MARIANA DAOU VERENHITACH

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS E
ANTIPROLIFERATIVOS DO PEPTÍDEO INKKI EM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MCF-7**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo
2015

MARIANA DAOU VERENHITACH

**Avaliação dos efeitos antitumorais e antiproliferativos
do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de
mama MCF-7**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Versão original

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Verenhitach, Mariana Daou

Avaliação dos efeitos antitumorais e antiproliferativos do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 / Mariana Daou Verenhitach . -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.INKKI 2.Peptídeo 3.Hidrolise 4.Caseína 5.Neoplasias da mama 6.Apoptose 7.Caspases

USP/FM/DBD-402/15

FOLHA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Candidata: Verenhitach, Mariana Daou

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Título da Dissertação: **Avaliação dos efeitos antitumorais e antiproliferativos do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ____/____/_____, considerou a candidata:

() Aprovada () Reprovada

Presidente: Nome: Prof.(a). Dr.(a).:_____

Assinatura:_____

Instituição: _____

Examinador(a): Nome: Prof.(a). Dr.(a).:_____

Assinatura:_____

Instituição: _____

Examinador(a): Nome: Prof.(a). Dr.(a).:_____

Assinatura:_____

Instituição: _____

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

butantan

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 21 de setembro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Atividade antiroliferativa e antiangiogênica do peptídeo derivado da hidrólise da Beta-caseína INKKI em linhagens de células de adenocarcinoma de mama e endoteliais", protocolado nº 7262130815, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria; Mariana Daou Verenhitch, foi revisado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN em 16/09/2015, e não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "", protocol number 7262130815, under the responsibility Durvanei Augusto Maria; Mariana Daou Verenhitch, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee in 09/16/2015, and that it does not involve breeding and/or use of animais belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Prof. Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Durvanei Augusto Maria pela paciência, generosidade, estímulo, apoio e conhecimento. Sem ele não seria possível finalizar este trabalho;

Aos orientandos do Professor Dr. Durvanei Augusto Maria: Arthur, Manuela, Clarissa, Antenor e José Alberto, que contribuíram com conhecimento técnico, experiência, tempo e atenção;

À minha família e aos queridos Leo e Eloísa pelo apoio moral!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	12
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 O ciclo celular mitótico e a tumorigênese	20
2.1.1 A fase G1	21
2.1.2 A fase S	24
2.1.3 A fase G2	26
2.1.4 A fase M e o ponto de checagem das fibras do fuso	27
2.2 Apoptose	27
2.2.1 Via extrínseca da apoptose	29
2.2.2 Via intrínseca da apoptose	29
2.2.3 A família Bcl-2 (do inglês: B-cell lymphoma-2): proteínas reguladoras que atuam cadeia acima à ativação de caspases efetoras	30
2.2.4 Execução da apoptose: a ação das caspases efetoras	32
2.3 A proteína p53	32
2.4 Peptídeos bioativos.	33
2.4.1 Peptídeos bioativos catiônicos anfipáticos e sua potencial atividade antitumoral	34
2.4.2 O Peptídeo INKKI	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivos específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Cultivo de linhagens de células tumorais e normais	39
4.2 Determinação da atividade citotóxica (Índice de Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) em células tumorais e normais pelo teste colorimétrico do MTT	39
4.3 Determinação da capacidade proliferativa de células de adenocarcinoma de mama tratadas com o peptídeo INKKI pelo método CFSE-DA em citometria de fluxo	40
4.4 Determinação do potencial elétrico mitocondrial em células de adenocarcinoma de mama com a sonda fluorescente Rodamina 123 e citometria de fluxo	41
4.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	42

4.6 Avaliação da formação de radicais lipoperoxidados (Lipoperoxidação Lipídica - LPO)	42
4.7 Avaliação da expressão de marcadores por citometria de fluxo	43
4.8 Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico	44
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6 RESULTADOS	46
6.1 Determinação da atividade citotóxica (Índice de Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) em células tumorais e normais pelo teste colorimétrico do MTT	46
6.2 Determinação da capacidade proliferativa de células de adenocarcinoma de mama tratadas com o peptídeo INKKI pelo método CSFE-DA em citometria de fluxo	47
6.3 Determinação do potencial elétrico mitocondrial em células de adenocarcinoma de mama com a sonda fluorescente Rodamina 123 e citometria de fluxo	48
6.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	50
6.5 Avaliação da formação de radicais lipoperoxidados (Lipoperoxidação Lipídica - LPO)	52
6.6 Avaliação da expressão de marcadores por citometria de fluxo	55
6.7 Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico	75
7 DISCUSSÃO	76
8 CONCLUSÃO	84
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

TABELAS:

Tabela-1: Determinação da atividade inibitória (IC50) em linhagens de células tumorais de mama e normais tratadas com o peptídeo INKKI e linhagens de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 com os quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo.

46

LISTA DE FIGURAS:

Figura-1: Histogramas representativos da capacidade proliferativa do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 pelo método CSFE-DA em citometria de fluxo.

47

Figura-2: Curvas dos diferentes potenciais elétricos da mitocôndria utilizando-se a sonda fluorescente Rodamina 123 por citometria de fluxo em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

49

Figura-3: Histogramas representativos da distribuição populacional das diferentes fases do ciclo celular das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas.

50

Figura-4: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão dos marcadores Ciclina D1, p53 e da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas com e sem o tratamento com o peptídeo INKKI.

56

Figura-5: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Caspase 3 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

58

Figura-6: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Caspase 8 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

60

Figura-7: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

62

Figura-8: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Bax em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

64

Figura-9: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Bad em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

66

Figura-10: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador p21 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

68

Figura-11: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador p27 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

70

Figura-12: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador P-gp em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.	72
Figura-13: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador pRb em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.	74
Figura-14: Fotografias da morfologia das culturas celulares das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 com e sem o tratamento com o INKKI.	75

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico – 1: Médias e desvios padrão da capacidade proliferativa do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 pelo método CSFE-DA.	48
Gráfico–2: Médias e desvios padrão do potencial elétrico mitocondrial do peptídeo INKKI (3,78 µg/mL) em células MCF-7 pelo método do efluxo da Rodamina 123 por citometria de fluxo.	49
Gráfico–3: Médias ± desvio padrão da distribuição populacional nas fases do ciclo celular das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle, peptídeo e paclitaxel.	51
Gráfico-4: Correlações estatísticas da efetividade e eficácia do tratamento dos grupos controle não tratado X peptídeo (3,78 µg/mL) nas fases do ciclo celular.	51
Gráfico–5: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	52
Gráfico–6: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama MDA-231 tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	53
Gráfico–7: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama T47-D tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	53
Gráfico–8: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama murina de Ehrlich tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	54
Gráfico–9: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células normais endoteliais humanas HUVEC tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	54
Gráfico–10: Médias ± desvio padrão dos níveis de LPO para as células de fibroblastos humanos FN-1 normais tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações.	55

Gráfico–11: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão dos marcadores ciclina D1, p53 e Bcl-2 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratado com o peptídeo INKKI (3,78 μ g/mL).	57
Gráfico–12: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Caspase 3 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	59
Gráfico–13: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Caspase 8 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	61
Gráfico–14: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	63
Gráfico–15: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Bax das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	65
Gráfico–16: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Bad das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	67
Gráfico–17: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador p21 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	69
Gráfico–18: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador p27 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	71
Gráfico–19: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador P-gp das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	73
Gráfico–20: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador pRb das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI e paclitaxel.	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

$\Delta\Psi_m$ – Potencial elétrico mitocondrial

[3,78 $\mu\text{g/mL}$] – concentração do peptídeo INKKI determinada pelo IC_{50}

[3,75 $\mu\text{g/mL}$] – concentração do quimioterápico paclitaxel determinada pelo IC_{50}

[4,81 $\mu\text{g/mL}$] – concentração do quimioterápico etoposídeo determinada pelo IC_{50}

$^{\circ}\text{C}$ - graus centígrados

μg - micrograma

μL – microlitro

A1, Mcl-1, Bcl-2 e Bcl-x – membros antiapoptóticos da família Bcl-2

ADP - do inglês: *Adenosine diphosphate*

AIF - do inglês: *Apoptosis-inducing factor*

ANT - do inglês: *Adenine nucleotide translocator*

Apaf-1 - do inglês: *Apoptotic protease activating factor 1*

APC - do inglês: *Anaphase-promoting complex*

ATCC - do inglês: *American Type Culture Collection*

ATM - do inglês: *Ataxia-telangiectasia mutated*

ATP - do inglês: *Adenosine triphosphate*

B16F10 – linhagem de células de melanoma murina

Bad - membro proapoptótico BH3 da família Bcl-2

Bak – membro proapoptótico da família Bcl-2

Bax – membro proapoptótico da família Bcl-2

Bcl-2 - do inglês: *B-cell lymphoma-2* = família de proteínas reguladoras da apoptose. Quando houver menção apenas a “Bcl-2”, está implícito que trata-se do membro da família a proteína antiapoptótica Bcl-2 de mesmo nome, caso especificado em contrário.

