relacionados, mas com funções alternativas na regulação da apoptose. Descoberta na década de 1980 devido à sua associação com a translocação cromossômica t(14;18) em linfomas foliculares, a BCL-2 foi posteriormente identificada como um oncogene que promove a sobrevivência celular, em

vez da especificação, diferenciando-se de outros oncogenes da época (Czabotar *et al.*, 2014). As proteínas da família Bcl-2 podem ter 3 classificações: as efetoras, que criam os poros mitocondriais e induzem a apoptose, a exemplo das proteínas BAX e BAK; as anti-apoptóticas como a Bcl-2 e Mcl-,1 que são responsáveis por bloquear a ação das proteínas pró-apoptóticas pertencentes a família Bcl-2, sendo por esta razão importantes na resistência quimioterapêutica; e as proteínas somente BH3, como a BID e BIM, que promovem a apoptose, seja pela ativação da BAX ou impendido a atuação das proteínas anti-apoptóticas (Flores-Romero *et al.*, 2022).

A expressão anormal de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2, é comumente encontrada em células cancerígenas, o que aumenta sua quimiorresistência. Em relação à sua estrutura, o domínio BH3 está presente em todas as proteínas da família Bcl-2, onde as consideradas antiapoptóticas possuem quatro domínios diferentes, sendo a porção BH3 altamente conservada e com um bolsão hidrofóbico de ligação a este domínio, que atua como receptor desta macromolécula (Kale; Osterlund; Andrews, 2017). A estrutura proteica deste bolsão hidrofóbico, que possui, aproximadamente 20 Å dá-se por quatro estruturas em α-hélice, sendo as principais regiões de interação as bolsas denominadas P2 e P4 (Souers *et al.*, 2013).

A via apoptótica intrínseca é ativada em resposta a diversos estresses celulares, como a depleção de fatores de crescimento, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA causados por quimioterapia (Lee; Fairlie, 2021). Em células saudáveis, as proteínas próapoptóticas BAX e BAK permanecem inativadas no citosol ou ligadas a proteínas prósobrevivência nas mitocôndrias. Quando um estímulo de morte ocorre, as proteínas somente BH3 são reguladas positivamente e interagem com as proteínas prósobrevivência, liberando BAX/BAK ativadas ou diretamente induzindo sua ativação. Isso leva à sua oligomerização e à formação de poros na membrana mitocondrial externa, resultando na liberação do citocromo c no citosol. Esse evento desencadeia a via apoptótica intrínseca, culminando na formação do apoptossomo, que ativa sequencialmente as caspases 9 e 3/7, promovendo a degradação de substratos intracelulares essenciais e levando à morte celular programada (Jan; Chaudhry, 2019).

A proteína Bcl-2 desempenha um papel central na regulação da apoptose ao interagir com essas proteínas pró-apoptóticas, formando complexos com BAX e BAK, impedindo sua ativação e garantindo a integridade mitocondrial. Esse mecanismo de inibição é essencial para a sobrevivência celular, especialmente em células cancerígenas, que frequentemente superexpressam Bcl-2 para escapar da apoptose (Lee; Fairlie, 2021). As proteínas somente BH3, como BAD, BIM, PUMA e BID, desempenham também de antagonizar a Bcl-2. Essas

proteínas funcionam como sensores de estresse celular e, ao se ligarem a Bcl-2, neutralizam sua ação inibitória, permitindo que BAX e BAK desencadeiem a apoptose (Mohan *et al.*, 2024).

Além disso, compostos sintéticos conhecidos como miméticos de BH3 foram desenvolvidos para imitar essa função. Esses compostos interrompem a interação entre Bcl-2 e proteínas pró-sobrevivência, promovendo a ativação da via apoptótica e sendo considerados estratégias promissoras no tratamento do câncer. Atualmente, vários compostos têm sido desenvolvidos para inibir seletivamente proteínas pró-sobrevivência da família BCL-2, oferecendo novas perspectivas para o tratamento do câncer (Lee; Fairlie, 2021).

A pesquisa sobre o direcionamento de proteínas BCL-2 no câncer tem se concentrado principalmente no desenvolvimento de pequenas moléculas miméticas de BH3. No entanto, também há esforços significativos voltados para a criação de moléculas baseadas em peptídeos BH3. Embora os peptídeos enfrentem desafios como a degradação por proteases e a dificuldade de atravessar membranas celulares, eles se destacam como um modelo valioso para desenvolver estratégias que contornem esses problemas. Sua capacidade de serem facilmente analisados, sua alta afinidade por alvos específicos e seu potencial terapêutico tornam essa abordagem promissora no campo da oncologia (Lee; Fairlie, 2021). Apesar dos avanços, os peptídeos direcionados às proteínas BCL-2 ainda não ultrapassaram os estágios laboratoriais e precisam ser mais explorados antes de se tornarem opções terapêuticas viáveis.

#### 3.7 A ação anticâncer de peptídeos bioativos

A quimioterapia convencional é amplamente utilizada no tratamento do câncer, baseando-se na administração de agentes citotóxicos com o intuito de eliminar células tumorais. Contudo, um dos principais desafios deste método reside na sua baixa especificidade, já que os compostos circulam pela corrente sanguínea e afetam, além das células cancerígenas, células e tecidos saudáveis, resultando em efeitos colaterais significativos (Nurgali; Jagoe; Abalo, 2018).

Problemas adicionais, como a resistência aos medicamentos, a rápida depuração, a biotransformação e a biodistribuição alterada, bem como o enfraquecimento do sistema imunológico, limitam ainda mais a eficácia dessa abordagem (Jalil *et al.*, 2023).

Em face dessas limitações, estratégias de quimioterapia direcionada têm sido desenvolvidas para concentrar a ação terapêutica exclusivamente nas células cancerígenas. Essa abordagem visa minimizar os danos aos tecidos saudáveis, proporcionando uma administração específica do agente anticâncer. Os últimos anos testemunharam um aumento no desenvolvimento de peptídeos terapêuticos para uma ampla gama de doenças. Os peptídeos são

considerados bons agentes terapêuticos devido a aspectos como flexibilidade, fácil modificação, baixa imunogenicidade e baixo custo de produção (Jalil *et al.*, 2023).

O uso de peptídeos terapêuticos no tratamento do câncer é uma estratégia nova e intrigante. Esses peptídeos fornecem excelentes perspectivas para a administração direcionada de medicamentos devido à sua alta seletividade, especificidade, pequenas dimensões, boa biocompatibilidade e simplicidade de modificação (Schaduangrat *et al.*, 2019). A especificidade do alvo e a toxicidade mínima são benefícios dos peptídeos terapêuticos.

Peptídeos derivados de diversas fontes alimentares têm sido amplamente investigados por suas propriedades anticarcinogênicas, demonstrando potencial no combate a diferentes tipos de câncer. Um exemplo notável foi um estudo realizado com hidrolisado total obtido do molusco Cyclina sinensis. O estudo avaliou os efeitos antitumorais do pentapeptídeo ILYMP, sobre células de câncer de próstata DU-145. Os resultados demonstraram que o peptídeo possui uma notável capacidade de inibir a proliferação celular e induzir apoptose. O ensaio MTT revelou que o ILYMP inibiu significativamente o crescimento das células DU-145 de forma dose-dependente, com um IC<sub>50</sub> de 11 mM em 72 horas, alcançando uma taxa de inibição de 84% na concentração de 22 mM. A indução da apoptose foi confirmada por ensaios de coloração com acridina laranja/brometo de etídio e microscopia eletrônica, evidenciando características apoptóticas típicas, como condensação de cromatina e formação de corpos apoptóticos. A análise por citometria de fluxo revelou que o tratamento com 18 mM de ILYMP aumentou a taxa de apoptose de 6% no controle para 20%. A expressão de proteínas associadas à apoptose também foi avaliada por western blot. Os resultados mostraram que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax aumentou aproximadamente 2,3 vezes, enquanto a proteína antiapoptótica Bcl-2 foi reduzida em cerca de 65% após tratamento com 18 mM de ILYMP, indicando um aumento significativo na razão Bax/Bcl-2, favorecendo a apoptose. Além disso, verificou-se um aumento expressivo nos níveis de caspase-9 e caspase-3 clivadas, em 1,8 e 2,5 vezes, respectivamente, reforçando a ativação da via mitocondrial da apoptose. Dessa forma, os achados indicam que o pentapeptídeo ILYMP apresenta um efeito antiproliferativo significativo e induz apoptose em células de câncer de próstata DU-145 (Yu et al., 2018).

Recentemente, pesquisadores mexicanos estudaram atividade antioxidante e antiproliferativa em células de câncer de cólon humano (Caco-2) do hidrolisado proteico produzido pela ação da pepsina e da proteína bruta. Os resultados demonstraram que o hidrolisado possui ação antioxidante, além da capacidade de inibir a proliferação celular de maneira dose-dependente. A atividade antioxidante foi avaliada por meio do ensaio de Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP), onde o hidrolisado apresentou um valor de 1435 µmol

TE/g, um aumento de aproximadamente 57% em relação à proteína bruta das folhas, que apresentou 912 μmol TE/g. Além disso, o hidrolisado demonstrou capacidade antioxidante celular, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em 73 e 84% nas concentrações de 250 e 500 μg/mL, respectivamente. Em relação ao efeito antiproliferativo, os valores observados foram 78 e 90% de inibição da proliferação celular para as concentrações de 200 e 500 μg/mL, respectivamente. Esses valores foram muito superiores ao controle positivo com 5-fluorouracil (5-FU) a 250 μM, que inibiu apenas 23% da proliferação das células Caco-2. Além disso, o hidrolisado não apresentou efeitos citotóxicos sobre células saudáveis do cólon (CCD-18Co) até a concentração de 500 μg/mL, sugerindo que sua ação é seletiva contra células tumorais. Portanto, os resultados destacam o potencial dos peptídeos de *Moringa oleifera* como ingredientes funcionais com propriedades antioxidantes e anticancerígenas (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2024).

Anteriormente, estudo identificou um novo peptídeo a partir do hidrolisado proteico oriundos do alho (Allium sativum), denominado VS-9, que apresentou atividade anticancerígena contra células MOLT-4, células leucêmicas T leucêmicas derivada de um paciente com leucemia linfoblástica aguda, e K562, linhagem de células mieloides derivada de um paciente com leucemia mieloide crônica. A inibição da proliferação celular foi significativa, com um IC<sub>50</sub> de 0,84 mM para a linhagem MOLT-4 e 1,57 mM para a K562, enquanto a toxicidade para células normais de sangue periférico, foi mínima. Além disso, análises de citometria de fluxo revelaram um aumento na apoptose das células tratadas, atingindo 36% para MOLT-4 e 29% para K562. O efeito apoptótico foi corroborado pela modulação da expressão gênica, com aumento dos níveis de caspase-3, caspase-8, caspase-9 e Bax, e redução da expressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w. Estudos de docking molecular indicaram que o VS-9 se liga com alta afinidade às proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, apresentando energias de ligação de -52,97 kcal/mol para Bcl-2 e -51,46 kcal/mol para Bcl-xL Essa interação foi confirmada experimentalmente por cromatografia de afinidade e LC-MS/MS, que indicaram um aumento de 4,1 vezes na intensidade da Bcl-2 ligada ao VS-9 (Rasaratnam et al., 2021).

Um outro estudo investigou a ação do peptídeo BIRD-2 na indução de morte celular em cânceres de células B, como linfoma difuso de grandes células B e leucemia linfocítica crônica. O tratamento com 10 µM de BIRD-2 por seis horas aumentou a ativação das caspases 3/7 em 65%, evidenciando um processo apoptótico. Além disso, o peptídeo provocou um rápido aumento na captação de cálcio mitocondrial, resultando na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial em apenas 3 segundos e na redução de 30% na fluorescência

mitocondrial de calceína após 30 minutos, confirmando o colapso mitocondrial. Em células da linhagem KARPAS-422, o BIRD-2 também mostrou forte atividade citotóxica, aumentando a ativação da caspase-3 em 50% e promovendo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, reduzindo a fluorescência de calceína em 60%. O impacto do peptídeo também foi evidente em amostras primárias de pacientes com leucemia linfocítica crônica, onde o tratamento com 10 μM por 24 horas elevou a morte celular em 65%. Em uma amostra específica, a captação mitocondrial de cálcio aumentou em 75%, confirmando a intensa desregulação do metabolismo mitocondrial. Os resultados demonstram que o BIRD-2 induz a morte celular por meio da sobrecarga de cálcio mitocondrial e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, independentemente das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. (Kerkhofs *et al.*, 2021). Esses achados reforçam o potencial de peptídeos como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas.

As proteínas de leguminosas, têm sido amplamente estudadas devido ao potencial bioativo dos peptídeos gerados por sua hidrólise. Estudos indicam que esses peptídeos atuam em diferentes fases da carcinogênese, modulando vias moleculares associadas à proliferação celular e apoptose, o que pode contribuir para a inibição do crescimento tumoral (Montales *et al.*, 2015). Além disso, pesquisas com culturas celulares tumorais demonstraram que proteínas e hidrolisados proteicos da soja possuem significativa atividade antitumoral, reduzindo a viabilidade de células cancerígenas por meio da indução da apoptose e da regulação de proteínas envolvidas na progressão do tumor (Mcconnell *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Li *et al.* (2019) avaliou os efeitos anticancerígenos de hidrolisados de proteína do feijão-mungo (*Vigna radiata*) obtidos por diferentes enzimas: alcalase, protease neutra e papaína. Entre os três hidrolisados testados, o preparado com papaína apresentou a maior taxa de inibição da proliferação de células HepG2 (79% a 16 mg/mL), sendo selecionado para estudos mais detalhados. Esse hidrolisado foi posteriormente fracionado por ultrafiltração e cromatografia em gel Sephadex G-15, resultando na obtenção de cinco frações, das quais a fração A demonstrou a maior atividade antiproliferativa (86% a 3 mg/mL). A inibição da proliferação celular foi dependente da dose e do tempo, atingindo 92% a 16 mg/mL após 72 horas. Além disso, a análise por citometria de fluxo demonstrou que os peptídeos presentes na fração A induziram apoptose celular, com a taxa total de apoptose aumentando de 10% no grupo controle para 30% a 2 mg/mL, 43% a 4 mg/mL e 57% a 8 mg/mL. Os peptídeos também causaram a interrupção do ciclo celular na fase S em baixas concentrações (aumentando a proporção de células de 20 para 31%) e na fase G0/G1 em altas concentrações (elevando a proporção de células de 63% para 70%).

No estudo com camundongos portadores de tumores H22, a fração A reduziu significativamente o peso tumoral, resultando em taxas de inibição de 17% a 400 mg/kg/dia, 29,8% a 800 mg/kg/dia e 32,7% a 1600 mg/kg/dia. Além disso, os índices do timo e do baço aumentaram em relação ao grupo modelo, sugerindo um efeito imunomodulador. O índice do timo foi de 2,79 mg/g no grupo modelo e aumentou para 3,67 mg/g no grupo tratado com a maior dose, enquanto o índice do baço subiu de 4,96 mg/g para 6,24 mg/g. A contagem de glóbulos brancos também foi significativamente elevada, passando de 5,96 × 10<sup>9</sup>/L no grupo modelo para 8,09 × 10<sup>9</sup>/L no grupo tratado com a dose mais alta. Comparado ao quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU), que reduziu significativamente o peso dos camundongos e causou toxicidade hepática e renal, a fração A não demonstrou efeitos adversos significativos. Além disso, os níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2 diminuíram de 94,8 pg/mL no grupo modelo para 78,5 pg/mL, enquanto a proteína pró-apoptótica Bax aumentou de 4,1 ng/mL para 5,2 ng/mL. A caracterização da fração A revelou a presença de quatro peptídeos bioativos identificados por espectrometria de massas: VEG, PQG, LAF e EGA, que continham aminoácidos como ácido glutâmico, glicina, alanina, valina e isoleucina. Esses aminoácidos são frequentemente encontrados em peptídeos com atividade anticancerígena (Li et al., 2019).

Estudo recentemente com investigou o efeito de hidrolisados e frações de peptídeos de diferentes tamanhos a partir da proteína β-conglicinina da soja e β-vignina do feijão-caupi. Os resultados observados pelos autores demonstraram a inibição do crescimento de células de câncer de mama (MDA-MB-231) e de próstata (DU-145), quando as células foram tratadas com o hidrolisado proteico total e na fração peptídica com peptídeos menores do que 3 kDa, derivados das  $\beta$ -conglicinina e  $\beta$ -vignina. Nos testes *in vitro*, o hidrolisado da  $\beta$ -conglicinina reduziu a viabilidade celular da MDA-MB-231, com um IC<sub>50</sub> de 97,7 μg/mL, e das células DU-145, com um IC<sub>50</sub> de 179,9 μg/mL. Os peptídeos menores que 3 kDa derivados do hidrolisado de β-conglicinina apresentaram uma ação significativamente mais expressiva na linhagem MDA-MB-231, reduzindo a viabilidade celular de forma dose-dependente. A redução na viabilidade celular foi de aproximadamente 20% na menor concentração testada (12,5 µg/mL) e atingiu quase 80% na maior concentração (200 µg/mL). O IC<sub>50</sub> para essa linhagem foi de 97,7 µg/mL. Já o hidrolisado de β-vignina do feijão-caupi também reduziu a viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e DU-145. A viabilidade das células MDA-MB-231 foi reduzida em aproximadamente 45% na maior concentração testada, enquanto a viabilidade das células DU-145 foi reduzida em cerca de 40%, sem uma relação linear evidente entre dose e resposta. A análise in silico identificou seis peptídeos com potencial mimético da região BH3 da proteína Bcl-2, um alvo essencial na regulação da apoptose celular. Entre eles, o peptídeo VIPAAY, derivado da subunidade β da β-conglicinina da soja, apresentou interações similares ao fármaco Venetoclax, um reconhecido inibidor da Bcl-2 utilizado em tratamentos contra o câncer. O peptídeo VIPAAY estabeleceu ligações hidrofóbicas com resíduos da Bcl-2, incluindo Phe112, Met115, Phe104 e Ala149 no sítio P2, e interações adicionais no sítio P4, como ligações de hidrogênio com Asn143 e ligações salinas com Asp103. Além da modulação da apoptose via Bcl-2, mecanismos antioxidantes também podem estar envolvidos no efeito protetor de peptídeos bioativos contra o câncer (Philadelpho *et al.*, 2024a).