Bcl-2 – membro antiapoptótico da família Bcl-2

Bcl-x – membro antiapoptótico da família Bcl-2

BER - do inglês: *Base excision repair*

Bid – membro proapoptótico BH3 da família Bcl-2

Bim – membro proapoptótico BH3 da família Bcl-2

Blk, Bmf, Hrk, Bik e Bok: membros proapoptóticos BH3 da família Bcl-2

CD95 - membro da superfamília de TNF-R

Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C - do inglês: *Cell division Cycle 25A, B ou C*

Cdks – do inglês, *Cyclin-dependent kinase*

CellQuest Pro - programa de aquisição de citometria de fluxo

chk1 e chk2 - do inglês: *Checkpoint kinase 1 e 2*

Cip/Kip - do inglês: *Cdk inhibitory protein / Kinase inhibitory protein*

CKIs - do inglês: *Cyclin-dependent kinase inhibitors*

c-Myc - do inglês: *Cellular Myc*

CO₂ - dióxido de carbono

CRL 1730 - linhagem de células endoteliais humanas normais HUVEC

CSFE-DA – reagente 5-(6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

Da – Dalton – Símbolo para Unidade de Massa Atômica

dATP - do inglês: *Deoxyadenosine triphosphate*

DISC - do inglês: *Death-inducing signaling complex*

DMSO - dimetilsulfoxido

DNA - do inglês: *Deoxyribonucleic acid*

DNA-PK - do inglês: *DNA-dependent protein kinase*

DNAases - enzimas que degradam a molécula de DNA

E2F - do inglês: *E2 promoter binding factor*

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FACSCalibur® - citômetro de fluxo (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

FADD - do inglês: *Fas-associated death domain protein*

FN1 – linhagem de células de fibroblastos humanos normais

G0 (ou fase G0) - G1 (ou fase G1) – do inglês: Gap 0

G1 (ou fase G1) – do inglês: Gap 1

G2 (ou fase G2) – do inglês: Gap 2

GADD45 - do inglês: *Growth arrest to DNA damage 45*

IAPs - do inglês: *Inhibitors of apoptosis*

IARC - do inglês: *International Agency for Research on Cancer*

IC₅₀ - Índice de Concentração Inibitória 50% - Concentração da toxina que inibe o crescimento de 50% das células

INK4 - do inglês: *Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*

INKKI – peptídeo bioativo catiônico anfipático derivado da β -casína bovina
INLKALAALAKKIL – peptídeo Mastoparan
Kg – quilo
LPO – radicais lipoperoxidados
M (ou fase M) – Mitose
MCF-7 – linhagem de células de adenocarcinoma humano mamário
MCM2-7 - do inglês: *Minichromosome maintenance protein 2 7*
MDA - malondialdeído
MDA-231 - linhagem de células tumorais de mama humana
Mdm2 – do inglês: *Mouse double minute 2*
MDM2 – gene da proteína Mdm2
MDR - do inglês: *Multidrug resistance*
ME – Membrana externa mitocondrial
mg - miligramas
MI – Membrana interna mitocondrial
mL - mililitro
mM – micromolar
Modfit–BD – programa de análise de citometria de fluxo (Modfit Becton-Dickinson)
MOMP - do inglês: *Mitochondrial outer membrane permeabilization*, ou seja, permeabilização da membrana externa mitocondrial
mRNA - do inglês: *Messenger Ribonucleic Acid*
mtDNA - do inglês: *Mitochondrial DNA*
MTT - reagente 3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide])
NER - do inglês: *Nucleotide excision repair*
nm – nanômetro
nM - nanomolar
Noxa – membro proapoptótico BH3 da família Bcl-2
NSCLC - do inglês: *Non-small cell lung cancer*
ORC1 - do inglês: *Origin recognition complex 1*
p15, p16, p18 e p19 – proteínas da família INK4
p21, p27 e p57 – proteínas da família Cip/Kip
p53 - proteína p53, produto do gene de mesmo nome

PARP – poli(ADP-ribose) polimerase

PBS - do inglês: *Phosphate-buffered solution*

PCA – Peptídeo catiônico anfipático

pRb - proteína retinoblastoma

PS – fosfatidilserina

PTP - do inglês: *Permeability transition pore*

Puma – membro proapoptótico BH3 da família Bcl-2 (do inglês: *p53-upregulated modulator of apoptosis*)

R - ponto de restrição

Ro-123 – sonda Rodamina 123

rpm - rotações por minuto

S (ou fase S) - Síntese

Smac/DIABLO - do inglês: *Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP binding protein with low pI*

T47D - linhagem de células tumorais de mama humana

TBA - ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

TNF- α - do inglês: *Tumor Necrosis Factor α*

TP53 – gene da proteína p53

TPM - Transição da permeabilidade mitocondrial

TRADD - do inglês: *TNF receptor-associated death domain*

TRAIL - do inglês: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

UV – Ultravioleta

VDAC - do inglês: *Voltage dependent anion channel*

α – símbolo para alfa

β – símbolo para beta

κ – símbolo para kappa

RESUMO

Verenhitach MD. *Avaliação dos efeitos antitumorais e antiproliferativos do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O INKKI é um peptídeo catiônico anfipático derivado da β -caseína bovina, análogo ao Mastoparan, isolado do veneno da vespa *Vespula lewisi*. Diferentes estudos mostraram sua atividade antiproliferativa e antitumoral *in vitro* com citotoxicidade seletiva em linhagens de células de melanoma B16F10 em relação às células normais. Em estudos *In vivo*, INKKI demonstrou potente ação estimuladora da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais. Quando aplicado diretamente em tumores, reduziu a massa tumoral, diminuindo o tempo de progressão do tumor e a formação de metástases, aumentando a probabilidade de sobrevida. Neste trabalho foram investigados os efeitos *in vitro* do peptídeo INKKI em linhagens de células de adenocarcinoma de mama e em células normais. As linhagens de células tumorais de mama utilizadas foram MDA-231, MCF-7 e T47D humanas, mama murina de Ehrlich e, como células normais, os fibroblastos e as células endoteliais. Foram avaliadas a atividade citotóxica, a viabilidade celular, a alteração do potencial elétrico mitocondrial, os efeitos na progressão e parada do ciclo celular e a investigação da morte por apoptose. Os resultados revelaram que o peptídeo INKKI apresenta citotoxicidade seletiva dose-dependente nas células tumorais, modulando negativamente o potencial elétrico mitocondrial. O índice de proliferação celular das células tratadas diminuiu, com a parada do ciclo celular na fase G0/G1. O peptídeo induziu a morte celular por apoptose, a qual demonstrou ocorrer dependente da via mitocondrial e de forma caspase-independente. O peptídeo INKKI é um potente modulador das atividades antiproliferativa e antitumoral da linhagem de células de adenocarcinoma de mama humana MCF-7.

Descritores: INKKI; peptídeos; hidrólise; caseínas; neoplasias da Mama; apoptose; caspases.

ABSTRACT

Verenhitch MD. *Evaluation of antitumor and antiproliferative effects of the INKKI peptide in breast adenocarcinoma MCF-7 cell line* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The INKKI is derived from the bovine hidrolisis of β -casein, a cationic and amphipathic peptide, analogous to mastoparan peptide isolated from the venom of the wasp *Vespula lewisi*. In in vitro studies, INKKI showed selective cytotoxicity in melanoma tumor cell B16F10 in relation to normal cells. In the *in vivo* tests, INKKI peptide has been shown to be a potent stimulator of the phagocytic activity of treated macrophages and, when applied directly into tumors, reduced tumor mass, decreasing the time progression and metastasis formation, increasing the probability of survival. This work investigated the *in vitro* effects of tumor peptide INKKI in cell line of human breast adenocarcinoma MCF-7. The tumor cells used were lineages of human breast tumor cells MCF-7, MDA-231 and T47D and murine tumor cells (Ehrlich). The normal cells used were fibroblasts and endothelial cells. The study evaluated the cytotoxic activity, cell viability, change of mitochondrial electrical potential, effects on the progression and arrest of the cell cycle and investigation of induced death by apoptosis. The results revealed that peptide presents selective dose-dependent cytotoxicity in tumor cells by modulating negatively the mitochondrial electric potential. The index of cell proliferation of cells treated declined, with the induction of cell cycle arrest at phase G0/G1. The peptide-induced cell death by apoptosis was demonstrated to occur via mitochondrial pathway and in a caspase-independent manner. The INKKI peptide is a potent modulator of antiproliferative and antitumor activities of the breast adenocarcinoma cell line.

Descriptors: INKKI; peptide; hidrolisis; caseins; breast neoplasms; apoptosis; caspases.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a luta contra o câncer tem sido um dos maiores objetivos da medicina. De acordo com a IARC (International Agency for Research on Cancer), agência especializada em câncer da Organização Mundial da Saúde, o câncer foi responsável pela morte de 8,2 milhões de pessoas no mundo, e em 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos (IARC, 2015).

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres, representando 23% do total de novos casos de câncer e 14% das mortes (INCA, 2013; JEMAL, 2011). Estima-se que 57 mil novos casos sejam diagnosticados no Brasil, sendo a região sudeste, incluindo o estado de Minas Gerais, a região com maior incidência (71 casos a cada 100 mil pessoas) Dessa forma, apesar dos avanços no tratamento de diversos tipos tumorais nos últimos anos, as taxas de mortalidade causadas por essas neoplasias ainda são significativas (INCA, 2013).

A etiopatogenia do câncer de mama está relacionada a avanço da idade, predisposição genética, histórico familiar, dieta, consumo de álcool, obesidade, sedentarismo, menarca precoce, primeira gestação acima dos 30 anos, uso de contraceptivos orais, menopausa tardia e uso de terapia de reposição hormonal (ABDULKAREEM et al., 2012; INCA, 2013). Destacam-se ainda fatores endócrinos, densidade da mama e histórico de neoplasia benigna (DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

O câncer é uma doença na qual células somáticas alteradas apresentam alta capacidade proliferativa e indiferença à ação dos mecanismos fisiológicos de controle de crescimento e à ação de muitos medicamentos quimioterápicos (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005; STRACHAN; READ, 2010). A massa tumoral se nutre com os recursos disponíveis do organismo, debilitando-o, e comprimindo órgãos vitais com seu crescimento inoportuno. O crescimento do tumor se agrava devido à capacidade das células neoplásicas promoverem angiogênese ao seu redor, o que aumenta seu aporte nutricional e facilita o caminho para células desgarradas ganharem novos terrenos no organismo,

gerando metástases. Quanto mais se desenvolvem, maior é a resistência à quimioterapia e à radioterapia, os quais juntamente com a cirurgia compõem as opções de tratamento contra o câncer. Assim, a cada dia, novas drogas devem ser desenvolvidas com o objetivo de combater esta terrível doença (DEVITA et al., 2005; GOLAN, 2009).

Com o objetivo de desenvolver terapias alternativas e que acarretem em mínimos efeitos colaterais às células saudáveis, peptídeos de origem natural denominados peptídeos bioativos têm sido isolados de microrganismos e fontes animais e vegetais e, em suas formas originais, sintéticas ou semissintéticas, sido testados em sua performance como agentes quimioterápicos (GOLAN, 2009; ZHENG et al., 2011).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ciclo celular mitótico e a tumorigênese

A mitose é o processo de divisão celular no qual uma célula somática dá origem a duas células filhas e sua ocorrência é desencadeada principalmente por fatores de crescimento, agentes mitogênicos, hormônios e sinalizações entre células vizinhas (DEVITA et al., 2005). Durante este processo o genoma é duplicado e suas cópias devem ser fiéis. O ciclo celular (divisão celular) é dividido em duas principais fases, que ocorrem em sequência: a primeira, chamada intérfase, é subdividida em: Gap 1(fase G1 ou G1), quando há alta taxa de transcrição do DNA nuclear; Síntese (fase S ou S), dedicada à replicação do material genético e formação da heterocromatina e; Gap 2(fase G2 ou G2), preparando-a para a segunda fase, a própria mitose (fase M ou M). A mitose subdivide-se em: (1) prófase, caracterizada pela condensação dos cromossomos; (2) prometáfase, momento em que há rompimento da membrana nuclear e ligação dos cromossomos às fibras do fuso; (3) metáfase, quando os cromossomos se posicionam na região equatorial da célula; (4) anáfase, separação das cromátides irmãs e, finalmente; (5) telófase, com a descondensação dos cromossomos e formação de nova membrana nuclear. Caso a célula não entre em um novo ciclo, devido, por exemplo, à especialização máxima, ausência de fatores de transcrição ou falta de nutrientes, a mesma entra em G0 (Gap 0: fase G0 ou G0), ou senescência celular, assim permanecendo. A velocidade na qual as fases S, G2 e M ocorrem é semelhante para todas as células. Diferenças no ritmo de proliferação tecidual se devem à fase G1 (SUMNER, 2003).

Na progressão do ciclo celular, o DNA (do inglês: *deoxyribonucleic acid*) deve ser totalmente replicado, sem erros e igualmente distribuído para as células-filhas, o que é garantido por mecanismos regulatórios (pontos de checagem). Quando da detecção de um erro, ocorre a parada do ciclo celular para que a célula tenha tempo para repará-lo. Caso o defeito seja irreparável, desencadeia-se o principal mecanismo de depleção celular: a apoptose, a qual será mencionada em item específico. Devido a alterações principalmente

genotípicas, células tumorais apresentam crescimento descontrolado, evasão dos mecanismos de controle do ciclo celular e da apoptose e evasão à senescência (permanência em G0 normalmente relacionada ao encurtamento de telômeros) (DEVITA et al., 2005; FOIJER; te RIELE, 2006; SHAPIRO; HARPER, 1999; TENGA; LAZAR, 2014).

2.1.1 A fase G1

A fase G1 é regulada, principalmente, por fatores de crescimento (agentes mitogênicos), ciclinas, quinases dependentes de ciclina (Cdks – do inglês: *Cyclin-dependent kinase*) e controle transcricional envolvendo a proteína retinoblastoma (pRb) (SUMNER, 2003).

Ciclinas são unidades reguladoras do ciclo celular, induzidas por atividade transcricional por fatores de transcrição, e atuam em conjunto com as Cdks, unidades catalíticas de fosforilação. Cdks são ativadas somente quando da sua ligação com as ciclinas, às quais compete a especificação do substrato do complexo ciclina/Cdk. Existem várias classes de ciclinas e tipos de Cdks, e atuam no ciclo celular as seguintes: a família das ciclinas D (D1, D2 e D3) em complexo com Cdks 4 e 6, atuando no início de G1; a família das ciclinas E (E1 e D2) em complexos com Cdks 2 (e eventualmente 1 e 3) atuando no final de G1/início de S; ciclina A em complexo com Cdks 1 e 2, atuando no final de G1/fase S/início de G2 e; ciclina B e complexo com Cdk 1 atuando no final de G2 e na fase M (DEVITA et al., 2005).

Cdks e ciclinas podem ser diretamente inibidas pelos CKIs (do inglês: *cyclin-dependent kinase inhibitors*): a família INK4 (do inglês: *Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*) inibe Cdk4 e Cdk6 e inclui as proteínas p15, p16, p18 e p19. A família Cip/Kip (do inglês: *Cdk inhibitory protein / Kinase inhibitory protein*) inibe tanto ciclinas quanto Cdks, e inclui as proteínas p21, p27 e p57. O acúmulo de CKIs exerce importante papel quando a célula decide não adentrar em um novo ciclo. A proteína p16, por exemplo, ao inibir Cdk4 e Cdk6, inibe a fosforilação de pRb, mantendo a célula em G1 (SHAPIRO; HARPER, 1999; SIDDIK, 2010; SUMNER, 2003; TENGA; LAZAR, 2014). p21 é a maior representante das Cip/Kips, podendo inibir diretamente os complexos

ciclina D-Cdk4 e ciclina E-Cdk2 em G1 e ciclina A-Cdk1 e ciclina B-Cdk1 em G2/M. p27 atua em complexos ciclina E-Cdk2 (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005). Cdk's e ciclinas também podem ser inibidas por fosforilação ou ubiquitinação (DEVITA et al., 2005).

A proteína pRb (proteína retinoblastoma), produto do gene RB1, um gene supressor de tumor, se encontra ligada a fatores de transcrição mitogênicos da família E2F (do inglês: *E2 promoter binding factor*). Esta ligação impede a ação destes fatores. A fosforilação de pRb, com sua consequente inibição e liberação dos fatores de transcrição a ela ligados, ocorre inicialmente através da ação do complexo da Ciclina D1-Cdk4/6. Os fatores de transcrição liberados da pRb disparam a transcrição de compostos necessários para a entrada em S, começando com a transcrição de Ciclina E, a qual em complexo com Cdk2 continuam a fosforilar pRb, ampliando sua ação. Genes que apresentam sítios de ligação com fatores da família E2F em suas regiões promotoras incluem c-Myc (do inglês: *Cellular Myc*), DNA polimerase alfa, ORC1 (do inglês: *Origin recognition complex 1*), ciclinas, Cdk's e os próprios E2F (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005; SIDDIK, 2010; SUMNER, 2003; WOLGEMUTH et al., 2013). A fosforilação de pRb continua até o final da mitose, sendo estacionada em um novo início de G1 ou G0. (WOLGEMUTH et al., 2013). A correta atuação de pRb compõe o principal mecanismo de checagem entre G1/S (STRACHAN; READ, 2010). Um segundo e importante mecanismo da regulação de G1 se relaciona à p53 (proteína p53), supressora de tumor, a qual será abordada com maiores detalhes em item específico. Aqui, cumpre consignar que esta proteína é altamente expressa por estímulo da proteína quinase ATM (do inglês: *Ataxia-telangiectasia mutated*), a qual será mencionada adiante, quando da ocorrência de danos ao DNA e é responsável pela ativação da transcrição da Cip/Kip p21, que inibe Cdk2 e possivelmente Cdk's 4 e 6 (DEVITA et al., 2005).

O correto funcionamento e progressão de G1 são garantidos pelo equilíbrio das ações dos elementos nele envolvidos. Alterações genéticas, epigenéticas, pós-transcricionais ou supra regulatórias em fatores direta ou indiretamente relacionados à inicialização e progressão de G1 e das demais fases do ciclo podem estar relacionadas à tumorigênese e sua manutenção e

progressão (SHAPIRO; HARPER, 1999). A etiologia das alterações genéticas será abordada na próxima seção (A fase S). Por exemplo, em uma análise do perfil da proteína p16 em diversas linhagens de células tumorais foram detectadas alterações que iam desde mutações pontuais à depleção homozigótica do gene 9p21-22, fato constatado em 50% das células de carcinoma de mama examinadas. Mutações em pRb podem impedi-la de neutralizar os efeitos dos fatores de transcrição E2F (OKAMOTO et al., 1994). Outro fator passível de ocorrência em células neoplásicas é a hiperexpressão de ciclinas D e Cdk4 (SHAPIRO; HARPER, 1999). Em um trabalho realizado por Na et al. (1999), amostras de tumores de mama primários de 95 pacientes foram analisadas revelando amplificação do gene de Cdk4 e superexpressão desta quinase em suas células. Outro estudo realizado em células de tumores primários de carcinomas escamosos de cabeça e pescoço humanos revelou um quadro de hiperexpressão de ciclina D1 nas amostras examinadas, relacionadas à amplificação do gene 11q13 (BARTKOVA et al., 1995). Quadros como estes são suficientes para desregular o sistema de checagem em G1, levando a célula a adentrar a fase S em uma situação já inapropriada (OKAMOTO et al., 1994).