Outro estudo, investigou o efeito anticancerígeno dos peptídeos VIPASY e AQQSY derivados da β-vignina do feijão-caupi em células de câncer de cólon HCT-116. O peptídeo VIPASY apresentou um IC<sub>50</sub> de aproximadamente 283 μM para as células HCT-116 e 651 μM para as células não cancerosas CCD-33Co, resultando em um índice de seletividade de 2,30. Já o peptídeo AQQSY apresentou um IC<sub>50</sub> de 656 μM para HCT-116 e 759 μM para CCD-33Co, com um índice de seletividade de 1,14, indicando uma menor especificidade para células cancerosas. O peptídeo AQQSY induziu uma forte parada do ciclo celular na fase G0/G1, aumentando a população celular nessa fase em 80%. Esse efeito foi comparável ao do palbociclib, sugerindo que o AQQSY pode atuar como um inibidor de CDK-6. O tratamento com AQQSY reduziu a razão p-Rb/Rb em 44%, indicando menor fosforilação da proteína Rb e, consequentemente, inibição da progressão do ciclo celular. Na apoptose, VIPASY foi o mais eficiente, induzindo 45% de apoptose, enquanto AQQSY induziu 25%. O aumento da razão Bax/Bcl-2 foi maior no tratamento com AQQSY, atingindo 50%, e houve uma redução na expressão da proteína antiapoptótica XIAP em 26%. Além disso, o AQQSY reduziu a expressão da proteína Ki-67 em 39%, um marcador de proliferação celular, reforçando seu efeito antiproliferativo. O estudo também avaliou a combinação dos peptídeos com fármacos. Esses demostram o potencial terapêutico dos peptídeos derivados da β-vignina no tratamento do câncer de cólon (Philadelpho et al., 2024b).

O estudo investigou a atividade anticarcinogênica de peptídeos bioativos extraídos do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), gerados por digestão enzimática com seis proteases diferentes: alcalase, flavourzyme, quimotripsina, papaína, pepsina e tripsina. Entre elas, os peptídeos produzidos pela alcalase exibiram a maior atividade antiproliferativa e foram submetidos a fracionamento por ultrafiltração para separar frações de diferentes pesos moleculares. A fração de peptídeos com menos de 3 kDa apresentou a maior eficácia contra células cancerígenas. Os ensaios de citotoxicidade revelaram que o hidrolisado gerados pela alcalase apresentou a maior eficácia na inibição do crescimento celular. A linhagem Ishikawa (câncer endometrial) foi a mais sensível ao tratamento, com um IC<sub>50</sub> de 101 µg/mL, valor

próximo ao do tamoxifeno (IC<sub>50</sub> 86 µg/mL). Em outras linhagens, este hidrolisado também apresentou efeito inibitório significativo, com valores de IC<sub>50</sub> de 126 μg/mL para A549 (câncer de pulmão), 114 µg/mL para HepG2 (câncer de fígado), 110 µg/mL para MCF-7 (câncer de mama), 107 μg/mL para MDA-MB-231 (câncer de mama) e 133 μg/mL para PA-1 (câncer de ovário). Dentro das frações obtidas a partir desse hidrolisado, a fração com menos de 3 kDa apresentou a maior atividade antiproliferativa, reduzindo a viabilidade das células Ishikawa entre 27 e 63%, dependendo da concentração do peptídeo (5 a 500 µg/mL). A apoptose foi confirmada pelos efeitos dos peptídeos da fração <3 kDa da alcalase, que induziram fragmentação do DNA e ativação da caspase-3. A ativação da caspase-3 foi observada de maneira dose-dependente, atingindo um aumento de 4,8 vezes em relação ao controle nas células tratadas com 500 µg/mL dessa fração. A análise da expressão de proteínas reguladoras da apoptose mostrou que os peptídeos dessa mesma fração reduziram a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumentaram a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, favorecendo a indução da morte celular. Além disso, os peptídeos dessa fração promoveram um aumento na permeabilidade da membrana celular, conforme demonstrado pelo ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), que aumentou de 24% no controle para 69% nas células tratadas com 500 µg/mL. Os peptídeos da fração <3 kDa da alcalase também induziram um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), passando de 76% no grupo controle para 212% no grupo tratado com 500 µg/mL do peptídeo, um valor comparável ao do tamoxifeno (288%). Esse aumento no estresse oxidativo pode ter contribuído para a morte celular. Além disso, o tratamento com os peptídeos da fração <3 kDa da alcalase induziu uma parada do ciclo celular nas fases S e G2, reduzindo a porcentagem de células nessas fases de 18% para 11% (fase S) e de 13% para 7,4% (fase G2), impedindo a progressão para a divisão celular. A análise de espectrometria de massa identificou o peptídeo ADLPGLK como o principal responsável pela atividade antiproliferativa. Esse peptídeo, encontrado na fração <3 kDa da alcalase, tem um peso molecular de 713,4 Da e uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos (40%), o que pode favorecer sua interação com componentes celulares e sua eficácia antitumoral. Os peptídeos gerados pela alcalase, especialmente a fração <3 kDa contendo o peptídeo ADLPGLK, demonstraram forte atividade anticancerígena, atuando por meio da indução de apoptose, ativação de caspase-3, aumento da geração de ROS, parada do ciclo celular e danos à membrana celular.

#### 3.8 Peptídeos derivados da soja com propriedade anticâncer

Entre as leguminosas, as proteínas da soja (*Glycine max*) têm sido as mais estudadas quanto à presença de peptídeos antitumorais (Chen *et al.*, 2019; Dia; De Mejia, 2010; Hsieh *et al.*, 2022; 2018; Pan *et al.*, 2018).

A lunasina, um peptídeo de 43 resíduos de aminoácidos originalmente isolado da albumina 2S desta leguminosa, tem demonstrado exercer notável atividade antitumoral e antiinflamatória (Hsieh *et al.*, 2018), bem como atividade protetora contra o estresse oxidativo (Fernández-Tomé *et al.*, 2014).

Um trabalho de utilizando este peptídeo avaliou sua ação anticarcinogênica em diferentes linhagens celulares, com destaque para a leucêmica L1210, além de HL60 (outra linhagem leucêmica), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e MCF-7 (câncer de mama). Em células de leucemia L1210, a lunasina purificada apresentou IC<sub>50</sub> de 14 µM, enquanto a farinha de soja enriquecida com lunasina teve um valor IC<sub>50</sub> de 16 µM. O tratamento com 1 mg/mL de farinha enriquecida por 18 horas aumentou a quantidade de células apoptóticas de 2% para 40%. Além disso, a exposição por 24 horas aumentou a fração de células no estágio sub-G1 para 44% com a dose de 0,3 mg/mL e para 73% com a dose de 1,0 mg/mL. O tratamento também levou a um bloqueio na fase G2 do ciclo celular, com um aumento de células nessa fase de 25% no grupo controle para 36% naqueles tratados com 5 miligramas por mililitro de farinha enriquecida. A apoptose foi mediada pela ativação das caspases 8 e 9, que tiveram um aumento de 6 vezes, e da caspase 3, cuja expressão foi 12 vezes maior. Em relação à linhagem HL60, a lunasina e a farinha enriquecida não demonstraram efeito citotóxico significativo nas concentrações utilizadas. Isso foi observado para as células HepG2 e para as células MCF-7 de câncer de mama, indicando que o efeito da lunasina pode ser específico para determinadas linhagens celulares (Mejia; Wang; Dia, 2010).

Outro estudo com a lunasina demonstrou que o peptídeo possui forte atividade inibitória sobre células de câncer colorretal HCT-116, tanto na população tumoral geral quanto na subpopulação derivada de esferoides tumorais. A análise de viabilidade celular revelou que lunasina reduz a proliferação celular de maneira dose-dependente, com uma diminuição de 13% a 10  $\mu$ M e de 64% na maior concentração avaliada (160  $\mu$ M), sendo o IC50 determinado em 107  $\mu$ M. Em relação à formação de tumorspheres, a inibição só foi significativa a partir de 20  $\mu$ M, e dentro da faixa de 20 a 160  $\mu$ M, a lunasina reduziu expressivamente a capacidade de formação dessas estruturas, com um IC50 de 161,0  $\pm$  2,4  $\mu$ M. A avaliação da apoptose revelou um aumento significativo na população de células apoptóticas após o tratamento com lunasina. Em células HCT-116 aderentes, as concentrações de 20, 40 e 80  $\mu$ M aumentaram a apoptose em 1,3x, 1,7x

e 1,8x, respectivamente, enquanto nos tumorspheres, a lunasina a 40 e 80 μM induziu um aumento de 2,0x na apoptose, predominantemente em estágios tardios. Esse efeito apoptótico foi confirmado pela ativação da caspase-3 e pela clivagem da proteína PARP, indicando a ativação da via mitocondrial da apoptose. Além da indução da apoptose, este peptídeo também afetou a progressão do ciclo celular, promovendo um acúmulo significativo de células na fase G1. Nas células HCT-116 aderentes, a fase G1 aumentou de 66% no controle para 72% na dose de 80 μM, enquanto nos tumorspheres, a lunasin na mesma concentração elevou essa fase para 74% e reduziu a proporção de células na fase S, sugerindo uma inibição da replicação celular. Esse bloqueio do ciclo celular foi associado ao aumento na expressão da proteína p21, um inibidor da progressão celular (Fernández-Tomé *et al.* 2020).

Pesquisa realizada por Chen *et al.* (2019) investigou peptídeos bioativos derivados do subproduto da soja preta, buscando identificar compostos com potencial antioxidante e anticancerígeno. A pesquisa utilizou técnicas de purificação e caracterização molecular para isolar o peptídeo Leu/Ile-Val-Pro-Lys (L/I-VPK), avaliando sua eficácia contra espécies reativas de oxigênio e células tumorais humanas. Em testes de capacidade antioxidante, o peptídeo purificado apresentou valores de IC<sub>50</sub> de 0,12 μM para a eliminação do radical DPPH e 0,037 μM para o radical hidroxila. Na avaliação citotóxica, o peptídeo apresentou IC<sub>50</sub> de 0,22 μM para células HepG2 (carcinoma hepatocelular), 0,15 μM para MCF-7 (câncer de mama) e 0,32 μM para Hela (câncer cervical). Esses valores indicam um efeito citotóxico significativo, especialmente quando comparados ao Paclitaxel, um fármaco de referência que apresentou IC<sub>50</sub> de 35 μg/mL para HepG2. Estudos de docking molecular revelaram que o peptídeo interage com proteínas-chave da apoptose, exibindo energia de ligação de -6,5 kcal/mol para caspase-3, a mais forte dentre as interações analisadas, além de -4,6 kcal/mol para XIAP, -4,9 kcal/mol para caspase-7 e -4,5 kcal/mol para Bcl-2.

O trabalho desenvolvido por Hsieh *et al.* (2022) demonstrou que os hidrolisados proteicos da soja, obtidos pela ação da bromelina e termolisina, apresentam atividade antiproliferativa contra a linha celular de carcinoma oral humano HSC-3. A avaliação da viabilidade celular revelou que, em 72 horas de tratamento, o hidrolisado de soja com bromelina apresentou uma inibição do crescimento celular variando de 35% a 72%, na faixa de concentração de 0,5 a 2 mg/mL, enquanto o hidrolisado de soja com termolisina exibiu uma inibição maior, variando de 39 a 76%, no mesmo intervalo de concentração. Os valores de IC<sub>50</sub> foram 0,74 mg/mL para o hidrolisado e 0,60 mg/mL, para o hidrolisado de bromelaina e termolisina, respectivamente. A análise do ciclo celular revelou que ambos os hidrolisados induziram a parada do ciclo na fase S após 72 horas de exposição. No caso do tratamento com

hidrolisado de soja com bromelina, a porcentagem de células na fase S aumentou de 14% (controle) para 24% a 0,25 mg/mL e atingiu 29% a 1,0 mg/mL. Para o hidrolisado de soja com termolisina, a porcentagem de células na fase S aumentou de 11 para 44% a 0,25 mg/mL, mas diminuiu para 23 e 24% nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, respectivamente. O acúmulo de células na fase S foi acompanhado por uma redução na fase G0/G1, indicando um bloqueio na progressão do ciclo celular. Além disso, observou-se uma redução na expressão das proteínas ciclina E e CDK2 no tratamento com hidrolisado de soja com bromelina, enquanto o hidrolisado de soja com termolisina reduziu a expressão de ciclina E, ciclina A, p21 e p27, sem alterar os níveis de CDK2. A avaliação da apoptose mostrou que o hidrolisado de soja com termolisina foi o principal responsável pela indução de morte celular programada. O tratamento com 0,5 mg/mL e 1 mg/mL desse hidrolisado resultou em um aumento significativo das células em apoptose tardia, atingindo 60 e 64%, respectivamente. Além disso, o hidrolisado de soja com termolisina promoveu aumentos na expressão das proteínas p53 e caspase-3 clivada, enquanto reduziu os níveis de Bcl-2, PARP, caspase-3 e caspase-9, indicando um mecanismo de apoptose mediado pela via mitocondrial. Por outro lado, o hidrolisado de soja com bromelina apresentou um perfil distinto, sugerindo um efeito predominantemente necrótico, com um aumento da população de células necrosadas especialmente na concentração de 1 mg/mL.

Diante dos inúmeros estudos sobre peptídeos com atividade anticarcinogênica, evidencia-se o potencial dos hidrolisados proteicos e peptídeos como agentes bioativos no combate ao câncer, e sua atuação em diversos mecanismos que levam células tumorais das mais diversas linhagens a entrar em parada celular ou em apoptose.

#### 3.9 Obtenção, características e funcionalidade dos peptídeos de soja

Alimentos funcionais como os peptídeos derivados da soja não só fornecem nutrição, mas também têm o potencial de prevenir e tratar diversas doenças, aumentando assim o interesse pela pesquisa na busca de produtos advindos da soja. Devido à sua natureza química, que difere dos metabólitos secundários, podem ter diferentes alvos e apresentar sinergismo se combinados com drogas convencionais ou fitoquímicos (Hasan *et al.*, 2023).

Recentemente, tem crescido o interesse na aplicação de peptídeos bioativos na terapia do câncer como alternativa ou complemento às drogas convencionais, especialmente para diminuir os graves efeitos colaterais e reverter a resistência multidrogas (Huang *et al.*, 2023). Peptídeos bioativos podem ser obtidos por processo de hidrólise enzimática *in vitro*; fermentação, através de bactérias ácido láticas; processamento de alimentos, pela modificação de pH, tratamento térmico, isolamento de proteínas, processamento de ultra/alta pressão e

condições de armazenamento (Barati *et al.*, 2020); e digestão gastrointestinal (Chatterjee; Gleddie; Xiao, 2018).

Além disso, os peptídeos podem ser obtidos de organismos vivos, incluindo mais de 3.000 espécies vegetais; famílias vegetais como Fabaceae, Asteraceae, Solanaceae, Cucurbitaceae e Brassicaceae são particularmente ricas em peptídeos anticancerígenos (Ghaly *et al.*, 2023). Com base em sua fonte, os peptídeos bioativos podem ser naturais (moléculas bem definidas ou hidrolisados de proteínas), artificialmente modificados (por exemplo, para resistir à proteólise ou para transportar moléculas de carga), ou sintetizados *in vitro* (Zasheva *et al.* 2024).

Estudos mostram que o peptídeo quando purificado é absorvido mais rapidamente pelo corpo do que aminoácidos isolados (Nath *et al.*, 2019). Trabalhos recentes indicam também que o intestino delgado possui um mecanismo distinto para absorver peptídeos não modificados, especialmente aqueles de baixo peso molecular (Amigo; Hernandez-Ledesma, 2020).

Os peptídeos anticancerígenos geralmente são compostos por 10 a 100 aminoácidos ligados por ligações peptídicas de maneira linear ou cíclica. Eles apresentam melhor biocompatibilidade e biodegradabilidade em comparação com drogas convencionais, além de variabilidade estrutural e alta afinidade de ligação, tornando-os ferramentas versáteis para o direcionamento seletivo de tumores (Huang *et al.*, 2023). Historicamente, a identificação de peptídeos anticâncer foram realizadas em laboratórios utilizando abordagens experimentais com procedimentos que demandam tempo, mão de obra e que possuem altos custos (Liscano; Oñate-Garzón; Delgado, 2020). No entanto, estudos recentes vêm incorporando recursos computacionais para analisar as possíveis interações entre peptídeos anticâncer e diferentes proteínas envolvidas no processo de carcinogênese, conseguindo assim acelerar o processo de identificação destes compostos (Lee *et al.*, 2019). Essas ferramentas computacionais oferecem previsões sobre as atividades potenciais dos peptídeos anticâncer antes da realização de testes *in vitro*, resultando em uma redução de tempo, custo e um aumento na eficiência da produção (Liscano; Oñate Garzón; Delgado, 2020).

Nos últimos anos, o uso de inteligência artificial tem permitido o desenvolvimento de métodos computacionais que conseguem prever sequências de peptídeos com atividade anticâncer (Tallorin *et al.*, 2018). Tais técnicas também têm sido ativamente usadas para a triagem de possíveis efeitos adversos, imunogenicidade ou degradabilidade por peptidases, predizendo parâmetros farmacocinéticos destes compostos (Ghaly *et al.*, 2023).

Para a aplicação de peptídeos bioativos com ação antitumoral, é fundamental comparar características como a fluidez da membrana, o aumento da área de superfície celular, a maior

carga líquida negativa e a superexpressão de certos receptores na superfície das células entre linhagens tumorais e não tumorais, pois as interações dos peptídeos anticâncer com as membranas celulares tumorais envolvem diversos fatores que promovem modificações na carga e na estrutura da membrana (Chiangjong; Chutipongtanate; Hongeng, 2020). A hipoxia e o aumento das espécies reativas de oxigênio alteram o microambiente tumoral, desorganizando a distribuição dos fosfolipídios entre as camadas internas e externas da membrana plasmática, resultando na exposição da fosfatidilserina aniônica, altamente expressa na camada externa, facilitando o reconhecimento por peptídeos anticâncer catiônicos (Felício et al., 2017). Outros fatores, como o aumento do número microvilosidades, aumentam a área de superfície de contato, e a redução do colesterol e da rigidez da membrana, favorecem interações hidrofóbicas que aumentam a citotoxicidade seletiva dos peptídeos anticâncer (Baxter et al., 2017). Os peptídeos anticâncer possuem diversos mecanismos de ação, podendo romper a integridade da membrana celular ao formar poros, ligar-se a receptores e ativar sinalizações descendentes, ou penetrar na célula para exercer efeitos citotóxicos internos (Chiangjong; Chutipongtanate; Hongeng, 2020). Conhecer o mecanismo de ação e correlacionar a estrutura e função destes compostos é importante para entender o potencial terapêutico desses peptídeos, especialmente aqueles com sequências de aminoácidos bem caracterizadas (Trapotsi; Hosseini-Gerami; Bender, 2021).

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Sequência primária da β-conglicinina

As sequências primárias (FASTA) das subunidades da proteína  $\beta$ -conglicinina foram obtidas a partir do banco de dados especializado em proteínas, UniProt BETA (<a href="https://beta.uniprot.org/">https://beta.uniprot.org/</a>). A busca pelas sequências das subunidades da  $\beta$ -conglicinina foi realizada utilizando identificadores específicos para cada uma delas. Para a subunidade  $\beta$ , foram utilizados os códigos GLCB1\_SOYBN. Para a subunidade  $\alpha$ , o identificador utilizado foi GLCA1\_SOYBN. Por fim, a subunidade  $\alpha$ ' foi acessada por meio do identificador GLCAP\_SOYBN. As sequências FASTA obtidas foram armazenadas para futuras análises.