A passagem de G1 para S, chamada ponto de restrição (R), é o momento-chave a partir do qual a célula se compromete com o prosseguimento das demais fases do ciclo, cuja evolução, já não mais dependente de fatores de transcrição, passa a ser controlada por uma cascata de ciclinas, Cdks, fosfatases e ubiquitinas (SUMNER, 2003; SIDDIK, 2010). Após a sua liberação pela pRb, os fatores de transcrição E2F estimulam diretamente os genes necessários para a fase S. Ainda em G1, o complexo proteico ORC se liga à cromatina, indicando os pontos de origem das replicações. ORC aciona outras proteínas que irão participar do processo, mediando a ligação do complexo proteico MCM2-7 (do inglês: *Minichromosome maintenance protein 2 7*) à cromatina, formando um complexo pré-replicação. MCM2-7 catalisa a helicase, iniciando o garfo de replicação e a fase S (SIDDIK, 2010).

2.1.2 A fase S

A fase S é marcada pela atuação do complexo ciclina A2-Cdk2 em proteínas envolvidas na replicação do DNA (WOLGEMUTH et al., 2013).

Durante todo o processo de replicação, agentes mutagênicos podem gerar erros nas novas moléculas de DNA. Agentes externos incluem radiação ionizante (radiação gama e raios-X), radiação ultravioleta e agentes químicos (por exemplo, hidrocarbonetos provenientes da fumaça do cigarro e alguns agentes quimioterápicos). Agentes internos compreendem metilação não-enzimática acidental, hidrólise com perda espontânea de bases púricas (adenina e guanina), desaminação espontânea de citosinas gerando uracilas, reação a EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e falhas na incorporação dos nucleotídeo na síntese da nova fita (STRACHAN; READ, 2010).

Uma mutação em um gene relacionado à proliferação celular (proto-oncogene) origina um oncogene, tem caráter geralmente dominante, com ganho de função. Genes que controlam o crescimento e proliferação celular são chamados genes supressores de tumores, e suas mutações apresentam em sua maior parte caráter recessivo, com perda de função (DEVITA et al., 2005).

A célula apresenta diferentes mecanismos de reparo para diferentes danos ao DNA. Danos que acometam apenas fitas complementares podem acionar os seguintes mecanismos, os quais utilizam a fita mãe como molde para a correção: (1) reparo por excisão de base ou BER (do inglês: *Base excision repair*). O grupo de enzimas BER-glicosilases identificam, removem e substituem uma única base anormal; (2) reparo por excisão de nucleotídeo ou NER (do inglês: *Nucleotide excision repair*). O sistema identifica e repara dois ou mais nucleotídeos em sequência em uma única ação e; (3) reversão direta do DNA danificado, quando, por exemplo, ocorrem dímeros de timina decorrentes de radiação UV (ultravioleta) (STRACHAN; READ, 2010).

Caso ocorra uma ruptura na molécula em ambas as fitas (original e complementar) causando ruptura da fita dupla, em um modelo denominado recombinação homóloga, as extremidades são realinhadas e reunidas baseando-se no padrão fornecido pela cromátide irmã. Este mecanismo só é

possível antes da anáfase. Nos casos em que a cromátide irmã não está por perto, extremidades de moléculas rompidas são reunidas sem o padrão de comparação, na denominada união de extremidades não-homóloga. Neste processo, extremidades podem ser religadas em pontos diferentes da molécula original, podendo haver perda de nucleotídeos. Este mecanismo pode até originar rearranjos cromossômicos. Os telômeros protegem as extremidades das moléculas de DNA contra este mecanismo de união de extremidades (STRACHAN; READ, 2010).

A principal reguladora de danos em fitas duplas é a quinase ATM, produto do gene supressor de tumor ATM de mesmo nome. Em estado inativo, se autofosforila quando detecta uma lesão ao DNA gerada principalmente por agentes citotóxicos, como radiação ionizante. Subsequentemente, através de fosforilações em mais de 700 proteínas, ativa efetores e quinases em cascata, restituindo estabilidade ao genoma. A ativação da ATM inibe regiões em início de replicação mesmo em regiões do genoma distantes do dano (MANGONE et al, 2015; SIDDIK, 2010). A ATM pode atuar não só em S, mas em qualquer fase do ciclo, quando um dano é detectado. Um de seus principais alvos é a ativação da p53, atuante em G1 e G2 (DEVITA et al., 2005).

Um estudo realizado por Mangone et al. investigou a frequência e o perfil de mutações do gene ATM em pacientes com câncer de mama no Brasil. Em 7% dos casos detectou-se mutações por substituição de base em regiões codificadoras do gene (éxons) levando à codificação de um aminoácido diferente (mutação “*missense*”). Em outros pacientes reportou-se ainda perda de heterozigotidade ou substituição, deleção ou inserção em regiões intrônicas do gene (MANGONE et al, 2015).

ATM atua em um importante mecanismo de regulação da fase S. A ativação da Cdk2 envolve a ação da fosfatase Cdc25A (do inglês: *Cell division cycle 25A*). Após a detecção de um dano, ATM regula cascata abaixo a ação de inibidores das isoformas da família Cdc25, chamados chk1 e chk2 (do inglês: *Checkpoint kinase 1 e 2*). Com a inibição de Cdc25A - e não ativação de Cdk2 - a célula mantém-se em S (DEVITA et al., 2005; SIDDIK, 2010).

Um belo estudo realizado por Younis et al. (2012) analisou células do tipo mais comum de câncer de pulmão (em inglês: *Non-Small Cell Lung Cancer*

(NSCLC)) e constatou superexpressão de uma isoforma de Cdc25A, a então denominada CDC25A^{Q110del}, em 75% das amostras obtidas de tumores e na maioria das células avaliadas *in vitro* (H1299). CDC25A^{Q110del} originou-se a partir de splicing alternativo de Cdc25A com deleção do códon 110 (uma glutamina). Na cultura celular, a nova isoforma apresentou meia-vida superior à forma selvagem desta fosfatase, maior resistência à radiação UV e aceleração da passagem de G2 para M. Em amostras de tecidos normais vizinhos dos tumores foi constatada a presença de CDC25A^{Q110del}, sugerindo que esta isoforma participa ativamente da carcinogênese neste tecido.

Ao final da fase S se inicia o acúmulo de ciclinas B, importantes na regulação de G2 (SIDDIK, 2010).

2.1.3 A fase G2

Em G2, fase de caráter regulatório, há atuação de complexos ciclina A-Cdk1 e ciclina B-Cdk1, mantidos inativos por fosforilação da Cdk1. O avanço em direção à fase M se deve à ação das fosfatases Cdc25B e Cdc25C (do inglês: *Cell Division Cycle 25B* e *Cell Division Cycle 25C*) sobre Cdk1, ativando-as. A ação destas fosfatases se inicia com sua fosforilação. Após a ativação, ciclina B-Cdk1 passa a agir em um *feedback* positivo sobre Cdc25Cs, fosforilando-as e reforçando a entrada e progressão de M (DEVITA et al., 2005). Caso a replicação esteja incompleta ou apresente danos, sinais ativam chk1 e chk2, inibidores da família Cdc25. Com a inibição de Cdc25C - e a não ativação de Cdk1 - a célula mantém-se em G2. O mecanismo envolvendo Cdc25s é a principal forma de checagem entre G2/M (STRACHAN; READ, 2010). Um segundo mecanismo que pode atuar de forma coadjuvante, porém independente, sobre a checagem de G2 se relaciona à p53, a qual estimulada pela ATM após um dano ativa a transcrição de GADD45 (do inglês: *Growth arrest to DNA damage 45*), detectora de alterações na cromatina e inibidora de Cdk1 (DEVITA et al., 2005; LOCKSHIN; ZAKERI, 2005; SIDDIK, 2010).

Em um estudo realizado em amostras de tumores e linhagens celulares de câncer de próstata foi constatado aumento significativo, quando comparado a tecidos saudáveis, da expressão de Cdc25C e de uma isoforma, a 5C

Cdc25C, decorrente de splicing alternativo. A superexpressão de ambas as formas foi associada à recorrência precoce do câncer e a de 5C Cdc25C associada a uma maior agressividade dos tumores (OZEN; ITTMANN, 2005).

2.1.4 A fase M e o ponto de checagem das fibras do fuso

Após a checagem em G2, inicia-se a mitose. Durante a metáfase as cromátides irmãs se encontram alinhadas no plano equatorial da célula, fixadas às fibras do fuso por cinetócoros, unidades proteicas presentes nos centrômeros. A tensão gerada pela tração das fibras é sentida pelos cinetócoros, os quais na ausência de força de tração sinalizam esta falha ao APC (do inglês: *Anaphase-promoting complex*), um complexo multiproteico. APC se torna ativa na metáfase e assim permanece até o fim da mitose, atuando na separação das cromátides irmãs na anáfase e posteriormente na ubiquitinação de ciclinas A e B para a nova entrada em G1. Falhas na separação das cromátides podem levar, por exemplo, a aneuploidia, com perda de genes supressores de tumores ou ganho de oncogenes (DEVITA et al., 2005; STRACHAN; READ, 2010).

2.2 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada em processos fisiológicos ao longo do desenvolvimento do organismo e de controle deletério de uma célula que sofreu alto nível de estresse ou dano irreparável durante sua divisão. Ao contrário da necrose, a apoptose não aciona mecanismos inflamatórios e pode ocorrer apenas nas células indesejadas, não afetando o tecido de forma global. Dentre os estímulos que induzem a apoptose estão lesões ao DNA, aumento de espécies reativas de oxigênio, resposta à interação de ligantes com a membrana plasmática e agentes quimioterápicos. A compreensão dos mecanismos da apoptose é essencial para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos, especialmente nos casos de células resistentes à radioterapia e algumas formas de quimioterapia (GRIVICICH et al., 2007).

A célula apoptótica caracteriza-se morfológicamente por condensação citoplasmática, formação de corpos apoptóticos (os quais serão eventualmente fagocitados por fagócitos ou células vizinhas), condensação e marginalização da cromatina junto à membrana nuclear, degradação do DNA internucleossomal, exteriorização da PS (fosfatidilserina), a qual sinaliza a fagocitose por macrófagos e, em tecidos sólidos, separação das células vizinhas. As membranas celulares são preservadas, permitindo a contenção do conteúdo celular (DEVITA et al., 2005; GRIVICICH et al., 2007; LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

As principais vias de iniciação/indução da apoptose são a via extrínseca e a via intrínseca, e são caspase-dependentes. Há também a apoptose caspase-independente, nas quais por algum motivo não há expressão ou atuação de caspases. Neste processo, as células apresentam características morfológicas da apoptose mas seus mecanismos de ação ainda são controversos (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

Caspases são proteases sito-específicas que clivam a porção C-terminal de seus alvos em ácido aspártico, e atuam em conjunto com outras proteases e nucleases com o principal objetivo de degradar proteínas estruturais e ácidos nucleicos, induzindo a morte celular (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005). São sintetizadas como zimogênios e ativadas por clivagem proteolítica após um estímulo de morte ou proapoptótico. Em humanos, foram identificadas 14 formas destas enzimas, sendo que participam da apoptose as caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10. As caspases subdividem-se em iniciadoras e efetoras. As iniciadoras traduzem diversos sinais para atividade de proteases, incluindo a ativação das pró-caspases efetoras. São iniciadoras as caspases -2, -8, -9 e -10. As efetoras compreendem as caspases -3, -6, -7. Estão presentes no citoplasma e, após sua ativação pelas caspases iniciadoras, atacam proteínas estruturais, como, por exemplo, o citoesqueleto, e podem clivar ou induzir enzimas, incluindo ativação de outras caspases, em cascata (DEVITA et al., 2005; MCILWAIN et al., 2013). Em um processo de morte celular caspase-dependente, não necessariamente haverá a participação de todas as caspases e algumas delas podem atuar de forma mais significativa que outras (COHEN, 1997).

2.2.1 Via extrínseca da apoptose

É iniciada por sinalização extracelular associada a receptores de membrana plasmática. Ligantes (como por exemplo, membros da família TNF- α (do inglês: *Tumor necrosis factor α*), Fas-ligantes ou TRAIL (do inglês: *TNF-related apoptosis-inducing ligant*)) se ligam ao seu respectivo receptor de membrana (TNF-R, Fas e Trail-R respectivamente) e recrutam suas respectivas moléculas adaptadoras (FADD (do inglês: *Fas-associated death domain protein*) para Fas e TRADD (do inglês: *TNF receptor-associated death domain*) para TNF- α) para a porção intracelular dos receptores de membrana, chamada receptor de morte. Moléculas adaptadoras associadas ao receptor de morte formam o DISC (do inglês: *Death-inducing signaling complex*) (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005). A pró-caspase 8, a mais significativa representante das caspases iniciadoras, se encontra ligada à molécula adaptadora FADD e é ativada pelo DISC por hidrólise, e na sequência pode ativar diretamente quaisquer caspases efetoras, às quais compete a execução do restante dos eventos que culminam com a morte celular (COHEN, 1997; MCILWAIN et al., 2013).

2.2.2 Via intrínseca da apoptose

A via intrínseca da apoptose está intimamente relacionada ao estado da mitocôndria, que desempenha uma participação crucial nesta via. A mitocôndria apresenta duas membranas: membrana externa (ME) e membrana interna (MI). Entre elas existe o espaço intermembranoso, onde se encontram citocromo c, proteína Apaf-1 (do inglês: *Apoptotic protease activating factor 1*), endonuclease G, Smac/DIABLO (do inglês: *Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP binding protein with low pI* – as quais são inibidoras de IAPs (do inglês: *Inhibitors of apoptosis*)) e AIF (do inglês: *Apoptosis-inducing factor*). O citocromo c é uma proteína transportadora de elétrons que participa ativamente da fosforilação oxidativa e se encontra adjacente à MI no espaço intermembranoso desta organela. IAPs regulam a apoptose ao se ligarem diretamente com as caspases, inibindo-as. Uma vez

liberados no citoplasma, citocromo c, Apaf-1 e dATP (do inglês: *Deoxyadenosine triphosphate*) se ligam à caspase 9 formando o complexo chamado apoptossomo. Smac/DIABLO se ligam ao complexo IAP-caspase 9, liberando-a. O principal alvo da caspase 9 é a ativação da caspase 3 efetora, à qual compete o prosseguimento da morte celular. Os demais compostos liberados, a endonuclease G e o AIF, são translocados para o núcleo onde promovem condensação e degradação da cromatina. AIF pode executar sua ação mesmo em apoptose caspase-independente (DEVITA et al., 2005; LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

Os mecanismos que culminam com a liberação dos compostos encontrados no espaço intermembranoso para o citoplasma são diversos, mas independentemente da causa, a liberação normalmente está associada a um quadro característico no qual percebe-se alteração do potencial elétrico das membranas mitocondriais ($\Delta\Psi_m$) (ou seja, sua despolarização), com consequente transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) e facilitação da passagem dos compostos para o citoplasma. O principal mecanismo de controle e preservação de $\Delta\Psi_m$ depende do equilíbrio da atuação das proteínas da família Bcl-2, as quais serão mencionadas a seguir (DEVITA et al., 2005; GRIVICICH et al., 2007).

Via extrínseca e intrínseca diferem até o momento da ativação das caspases efetoras. A partir daí a execução da apoptose segue da mesma forma, independentemente da via que a induziu. O papel das caspases efetoras será apresentado mais adiante (MCILWAIN et al., 2013).

2.2.3 A família Bcl-2 (do inglês: B-cell lymphoma-2): proteínas reguladoras que atuam cadeia acima à ativação de caspases efetoras

- **Bcl-2, Bcl-x, A1, Mcl-1, Boo e Bcl-w:** são proteínas antiapoptóticas. Apresentam quatro domínios denominados BH1, BH2, BH3 e BH4. Bcl-2 e Bcl-x são as principais representantes deste grupo; Estão localizadas na ME, protegendo-a contra o extravasamento de citocromo c para o citoplasma.

Observação: A família de proteínas recebe o nome de Bcl-2, e um de seus membros, a proteína antiapoptótica Bcl-2, recebe o mesmo nome. Neste

trabalho, quando houver menção apenas ao termo “Bcl-2”, esta refere-se à proteína antiapoptótica Bcl-2, exceto especificações a parte (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

- **Bax, Bak e Bok:** são próapoptóticas e apresentam homologia em relação aos domínios BH e estrutura secundária de Bcl-2 e Bcl-x. Bax e Bak, as principais representantes do grupo, são direta ou indiretamente ativadas pelas proteínas do grupo BH3-only (proteínas que apresentam apenas o domínio BH3, e serão descritas a seguir). Bax é encontrado no citoplasma e Bak reside no espaço intermembranoso mitocondrial. Alguns modelos propõem seus mecanismos de ação: 1) como reguladoras pós-transcricionais de Bcl-2 e Bcl-x, inibindo-as por ligação direta (e promovendo liberação de citocromo c); 2) devido à sua configuração constituída principalmente por alfa-hélices, interagem diretamente com a membrana mitocondrial, formando poros, facilitando o extravasamento de citocromo c para o citoplasma e; 3) Bax interage com o VDAC (do inglês: *Voltage dependent anion channel*) da ME e Bak com a ANT (do inglês: *Adenine nucleotide translocator*) da MI. VDAC e ANT compõem o PTP (do inglês: *Permeability transition pore*), canais regulatórios do $\Delta\Psi_m$ (DEVITA et al., 2005; LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

- **Bid, Bim, Blk, Bmf, Puma, Noxa, Hrk, Bad e Bik:** são próapoptóticas e contém apenas o domínio BH3 (“BH3-only proteins”). Neste trabalho serão mencionadas apenas como proteínas BH3. Atuam como reguladoras pós-transcricionais de Bcl-2 e Bcl-x, inibindo-as por ligação direta e ativam, direta ou indiretamente, Bax e Bak. São reguladas de diferentes formas, como por exemplo: a transcrição de Puma e Noxa é diretamente induzida pela p53. Bad é regulada por fosforilação, e após sua desfosforilação se liga a Bcl-x, inibindo-a e Bim é ativada por proteólise pelas caspases 8 ou 3. Estas proteínas residem principalmente no citoplasma (DEVITA et al., 2005; LOCKSHIN; ZAKERI, 2005).

2.2.4 Execução da apoptose: a ação das caspases efetoras

A caspase 3 é a representante mais significativa destas proteases, sendo responsável pela clivagem parcial ou total de proteínas-chave do metabolismo celular. Cumpre consignar que um mesmo substrato pode ser alvo de diferentes caspases, enquanto outros são exclusivos de apenas uma caspase. Alguns dos principais substratos identificados da caspase 3 são: 1) enzima nuclear PARP (poli(ADP-ribose) polimerase), uma enzima de reparo do DNA; 2) DNA-PK (do inglês: *DNA-dependent protein kinase*), enzima envolvida em reparo de lesões de fita dupla no DNA. Sua clivagem dificulta a capacidade de reparo de danos e facilita a degradação do DNA necessária na apoptose; 3) U1-70 kDa, uma ribonucleoproteína essencial nos processos de splicing. Sua clivagem impede a nova síntese de mRNAs (do inglês: *Messenger Ribonucleic Acid*) maduros de elementos necessários para o reparo e reestruturação celular e; 4) pRb (COHEN, 1997).