#### 4.2 Mimetização da digestão gastrointestinal

As sequências FASTA das subunidades da proteína β-conglicinina da soja, previamente obtidas, foram inseridas no servidor BIOPEP (BIOPEP UWM database, Olsztyn, Województwo warmińsko-mazurskie, Polônia), disponível no endereço eletrônico: <a href="http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep">http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep</a>. Por meio desse servidor, foi realizada uma simulação virtual com ação hidrolítica sequencial das enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina (EC 3.4.21.1) sobre as sequências da β-conglicinina. Esse processo resultou na obtenção de um hidrolisado proteico, composto por fragmentos de peptídeos de diferentes tamanhos e sequências. A hidrólise das três subunidades da β-conglicinina gerou um total de 214 peptídeos. No entanto, para evitar redundâncias, os peptídeos repetidos foram removidos, resultando em um total de 96 peptídeos distintos. Após a obtenção do hidrolisado, as sequências de aminoácidos livres foram excluídas e os peptídeos gerados foram armazenadas para análises posteriores.

#### 4.3 Predição da atividade biológica

Para a verificação do potencial efeito anticarcinogênico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da β-conglicinina, as sequências foram convertidas para o formato FASTA e inseridas na ferramenta ACPred<sup>®</sup> (https://bio.tools/ACPred). Dentre os peptídeos que apresentaram predição para atividade anticarcinogênica foram considerados para as análises posteriores aqueles que apresentaram uma probabilidade superior a 0.800. Os peptídeos que atingiram esse critério foram: ASVSVSF, GIAY, QACH, PIPF, PQPR, QEEEH, EQQEW, IVIL, GTAIL, EQIR, SSSR, DPIY, AIVIL, VIPAGY, AIGN, SSIL, GVVF, EEEK, AIVVL, VGIK, EQQR, AGSK, PGSAK, GTVF, ASVCVSL, IVQF, EQQK, VIPAAY, AGEK, QIER

e PSIL. Na etapa seguinte, os peptídeos que continham menos de cinco aminoácidos foram excluídos, visto que dados da literatura revelaram que peptídeos anticancerígenos compostos por 5 a 30 aminoácidos demonstraram potencial para inibir o crescimento de células cancerígenas. Os peptídeos remanescentes foram então submetidos à técnica de docking molecular.

### 4.4 Docking molecular

Para os estudos de docking molecular, a proteína Bcl-2 foi escolhida como alvo devido ao seu envolvimento no processo de apoptose. A estrutura cristalográfica da Bcl-2 (PDB ID: 600K) foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB). A preparação das estruturas da proteína Bcl-2 e dos ligantes, incluindo Venetoclax e os peptídeos selecionados, foi realizada utilizando o software AutoDock Tools® versão 1.5.6. Inicialmente, os arquivos PDB foram processados para remover moléculas de ligantes e de água presentes na estrutura cristalográfica, evitando interferências nas interações do ligante com o receptor. Em seguida, foram adicionados átomos de hidrogênio à estrutura da proteína para corrigir estados de ionização. Além disso, cargas parciais de Gasteiger foram incorporadas aos átomos de carbono associados ao hidrogênio, assegurando a parametrização da energia do sistema.

Os peptídeos selecionados foram convertidos para representações estruturais bidimensionais utilizando o software Marvin Sketch. Após essa conversão, foram feitas modificações estruturais para a neutralização dos grupos terminais por meio da adição de átomos de hidrogênio. Posteriormente, as estruturas bidimensionais foram convertidas em modelos tridimensionais. A definição do sítio de ligação na proteína Bcl-2 foi baseada nas interações do ligante original no sítio ativo, considerando os resíduos dentro de um raio de 10 Å do ligante original.

Para cada peptídeo, foram geradas dez conformações de docking para explorar diferentes orientações espaciais e modos de ligação potenciais. Os cálculos de docking molecular foram realizados utilizando o software AutoDock-VINA® versão 1.1.2, e a seleção das melhores conformações foi feita por meio de inspeção visual das interações entre receptor e ligante, levando em consideração as pontuações de docking, que refletem a energia de ligação entre as moléculas. Para garantir uma cobertura adequada do sítio de ligação, o espaço de busca para a estrutura da Bcl-2 foi definido pelas coordenadas -15.282(x), 2.238(y), -9.432(z), e dimensões da caixa de busca de 22Å(x), 24Å(y), 28Å(z). As ligações amida e guanidínio foram consideradas rotacionáveis, permitindo flexibilidade na interação molecular. As representações

bidimensionais dos resultados foram geradas utilizando o software Discovery Studio, enquanto as representações tridimensionais foram obtidas por meio do software PYMOL (versão 2.3.5).

### 4.5 Predição da estrutura secundária

A estrutura secundária dos peptídeos selecionados foi prevista utilizando o software PEP-FOLD4®, disponível no endereço eletrônico http://bioserv.rpbs.univ-parisdiderot.fr/services/PEP-FOLD4. Para realizar a previsão, a sequência em formato FASTA dos peptídeos foi inserida diretamente no sistema PEP-FOLD4®. O software realiza a predição utilizando um algoritmo baseado em simulações de Monte Carlo e dinâmica molecular, permitindo gerar múltiplos modelos do peptídeo. Entre as estruturas geradas, é selecionada aquela que apresenta a menor energia livre, representando a conformação mais estável (Rey *et al.*, 2023).

### 4.6 Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, peso molecular, área de superfície polar topológica (ASPT), coeficiente de partição octanol/água (LogP), constante de dissociação ácido-base (pKa), volume de distribuição (VD), clearance plasmático (Cl) e a meia-vida (T ½), dos peptídeos selecionados foram avaliadas utilizando o software ADMETlab® 3.0, disponível no site https://admetlab3.scbdd.com. Além disso, também foram avaliadas as interações dos compostos com as enzimas do citocromo P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 prever a metabolização dos compostos.

### 4.7 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados utilizando o método de síntese em fase sólida, (Merrifield, 1964). Durante a síntese, utilizou-se o grupo protetor Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) para proteger os grupos α-amino dos aminoácidos, impedindo que estes reagissem durante as etapas sucessivas de elongação da cadeia peptídica. O grupo Fmoc foi removido quando necessário, permitindo a adição do próximo aminoácido na sequência. Após a síntese, a identidade e pureza dos peptídeos sintetizados foram confirmadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao espectrômetro de massas com eletrospray e ionização positiva (LC/ESI-MS, Thermo LCQ-fleet). O sistema de solventes utilizado na CLAE consistiu em duas fases: A e B. A fase A foi composta por 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura, enquanto a fase B consistia em 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. A vazão utilizada foi de 0,5 mL/min. A temperatura do sistema foi mantida a 30

°C. O gradiente de eluição iniciou-se com 5% de fase A e 95% de fase B, e a composição dos solventes foi ajustada ao longo do tempo para melhorar a separação das substâncias. Esse gradiente foi mantido por 20 minutos.

#### 4.8 Ensaios de viabilidade celular

Os testes de citotoxicidade foram realizados em duas linhagens celulares: células de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231, ATCC HTB-26) e uma linhagem celular diploide composta por fibroblastos (MRC-5, ATCC CCL-171). A atividade antiproliferativa foi quantificada utilizando o ensaio Alamar Blue, conforme o método relatado por Page, Page e Noel (1993). As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1,5 × 10<sup>4</sup> células por poço. Após 24 horas, os peptídeos foram dissolvidos em água Milli-Q e adicionados aos poços a fim de atingir concentrações variando de 25 a 800 μM. A água Milli-Q (0,1% v/v) foi utilizada como veículo controle. As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, permitindo que os peptídeos interagissem com as células. Após esse período de incubação, foram adicionados 50 μL de Alamar Blue (0,01% p/v de resazurina) a cada poço. As placas foram incubadas novamente por 1 hora a 37 °C, em ambiente protegido da luz, para permitir a conversão do corante. Após a incubação, as leituras de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de fluorescência Synergy<sup>®</sup> (Biotek, Winooski, EUA). Foram empregados filtros de excitação e emissão com comprimentos de onda de 530 nm e 590 nm, respectivamente, para quantificar a intensidade da fluorescência e, assim, estimar a viabilidade celular. A citotoxicidade de cada tratamento foi expressa como a porcentagem de viabilidade celular, que foi calculada em relação ao controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3).

#### 2.9 Ensaio de apoptose

A linhagem celular MDA-MB-231 foi cultivada em meio de crescimento completo contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em uma incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços estéreis, brancas e tratadas para cultura de tecidos, a uma densidade de 10.000 células por poço. As células foram deixadas para aderir por 24 horas antes da aplicação dos tratamentos. A apoptose foi induzida nos poços utilizando compostos de teste, preparados em concentrações variadas em meio de crescimento. Esses compostos foram adicionados aos poços em um volume final de 50 μL. A avaliação da apoptose foi realizada utilizando o Ensaio de Apoptose

RealTime-Glo<sup>TM</sup> Annexin V (Promega, JA1000, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O Reagente de Detecção 2X foi preparado diluindo os componentes Annexin V-LgBiT, Annexin V-SmBiT, o Substrato Annexin V NanoBiT<sup>®</sup> e CaCl<sub>2</sub> em meio de cultura completo, na diluição de 500 vezes. Após a semeadura das células e a indução da apoptose com os compostos, 50 μL do Reagente de Detecção 2X foram adicionados a cada poço, elevando o volume final do ensaio para 100 μL. As placas foram brevemente agitadas por 30 segundos a 500-700 rpm para garantir a mistura uniforme dos reagentes. Após a agitação, as placas foram incubadas em um leitor de placas multimodal, com capacidade para detecção de luminescência, a 485 nm, mantendo a incubação a 37 °C. Para a análise dos dados, os valores de luminescência de fundo, obtidos dos controles sem células, foram subtraídos dos valores experimentais. A apoptose foi inferida a partir dos aumentos dependentes do tempo na luminescência. Os experimentos foram realizados em triplicata (*n* = 3).

### 2.10 Quantificação da proteína Bcl-2 (Humana)

O ensaio para quantificação da proteína Bcl-2 foi realizado utilizando o kit ELISA Human Bcl-2 (E-EL-H0114, Elabscience, Houston, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O processo começou com a preparação dos padrões com concentrações conhecidas de Bcl-2 e amostras biológicas, que foram diluídas adequadamente para se ajustarem à faixa de detecção do kit. Em seguida, 100 µL de cada padrão e amostra foram adicionados aos poços de uma placa de ELISA de 96 poços, que foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora para permitir a ligação da proteína Bcl-2 à superfície recoberta com anticorpos específicos. Após a incubação, adicionou-se 100 μL de anticorpo de detecção biotinilado, que se ligou à proteína Bcl-2 capturada na superfície da placa. Essa etapa foi seguida por uma nova incubação de 1 hora, permitindo a interação entre o anticorpo de detecção e a proteína. Em seguida, 100 μL de avidina conjugada com peroxidase foram adicionados a cada poço, promovendo a ligação com o anticorpo biotinilado e gerando o sinal enzimático. Após as lavagens para remover reagentes não ligados, 100 μL de solução de substrato foram adicionados a cada poço, iniciando a reação enzimática, que resultou na formação de um produto colorido, cuja intensidade foi diretamente proporcional à quantidade de Bcl-2 presente nas amostras. A reação foi interrompida com uma solução de parada, cessando a atividade da peroxidase. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas, e a concentração de Bcl-2 nas amostras foi determinada com base em uma curva de calibração gerada a partir das absorbâncias dos padrões conhecidos. Para isso, as absorbâncias dos padrões foram plotadas em função das concentrações de Bcl-2, gerando uma curva padrão. A concentração de Bcl-2 nas amostras foi determinada por interpolação dos valores de absorbância na curva de calibração. O ensaio foi realizado em duplicata (n = 2).

#### 2.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como a média aritmética  $\pm$  desvio padrão. Para a avaliação das diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via. Caso a ANOVA indicasse diferenças estatísticas significativas, o próximo passo foi realizar o teste de Tukey, identificando quais pares de grupos apresentam diferenças estatisticamente significativas. O nível de significância adotado foi de p < 0,05. A análise estatística foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

## **5 RESULTADOS**

Como resultado do desenvolvimento da dissertação intitulada "Estudo de peptídeos derivados da proteínaβ-conglicinina da soja sobre a proliferação celular de carcinoma de mama" foi elaborado (1) um manuscrito científico que está em processo de submissão à publicação, conforme apresentado a seguir.

*Manuscrito:* Soybean  $\beta$ -Conglycinin-derived ATSDL peptide induces apoptosis by modulation of Bcl-2 in MDA-MB-231 Cells

1 Soybean β-Conglycinin-derived ATSDL peptide induces apoptosis by modulation of Bcl-

## 2 2 in MDA-MB-231 Cells

Periódico a ser submetido (1ª submissão):	Scientific Reports (ISSN 2045-2322).
Maior percentil (Scopus):	92 (https://www.scopus.com/sourceid/21100200805)
Periódico a ser submetido (2ª submissão):	Food Chemistry: Molecular Sciences (ISSN: 2666-5662)
Maior percentil (Scopus):	74 (https://www.scopus.com/sourceid/21101066155)

3

4 Victória Guimarães Santiago<sup>1</sup>, and Ederlan de Souza Ferreira<sup>1</sup>\*

5

- 6 <sup>1</sup> School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Barão de Jeremoabo Street, 40170-115,
- 7 Salvador, BA, Brazil.
- 8 <sup>2</sup> Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Prof. Francisco Swgni street,
- 9 14800-0600, Araraquara, SP, Brazil.
- <sup>3</sup> Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), Università degli
- 11 Studi di Milano, 20133 Milan, Italy.
- \*Corresponding author: <u>ederlan.ferreira@ufba.br</u>

13

14

15

#### 16 **Abbreviations**:

- 17 BAK, BCL-2-antagonist/killer. BAX, BCL-2 associated protein X. BCL-2, B-cell lymphoma
- protein-2. BH3, BCL-2 homology domain-3. BID, BCL-2 interacting domain. BIM, BCL-2
- interacting mediator. MCL-1, Myeloid cell leukemia 1. MDA-MB-231, breast cancer cell line.
- 20 MRC-5, Medical Research Council cell strain 5.

#### **Abstract**

21

22 The anticancer effect of peptides from soybean β-conglycinin was investigated in cultivated breast adenocarcinoma cells through silico and in vitro approaches. Twelve peptides with five 23 or more amino acid residues were predicted to have anticancer action. However, only the 24 25 ASVCVSL, ATSDL, and EEQEW structures presented a helical structure and interacted with the P2 and P4 cavities of the BH3 domain of the Bcl-2 protein. The ASVCVSL, ATSDL, and 26 27 EEQEW peptides dose-dependently reduced the cell viability of MDA-MB-231. They decreased cell growth by 87, 69, and 42% when treated at a concentration of 800 µM, 28 respectively. Although the effect of the peptide ASVCVSL (IC50=113.8 µM) was more 29 significant than ATSDL (IC50=205 μM) and EEQEW (IC50=1520.6 μM), it presented the 30 lowest selectivity index (0.35). The ATSDL and EEQEW peptides increased apoptosis of the 31 32 MDA-MB-231 by 3.2 and 5.5-fold and 1.3 and 3.1-fold, respectively. In contrast, venetoclax 33 increased it by 2.1 and 5.3-fold in the 24 and 48 h treatments. Furthermore, there was a decrease in Bcl-2 protein concentration with ATSDL, EEQEW, and venetoclax. However, the in silico 34 results suggested these peptides have low absorption and bioavailability. The present study 35 shows that the peptides ATSDL and EEQEW derived from the soybean β-conglycinin protein 36 can exert pro-apoptotic action on breast cancer by modulating the target protein Bcl-2. 37

- **Keywords:** Bioactive peptides, BH3 mimetics, molecular docking, breast cancer cell line,
- 39 *BCL-2-antagonist/killer*.

#### 1 Introduction

Cancer is currently one of the most prevalent chronic diseases, with its high incidence associated with population aging and modern lifestyle habits (Bray *et al.*, 2021). Some types of cancer, such as breast, prostate, pancreatic, liver, kidney, melanoma, uterine body, oropharynx, colorectal, and cervical, have shown a significant increase in incidence since 2015 (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024). Although there have been advances in treatment strategies, it is estimated that by 2040, there will be 28.4 million new cases, representing an increase of 47% compared to 2020 (Sung *et al.*, 2021). Breast cancer is the most common type of cancer in 157 countries, with more than 2.3 million diagnoses and approximately 670,000 deaths worldwide in 2022 (Bray *et al.*, 2024).

Unregulated proliferation of cancer cells is a central feature of tumorigenesis. While in normal cells, proliferation is controlled by a balance between growth and anti-growth signals, tumor cells can generate their growth signals, becoming insensitive to anti-growth signals (Pavlova; Zhu; Thompson, 2022). In normal cells, proliferation is controlled by a balance between signals that stimulate and inhibit growth, ensuring cell division occurs only when necessary to maintain cellular homeostasis (Gupta *et al.*, 2010). Apoptosis, or programmed cell death, complements this control by eliminating damaged, aged, or potentially dangerous cells. However, in tumor cells, this balance is disrupted. Cancer cells produce their growth signals and become resistant to stimuli that limit their proliferation or induce apoptosis, favoring their uncontrolled survival (Pavlova; Zhu; Thompson, 2022). In this context, Bcl-2 family proteins play a crucial role in regulating apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway, contributing to tumor progression by preventing programmed cell death (Mohan *et al.*, 2024). These proteins are responsible for maintaining the integrity of the outer mitochondrial membrane, and their overexpression is associated with several types of cancer, such as breast (Kumari; Suresh; Josephine, 2022), prostate (Soliman *et al.*, 2021), and hematologic tumors

(Zhou et al., 2019). The Bcl-2 family includes proteins that induce apoptosis (e.g., BAX and BAK), those responsible for blocking the action of pro-apoptotic proteins (e.g., Bcl-2 and Mcl-1), contributing to chemotherapy resistance, and those that promote apoptosis by either activating BAX or inhibiting anti-apoptotic proteins (e.g., BID and BIM) (Flores-Romero et al., 2022). The BH3 domain (Bcl-2 homology 3) is a short amino acid sequence found in several proteins of the Bcl-2 family. When BH3-only proteins bind to Bcl-2, it modulates Bax and Bak, promoting their oligomerization at the mitochondrial membrane, which causes the release of factors that induce apoptosis (Letai, 2003). Drugs that mimic the BH3 domain, such as venetoclax, have been developed to inhibit Bcl-2 and restore the ability of cancer cells to undergo apoptosis, making them more susceptible to treatmentVenetoclax é, portanto, um inibidor oral que imita a ação de proteínas pró-apoptóticas contendo o domínio BH3 e se liga competitivamente ao Bcl-2, bloqueando assim sua função antiapoptótica e promovendo a morte de células cancerígenas que dependem dessa proteína para sobreviver (Juárez-Salcedo; Desai; Dalia, 2019). Evidence from epidemiological studies has demonstrated that a diversity of compounds present in the diet can reduce the risk of developing cancer (Fan et al., 2024; Grosso et al., 2017). We have shown that proteins hydrolysates obtained from legume proteins contain bioactive peptides displaying antitumor properties (Philadelpho et al., 2024; Philadelpho et al., 2024). Among legumes, soybean proteins have been the most studied for the presence of antitumor peptides (Chen et al., 2019; Freitas et al., 2019; Hsieh; Hernández-Ledesma; Lumen, 2020). β-Conglycinin is cytotoxic to HCT-116 colon cancer cells (Montales et al., 2015), L1210 leukemia cells (Wang et al., 2008), and breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF-7)

(Gonzáles-Montoya et al., 2016; Philadelpho, 2024), as well as prostate cancer cells

(Philadelpho, 2024). However, although some studies have demonstrated that soy peptides

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

exhibit antitumor activity, the mechanisms of action these components exert their effects are not yet fully understood (Luna-Vital; De Mejia, 2018; Philadelpho *et al.*, 2024).