A caspase 6 pode ser ativada pela caspase 3 e vice-versa, em um ciclo de amplificação. Seu principal – e exclusivo - substrato é a Laminina A, a qual participa da manutenção da estrutura nuclear. Caspase 7 tem como alvo alguns dos mesmos substratos da caspase 3, como PARP e proteínas heterorribonucleares C1 e C2, participantes do processo de splicing (COHEN, 1997).

2.3 A proteína p53

Devido à sua relevância tanto na regulação do ciclo celular quanto na execução da apoptose, p53 será mencionada neste item específico.

A proteína supressora tumoral p53 é produto do gene TP53 (STRACHAN; READ, 2010). É um fator de transcrição que pode diretamente induzir ou suprimir a expressão de genes envolvidos no ciclo celular e na apoptose. Seus principais campos de atuação são: como agente pró-apoptótica e como promotora da parada da progressão do ciclo celular. As diferentes vias de ativação da p53 são independentes, variando de acordo com o estímulo que a recruta (LOCKSHIN; ZAKERI, 2005). p53 também atua como fator de

transcrição de genes de reparo celular, mas esta função é sobreposta pelos seus efeitos pró-apoptóticos quando a extensão do dano no DNA é demasiada (SIDDIK, 2010).

O principal mecanismo através do qual p53 promove a parada do ciclo celular é pela indução direta da expressão de p21. Quando ocorrem lesões no DNA, p53 é fosforilada – e ativada - pela ATM (SIDDIK, 2010). Já na apoptose, p53 pode agir de modo multifatorial. Dentre seus diversos mecanismos de ação, são altamente relevantes a indução direta da transcrição de Puma (do inglês: *p53-upregulated modulator of apoptosis*), Bax e Noxa e a repressão direta da expressão de Bcl-2 (DEVITA et al., 2005). p53 também pode induzir a expressão de receptores de morte como o CD95-Fas-R, atraindo caspase 8 para o DISC (MCILWAIN et al., 2013; SIDDIK, 2010).

Cerca de 50% dos tumores apresentam deficiência na expressão de p53 devido a alterações que vão desde mutações à depleção total do gene (SIDDIK, 2010).

A regulação de p53 é realizada diretamente pela proteína Mdm2, produto do oncogene MDM2. Em sua forma inativa (desfosforilada), p53 pode ser marcada por Mdm2 (do inglês: *Mouse double minute 2*) para ubiquitinação (STRACHAN; READ, 2010). O gene MDM2 (gene de Mdm2) em si é alvo de transcrição de p53, e atuam em feedback. Cerca de 10 a 20% dos tumores apresentam superexpressão de MDM2 (SIDDIK, 2010).

2.4 Peptídeos bioativos

Peptídeos bioativos são peptídeos derivados de proteínas de origem animal ou vegetal e que apresentam atividade antimicrobiana, antiviral, imunossupressora ou antitumoral (HUANG et al., 2014; MULDER et al., 2013; ZHENG et al., 2011). Denominados “creptídeos” por Pimenta e Lebrun (2007), peptídeos bioativos podem ser obtidos por proteólise em pontos diferentes dos pontos-alvo da via enzimática clássica, como por exemplo a via de processamento natural do processo digestivo. A atividade dos creptídeos pode ser similar, ampliada ou completamente diferente da atividade da proteína que o originou.

Muitos estudos tem se voltado para estes novos agentes terapêuticos devido à sua abundância na natureza, relativo baixo custo de produção e probabilidade de maior biocompatibilidade em relação a drogas totalmente sintéticas. Peptídeos bioativos podem ser obtidos integralmente a partir de suas proteínas precursoras ou, uma vez isolados, multiplicados de forma sintética. Sua estrutura original pode ser modificada ou adaptada resultando em compostos semissintéticos (GOLAN, 2009). O processo de eleição de um peptídeo bioativo pode decorrer de testes empíricos ou ser guiada por bancos de dados, *softwares* e algoritmos quando do conhecimento prévio da sequência completa de resíduos da proteína original (PIMENTA; LEBRUN, 2007). Atualmente, drogas desenvolvidas a partir de peptídeos bioativos compreendem cerca de 1,5% do comércio farmacêutico global (MULDER et al., 2013).

A atividade antitumoral e a adaptação de peptídeos bioativos em agentes quimioterápicos tem sido altamente exploradas e desenvolvidas nas últimas décadas visando novas opções de terapias coadjuvantes aos quimioterápicos já consagrados pela medicina (MULDER et al., 2013).

2.4.1 Peptídeos bioativos catiônicos anfipáticos e sua potencial atividade antitumoral

Peptídeos, incluindo peptídeos bioativos, podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas em pH fisiológico. Peptídeos podem ser catiônicos, apresentando carga predominantemente positiva devido à presença de resíduos de arginina e/ou lisina, ou aniônicos, com carga predominantemente negativa. A carga positiva promove atração eletrostática com componentes de membranas celulares carregados negativamente, como o sulfato de heparan e a PS. Em relação à polaridade, podem ser hidrofílicos ou anfipáticos. Peptídeos anfipáticos apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas. A porção hidrofílica permite sua solução no meio extracelular e sua porção hidrofóbica confere afinidade com os fosfolipídios das membranas celulares. Assim, peptídeos catiônicos anfipáticos (PCAs) são atraídos pelas membranas celulares devido à sua carga positiva e, uma vez em contato com

as membranas celulares, devido à sua porção hidrofóbica, podem facilmente transpô-las através da formação de poros, em um processo sem dispêndio energético. Alguns autores também descreveram a penetração de PCAs por meio de endocitose (KAY; GRINSTEIN, 2011; MADANI et al., 2011; MULDER et al., 2013).

A membrana plasmática de células tumorais apresentam maior negatividade em relação às respectivas membranas de células sadias. Isto ocorre devido à maior expressão de elementos aniônicos como o sulfato de heparan, PS e ácido siálico. A maior negatividade de suas membranas citossólicas tornam células cancerígenas mais susceptíveis à captação de PCAs em concentrações específicas, conforme demonstrado por testes de atividade citotóxica (Índice de Concentração Inibitória (IC₅₀)) em diferentes linhagens de células tumorais e normais *in vitro* e *in vivo*. Esta característica das células cancerígenas confere citotoxicidade seletiva e maior especificidade de ação aos PCAs sobre as mesmas. Outra característica de membranas citoplasmáticas de células tumorais é a maior presença de microvilosidades em relação a membranas de células sadias, aumentando a superfície de contato com PCAs. Estas características das membranas de células tumorais são elementos que as diferenciam das células normais. A busca por características que individualizam células tumorais são fundamentais no desenvolvimento de um agente quimioterápico, prevenindo sua ação contra células normais, o que ocorre quando do tratamento com alguns quimioterápicos convencionais. (HUANG et al., 2014; MULDER et al., 2013).

Os mecanismos através dos quais PCAs atuam sobre as células tumorais são diversos e incluem: ruptura de membranas celulares, morte por indução de apoptose, parada de progressão do ciclo celular, influxo de íons cálcio, inibição de síntese proteica, condensação da cromatina e fragmentação de moléculas de DNA (MULDER et al., 2013).

PCAs têm se mostrado efetivos agentes antitumorais mesmo em linhagens celulares já resistentes a quimioterápicos convencionais (HUANG et al., 2014).

2.4.2 O Peptídeo INKKI

A caseína é uma das mais importantes e complexas proteínas do leite bovino e representa aproximadamente 80% da fração protéica total do leite. Apresentam resistência térmica à desnaturação, o que se dá devido à sua carência de um complexo secundário e estrutura terciária. A caseína é secretada quase que exclusivamente na forma de grandes agregados dependentes de cálcio chamados de micelas, e é composta por quatro subgrupos de fosfoproteínas, as cadeias polipeptídicas denominadas α_{s1} (119 aminoácidos), α_{s2} (207 aminoácidos), β (209 aminoácidos) e κ -caseína (169 aminoácidos) (MEISEL, 1997).

A β -caseína apresenta-se quase que totalmente em estrutura primária, parte em α -hélice e parte em folha β -pregueadas. São relativamente hidrofóbicas. (KUMOSINSKI et al., 1993).

O peptídeo INKKI corresponde ao fragmento 41-45 da β -caseína, inserido dentro de uma estrutura β -pregueada, podendo ser obtido por hidrólise e amplificado de forma sintética. O peptídeo apresenta resíduos de isoleucina em cada extremidade, lhe conferindo caráter apolar. Dois resíduos de lisina lhe conferem carga positiva, os quais juntamente com resíduos de asparagina lhe conferem caráter hidrofóbico (AZEVEDO et al., 2012).

Em estudos recentes, o peptídeo INKKI apresentou atividade antitumoral *in vitro* em células de melanoma murina B16F10, com citotoxicidade seletiva em relação às células de fibroblastos normais FN1. Os efeitos antitumorais e antiproliferativos se deram através de indução da apoptose via caspase 3 e parada da divisão celular na fase sub-G1. Em testes *in vivo* realizados em tumores abdominais induzidos com células B16F10 em roedores, o grupo tratado com o peptídeo apresentou redução de 78,8% no volume da massa tumoral, com indução de necrose, diminuição pela metade do tempo de crescimento do tumor e redução da taxa de metástase (AZEVEDO et al., 2012). O INKKI também demonstrou ser um potente estimulador da atividade fagocitária de macrófagos tratados com o peptídeo em testes *in vivo* (LEBRUN et al., 2004).