Soybean's main components are the storage proteins  $\beta$ -conglycinin and glycinin, which account for 50–70% of the total protein content in its seeds (Wang *et al.*, 2008). The bioactive peptides from soybean proteins are typically obtained through enzymatic hydrolysis, which mimics digestion by breaking down storage proteins such as  $\beta$ -conglycinin and glycinin into smaller peptide fragments (Chatterjee; Gleddie; Xiao, 2018). These hydrolysates contain peptides with potential antitumor properties, some of which may interact with apoptotic pathways.

In the present study, we investigated the potential anticancer effect of peptides derived from β-conglycinin, a soybean protein, based on *in silico* predictions indicating their ability to interact with Bcl-2. Thus, we hypothesized that these peptides exhibit potential anticancer activity against breast cancer cells (MDA-MB-231) by modulating the Bcl-2 protein involved in the apoptotic pathway.

# 2 Material and Methods

#### 2.1 Plant material and reagents

Human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231 - ATCC HTB-26) and a diploid cell culture line composed of fibroblasts (MRC-5 ATCC CCL-171) were obtained from the American Type Cell Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Cell viability was measured using the CellTiter96® AQueous One Solution Assay Kit (Promega Corporation, WI, USA). Venetoclax (≥ 98% purity) and an Annexin V-FITC apoptosis detection kit were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Protein levels were measured using the DC

Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All reagents were purchased from Sigma-113 114 Aldrich® unless otherwise specified. 115 116 2.2 *In vitro* analysis 117 2.2.1 Simulated Gastrointestinal Digestion The primary sequences (FASTA) of the  $\beta$ conglycinin protein subunits:  $\beta$  (UniProtKB: 118 GLCB1 SOYBN), α (UniProtKB: GLCA1 SOYBN), and α' (UniProtKB: GLCAP SOYBN) 119 were obtained from UniProt BETA (https://beta.uniprot.org/, accessed on 09 September 2024). 120 Simulated gastrointestinal digestion was performed from sequential action of pepsin (EC 121 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4), and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) using the BIOPEP® server 122 123 (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep, accessed on 9 September 2024). 124 125 2.2.2 Screening of putative anticancer peptides The peptides were predicted to potentially have anticancer effects using the ACPred® 126 tool (https://bio.tools/ACPred, accessed September 13, 2024). 127 128 For molecular docking studies, the Bcl-2 protein was selected as the target due to its association with apoptosis. The crystallographic structure of Bcl-2 (PDB: 600k) was obtained 129 from the PDB database (https://www.rcsb.org, accessed September 13, 2024). Proteins and 130 ligands (Venetoclax/peptides) were prepared using AutoDock tools® version 1.5.6 (Molecular 131 132 Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). The ligands and water molecules were removed from the PDB files, and hydrogen atoms were added. 133 134 Subsequently, hydrogen atoms and Gasteiger partial charges were incorporated into the carbon atoms that were associated with hydrogen. Two-dimensional structures of the peptides were 135 136 created using Marvin Sketch software (https://marvinjs-

demo.chemaxon.com/latest/demo.html, accessed September 15, 2024). Terminal groups were

neutralized by adding hydrogen atoms and then converted into three-dimensional models. The binding site was identified based on the original ligand interactions in the active site and residues within 10 Å of the original ligand. Ten docking poses were generated. The final docking protocol was based on the successful re-docking of known ligands. Docking results were obtained using AutoDock-VINA® software (version 1.1.2) (Trott & Olson, 2010), and the best docking poses were selected through visual inspection of receptor-ligand interactions and docking scores. The search space for the Bcl-2 structure was defined as -15.282(x), 2.238(y), -9.432(z) and 22Å(x), 24Å(y), 28Å(z) for the center and search box dimensions, respectively. Discovery Studios software was utilized to generate 2D graphical representations of the docking results, while PYMOL (version 2.3.5, Molecular Graphics System, Schrödinger LLC, New York, NY, USA) was used for 3D representations of the docking results.

## 2.2.3 Secondary structure prediction

The secondary structure of the peptides was predicted using PEP-FOLD4® software (Tufféry & Derreumaux, 2023) (http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4, accessed on 18 September 2024).

### 2.2.4 Physicochemical and pharmacokinetic properties

The physicochemical and pharmacokinetic properties of Molecular Weight (MW), Topological Polar Surface Area (TPSA), Log of octanol/water partition coefficient (LogP), Acid-base dissociation constant (pKa), Volume Distribution (VD), Clearance (Cl), half-life (T ½), CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4 substrates, were evaluated using ADMETlab® 3.0 software (https://admetlab3.scbdd.com/, accessed on 21 September 2024).

## 2.3 In vitro analysis

# 2.3.1 Synthesis of the peptides

The peptides were synthesized using the solid-phase synthesis method (Merrifield, 1964), employing the Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) protecting group for the  $\alpha$ -amino groups of amino acids. Their identity and purity were analyzed by HPLC coupled with a positive ionization electrospray mass spectrometer (LC/ESI-MS, Thermo LCQ-fleet). The solvent system used consisted of A (0.1% formic acid in ultrapure water) and B (0.1% formic acid in acetonitrile), with a flow rate of 0.5 mL/min at 30 °C. The gradient started at 5% A and 95% B, reaching 20 min. The chromatographic profiles of the pure peptides are reported in **Fig. S2 and Table S1**.

#### 2.3.2 Cell viability assay

Cytotoxicity tests were performed on human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231 - ATCC HTB-26) and a diploid cell culture line composed of fibroblasts (MRC-5 ATCC CCL-171). Antiproliferative activity was quantified using the Alamar Blue assay (Page; Page; NoeL, 1993). Cells were seeded into 96-well plates (1.5 x 10<sup>4</sup> cells/well). After 24 h, peptides were dissolved in Milli-Q water, added to each well, and incubated at 37 °C in a 5% CO2 atmosphere for 24 hours. Peptides were prepared to achieve concentrations ranging from 25 to 800 μM. After 24 and 48 h of incubation, 50 μL of Alamar Blue (0.01% w/v resazurin) were added to each well, and plates were incubated for one h at 37 °C in the dark. Fluorescence readings were performed using a Synergy® fluorescence spectrophotometer (Biotek, Winooski, USA), with excitation and emission filters at wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Cytotoxicity of each treatment was expressed as the percentage of cell viability calculated relative to the negative control (100% viability).

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

# 2.3.3 Apoptosis assay

MDA-MB-231 cell line was cultured in a complete growth medium containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in an incubator with 5% CO2. Cells were seeded at a density of 10,000 cells per well in sterile, white, tissue culture-treated 96-well plates and allowed to adhere for 24 hours prior to treatment. Apoptosis was induced using test compounds at varying concentrations, prepared in a growth medium, and added to the wells in a final volume of 50 μL. Apoptosis was assessed using the RealTime-Glo<sup>TM</sup> Annexin V Apoptosis Assay (Promega, JA1000, Madison, WI, USA) following the manufacturer's protocol. The 2X Detection Reagent was prepared by diluting the Annexin V-LgBiT, Annexin V-SmBiT, Annexin V NanoBiT® Substrate, and CaCl2 in complete culture medium at a 500-fold dilution. After cell seeding and compound treatment, 50 µL of the 2X Detection Reagent was added to each well, bringing the final assay volume to 100 µL. The plate was briefly shaken for 30 seconds at 500-700 rpm to mix the reagents. The plate was then incubated in a multimode plate reader equipped with luminescence detection at 485 nm at 37 °C. Background luminescence values from no-cell controls were subtracted from experimental data. Data were analyzed using GraphPad Prism® software. Apoptosis was inferred from time-dependent increases in luminescence. All experiments were performed in triplicate.

205

206

207

208

209

210

### 2.3.4 Human BCL-2 concentration

The Human Bcl-2 ELISA Kit (E-EL-H0114, Elabscience, Houston, TX, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Standards and samples were added to the wells, followed by a biotinylated detection antibody and HRP-conjugated avidin. After incubation and washing steps, the substrate solution was added to initiate the enzymatic reaction. The reaction

was stopped, and absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader. All assays were conducted in duplicate.

## 2.4 Statistical analysis

The cell viability assays were carried out in triplicate; the results are expressed as the arithmetic average  $\pm$  standard deviation. Significant differences were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey's multiple range test was applied (p < 0.05) using GraphPad Prism 10 software (GraphPad Software, Boston, MA, USA).

#### 3 Results

### 3.1 Potential BH3-Mimetic effect of peptides

Sequential enzymatic hydrolysis with pepsin, trypsin, and chymotrypsin of the  $\beta$ ,  $\alpha$ , and  $\alpha'$  subunits of soybean  $\beta$ -conglycinin simulated through BIOPEP®, generated a total of 96 different peptide sequences. Thirty-three peptides were predicted to have potential anticancer properties with a score > 0.80 (**Table S2**).

Venetoclax was re-docked into BCL-2 (PDB ID: 600K) using different box dimensions. Although a slight increase in the software's execution time was observed, no significant changes were detected in the highest-ranked ligand pose, which maintained an RMSD <3.0 Å in all cases. As illustrated in **Figure S1**, the predicted pose of venetoclax showed strong agreement with the crystallographic binding structure, presenting an RMSD of 1.61 Å when a box size of  $22 \text{ Å} \times 24 \text{ Å} \times 28 \text{ Å}$  was used.

Previous studies have revealed that anticancer peptides consisting of 5 to 30 amino acids have shown the potential to inhibit the growth of cancer cells (Felício *et al.*, 2017; Rao; Zhang; Zhang, 2020; Singh *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). For this reason, peptides < 5 amino acids

were not considered for analysis. Our research group previously analyzed the molecular docking of the ASVSVSF and VIPAAY peptides (Philadelpho et al., 2024) and is not presented here. Ten peptides were analyzed through docking. The peptides GTAIL, AIVIL, and AIVVL could not interact with the P4 pocket and were, therefore, not included in further analyses (Figure 1e, 1g, and 1k). Seven peptides interacted with both the P2 and P4 pockets of the BH3 domain of the BCL-2 protein (Figure 1). The peptide QEEEH interacts with the residues VAL 133, LEU 137, GLU 136, ARG 146, PHE 153, ALA 149, ASN 143, GLY 145, and TYR108 through hydrogen bonds and showed an attractive charge with GLU 136 (Figure 1a, 1b). The peptide EEQEW interacts with the residue TYR 202 (Pi-Pi T shaped), ALA 100 and VAL 148 (Alkyl-type bonds), GLU 136, TYR 108, ASP 103, ALA149, ASN 143 and ARG 146 (through hydrogen bonds) and a carbon-hydrogen interaction with PHE 153 (Figure 1c, 1d). The peptide VIPAGY exhibited hydrogen bond interactions with the residues ALA149, ARG146, TYR202, and ALA100, a carbon-hydrogen interaction with the residue ASN143, a T-shaped pi-pi interaction with TYR202, as well as an alkyl interaction with LEU137 (Figure 1i, 1j). The peptide EQQQR interacts by forming hydrogen bonds with ALA 100, GLY 145, ASN 143, and TYR 202 and showed two different attractive charges with ASP 103, a carbon-hydrogen interaction as also observed with TYR 108 (Figure 1m, 1n). The peptide ATSDL, in turn, interacts with the residues ASP 103 (attractive charges), ALA 100, TYR 108, and two interactions with ARG146 (hydrogen bonds) and an Alkyl-type bond with PHE 104. (Figure 10, 1p). The peptide PGSAK performs six interactions: two hydrogen bonds with ASP 111 and ALA 100, three carbon-hydrogen interactions with TYR 108, ARG 146, and GLY 145, and an attractive charge with ASP 108 (Figure 1q, 1r). The ASVSVSL peptide interacts, forming Alkyl-type bonds with residues ALA 100 and TYR 202 and hydrogen bonds with ASN143, GLY 145, ASP 103, and ARG 107. it also interacts through carbon-hydrogen interaction with ARG146, in addition to attractive charges with ASP 111 (Figure 1s, 1t).

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

The three-dimensional conformation of the peptides was also analyzed (**Figure 2**) using the PEPFOLD4 software, which predicts peptide structures in an aqueous solution. Three of the six peptides tend to have a helical structure.

## 3.2 Peptide synthesis.

The selected peptides were synthesized and underwent a purification process followed by identity verification using mass spectrometry (**Figure S2**). Based on the mass-to-charge ratio, it was possible to calculate the molecular mass of the peptides, which was close to the estimated theoretical value. The peptides ASVCVSL, EEQEW, and ATSDL presented measured charges of 678.36 g/mol, 720.31 g/mol, and 506.27 g/mol, respectively.

## 3.2 Antitumor effect of synthetic soybean β-conglycinin peptides

The cell viability of the breast cancer (MDA-MB-231) and control (MRC-5) cell lines was assessed after treatment with the peptides ASVCVSL, EEQEW, and ATSDL at concentrations ranging from 25.0 to 800.0  $\mu$ M for periods of 24 and 48 hours (**Figure 3**). The results after 24 hours of treatment indicate that in the MRC-5 cell line, cell viability remained high under all tested conditions for ATSDL, EEQEW, and Venetoclax, suggesting that the evaluated compounds did not exert a significant cytotoxic effect on non-tumor cells (**Figure 3c, 3e, 3g**). A different response was observed with the ASVCVSL peptide, which led to a more pronounced reduction in the viability of this non-tumor cell line (26.49  $\pm$  1.43%) at a concentration of 800  $\mu$ M (**Figure 3a**). In the MDA-MB-231 cell line, a dose-dependent reduction in cell viability was observed across all evaluated treatments. At the highest tested concentration (100  $\mu$ M), Venetoclax reduced viability to 40.12  $\pm$  4.25% (**Figure 3g**). The peptides ASVCVSL, ATDSL, and EEQEW, at a concentration of 800  $\mu$ M, decreased cell viability to 42.79  $\pm$  2.34%, 71.73  $\pm$  2.30%, 74.80  $\pm$  3.00%, and respectively (**Figure 3a, 3c,** 

and 3e). Except for the ASVCVSL peptide, the difference in response between the MDA-MB-286 231 and MRC-5 cell lines suggests a selective effect of the treatments on tumor cells. To gain 287 deeper insight, assessing whether this trend persisted after more prolonged exposure periods 288 was necessary. Therefore, the response of these compounds was also evaluated over 48 hours. 289 290 In MRC-5 cells, the same response observed at 24 hours was maintained for ATSDL, EEQEW, and Venetoclax (Figure 3d, 3f, and 3h). However, the inhibitory effect of the ASVCVSL 291 292 peptide became even more pronounced, reducing cell viability to  $18.40 \pm 1.75\%$  at the highest 293 tested concentration (800 μM) (**Figure 3b**). In MDA-MB-231 cells, after 48 hours of treatment, 294 Venetoclax and all three tested peptides demonstrated the ability to reduce cell viability to varying degrees. Treatment with Venetoclax reduced viability to 24.10% ± 3.55 at 100 μM 295 296 (Figure 3h). The ASVCVSL peptide further decreased viability to 13.6%  $\pm$  2.28 at 800  $\mu$ M (Figure 3b), while ATSDL reduced viability to  $30.8\% \pm 4.13$  under the same conditions 297 (Figure 3d). Although less pronounced, the EEQEW peptide reduced viability to  $58.01 \pm$ 298 4.84% (**Figure 3f**). 299 After 48 hours of treatment, the peptides ASVCVSL, EEQEW, and ATSDL demonstrated 300 a dose-dependent inhibitory effect on cell viability, with IC<sub>50</sub> values of 113.82  $\mu$ M (R<sup>2</sup> = 301 0.7777), 1520.61  $\mu$ M (R<sup>2</sup> = 0.8625), and 205.00  $\mu$ M (R<sup>2</sup> = 0.8444), respectively (**Figure 4**, 302 303 Table 1). 304 The effect of the ASVCVSL peptide was the most pronounced. Due to the high viability 305 observed at the highest tested concentrations (800 µM), it was impossible to calculate the IC<sub>50</sub> 306 for the MRC-5 cell line treated with the EEQEW and ATSDL peptides. However, the 307 ASVCVSL peptide exhibited an IC<sub>50</sub> of 43.84  $\mu$ M (R2 = 0.9812). Due to its pronounced effect on non-tumor cell lines, the ASVCVSL peptide was not used in subsequent analyses. Some 308 IC<sub>50</sub> values were extrapolated because they were higher than the maximum concentration tested 309 in the cell experiments. 310

This study aimed to identify peptides that can interact with the Bcl-2 protein, a key regulator of cell death (apoptosis). However, *in vitro* analyses represent only a theoretical prediction, making experimental validation essential to confirm the interaction between the peptide and Bcl-2.

In the RealTime-Glo<sup>TM</sup> Annexin V Apoptosis assay, compounds that induce apoptosis exhibit time- and dose-dependent increases in luminescence. This increase correlates with the binding of luciferase-labeled annexin V to phosphatidylserine residues on the cell membrane, which is recognized as an early marker of apoptosis (Vermes *et al.*, 1995). In this experiment, we evaluated the response of the MDA-MB-231 cell line treated with 25, 50, 100, 200, 400, and 800 μM of the ATSDL and EEQEW peptides over 64 hours (**Figure 5a, 5b**), as well as 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM of the drug Venetoclax (**Figure 5c**). In all cases, an increase in apoptosis-related luminescence was observed from 12 hours onward, with the signal steadily rising at the highest tested concentration until reaching its peak between 40 and 48 hours (**Figure 5**).

The concentration of the anti-apoptotic protein BCL-2 was 0.397 ng/mL in the untreated control group. This concentration decreased to 0.374 ng/mL after administration of the selective BCL-2 inhibitor venetoclax and the peptide ATSDL and to 0.370 ng/mL when treated with the peptide EEQEW (**Figure 6**). Treatment with the peptides EEQEW and ATSDL reduced BCL-2 protein concentration compared to the untreated group (p <0.05), resembling the effect observed with venetoclax.

**Table 2** presents key physicochemical and pharmacokinetic properties of Venetoclax, EEQEW, and ATSDL peptides. Venetoclax has a molecular weight of 867.23 g/mol, making it more significant than the peptides EEQEW (719.28 g/mol) and ATSDL (505.52 g/mol). The peptides exhibit more significant polar surface areas—with increases of 103.74% and 49.37%

for EEQEW and ATSDL, respectively—demonstrating their higher hydrophilicity, which is further supported by their lower octanol/water partition coefficients.

Additionally, the peptides have lower pKa values than Venetoclax, suggesting a higher degree of dissociation in acidic environments. All compounds showed negative distribution volumes, with Venetoclax at -0.008 L/Kg, followed by ATSDL (-0.553 L/Kg) and EEQEW (-0.678 L/Kg). The clearance of venetoclax was 2.298 mL/min/Kg, whereas ATSDL and EEQEW exhibited lower clearance rates (1.770 and 1.848 mL/min/Kg, respectively). Moreover, the half-lives of EEQEW and ATSDL (0.6 and 1.3 hours, respectively) were longer than that of Venetoclax. Notably, none of the peptides were substrates for CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, or CYP3A4, unlike Venetoclax, which is metabolized by CYP2C19 and CYP2C9 (Table 3).

#### 4 Discussion

Apoptosis is the process of programmed cell death, essential for suppressing oncogenesis in multicellular organs. Intrinsic or extrinsic pathways can initiate this process. The extrinsic pathway involves the activation of cell death receptors. In contrast, the intrinsic pathway is activated by extracellular and internal stimuli, such as DNA damage, oxidative stress, or signals induced by chemotherapy drugs (Mustafa *et al.*, 2024). The proteins of the Bcl-2 family, including the pro-apoptotic Bax and the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, are important regulators of the intrinsic apoptosis pathway (Campbell; Tait, 2018). The BH3 domain is present in all proteins of the Bcl-2 family, with those considered antiapoptotic containing four different domains. The BH3 portion is highly conserved and features a hydrophobic pocket that binds to this domain, acting as a receptor for macromolecules (Qian *et al.*, 2022). Within Bcl-2, two hydrophobic  $\alpha$ -helices are surrounded by six to seven amphiphilic  $\alpha$ -helices, four of which form the BH3 domain. The central interaction regions are located at the P2 and P4

hydrophobic pockets, which facilitate interaction with the Bax protein (Souers *et al.*, 2013). According to Krishna *et al.* (2021), the key residues contributing most to the energetic stability of Bcl-2 binding are PHE 104, TYR 108, PHE 112, MET 115, GLY 145, and TYR 202. Most of these residues contribute negatively to the binding energy, thereby reinforcing the stability of the complex. These interactions are crucial for the binding of Bcl-2 with Bax, which plays a significant role in regulating apoptosis. Redocking experiments showed that the venetoclax ligand, when reinserted into the crystallographic structure, maintained these interactions, highlighting their importance. Comparatively, the peptides also show predicted interactions with many of these critical residues. For example, the ASVSVSL peptide forms alkyl bonds with TYR 202 and hydrogen bonds with GLY 145. ATSDL interacts through alkyl bonding with PHE 104 while forming a hydrogen bond with TYR 108. EEQEW exhibits a T-shaped  $\pi$ - $\pi$  interaction with TYR 202 and forms two hydrogen bonds with TYR 108. Other peptides, such as PGSAK, QEEEH, EQQQR, and VIPAGY, involve residues like TYR 108, TYR 202, and GLY 145, replicating many of the interactions observed with venetoclax.

In this study, three peptides were predicted to adopt a helical structure. The helical conformation of peptides plays a crucial role in selecting anticancer candidates and designing therapeutic compounds. Studies indicate that peptides with this structure selectively penetrate and disrupt cancer cell membranes (Philippe *et al.*, 2019). This mechanism of action minimizes unwanted side effects by reducing the likelihood of affecting normal cells, a common concern in conventional anticancer treatments. Furthermore, the stability conferred by the helical structure is essential for maintaining the functional integrity of peptides in physiological environments (Musaimi *et al.*, 2022). Another important factor is that Bcl-2 inhibitors must have an  $\alpha$ -helix structure, as the natural interaction between this protein and pro-apoptotic proteins occurs through the BH3 domain, which adopts this conformation when binding to the hydrophobic groove of Bcl-2 (Czabotar *et al.*, 2014; Kale; Osterlund; Andrews, 2018).

Cytotoxic effects were observed in soybean β-conglycinin hydrolysate, and its peptide fraction <3 kDa was evaluated against breast (MDA-MB-231) and prostate (DU-145) cancer cells using the Alamar Blue assay. The results showed a dose-dependent reduction in cancer cell viability with MDA-MB-23. Furthermore, the peptide fraction <3 kDa exhibited more excellent cytotoxic activity than the hydrolysate, indicating that smaller peptides may have more significant anticancer potential. The anticancer effects observed in this study suggest that peptides derived from β-conglycinin may serve as promising natural compounds for cancer treatment (Philadelpho *et al.*, 2024). The selected peptides were synthesized and tested against tumors and non-tumor cell lines to observe their influence on cell viability. The synthesized peptides were purified (>95%) by chromatography, followed by identification using mass spectrometry. By analyzing the mass-to-charge ratio, we could precisely calculate the molecular weight of the peptides. These results matched the expected theoretical values..

The results found in the present study demonstrate the cytotoxic activity of the peptides

The results found in the present study demonstrate the cytotoxic activity of the peptides EEQEW, ASVCVSL, and ATSDL against the tumor (MDA-MB-231) and the non-tumor (MRC-5) cell lines. The observed responses emphasize the therapeutic potential of ATSDL while highlighting the limitations of ASVCVSL and lack of selectivity. ATSDL demonstrated a significant capacity to reduce the viability of MDA-MB-231 cells while exerting minimal cytotoxic effects on MRC-5 cells. At the highest concentration tested (800 μM), tumor cells' viability decreased (69.2% reduction) after 48 hours of treatment without causing substantial inhibition in non-tumor cells. In contrast, ASVCVSL exhibited a more pronounced cytotoxic effect (86.5% reduction in cell viability at 800 μM treatment after 48 hours). However, it also reduced cell viability in non-tumor cells (81.6% reduction in cell viability, μM after 48 hours), suggesting a lack of specificity. ASVCVSL peptide, at 800 μM after 24 hours and at concentrations ranging from 25 to 200 μM after 48 hours, showed a significantly more significant reduction in viability in MRC-5 (non-tumoral) cells compared to tumor cells

(p<0.05). The pronounced cytotoxicity in MRC-5 cells indicates that ASVCVSL may lack the necessary specificity, potentially leading to severe side effects and toxicity in normal tissues. Consequently, despite its effectiveness against tumor cells, the adverse impact on non-tumoral cells limits its therapeutic potential.

In contrast, the EEQEW peptide exhibited cytotoxic activity (42% reduction), although less pronounced than ASVCVSL and ATSDL. Like ATSDL, the EEQEW peptide did not show a significant decrease in viability for the non-tumor cell line (MRC-5), suggesting selectivity for breast adenocarcinoma cells rather than fibroblast cells. Structural modifications may also enhance the potency of the EEQEW peptide as an antitumor agent due to its pronounced activity in non-tumoral cells, particularly its significant cytotoxicity in MRC-5 cells. The ASVCVSL peptide was not chosen for further study. This decision was based on the need to focus on compounds that show a more substantial selection for targeting tumor cells, minimizing potential damage to healthy tissues.

The IC50 values reveal distinct differences in potency between the tested peptides and the drug. Venetoclax exhibited the lowest IC50 (31.88  $\mu$ M), indicating greater cytotoxic efficacy. Among the peptides, ASVCVSL demonstrated the highest activity (IC50 = 113.82  $\mu$ M), followed by ATSDL (IC50 = 205.01  $\mu$ M), while EEQEW showed significantly lower potency (IC50 = 1520.61  $\mu$ M). These findings suggest that although ASVCVSL and ATSDL display moderate activity, they remain less effective than venetoclax. The markedly higher IC50 of EEQEW indicates limited cytotoxic potential compared to other tested peptides. Peptides derived from other systems, such as Smp43 extracted from scorpion venom, have shown significant cytotoxic effects on breast cell lines. The IC50 values for Smp43 were determined to be 47.7  $\mu$ g/mL for MDA-MB-231 cells and 11.9  $\mu$ g/mL for MCF-7 cells after 24 h of treatment, which further decreased to 25.3  $\mu$ g/mL and 6.9  $\mu$ g/mL, respectively, after 48 h, indicating enhanced potency with more prolonged exposure. In contrast, non-cancerous MCF-10 cells

maintained an IC<sub>50</sub> of 94  $\mu$ g/mL at both time points (Teleb *et al.* 2022). This study demonstrates that the scorpion venom peptide Smp43 exhibits enhanced cytotoxic activity with extended exposure, as its IC<sub>50</sub> value decreases significantly from 24 to 48 h. This time-dependent increase in activity is also observed in the present work, highlighting the importance of evaluating the peptide over more extended time periods to characterize its behavior. Cowpea β-vignin demonstrated IC<sub>50</sub> values of 283 µM for the VIPASY peptide and 656 µM for AQQSY in colorectal cancer cells (HCT-116) (Philadelpho et al. 2024). Another work examined the anticancer potential of the antimicrobial peptides, MAP-04-03 and MAP-04-04, derived from an Ixosin-B amide fragment. The peptides were tested in MCF-7 breast cancer cells, with MAP-04-03 showing an IC<sub>50</sub> of 62 μM, while MAP-04-04 showed no significant cytotoxicity at concentrations up to 100 µM (Hsiao et al. 2013). The IC<sub>50</sub> values of the peptides in the present study differ from the findings. The ASVCVSL and ATSDL peptides demonstrated greater potency compared to the data from Philadelpho et al. (2024). However, when compared to the MP-04-03 peptide, ATSDL and ASVCVSL showed lower potency. These comparisons highlight that peptide efficacy can vary widely depending on the sequence, the tested cell line, and the molecular origin, emphasizing the need for further investigations to understand the underlying mechanisms behind these differences.

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

Lunasin, a bioactive peptide derived from soybeans, is recognized for its antiproliferative properties. A study using synthetic lunasin demonstrated that it exerts antiproliferative effects in human breast cancer cells (MDA-MB-231) at a 0.25 mg/mL concentration, mainly by activating caspase-mediated mitochondrial intrinsic apoptosis. Furthermore, suppressing the lysosomal pathway observed in that study suggests a cooperative role between lysosomes and mitochondria in apoptosis. At the same time, the downregulation of genes involved in DNA replication further contributes to its antiproliferative effects (Hao *et al.*, 2022). In this context, understanding the mechanism of action of synthesized peptides in breast cancer cells is relevant.

The RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis assay confirms that the EEQEW and ATSDL peptides induce apoptosis in MDA-MB-231 cells in a time- and concentration-dependent manner. Luminescence progressively increased from 12 h onward, peaking between 40 and 48 hours, suggesting a sustained apoptotic response. This temporal profile aligns with cell viability data, indicating that the observed reduction at 48 h is attributed to apoptotic pathway activation. The interaction of EEQEW and ATSDL with phosphatidylserine residues on the cell membrane strongly supports apoptosis induction, as phosphatidylserine externalization is an early apoptotic event (Vermes et al., 1995). ATSDL treatment increased Annexin V binding by 3.2and 5.5-fold, while EEQEW resulted in 1.3- and 3.1-fold increases at 24 and 48 hours, respectively, compared with negative control, demonstrating their pro-apoptotic effects. ATSDL exhibited a more pronounced apoptotic response, yet EEQEW also induced apoptosis. Comparison with venetoclax, a well-established BCL-2 inhibitor, highlights the potency of these peptides. Venetoclax increased Annexin V binding by 2.1- and 5.3-fold at 24 and 48 hours, respectively, showing effects comparable to ATSDL. It's important to note that the peptides were tested at concentrations up to 800 µM, while Venetoclax was tested at a maximum of 100 µM. This concentration difference suggests that higher doses of the peptides are required to achieve effects similar to Venetoclax. Like apoptosis, necroptotic cells expose phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane (GONG et al., 2017; Zargarian et al., 2017). Therefore, future studies should explore alternative cell death pathways to fully elucidate the mechanisms underlying the effects of EEQEW and ATSDL. The reduction in BCL-2 protein concentration after treatment with the peptides ATSDL

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

The reduction in BCL-2 protein concentration after treatment with the peptides ATSDL and EEQEW, as well as the selective BCL-2 inhibitor venetoclax, suggests a potential modulatory effect on apoptotic pathways. The statistically significant decrease in BCL-2 expression compared to the venetoclax-like negative control further supports its role in regulating apoptosis. In percentage terms, BCL-2 levels decreased by 5.8% with ATSDL and

venetoclax and by 6.8% with EEQEW. BCL-2 is a well-documented apoptosis regulator that prevents cytochrome c release and caspase activation. Its downregulation may indicate the activation of intrinsic apoptotic pathways, leading to programmed cell death (Jacobson, 1997). Therefore, to fully elucidate the mechanism of action of these peptides, future studies should evaluate additional apoptotic markers, including the pro-apoptotic protein Bax and caspase activation, particularly caspase-3 and caspase-9. An increased Bax/BCL-2 ratio may indicate enhanced apoptosis, while caspase activation would confirm apoptotic progression..

Compounds physicochemical and pharmacokinetic are essential for designing lead compounds that effectively interact with biological targets while minimizing toxicity and side effects (Pantaleão *et al.*, 2022). The physicochemical and pharmacokinetic properties of venetoclax and the synthesized peptides EEQEW and ATSDL provide insights into their potential therapeutic applications. Venetoclax is significantly larger than the peptides EEQEW, and ATSDL. The higher polar surface area of the peptides compared to Venetoclax confirms the more hydrophilic nature of these compounds, which aligns with their lower octanol/water partition coefficients, which suggest a limited tissue distribution via passive diffusion. However, specific transporters in the body can facilitate the active transport of peptides across the plasma membrane, mitigating the challenges related to low lipophilicity (Pizzagalli; Bensimon; Superti-Furga, 2021).

The pKa is a key property that determines a molecule's ionization under different pH conditions, influencing its solubility, permeability, and pharmacokinetics. In this study, the selected peptides exhibited significant dissociation above pH 2.4 for EEQEW, 3.6 and 3.4 for ATSDL, suggesting that they are likely to be predominantly ionized at physiological pH. While this ionization profile enhances their aqueous solubility, it may also reduce their ability to cross lipid membranes, potentially affecting their absorption and distribution in vivo. The pKa values found suggest that the selected peptides are more likely to be absorbed in the stomach's acidic

environment. The low bioavailability found for the synthesized peptides may be correlated with the presence of serum peptidases that play a crucial role in the degradation of peptides, reducing their systemic circulation (Wang; Xie; Li, 2019). A practical approach to increasing peptide stability involves structural modifications, such as replacing natural amino acids with non-natural analogs (Adessi; Soto, 2002; Gentilucci; De Marco; Cerisoli, 2010), cyclizing the peptide chain (Li; Roller, 2002; Nguyen *et al.*, 2010), or Replacing L-amino acids with D-amino acids (Welch *et al.*, 2010), making them more resistant to enzymatic degradation. Another strategy is PEGylation, which can enhance plasma stability and extend the peptides' half-life in circulation (Lawrence; Price, 2016; Zuma *et al.*, 2022). Additionally, the use of lipid carriers (Matougui *et al.*, 2016), nanoparticles (CAO *et al.*, 2019), or polymer conjugation (Fuhrmann; Fuhrmann, 2017) can protect peptides from enzymatic degradation while improving their absorption and biodistribution. Therefore, the results found for the peptides differ from those of Venetoclax, which is known to have good human intestinal absorption and bioavailability (Lachowiez; Dinardo; Konopleva, 2020).

The distribution volume values were negative for all three compounds, implying differences in their tissue distribution. Plasma protein binding (PPB) is an important point to be evaluated, as it directly interferes with the pharmacodynamics of the compounds, influencing their safety and potential adverse effects. Since only the unbound fraction is pharmacologically active, variations in PPB will be correlated with the metabolism and risk of toxicity of these compounds (Xiong *et al.*, 2021). The EEQEW and ATSDL peptides showed a harmful volume of distribution values. It is important to understand that these negative values do not mean the actual distribution volume is harmful but that the log Vd values are below zero. This indicates that the predicted volumes of distribution are less than 1 L/Kg, suggesting these compounds have limited distribution beyond the bloodstream.

EEQEW and ATSDL exhibited a lower clearance rate than Venetoclax, indicating potentially prolonged systemic retention. The half-life of the three peptides was also longer than that of Venetoclax, which may impact dosing frequency and therapeutic efficacy. EEQEW and ATSDL are not substrates for the significant CYP enzymes, such as CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, or CYP3A4, possibly due to their low LogP values, indicating higher hydrophilicity and lower membrane permeability. More lipophilic drugs, with higher log P values, are typically metabolized in the liver by CYP enzymes, as their affinity for lipid membranes facilitates hepatic uptake and biotransformation (Zhao et al., 2021). Cytochrome P450 enzymes play a central role in phase I drug metabolism, catalyzing oxidation reactions that increase the polarity of molecules, facilitating their elimination. Isoforms such as CYP3A4, CYP2D6, and CYP2C9 are particularly important in the biotransformation of small lipophilic molecules, metabolizing a wide range of drugs (Esteves; Rueff; Kranendonk, 2021; Zhao et al., 2021). In contrast, peptides, due to their hydrophilic structure, follow distinct metabolic pathways, primarily being degraded by specific peptidases, such as aminopeptidases and carboxypeptidases (Esteves; Rueff; Kranendonk, 2021). These enzymes hydrolyze peptide bonds, breaking peptides into smaller fragments or free amino acids (Yao et al., 2018). Therefore, this is likely why CYP enzymes do not target them.

551

552

553

554

555

556

557

558

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

#### **6 Conclusion**

This study presented the potential anticancer effect of two peptides derived from soybean protein  $\beta$ -conglycinin. The results indicated that ATSDL and EEQEW peptides showed cytotoxic activity in MDA-MB-231 cells, with dose-dependent responses. In addition, it has the potential to modulate apoptosis by reducing the concentration of the Bcl-2 protein. The pharmacokinetic parameters revealed that these two peptides possess characteristics associated with low absorption, bioavailability, and distribution within the organism, yet they

have favorable clearance and half-life. This profile suggests that further studies should focus on structural modifications to preserve their activity while enhancing their pharmacokinetic properties. Despite the promising activity of the ATSDL peptide, future investigations should assess its impact on additional apoptotic markers, such as Bax and caspases, to provide a more comprehensive understanding of its therapeutic potential.