O peptídeo INKKI é um análogo do mastoparan, um PCA isolado do veneno da vespa *Vespula lewisi*, composto por 14 resíduos de aminoácidos (INLKALAALAKKIL) (AZEVEDO et al., 2015). INKKI apresenta 60% de homologia e propriedades bioquímicas do mastoparan (AZEVEDO et al., 2012), possuindo os mesmos resíduos, exceto os neutros (Alanina, Glicina e Leucina) (LEBRUN et al., 2004). Tanto o mastoparan quanto seus análogos exercem atividade citotóxica seletiva em células tumorais em relação a células normais, e seu maior espectro de ação envolve alteração da permeabilidade mitocondrial (AZEVEDO et al., 2015; PFEIFFER et al., 1995). Em estudo *in vitro* realizado com células de melanoma B16F10-Nex2 murinas, o mastoparan foi capaz de induzir a permeabilidade das membranas mitocondriais com redução do $\Delta\Psi_m$, ruptura de ME e MI, perturbação da atividade do VDAC e indução da via intrínseca da apoptose. Estas mesmas células foram utilizadas para induzir tumores em camundongos e, *in vivo*, o tratamento com mastoparan reduziu o volume tumoral e prolongou a sobrevida dos animais em relação ao grupo controle. Os animais tratados não apresentaram perda de peso ou efeitos colaterais tóxicos. (AZEVEDO et al., 2015).

3 OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram avaliar os efeitos antitumorais e antiproliferativos do peptídeo INKKI em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma humano mamário – MCF-7.

3.1 *Objetivos específicos*

Após as diferentes condições de tratamento com o peptídeo INKKI em culturas celulares e tratamentos com os quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo foram:

- Determinadas as atividades citotóxicas pelo método colorimétrico do MTT e determinada a Concentração Inibitória 50% (IC₅₀);
- Analisadas as fases do ciclo celular;
- Determinados os índices de proliferação celular;
- Determinados os potenciais elétricos mitocondriais;
- Avaliadas a formação de radicais lipoperoxidados (LPO);
- Avaliadas as expressões de marcadores celulares envolvidos na progressão e controle do ciclo celular e mecanismo da apoptose e;
- Observada a morfologia celular para a conformação da morte por apoptose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O peptídeo sintético **INKKI** utilizado neste projeto foi cedido gentilmente pelo pesquisador Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica, do Instituto Butantan.

4.1 Cultivo de linhagens de células tumorais e normais

As células de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-231, T47D) fazem parte do Banco de Células do Laboratório do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Instituto Butantan). As células de mama murina de Ehrlich e células normais endoteliais humanas HUVEC (CRL 1730) e fibroblastos humanos FN-1 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC - Manassas, VA, EUA).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, com 1% (v / v) de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e mantidas em estufa de CO₂ a 5%, a 37°C.

4.2 Determinação da atividade citotóxica (Índice de Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) em células tumorais e normais pelo teste colorimétrico do MTT

O método colorimétrico MTT (3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo) consiste em um ensaio de viabilidade celular que avalia a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial presente em células vivas, a qual reduz o sal MTT no produto formazan, cuja coloração é mensurável.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar o efeito citotóxico do peptídeo INKKI e de drogas quimioterápicas comerciais (controles positivos paclitaxel e etoposídeo) em diversas concentrações nas células de adenocarcinoma de mama humana, murina e em células normais endoteliais (CRL 1730) e fibroblastos da derme humana (FN-1).

As linhagens celulares tumorais e normais foram cultivadas por 96 horas em placas contendo 96 cavidades e tratadas por 24 horas com as diferentes concentrações do peptídeo INKKI diluídos em meio de cultura sem SFB. Os

peptídeos foram obtidos em 10 concentrações nos intervalos de 100 a 1 µg/mL (145 nM a 0,28 nM).

A determinação da sensibilidade das diferentes doses foi otimizada de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Nacional de Câncer, USA (National Cancer Institute). Foram adicionados 100µL de MTT (5mg/mL) às células, incubadas por 3 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi removido e acrescido de 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan-MS) em comprimento de onda de 540nm.

4.3 Determinação da capacidade proliferativa de células de adenocarcinoma de mama tratadas com o peptídeo INKKI pelo método CFSE-DA em citometria de fluxo

A técnica utilizada para a avaliação da capacidade proliferativa das células tumorais foi realizada através do uso do CFSE-DA (5-(6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), marcador fluorescente intracelular que se divide igualmente entre as células filhas. Neste sistema pode-se avaliar a divisão celular por múltiplas gerações através da citometria de fluxo, permitindo a identificação de até 10 gerações em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

As células foram cultivadas por 96 horas. A concentração celular foi ajustada a 5×10^6 e incubadas com CFSE-DA (1µL na concentração final de 50mM), por 20 minutos em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, para após este período proceder-se a uma nova contagem. Subsequentemente, as células foram plaqueadas em poços na concentração de 2×10^5 células diluídas em 90 µL de RPMI com 5% de SFB, com o peptídeo INKKI em 10 µL de RPMI com 5% de SFB (basal), tendo mitógenos como controles positivos (fitohemaglutinina e conconavalina-A) e agentes quimioterápicos como controles negativos (paclitaxel e etoposídeo).

Finalmente, as células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 72 horas. Após o tratamento, as suspensões celulares foram recolhidas, lavadas e

fixadas em tampão paraformaldeído 4%. As análises foram efetuadas através da porcentagem das células responsivas e o número de divisões que cada célula sofreu analisadas pela discriminação do conteúdo de CFSE-DA através da citometria de fluxo pelo FACSCalibur® - citômetro de fluxo (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) e analisadas pelos programas de aquisição CellQuest Pro e de análise Modfit da Becton-Dickson (Modfit-BD).

4.4 Determinação do potencial elétrico mitocondrial em células de adenocarcinoma de mama com a sonda fluorescente Rodamina 123 por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Ro-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico carregado positivamente permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Ro-123 da mitocôndria para o citosol.

Para a visualização das mitocôndrias e seu potencial proto-iônico, as culturas de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 foram tratadas 24 horas com o peptídeo INKKI, com o paclitaxel, com o etoposídeo e sem tratamento (controle) e então incubadas com rodamina (Ro-123 - Molecular Probes®), por 30 minutos em estufa de cultura CO₂ a 5% umidificada à 37°C. A solução estoque de Ro-123 foi diluída em metanol e as diluições de incubação foram realizadas em meio de cultura contendo: sacarose 1,25mM, cloreto de potássio 65 mM, fosfato de potássio 2mM, cloreto de magnésio 1mM, EGTA 0,1mM, Hepes-KOH 10 mM e succinato 5 mM, pH 7,4. A análise e aquisição das modificações do potencial elétrico da membrana mitocondrial foram realizadas em citômetro de fluxo, e os histogramas da intensidade de fluorescência com parâmetro FL1-H foram adquiridos pelo programa CellQuest Pro. A Ro-123 é um componente catiônico que se excita a 488nm e emite

fluorescência verde a 515-575nm. O potencial de membrana foi determinado em citômetro de fluxo FACScalibur®.

4.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo aplicada para o estudo do ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, ploidia, a fração de proliferação celular e a porcentagem de células encontradas nas fases G0/G1, S e G2/M. A análise fornece o percentual de células que estão sintetizando DNA, da duração da fase S e do tempo de duplicação potencial.

Um grupo da suspensão celular de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 (10^6 células) foi tratado por 96 horas com o peptídeo INKKI, um com o quimioterápico paclitaxel (controle positivo) e outro grupo não foi tratado (grupo controle). As suspensões celulares foram centrifugadas duas vezes a 3000 rpm com solução PBS (solução tampão fosfato, do inglês: *Phosphate-buffered solution*) e ressuspensas em 200 µL solução de iodeto de propídio (20 mg/mL), 20 µl de Triton X-100 e 4 mg de RNase - A, por trinta minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria de fluxo. As imagens foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur® pelo programa CellQuest Pro. As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G0/G1, S e G2/M) foram analisadas pelo programa Modfit-BD.

4.6 Avaliação da formação de radicais lipoperoxidados (LPO)

Os sobrenadantes de culturas celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade foram recolhidos e congelados para utilização no ensaio de peroxidação lipídica. A quantificação da peroxidação lipídica em cultura de células é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica das membranas celulares. A reação do MDA com o TBA produz uma cor característica que pode ser medida espectrofotometricamente.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. Alíquotas de 40µL de amostra foram adicionadas em microtubos juntamente a 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Em outros microtubos, 40µL da mesma amostra foram adicionadas com 200 µL de TBA 0,86%. Estes microtubos foram colocados em banho quente (100°C) durante 20 minutos, seguido por resfriamento a 0°C durante 20 minutos. Após, os microtubos foram centrifugadas a 8000 rpm durante 4 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de TBA. A leitura foi feita no espectrofotômetro Multiskan-MS em comprimento de onda de 535nm.

4.7 Avaliação da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Foi realizada a avaliação das modificações no perfil das expressões dos marcadores envolvidos no controle e progressão do ciclo celular e mecanismo da apoptose.

As análises foram realizadas em duas fases. A primeira fase foi realizada com o objetivo de se verificar indicativos concretos do controle de progressão do ciclo celular e apoptose, após a qual, de acordo com os resultados, poderia se seguir para a segunda fase. Na primeira fase foram utilizados os marcadores proteína p53, ciclina D1 e proteína antiapoptótica Bcl-2.