564

565

## REFERÊNCIA

- ADESSI, C.; SOTO, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and
- 567 Bioavailability. Current Medicinal Chemistry, v. 9, n. 9, 2002. 568

BRAY, F. et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature

570 death worldwide. Cancer, v. 127, n. 16, 2021.

571

- 572 BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and
- 573 mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v.
- 574 74, n. 3, 2024.

575

576 CAMPBELL, K.J.; TAIT, S. W. G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. Open Biology, v. 8, n. 5, 2018.

578

- 579 CHEN, Z. et al. Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black
- soybean [Glycine max (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking
- study. European Food Research and Technology, v. 245, n. 3, p. 677–689, 2019.

582

- 583 CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for
- physiology and therapy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014.

585

- 586 ESTEVES, F.; RUEFF, J.; KRANENDONK, M. The Central Role of Cytochrome P450 in
- 587 Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. Journal of
- 588 Xenobiotics, v. 11, n. 3, 2021.

589

- 590 FAN, Y. et al. Effects of diets on risks of cancer and the mediating role of metabolites. Nature
- 591 Communications, v. 15, n. 1, 2024.

592

- 593 FREITAS, C. S. et al. Encrypted antimicrobial and antitumoral peptides recovered from a
- 594 protein-rich soybean (Glycine max) by-product. Journal of Functional Foods, v. 54, 2019.

595

- 596 FUHRMANN, K.; FUHRMANN, G. Recent advances in oral delivery of macromolecular
- 597 drugs and benefits of polymer conjugation. Current Opinion In Colloid & Interface Science,
- 598 v. 31, 2017.

- 600 GONG, Y. et al. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death
- and Its Consequences. Cell, v. 169, n. 2, 2017.

- 603 GONZÁLEZ-MONTOYA, M. et al. Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative
- 604 Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Brea
- st and Cervical Cancer Cell Lines. Plant Foods for Human Nutrition, v. 71, n. 4, 2016.

606

- 607 GROSSO, G. et al. Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple meta-
- analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. Nutrition Reviews, v. 75, n. 6, p.
- 609 405–419, 2017.

610

- 611 GUPTA, S. C. et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and
- metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by
- 613 nutraceuticals. Cancer And Metastasis Reviews, v. 29, n. 3, 2010.

614

- 615 HAO, Y. et al. Lunasin peptide promotes lysosome-mitochondrial mediated apoptosis and
- 616 mitotic termination in MDA-MB-231 cells. Food Science and Human Wellness, v. 11, n. 6,
- 617 2022.

618

- 619 HSIAO, Y. et al. Anticancer activities of an antimicrobial peptide derivative of Ixosin-B
- amide. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 23, n. 20, 2013.

621

- HSIEH, C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. de. Cancer Chemopreventive
- Potential of Seed Proteins and Peptides. Nuts And Seeds In Health And Disease Prevention,
- 624 2020.

625

- JACOBSON, M. D. Apoptosis: bcl-2-related proteins get connected. Current Biology, v. 7, n.
- 627 5, 1997.

628

- JUÁREZ-SALCEDO, L. M.; DESAI, V.; DALIA, S. Venetoclax: Evidence to date and
- clinical potential. Drugs in Context, v. 8, 2019.

631

- KALE, Justin; OSTERLUND, Elizabeth J; ANDREWS, David W. BCL-2 family proteins:
- changing partners in the dance towards death. Cell Death & Differentiation, v. 25, n. 1, 2017.

634

- 635 KUMARI, N.; SURESH, N.; A., J. Significance of Bcl-2 expression in breast
- 636 cancer. Biomedicine, v. 42, n. 4, 2022.

637

- 638 LACHOWIEZ, C.; DINARDO, C. D.; KONOPLEVA, M. Venetoclax in acute myeloid
- leukemia—current and future directions. Leukemia and Lymphoma, v. 61, n. 6, 2020.

640

- 641 LAWRENCE, P. B.; PRICE, J. L. How PEGylation influences protein conformational
- stability. Current Opinion In Chemical Biology, v. 34, 2016.

643

- 644 LETAI, A. BH3 domains as BCL-2 inhibitors: prototype cancer therapeutics. Expert Opinion
- 645 On Biological Therapy, v. 3, n. 2, 2003.

646

- 647 LI, P.; ROLLER, P. Cyclization Strategies in Peptide Derived Drug Design. Current Topics in
- 648 Medicinal Chemistry, v. 2, n. 3, 2002.

- LUNA-VITAL, D.; DE MEJIA, E. G. Peptides from legumes with antigastrointestinal cancer 650
- potential: Current evidence for their molecular mechanisms. Current Opinion in Food 651
- 652 Science, v. 20, p. 13-18, 2018

- MATOUGUI, N. et al. Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. International 654
- 655 Journal Of Pharmaceutics, v. 502, n. 1-2, 2016.

656

- MOHAN, L. et al. BCL Protein and It's Intrinsic Apoptotic Pathway: A Literature Review. 657
- Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, v. 18, n. 4, 2024. 658

659

- 660 MUSAIMI, O. A. et al. Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery.
- Pharmaceuticals, v. 15, n. 10, 2022. 661

662

- MUSTAFA, M. et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, 663
- 664 morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. Cells, v.
- 13, n. 22, 2024. 665

666

- NGUYEN, L. T. et al. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial 667
- 668 peptide analogs. PLoS ONE, v. 5, n. 9, 2010.

669

- 670 PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A NEW FLUOROMETRIC ASSAY FOR
- CYTOTOXICITY MEASUREMENTS IN-VITRO. International Journal of Oncology, 1993. 671

672

- PANTALEÃO, S. Q. et al. Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties 673
- 674 in Drug Design Studies: a review. Chemmedchem, v. 17, n. 1, 2021.

675

- 676 PAVLOVA, N. N.; ZHU, J.; THOMPSON, C. B. The hallmarks of cancer metabolism: still
- emerging. Cell Metabolism, v. 34, n. 3, 2022. 677
- PFISTERER, P. H. et al. In silico discovery of acylated flavonol monorhamnosides from 678
- Eriobotrya japonica as natural, small-molecular weight inhibitors of XIAP BIR3. Bioorganic 679
- 680 & Medicinal Chemistry, v. 19, n. 2, 2011.

681

- PHILADELPHO, B. et al. Chromatography-independent fractionation and newly identified 682
- molecular features of the adzuki bean (Vigna angularis willd.) β-vignin protein. International 683
- Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 6, 2021. 684

685

- 686 PHILADELPHO, B. O. et al. Cowpea bean β-vignin-derived AQQSY peptide exerts an
- anticancer effect by inducing cell cycle arrest in the G0/G1 phase and modulating apoptotic 687
- 688 signals. Journal of Functional Foods, v. 122, 1 nov. 2024a.

689

- 690 PHILADELPHO, B. O. et al. Soybean β-Conglycinin and Cowpea β-Vignin Peptides Inhibit
- Breast and Prostate Cancer Cell Growth: An In silico and In vitro Approach. Foods, v. 13, n. 691
- 692 21, 1 nov. 2024b.

693

- PHILIPPE, G. J. B. et al. Cell Membrane Composition Drives Selectivity and Toxicity of 694
- Designed Cyclic Helix-Loop-Helix Peptides with Cell Penetrating and Tumor Suppressor 695
- Properties. ACS Chemical Biology, v. 14, n. 9, 2019. 696

- 698 PIZZAGALLI, M. D.; BENSIMON, A.; SUPERTI-FURGA, G. A guide to plasma membrane
- 699 solute carrier proteins. The Febs Journal, v. 288, n. 9, 2020.

QIAN, S. *et al.* The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. Frontiers In Oncology, v. 12, 2022.

703

SCHADUANGRAT, N. *et al.* ACPred: A computational tool for the prediction and analysis of anticancer peptides. Molecules, v. 24, n. 10, 2019.

706

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 1, 2024.

709

- 710 SOLIMAN, L. et al. The Role of BCL-2 Proteins in the Development of Castration-resistant
- 711 Prostate Cancer and Emerging Therapeutic Strategies. American Journal of Clinical
- 712 Oncology, v. 44, n. 7, 2021.

713

SOUERS, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nature Medicine, v. 19, n. 2, 2013.

716

- 517 SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and
- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians,
- 719 v. 71, n. 3, 2021.

720

- 721 TELEB, W. K. et al. Cytotoxicity and Molecular Alterations Induced by Scorpion Venom
- Antimicrobial Peptide Smp43 in Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and MCF-7.
- 723 International Journal of Peptide Research and Therapeutics, v. 29, n. 1, 2023.

724

- 725 VERMES, István; HAANEN, Clemens; STEFFENS-NAKKEN, Helga;
- 726 REUTELLINGSPERGER, Chris. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of
- 727 phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin
- 728 V. Journal Of Immunological Methods, v. 184, n. 1, 1995.

729

- 730 WANG, B.; XIE, N.; LI, B. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal
- transport, and *in vitro* bioavailability: a review. Journal Of Food Biochemistry, v. 43, n. 1,
- 732 2018.

733

- WANG, W. et al. β-Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different
- 735 soybean varieties that inhibit leukemia cells *in vitro*. Journal of Agricultural and Food
- 736 Chemistry, v. 56, n. 11, 2008.

737

- WELCH, B. D. *et al.* Design of a Potent d -Peptide HIV-1 Entry Inhibitor with a Strong
- 739 Barrier to Resistance. Journal of Virology, v. 84, n. 21, 2010.

740

- 741 XIONG, G. et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and
- comprehensive predictions of ADMET properties. Nucleic Acids Research, v. 49, 2021.

743

YAO, J.-F. *et al.* Metabolism of Peptide Drugs and Strategies to Improve their Metabolic Stability. Current Drug Metabolism, v. 19, n. 11, 2018.

746

ZARGARIAN, S. *et al.* Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis. Plos Biology, v. 15, n. 6, 2017.

750 751	ZHAO, M. <i>et al.</i> Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. International Journal Of Molecular Sciences, v. 22, n. 23, 2021.
752 753 754	ZHOU, J. D. <i>et al.</i> BCL2 overexpression: Clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. Diagnostic Pathology, v. 14, n. 1, 2019.
755 756 757 758	ZUMA, L. K. <i>et al.</i> Protein PEGylation: navigating recombinant protein stability, aggregation, and bioactivity. Biomed Research International, v. 2022, n. 1, 2022.
759	
760	<b>Author Contributions</b>
761	Victória Santiago: conceptualization, methodology, validation, investigation, in vitro and in
762	vitro experiments, data curation, formal analysis, and writing the manuscript. Biane
763	Philadelpho: conceptualization, validation, investigation, in vitro experiments, data curation,
764	formal analysis. Johnnie dos Santos: performed the methodology, validation, investigation,
765	and experiments in vitro. Eduardo Cilli: Performed the methodology, validation, investigation,
766	data curation, and project administration. Alessio Scarafoni: data curation, formal analysis,
767	data curation, formal analysis, writing—review, and editing. Fernando Pavan: methodology,
768	validation, in vitro experiments, data curation, formal analysis, project administration, and
769	acquired funding. Carolina Souza: conceptualization, data curation, formal analysis, reviewed,
770	edited, and acquired funding. Ederlan Ferreira: conceptualization, methodology, validation,
771	investigation, formal analysis, reviewed, edited, project administration, acquired funding and
772	was primarily responsible for the final manuscript.
773	
774	Conflicts of interest
775	All the authors declare no conflict of interest with regard to the research described, the

Acknowledgments

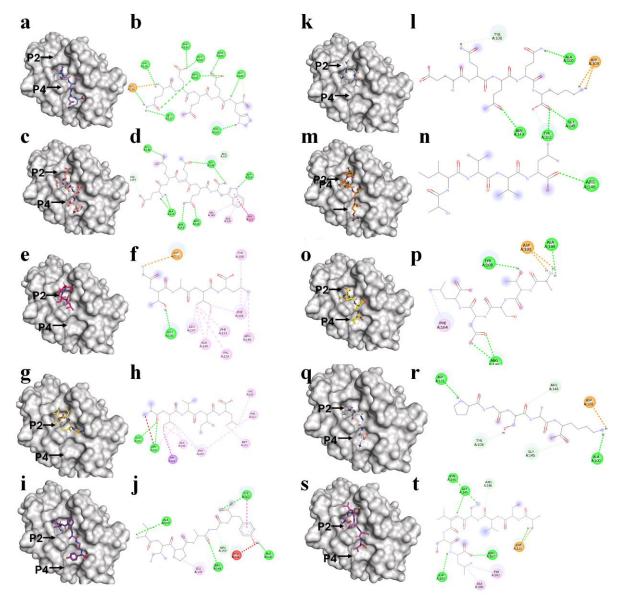
776

777

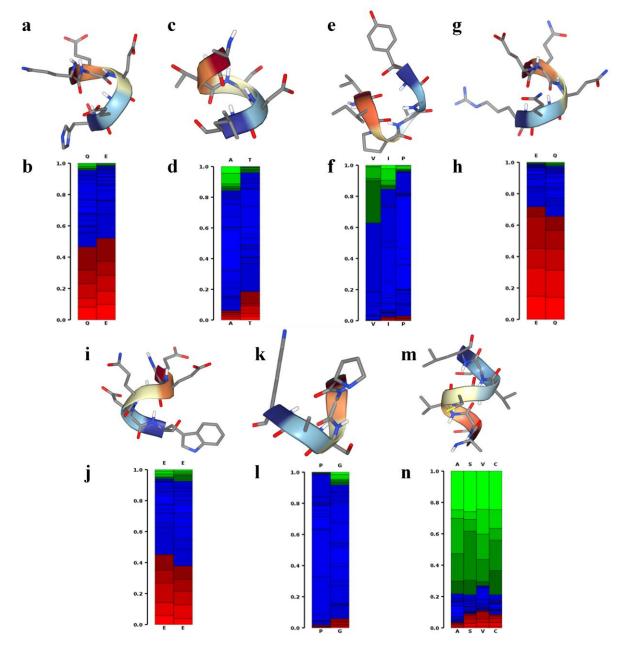
778

publication of the results, and financial issues.

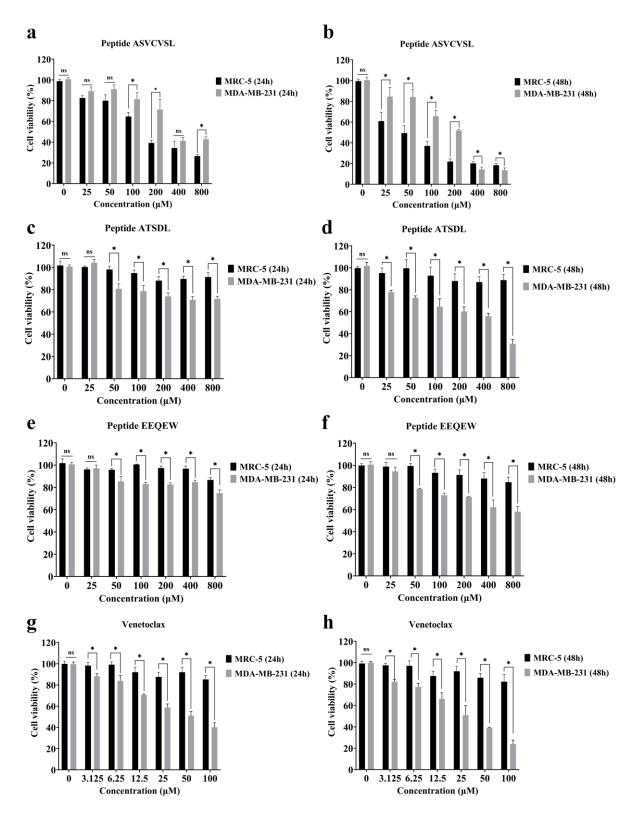
This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB/JCB n° 0012/2016), (FAPESB/INCITE, n° PIE0006/2022), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001; CAPES/PDPG (n° 88881.708195/2022-0). The fellowship of Victória Guimarães Santiago is FAPESB n° BOL0769/2023. Ederlan de Souza Ferreira is a researcher at CNPq (n° 301975/ 2021–3).



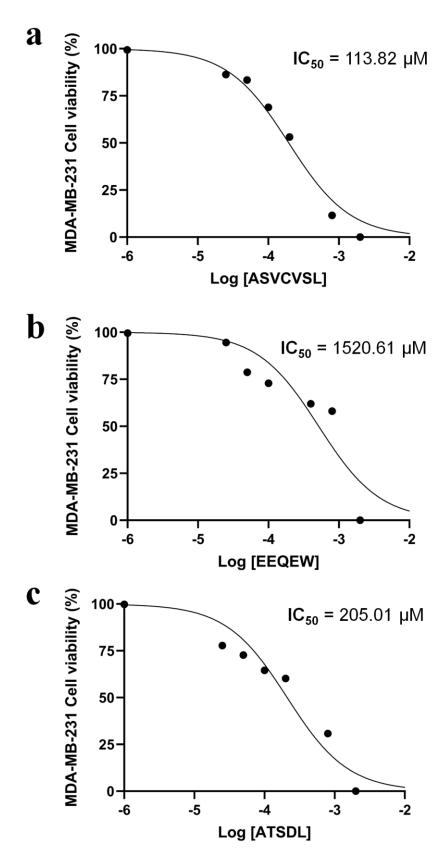
**Figure 1**. Docking analysis of β-conglycinin peptides with the BCL-2 BH3 domain (PDB ID: 600K) using the AutoDock Vina software. Orientations of QEEEH, EEQEW, GTAIL, AIVIL, VIPAGY, AIVVL, EQQQR, ATSDL, PGSAK, ASVCVSL docked into the BCL-2 BH3 domain are shown (a, c, e, g, i, k, m, o, q and s), respectively; their predicted binding profile (2D diagram) in the active site is shown in (b, d, f, h, j, l, n, p, r and t), respectively. All images were generated using PyMOL 0.99r software (Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA).



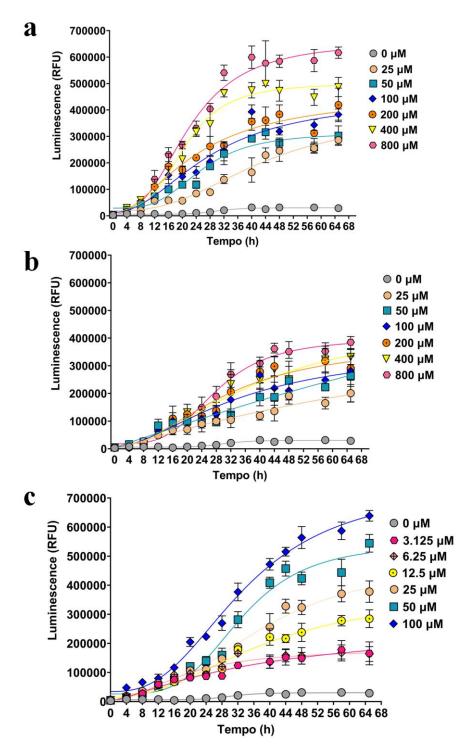
**Figure 2**. Secondary structure of QEEEH (a), EEQEW (c), VIPAGY (e), EQQQR (g), ATSDL (i), PGSAK (k), and ASVCVSL (m) peptides and local structure prediction profile (b, d, f, h, l and m) respectively predicted on PEPFOLD4<sup>®</sup>. Red, green, and blue colors indicate helical, extended, or other state propensities.



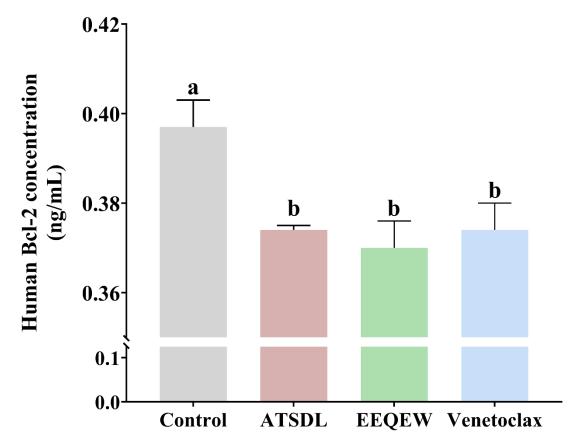
**Figure 3**. Cell viability (%) of MRC-5 and MDA-MB-231, treated with ASVCVSL, ATSDL, EEQEW, and venetoclax for 24 hours (a, c, e, and g) and 48 hours (b, d, f, and h), respectively. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). The symbol (\*) indicates a difference between the cell lines treated (p-value < 0.05 according to t-test).



**Figure 4**. Concentration-response effect of ASVCVSL (a), ATSDL (b), and (c) EEQEW peptides on cancer cell lines MDA-MB-231 treated per 48 hours.



**Figure 5.** Apoptosis levels in MDA-MB-231 cells under different treatments. ATSDL (a), EEQEW (b) peptides (concentrations of 0, 25, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ M), and venetoclax (c) (concentrations of 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100  $\mu$ M). Apoptosis was quantified using the RealTime-Glo annexin V apoptosis assay kit (Promega Inc., WI, USA). Increased luminescence (RFU) indicates annexin V binding to phosphatidylserine residues on the cell membrane, serving as an early apoptosis marker. Data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).



**Figure 6.** Effects of ATSDL, EEQEW, and venetoclax on BCL-2 protein concentration. All values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (n = 2). Results with the same letter do not differ according to Tukey's test (p > 0.05).

**Table 1.** Growth inhibition (%) and IC<sub>50</sub> values of the cancer cell lines, treated with the peptides or drug for 48 h.

Peptides	[ ] of inhibitor (µM)	MRC-5		MDA-MB-231	
		Inhibition (%)	IC50 (µM)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (µM)
Control	-	0.0	-	0.0	-
ASVCVSL	25 - 800	39.0 – 81.6	43.8	15.37 – 86.5	113.8
ATSDL	25 - 800	4.81 - 11.2	> 800	22.2 - 69.2	205.0
EEQEW	25 - 800	1.2 - 15.3	> 800	5.5 - 42.0	1520.6
Venetoclax	3.12 - 100	3.7 – 10.3	>100	17.9 – 75.9	31.9

**Table 2.** Physicochemical and pharmacokinetic properties of the peptides and drug.

Properties	ATSDL	EEQEW	Venetoclax
MW (g.mol <sup>-1</sup> )	505.52	719.28	867.32
TPSA (Ų)	257.48	350.50	172.03
LogP (w/o)	-2.610	-1.578	5.331
pKa	3.369	2.437	8.774
Bioavailability	< 20%	<20%	> 50%
VD L/Kg	-0,553	-0.678	-0.008
PPB (%)	24.2	31.8	99.6
CL plasma (mL.min <sup>-1</sup> .Kg <sup>-1</sup> )	1.770	1.848	2.298
T1/2 (hours)	1.923	1.274	0.671

MW, molecular weight. TPSA, Topological polar surface area. LogP, Log of octanol/water partition coefficient. pKa, Acid-base dissociation constant. VD, Volume Distribution. PPB, Protein Plasma Binding. Cl, Clearance. T1/2, half-life.

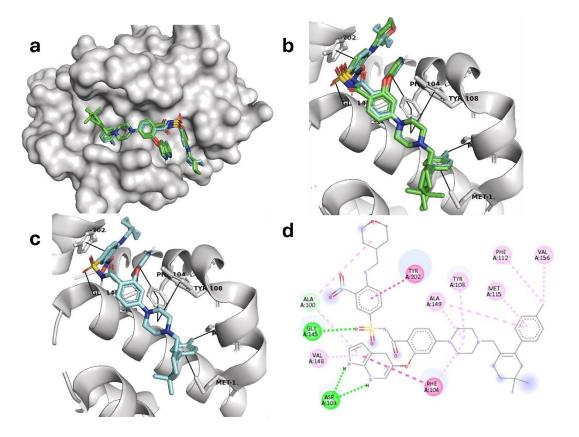
**Table 3.** Evaluation of peptides as substrates for liver enzymes.

824

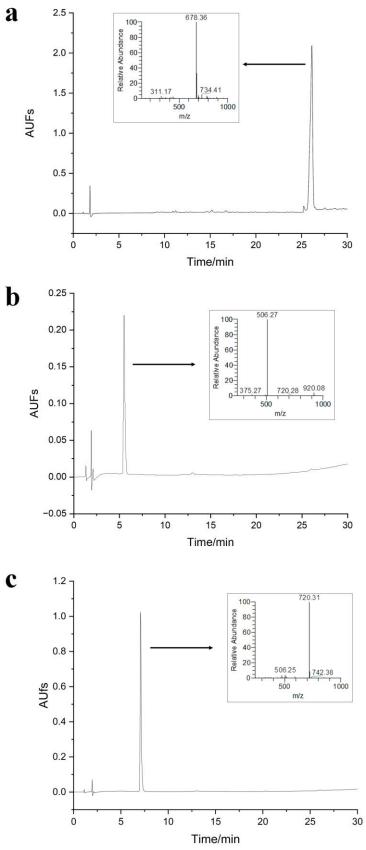
Enzyme	ATSDL	EEQEW	Venetoclax
CYP1A2	_	_	_
CYP2C19	_	_	+
CYP2C9	_	_	+
CYP2D6	_	_	_
CYP3A4	_	_	_

<sup>(+)</sup> indicates the compound is a substrate and (—) indicates the compound is not an enzyme substrate.

## **Supplementary material**



**Figure S1.** Docking analysis of venetoclax with the Bcl-2 protein (PDB ID: 6O0K) using AutoDock Vina software. Positioning of the crystallographic navitoclax (blue) and re-docked navitoclax (green) in the Bcl-2 binding site (a). Top-ranked pose of venetoclax (green) in the BCL-2 BH3 domain (b). Crystallographic binding profile of Venetoclax (blue) in the active site of BCL-2 (c). 2D diagram of Venetoclax interactions (d).



**Figure S2**. RP-HPLC data and mass-to-charge ratios (m/z) of ASVCVSL (a), ATSDL (b), and (c) EEQEW peptides after purification.

**Table S1** – Experimental data of the syntheses of peptides.

Peptide	Synthesis yield (%)	Purity (%)	MWTheoretical (g/mol)	MW <sub>Measured</sub> (g/mol)
ASVCVSL	65.2	> 95	677.82	678.36
EEQEW	82.3	99	719.70	720.30
ATSDL	85.8	96	505.50	506.26

MW, molecular weight.

839

**Table S2** – Prediction of anticancer peptides according to ACPred<sup>®</sup>.

Nº	Peptide	ACP	Non-ACP	Prediction
1	ASVSVSF*	0.802	0.198	ACP
2	GIAY*	0.822	0.178	ACP
3	QSCN	0.791	0.209	ACP
4	QACH*	0.925	0.075	ACP
5	EECEEGEIPR	0.612	0.388	ACP
6	EPQQPGEK	0.647	0.353	ACP
7	EEDEDEQPR	0.684	0.316	ACP
8	PIPF*	0.909	0.091	ACP
9	PQPR*	0.836	0.164	ACP
10	QEEEH*	0.842	0.158	ACP
11	EEQEW*	0.815	0.185	ACP
12	GSEEEDEDEDEEQDER	0.169	0.831	Non-ACP
13	QEEDEDEEQQR	0.352	0.648	Non-ACP
14	ESEDSEL	0.580	0.42	ACP
15	SPQL	0.713	0.287	ACP
16	ADADY	0.791	0.209	ACP
17	IVIL*	0.914	0.086	ACP
18	GTAIL*	0.857	0.143	ACP
19	QSGDAL	0.660	0.34	ACP
20	VPSGTTY	0.734	0.266	ACP
21	AIPVN	0.773	0.227	ACP
22	SSTEAQQSY	0.534	0.466	ACP
23	EASY	0.744	0.256	ACP
24	EEIN	0.735	0.265	ACP
25	EEGQQQGEQR	0.606	0.394	ACP
26	QESVIVEISK	0.271	0.729	Non-ACP
27	EQIR*	0.866	0.134	ACP
28	SSSR*	0.857	0.143	ACP
29	TISSEDK	0.497	0.503	Non-ACP
30	DPIY*	0.822	0.178	ACP
31	EITPEK	0.714	0.286	ACP

32	SIVDM	0.683	0.317	ACP
33	EGAL	0.748	0.252	ACP
34	AIVIL*	0.899	0.101	ACP
35	EGDAN	0.620	0.38	ACP
36	EQQQEQQQEEQPL	0.158	0.842	Non-ACP
37	SEQDIF	0.528	0.472	ACP
38	VIPAGY*	0.831	0.169	ACP
39	PVVN*	0.816	0.184	ACP
40	ATSN	0.740	0.164	ACP
41	AIGN*	0.836	0.164	ACP
42	AGSQDN	0.598	0.402	ACP
43	VISQIPSQVQEL	0.145	0.855	Non-ACP
44	PGSAQAVEK	0.504	0.496	ACP
45	VDAQPK	0.708	0.292	ACP
46	EEGN	0.671	0.329	ACP
47	SSIL*	0.867	0.133	ACP
48	GVVF*	0.846	0.154	ACP
49	VEEEEECEEGQIPR	0.185	0.815	Non-ACP
50	EEDEGEQPR	0.654	0.346	ACP
51	GSEEEQDER	0.527	0.473	ACP
52	EEEK*	0.853	0.147	ACP
53	ESEEEED	0.651	0.349	ACP
54	QDEDEEQDK	0.613	0.387	ACP
55	ESQESEGSESQR	0.143	0.857	Non-ACP
56	SQQL	0.761	0.239	ACP
57	QSGDA	0.654	0.346	ACP
58	VPAGTTY	0.736	0.264	ACP
59	SSTQAQQSY	0.571	0.429	ACP
60	EEGQQQGEER	0.555	0.445	ACP
61	EITPEK	0.713	0.287	ACP
62	SVVDM	0.679	0.321	ACP
63	AIVVL*	0.893	0.107	ACP
64	EGEAN	0.633	0.367	ACP

65	VGIK*	0.905	0.095	ACP
66	EQQQR*	0.827	0.173	ACP
67	QQQEEQPL	0.604	0.396	ACP
68	ATSDL*	0.833	0.167	ACP
69	AGSK*	0.918	0.082	ACP
70	PGSAK*	0.897	0.103	ACP
71	DIEN	0.747	0.253	ACP
72	SQSESY	0.572	0.428	ACP
73	VDAQPQQK	0.636	0.364	ACP
74	GTVF*	0.888	0.112	ACP
75	ASVCVSL*	0.859	0.141	ACP
76	EDEN	0.760	0.24	ACP
77	IVQF*	0.990	0.01	ACP
78	ADADF	0.730	0.27	ACP
79	PGDAQR	0.703	0.297	ACP
80	IPAGTTY	0.797	0.203	ACP
81	ETSF	0.722	0.278	ACP
82	GEEEEQR	0.717	0.283	ACP
83	QQEGVIVEL	0.420	0.58	Non-ACP
84	TISSEDEPF	0.521	0.479	ACP
85	SSVDIN	0.562	0.438	ACP
86	EQQK*	0.806	0.194	ACP
87	QEEEPL	0.691	0.309	ACP
88	EVQR	0.780	0.22	ACP
89	SEDDVF	0.662	0.338	ACP
90	VIPAAY*	0.845	0.155	ACP
91	AGEK*	0.813	0.187	ACP
92	QIER*	0.867	0.133	ACP
93	QVQEL	0.675	0.325	ACP
94	PGSAQDVER	0.431	0.569	Non-ACP
95	EEGSK	0.685	0.315	ACP
96	PSIL*	0.908	0.092	ACP

(\*) indicates peptides with a score > 0.8 that had their interaction potential investigated via molecular docking. ACP indicates peptides predicted and characterized to have anticancer activities. Non-ACP indicates peptides that have not been predicted and characterized as having anticancer activities.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Peptídeos oriundos da proteína β-conglicinina da soja demonstraram um potencial significativo na modulação da apoptose, evidenciado pela sua ação inibitória sobre a proteína Bcl-2. Embora o peptídeo ASVCVSL tenha promovido uma redução considerável na viabilidade celular, sua baixa seletividade para células não tumorais limita sua aplicação terapêutica. Em contrapartida, os peptídeos ATSDL e EEQEW exibiram atividade citotóxica nas células MDA-MB-231 de forma dependente da dose, corroborando a evidência de que esses peptídeos podem ser explorados como agentes anticancerígenos.

Os parâmetros farmacocinéticos de todos os peptídeos avaliados indicaram um perfil de baixa absorção e biodisponibilidade, mas com características favoráveis de depuração e meia-vida. Esses resultados sugerem para estudos futuros sejam realizadas modificações estruturais que melhorem suas propriedades farmacocinéticas, mantendo suas atividades biológicas e ampliando seu potencial terapêutico. Portanto, espera-se que trabalhos subsequentes a este estudo explorem modificações estruturais capazes de melhorar os parâmetros farmacocinéticos dos peptídeos, além de investigar outras possíveis vias de ação dos peptídeos, a exemplo verificando se há também interferência no ciclo celular.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-RAZEQ, H. *et al.* Patterns and prevalence of brca1 and brca2 germline mutations among patients with triple-negative breast cancer: Regional perspectives. **Cancer Management and Research**, v. 13, 2021.

ADESSI, C.; SOTO, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, 2002.

AMIGO, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. **Molecules**, v. 25, n. 19, 2020.

AVILÉS-GAXIOLA, S. *et al.* Moringa oleifera Lam. Leaf Peptides: Antioxidant and Antiproliferative Activity in Human Colon Cancer Caco-2 Cell Line. **Antioxidants**, v. 13, n. 11, 2024.

BARATI, M. *et al.* Techniques, perspectives, and challenges of bioactive peptide generation: A comprehensive systematic review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, 2020.

BAXTER, Amy A. *et al.* Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 20, 2017.

BONFIGLIO, R.; PIETRO, M.L. The impact of oral contraceptive use on breast cancer risk: state of the art and future perspectives in the era of 4p medicine. **Seminars In Cancer Biology**, v. 72, 2021.

BRAY, F. *et al.* The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, 2021.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, 2024.

CAMPBELL, K.J.; TAIT, S. W. G.. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. **Open Biology**, v. 8, n. 5, 2018.

CAO, Shu-Jun *et al.* Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. **Aaps Pharmscitech**, v. 20, n. 5, 2019.

CAVAZOS, A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 12, n. 4, 2013.

CHAMSEDDINE, R. S. *et al.* Penetrance of male breast cancer susceptibility genes: a systematic review. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 191, n. 1, 2021.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C.-W. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. **Nutrients**, v. 10, n. 9, 2018.

CHEN, Z. *et al.* Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [Glycine max (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking study. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 3, p. 677–689, 2019.

CHEUNG, C. H. A. *et al.* Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of xiap, survivin, and bruce. **Journal Of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 2020.

CHIANGJONG, W.; CHUTIPONGTANATE, S.; HONGENG, S. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application. **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 3, 2020.

CUNHA, S. A.; PINTADO, M. E. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 348–370, 2022.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014.

DANDAMUDI, A. *et al.* Dietary Patterns and Breast Cancer Risk: a systematic review. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, 2018.

ELMORE, J. G. *et al.* Screening for Breast Cancer. **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, 2005.

ESTEVES, F.; RUEFF, J.; KRANENDONK, M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. **Journal Of Xenobiotics**, v. 11, n. 3, 2021.

FAN, Y. *et al.* Effects of diets on risks of cancer and the mediating role of metabolites. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 2024.

FELÍCIO, M. R. *et al.* Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. **Frontiers In Chemistry**, v. 5, 2017.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S. *et al.* Inhibitory effects of peptide lunasin in colorectal cancer hct-116 cells and their tumorsphere- derived subpopulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, 2020.

FLORES-ROMERO, H. *et al.* BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 41, n. 2, 2022.

FREITAS, C. S. *et al.* Encrypted antimicrobial and antitumoral peptides recovered from a protein-rich soybean (Glycine max) by-product. **Journal of Functional Foods**, v. 54, 2019.

FUHRMANN, K.; FUHRMANN, G. Recent advances in oral delivery of macromolecular drugs and benefits of polymer conjugation. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, v. 31, 2017.

GAO, B. *et al. In vitro* Protective Effect of Pea-Derived Peptides (PPs) via the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway on Alpha-Gliadin-Sensitizing Peptide Induced Cacao-2 Cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 68, n. 15, 2024.

GARTNER, A.; ENGEBRECHT, J. DNA repair, recombination, and damage signaling. **Genetics**, v. 220, n. 2, 2022.

GENTILUCCI, L.; DE MARCO, R.; CERISOLI, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, 2010.

GHALY, G. et al. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. Molecules, v. 28, n. 3, 2023.

GONG, Y. *et al.* ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. **Cell**, v. 169, n. 2, 2017.

GONZÁLEZ-MONTOYA, M. *et al.* Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Breast and Cervical Cancer Cell Lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 4, 2016.

GROSSO, G. *et al.* Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple metaanalyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 6, p. 405–419, 2017.

GUPTA, S. C. *et al.* Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer And Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, 2010.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell, 2011.

HAO, Y. *et al.* Lunasin peptide promotes lysosome-mitochondrial mediated apoptosis and mitotic termination in MDA-MB-231 cells. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 6, 2022.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. Nature Reviews Disease Primers, v. 5, n. 1, 2019.

HASAN, M. *et al.* Research trends and approaches for the nutritional and bio-functionality enhancement of fermented soymilk. **Journal Of Functional Foods**, v. 107, 2023.

HAUSSMANN, J. *et al.* Recent advances in radiotherapy of breast cancer. **Radiation Oncology**, v. 15, n. 1, 2020.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. Cancer Cell, v. 38, n. 2, 2020.

HSIAO, Y. *et al.* Anticancer activities of an antimicrobial peptide derivative of Ixosin-B amide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, 2013.

HSIEH, C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. de. Cancer Chemopreventive Potential of Seed Proteins and Peptides. **Nuts And Seeds In Health And Disease Prevention**, 2020.

HSIEH, C. H. *et al.* The Hydrolytic Peptides of Soybean Protein Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis on Human Oral Cancer Cell Line HSC-3. **Molecules**, v. 27, n. 9, 2022.

HUANG, Y. *et al.* The role of peptides in reversing chemoresistance of breast cancer: current facts and future prospects. **Frontiers in Pharmacology,** v. 14, 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2023**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JACOBSON, M. D. Apoptosis: bcl-2-related proteins get connected. **Current Biology**, v. 7, n. 5, 1997.

JALIL, A. T. *et al.* Peptide-Based Therapeutics in Cancer Therapy. **Molecular Biotechnology**, v. 66, n. 10, 2023.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, 2019.

JUÁREZ-SALCEDO, L. M.; DESAI, V.; DALIA, S. Venetoclax: Evidence to date and clinical potential. **Drugs in Context**, v. 8, 2019.

KALE, Justin; OSTERLUND, Elizabeth J; ANDREWS, David W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, 2017.

KEELAN, S.; FLANAGAN, M.; HILL, A. D. K. Evolving Trends in Surgical Management of Breast Cancer: an analysis of 30 years of practice changing papers. **Frontiers In Oncology**, v. 11, p. 12-32, 2021.

KERKHOFS, M. *et al.* BIRD-2, a BH4-domain-targeting peptide of Bcl-2, provokes Bax/Bak-independent cell death in B-cell cancers through mitochondrial Ca2+-dependent mPTP opening. **Cell Calcium**, v. 94, 2021.

KRISHNA, S. *et al.* Structure-based design approach of potential BCL-2 inhibitors for cancer chemotherapy. **Computers In Biology and Medicine**, v. 134, 2021.

KUMARI, N.; SURESH, N.; A., J. Significance of Bcl-2 expression in breast cancer. **Biomedicine**, v. 42, n. 4, 2022.

LACHOWIEZ, C.; DINARDO, C. D.; KONOPLEVA, M. Venetoclax in acute myeloid leukemia–current and future directions. **Leukemia and Lymphoma**, v. 61, n. 6, 2020.

- LAWRENCE, P. B.; PRICE, J. L. How PEGylation influences protein conformational stability. **Current Opinion In Chemical Biology**, v. 34, 2016.
- LEE, A. C. L. *et al.* A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2019.
- LEE, E. F.; FAIRLIE, W. Douglas. Discovery, development and application of drugs targeting BCL-2 pro-survival proteins in cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 5, 2021.
- LETAI, A. BH3 domains as BCL-2 inhibitors: prototype cancer therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, n. 2, 2003.
- LI, M. *et al.* Finding and isolation of novel peptides with anti-proliferation ability of hepatocellular carcinoma cells from mung bean protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 62, 2019.
- LI, P.; ROLLER, P. Cyclization Strategies in Peptide Derived Drug Design. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 2, n. 3, 2002.
- LIMA, S. M.; KEHM, R. D.; TERRY, M. B. Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. **EClinicalMedicine**, v. 38, 2021.
- LISCANO, Y.; OÑATE-GARZÓN, J.; DELGADO, J. P. Peptides with Dual Antimicrobial—Anticancer Activity: Strategies to Overcome Peptide Limitations and Rational Design of Anticancer Peptides. **Molecules**, v. 25, n. 18, 2020.
- LIU, Y. *et al.* Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 5, n. 5, 2015.
- LUNA-VITAL, D.; DE MEJIA, E. G. Peptides from legumes with antigastrointestinal cancer potential: Current evidence for their molecular mechanisms. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 13-18, 2018.
- MATOUGUI, N. *et al.* Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 502, n. 1-2, 2016.
- MAUMY, L. *et al.* Impact des régimes alimentaires sur la mortalité et le risque de récidive de cancer du sein : revue de la littérature. **Bulletin du Cancer**, v. 107, n. 1, 2020.
- MCCONNELL, E. J. *et al.* The soybean-derived peptide lunasin inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by suppressing phosphorylation of the retinoblastoma protein. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, 2015.
- MEIRSON, T.; GIL-HENN, H.; SAMSON, A. O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. **Oncogene**, v. 39, n. 9, 2020.

MEJIA, E. G.; WANG, W.; DIA, V. Lunasin, with an arginine—glycine—aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 3, 2010.

MELO-ALVIM, C. *et al.* Radiotherapy, Chemotherapy and Immunotherapy—Current Practice and Future Perspectives for Recurrent/Metastatic Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Diagnostics**, v. 13, n. 1, 2022.

MERRIFIELD, R. B.. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin\*. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, 1964.

MITTELMAN, S. D. The Role of Diet in Cancer Prevention and Chemotherapy Efficacy. **Annual Review of Nutrition**, v. 40, n. 1, 2020.

MOHAN, L. *et al.* BCL Protein and It's Intrinsic Apoptotic Pathway: A Literature Review. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 18, n. 4, 2024.

MONTALES, M. T. E. *et al.* Metformin and soybean-derived bioactive molecules attenuate the expansion of stem cell-like epithelial subpopulation and confer apoptotic sensitivity in human colon cancer cells. **Genes & Nutrition**, v. 10, n. 6, 2015.

MUÑOZ-RODRÍGUEZ, D. I.; ARANGO-ALZATE, C. M.; SEGURA-CARDONA, Á. M. Entornos y actividad física en enfermedades crónicas: Más allá de factores asociados. **Universidad y Salud**, v. 20, n. 2, 2018.

MUSAIMI, O. A. *et al.* Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery. **Pharmaceuticals,** v. 15, n. 10, 2022.

MUSTAFA, M. *et al.* Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. **Cells**, v. 13, n. 22, 2024.

NARDIN, S. *et al.* Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. **Frontiers In Oncology**, v. 10, 2020.

NATH, A. *et al.* Antioxidant and Antibacterial Peptides from Soybean Milk through Enzymatic- and Membrane-Based Technologies. **Bioengineering**, v. 7, n. 1, 2019.

NGUYEN, L. T. *et al.* Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, 2010.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy. **Frontiers In Pharmacology**, v. 987, n. 22, 2018.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, 2024.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A NEW FLUOROMETRIC ASSAY FOR CYTOTOXICITY MEASUREMENTS IN-VITRO. **International Journal of Oncology**, 1993.

PANTALEÃO, S. Q. *et al.* Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: a review. **Chemmedchem**, v. 17, n. 1, 2021.

PAVLOVA, N. N.; ZHU, J.; THOMPSON, C. B. The hallmarks of cancer metabolism: still emerging. **Cell Metabolism**, v. 34, n. 3, 2022.

PFISTERER, P. H. *et al. In silico* discovery of acylated flavonol monorhamnosides from Eriobotrya japonica as natural, small-molecular weight inhibitors of XIAP BIR3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, 2011.

PHILADELPHO, B. *et al.* Chromatography-independent fractionation and newly identified molecular features of the adzuki bean (Vigna angularis willd.) β-vignin protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, 2021.

PHILADELPHO, B. O. *et al.* Cowpea bean  $\beta$ -vignin-derived AQQSY peptide exerts an anticancer effect by inducing cell cycle arrest in the G0/G1 phase and modulating apoptotic signals. **Journal of Functional Foods**, v. 122, 1 nov. 2024a.

PHILADELPHO, B. O. *et al.* Soybean β-Conglycinin and Cowpea β-Vignin Peptides Inhibit Breast and Prostate Cancer Cell Growth: An *In silico* and *In vitro* Approach. **Foods**, v. 13, n. 21, 1 nov. 2024b.

PHILIPPE, G. J. B. *et al.* Cell Membrane Composition Drives Selectivity and Toxicity of Designed Cyclic Helix-Loop-Helix Peptides with Cell Penetrating and Tumor Suppressor Properties. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 9, 2019.

PIZZAGALLI, M. D.; BENSIMON, A.; SUPERTI-FURGA, G. A guide to plasma membrane solute carrier proteins. **The Febs Journal**, v. 288, n. 9, 2020.

QIAN, S. *et al.* The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. **Frontiers In Oncology**, v. 12, 2022.

RAO, B.; ZHANG, L.; ZHANG, G. ACP-GCN: The identification of anticancer peptides based on graph convolution networks. **IEEE Access**, v. 8, 2020.

RASARATNAM, K. *et al.* A novel peptide isolated from garlic shows anticancer effect against leukemic cell lines via interaction with Bcl-2 family proteins. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 97, n. 5, 2021.

REY, J. et al. PEP-FOLD4: a ph-dependent force field for peptide structure prediction in aqueous solution. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 1, 2023.

SANTOS, M. DE O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia,** v. 69, n. 1, 2023.

SCHADUANGRAT, N. *et al.* ACPred: A computational tool for the prediction and analysis of anticancer peptides. **Molecules**, v. 24, n. 10, 2019.

SEILER, Annina *et al.* Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. Current **Breast Cancer Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 14-27, 2018.

SEKINE, Masayuki; NISHINO, Koji; ENOMOTO, Takayuki. Differences in Ovarian and Other Cancers Risks by Population and BRCA Mutation Location. **Genes**, v. 12, n. 7, 2021.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA**: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 1, 2024.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA**: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 1, p. 12–49, 2024.

SINGH, M. *et al.* Computational Design of Biologically Active Anticancer Peptides and Their Interactions with Heterogeneous POPC/POPS Lipid Membranes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 1, 2020.

SMOLARZ, Beata *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment. **Cancers**, v. 14, n. 10, p. 2569, 2022.

SOLIMAN, L. *et al.* The Role of BCL-2 Proteins in the Development of Castration-resistant Prostate Cancer and Emerging Therapeutic Strategies. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 44, n. 7, 2021.

SOUERS, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, 2013.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA**: A Cancer Journal for Clinicians, v. 71, n. 3, 2021.

TALHOUET, S. *et al.* Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

TALLORIN, L. *et al.* Discovering de novo peptide substrates for enzymes using machine learning. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

TELEB, W. K. *et al.* Cytotoxicity and Molecular Alterations Induced by Scorpion Venom Antimicrobial Peptide Smp43 in Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and MCF-7. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 29, n. 1, 2023.

TOSTIVINT, V. *et al.* Progrès dans l'étude du cancer de la prostate : la culture cellulaire en trois dimensions reproduit ex vivo les caractéristiques des tumeurs prostatiques. **La Presse Médicale**, v. 46, n. 10, 2017.

TRAPOTSI, M.; HOSSEINI-GERAMI, L.; BENDER, A. Computational analyses of mechanism of action (MoA): data, methods and integration. **Rsc Chemical Biology**, v. 3, n. 2, 2022.

UNWIN, N.; ALBERTI, K. G. M. M. Chronic non-communicable diseases. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 5–6, 2006.

VARINSKA, L. *et al.* Soy and Breast Cancer: focus on angiogenesis. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, 2015.

VERMES, István; HAANEN, Clemens; STEFFENS-NAKKEN, Helga; REUTELLINGSPERGER, Chris. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal Of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, 1995.

WAKUI, N. *et al.* Exploring the selectivity of inhibitor complexes with Bcl-2 and Bcl-XL: A molecular dynamics simulation approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 79, 2018.

WANG, B.; XIE, N.; LI, B. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and *in vitro* bioavailability: a review. **Journal Of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, 2018.

WANG, W. *et al.* β-Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, 2008.

WANG, Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. **Cells**, v. 10, n. 12, 2021.

WEEDEN, C. E. et al. Impact of risk factors on early cancer evolution. Cell, v. 186, n. 8, 2023.

WELCH, B. D. *et al.* Design of a Potent d -Peptide HIV-1 Entry Inhibitor with a Strong Barrier to Resistance. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, 2010.

XIONG, G. *et al.* ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, v. 49, 2021.

XU, L. *et al.* A novel hybrid sequence-based model for identifying anticancer peptides. **Genes**, v. 9, n. 3, 2018.

YAO, J.-F. *et al.* Metabolism of Peptide Drugs and Strategies to Improve their Metabolic Stability. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 11, 2018.

YIMIT, D. *et al.* Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers. **Nutrition**, v. 28, n. 2, 2012.

YU, F. *et al.* A novel anti-proliferative pentapeptide (ILYMP) isolated from *Cyclina sinensis* protein hydrolysate induces apoptosis of DU-145 prostate cancer cells. Molecular Medicine Reports, v. 18, n. 1, 2018.

ZARGARIAN, S. *et al.* Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis. **Plos Biology**, v. 15, n. 6, 2017.

ZASHEVA, D. *et al.* Cytotoxic Effects of Plant Secondary Metabolites and Naturally Occurring Bioactive Peptides on Breast Cancer Model Systems: molecular mechanisms. **Molecules**, v. 29, n. 22, 2024.

ZHAO, M. *et al.* Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

ZHOU, J. D. *et al.* BCL2 overexpression: Clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. **Diagnostic Pathology**, v. 14, n. 1, 2019.

ZUMA, L. K. *et al.* Protein PEGylation: navigating recombinant protein stability, aggregation, and bioactivity. **Biomed Research International**, v. 2022, n. 1, 2022.

# PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA (2023 – 2025)

#### **Artigos publicados:**

1. Soybean β-Conglycinin and Cowpea β-Vignin Peptides Inhibit Breast and Prostate Cancer Cell Growth: An *In silico* and *In vitro* Approach (https://doi.org/10.3390/foods13213508)

#### Trabalhos completo em eventos científicos:

- Potencial de Peptídeos Bioativos Derivados da Soja: Uma Prospecção Tecnológica Sobre Aplicações na Saúde. III Semana da Engenharia de Alimentos (SeAli), 2023.
- Peptídeos FS e NF como potenciais inibidores da VEGFR2: uma abordagem in silico.
   V Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia (COBICET), 2024.

### Resumos (simples ou expandido) em eventos científicos:

- Estudo in silico e in vitro da citotoxicidade do hidrolisado e frações peptídicas derivadas da proteína beta-vignina (7S) do feijão-caupí, sobre linhagens tumorais humanas. Congresso UFBA 2023, 2023.
- Estudo in sílico e *in vitro* do efeito citotóxico de hidrolisados e frações peptídicas derivado da proteína beta-conglicinina da soja, sobre linhagens tumorais humanas. Congresso UFBA 2023, 2023.
- Aplicabilidades e bioatividade de compostos de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K, Schum.). II Simpósio Integrado dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia (SIPPFar), 2023.
- Potencialidade de utilização da semente de cupuaçu como fonte de nutrientes. II Simpósio Integrado dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia (SIPPFar), 2023.
- Avaliação *in silico* de peptídeos derivados da proteina β-conglicinina inibidores da Bel II Simpósio Integrado dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia (SIPPFar), 2023.
- Adzuki β-Vignin (7s Globulin) As a Curcumin Carrier Biological System: An *In silico* Approach. IV Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia, 2023.

- Avaliação da atividade anticancerígena do hidrolisado total e peptídeos oriundos betavignina do feijão-caupí em linhagem de carcinoma hepatocelular. Seminário Estudantil UFBA 2023.
- 8. Avaliação *in silico* e *in vitro* da atividade antitumoral de peptídeos da beta-conglicinina da soja em linhagem tumoral de cólon. Seminário Estudantil UFBA 2023, 2023.
- Composição centesimal, extratibilidade proteica e quantificação de fenólicos totais da semente de cupuaçu (Theobroma grandiflorum). Seminário Estudantil UFBA 2023, 2023.
- Determinação e aplicação de propriedades funcionais da proteína da semente de piaçava. Seminário Estudantil UFBA 2023, 2023.
- 11. Iniciação ao estudo de peptídeos derivados da proteína de feijões como promotores benéficos à saúde. Seminário Estudantil UFBA 2023, 2023.
- 12. NDY and PYRGLUDF peptides analogues to QDF have hypocholesterolemic potential: an *in silico* and *in vitro* investigation. 52nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2023.
- 13. Parâmetros para Obtenção de Concentrado Proteico a Partir Da Semente de Cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*). 15° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição (SLACAN): 'A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável', 2023.
- 14. Composição Proximal, Frações Proteicas e Estudo de Solubilidade da Proteína da Larva de Tenébrio Gigante (*Zophobas Morio*). 15° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição (SLACAN): 'A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável', 2023.
- 15. Techno-Functional Properties Of Piassava Protein Fraction: Potential Food Applications. 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2024.
- 16. Parameters for obtaining a protein concentrate from the larvae of the Giant Tenbridge (*Zophobas Morio*). 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos(CBCTA), 2024.
- 17. Texture and color properties of cupuaçu seed flour extrudate. 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2024.
- 18. Evaluation of the techno-functional properties of cowpea protein isolate subjected to different physical treatments. 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2024.

- 19. Cupuassu Seeds As A Source Of Protein For The Food Industry. 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2024.
- 20. Molecular screening of peptides derived from β-vignin with antitumor potential and predicted interaction with Bcl-2 and CDK-6. In: 29° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2024.
- 21. β-Conglycinin Can Act as Bcl-2 Inhibitors: An *In silico* Approach. 3rd International Congress on Bioactive Compounds and 4th International Workshop on Bioactive Compounds: Functional Foods as the Cornerstone of Healthy Nutrition: Linking Academia and Industry, 2024.

#### Tutoria de alunos de iniciação científica (IC):

- Nome do aluno de IC: João Ricardo Oliveira Rangel Ferreira dos Santos
   Título do trabalho: Avaliação da atividade anti-hipertensiva do hidrolisado total e peptídeos oriundos da beta-vignina do feijão-caupí.
   Órgão de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
   (CNPq)
- Nome do aluno de IC: Alfredo Almeida Bitercourt Neto
   Título do trabalho: Iniciação ao estudo de peptídeos bioativos derivados da proteína de feijões como promotores da saúde.
   Órgão de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
   (CNPq)

#### Prêmios:

- 3. Menção Honrosa pelo trabalho "Potencialidade De Utilização Da Semente De Cupuaçu Como Fonte De Nutrientes", II Simpósio Integrado dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia (SIPPFar), Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2023.
- 4. Menção honrosa pelo trabalho "Potencial anticancerígeno do peptídeo NFI através da inibição da proteína FGFR1: uma avaliação in silico", 38º Semana de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2024.
- 5. Menção Honrosa ao Trabalho "Peptídeos FS e NF como potenciais inibidores da VEGFR2: uma abordagem *in silico*", V COBICET, 2024.