Na primeira fase, após 24 horas de cultura celular, as células foram tratadas com o peptídeo INKKI e o grupo controle sem tratamento. Após 48 horas, as células tratadas e controle foram distribuídas em tubos de citometria (10^6 células), sendo aplicados em cada tubo 10µL de Triton por 30 minutos e em seguida 1µg de cada anticorpo primário. Após 24 horas foram aplicados os anticorpos secundários, sendo 1µg por tubo.

Os resultados da primeira fase justificaram a realização da segunda fase, sendo utilizados os seguintes marcadores: caspase 3 ativa, caspase 8, TRAIL-receptor DR4 (da família TNF), as proteínas proapoptóticas Bad e Bax, proteína p21, proteína p27, proteína pRb e proteína p-gp, envolvida na resistência contra drogas.

Na segunda fase, após 24 horas de cultura celular, as células foram tratadas com o peptídeo INKKI e com o quimioterápico paclitaxel como controle positivo; o grupo controle não foi tratado. Após 48 horas, as células tratadas e controles foram distribuídas em tubos de citometria (10^6 células), sendo aplicados em cada tubo $10\mu\text{l}$ de Triton por 30 minutos (exceto para os marcadores TRAIL-receptor DR4 e p-gp) e, em seguida, $1\mu\text{g}$ de cada anticorpo primário. Após 24 horas foram aplicados os anticorpos secundários, sendo $1\mu\text{g}$ por tubo.

A citometria de fluxo foi realizada com o citômetro FACSCalibur® e os histogramas representativos foram adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro com os parâmetros FL1-H e FSC-H e analisados no programa Modfit-BD.

4.8 Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico

Foi realizada a avaliação das modificações morfológicas nas culturas celulares de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas com o peptídeo após 24 horas de tratamento e em células não-tratadas.

A observação foi realizada em microscópio óptico Nikon Eclipse TS 100, lente 10x.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção dos valores individuais de cada grupo experimental e controle tratados, os resultados foram tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 4.0 e InStatPad Prism Version 4.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. Todos os valores obtidos dos diferentes grupos experimentais foram expressos em média $\pm$ desvio médio, considerando como nível crítico para significância valores de $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 Determinação da atividade citotóxica em células tumorais e normais pelo teste colorimétrico do MTT

Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço e o percentual de viabilidade obtido através da seguinte fórmula: $[(\text{Absorbância das células tratadas} / \text{Absorbância das células não tratadas})] \times 100$. A Concentração Inibitória IC_{50} foi calculada após a interpolação da concentração do composto e a viabilidade celular, a equação da reta obtida e o coeficiente de correlação (r^2). Os experimentos foram realizados em octoplicatas e as concentrações obtidas apresentadas na Tabela-1. Os resultados demonstraram citotoxicidade nos tratamentos utilizando-se o peptídeo INKK em células tumorais, sem efeitos tóxicos ou inibitórios do crescimento em células normais. Não houve diferença significativa entre as concentrações inibitórias para as diferentes linhagens de células tumorais de mama humana e murina.

Tabela-1: Determinação da atividade inibitória (IC_{50}) em linhagens de células tumorais de mama e normais tratadas com o peptídeo INKKI e linhagens de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 com os quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo.

<u>Linhagem Celular - espécie</u>	<u>IC50%</u>	<u>R²</u>
MCF-7 (humana)	3,78 µg/mL	0,94
MDA-231 (humana)	3,53 µg/mL	0,89
T47-D (humana)	3,26 µg/mL	0,97
Ehrlich (murina)	3,07 µg/mL	0,95
Fibroblasto FN-1 (humana)	Sem efeito	--
Endotelial CRL 1730 (humana)	Sem efeito	--
Controle - Paclitaxel	3,75 µg/mL	0,98
Controle - Etoposídeo	8,41 µg/mL	0,97

As referências nos gráficos e figuras das concentrações utilizadas e determinadas pela IC_{50} serão apresentadas no decorrer do trabalho da seguinte forma: concentração do peptídeo INKKI de 3,78 $\mu\text{g/ml}$ [3,78 $\mu\text{g/ml}$]; concentração do quimioterápico paclitaxel de 3,75 $\mu\text{g/ml}$ [3,75 $\mu\text{g/ml}$] e concentração do quimioterápico etoposídeo de 4,81 $\mu\text{g/ml}$ [4,81 $\mu\text{g/ml}$].

6.2 Determinação da capacidade proliferativa de células de adenocarcinoma de mama tratadas com o peptídeo INKKI pelo método CSFE-DA em citometria de fluxo

Os resultados mostraram que o peptídeo INKKI, na concentração de 3,78 $\mu\text{g/mL}$ determinada pelo IC_{50} , inibiu significativamente cerca de 28% a resposta proliferativa de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 (Figura–1 e Gráfico-1).

Figura–1: Histogramas representativos da capacidade proliferativa do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 pelo método CSFE-DA em citometria de fluxo. (A) Grupo Controle – MCF-7; (B) Grupo Tratado com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$], mantidos em cultura por 96 horas; inset, destaca-se a população de células tumorais adquiridas no programa CellQuest Pro.

Gráfico – 1: Médias e desvios padrão da capacidade proliferativa do peptídeo INKKI em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 pelo método CSFE-DA, mantidas em cultura por 96 horas com os diferentes grupos de tratamento: controles positivos (mitógenos nas concentrações de 5 µg/ml), negativos (quimioterápicos paclitaxel [3,75 µg/ml] e etoposídeo [4,81 µg/ml]), INKKI [3,78 µg/ml] e controle sem tratamento.

Serie 1 = média de três experimentos independentes.

*** Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA) entre os grupos controle (positivo ou negativo) e o grupo tratado com o peptídeo INKKI.

6.3 Determinação do potencial elétrico mitocondrial em células de adenocarcinoma de mama com a sonda fluorescente Rodamina 123 e citometria de fluxo

Os resultados em células MCF-7 demonstraram que o peptídeo INKK, na concentração de 3,78 µg/mL, reduz a atividade mitocondrial em $36,4 \pm 5,8$ % quando comparado ao controle positivo. O quimioterápico paclitaxel foi capaz de reduzir em média $93,2 \pm 12,4$ % do potencial mitocondrial. A Figura–2 representa o “*overlay*” das curvas obtidas dos diferentes grupos experimentais (controle, peptídeo e paclitaxel), adquirido no programa de análise Modfit – BD. As médias, desvios padrão e as diferenças estatísticas estão apresentados no Gráfico-2.

Figura-2: Curvas dos diferentes potenciais elétricos da mitocôndria utilizando-se a sonda fluorescente Rodamina 123 por citometria de fluxo em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas 24 horas com o peptídeo INKKI [3,78 µg/ml] (curva em verde), paclitaxel [3,75 µg/ml] (curva em vermelho), etoposídeo [4,81 µg/ml] (curva em laranja) e controle (curva em azul).

Gráfico-2: Médias e desvios padrão do potencial elétrico mitocondrial do peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] em células MCF-7 pelo método do efluxo da Rodamina 123 por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com o peptídeo [3,78 µg/ml], paclitaxel [3,75 µg/ml] e etoposídeo [4,81 µg/ml] e os grupos controle. As barras em azul representam a população de células com potencial inativo, que não apresentam potencial elétrico, e as barras em vermelho as células ativas, que apresentam potencial elétrico.

**Diferença estatística (Teste de variância de ANOVA) entre as proporções de células inativas do grupo controle positivo e o grupo tratado com o peptídeo, sendo ** $p < 0,01$.

6.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Os resultados mostraram um efeito inibitório na capacidade de proliferação (diminuição da população na fase G2/M) e o aumento na proporção de células com DNA fragmentado. O aumento da fragmentação do DNA em média de 2,4 vezes foi relacionada às modificações encontradas nas culturas com formação de células arredondadas, perda da adesão ao substrato e corpos apoptóticos. A proporção das células na fase G2/M do grupo tratado com o peptídeo foi cerca de 60% menor em comparação ao grupo controle. As correlações estatísticas da efetividade e eficácia do tratamento INKKI na concentração de 3,78 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao paclitaxel e os histogramas representativos estão apresentadas na Figura-3 e Gráfico-3, e mostraram claramente as modificações na diminuição da proporção de células com potencial proliferativo inversamente proporcional ao DNA fragmentado (Gráfico-4).

Figura-3: Histogramas representativos da distribuição populacional das diferentes fases do ciclo celular das células de adenocarcinoma de mama MCF-7: A - grupo controle; B – grupo tratado 96 horas com o INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$]. Histograma de aquisição pelo programa Cell-Quest Pro e analisado pelo programa Modfit-BD.

Gráfico-3: Médias $\pm$ desvio padrão da distribuição populacional nas fases do ciclo celular das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle, peptídeo INKKI [3,78 μ g/mL] e paclitaxel [3,75 μ g/mL].

*** Diferenças estatísticas significativas (Teste de variância de ANOVA) entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo.

Gráfico-4: Correlações estatísticas da efetividade e eficácia do tratamento dos grupos controle não tratado X peptídeo INKKI [3,78 μ g/mL] nas fases do ciclo celular. As proporções de células com potencial proliferativo mostraram-se inversamente proporcionais ao conteúdo de DNA fragmentado (destacado na seta em vermelho) e a diminuição da capacidade de síntese, como destacado na seta em rosa.

6.5 Avaliação da formação de radicais lipoperoxidados (Lipoperoxidação Lipídica - LPO)

A quantificação da peroxidação lipídica das linhagens de células tumorais humanas e murina e células normais foi mensurada através de leitura em espectrofotômetro, conforme especificado anteriormente. Os níveis de peroxidação estão relacionados, em cada linhagem, à concentração do peptídeo INKKI ao qual foram submetidas em tratamento. Os resultados dos níveis de LPO para cada linhagem celular estão representados nos Gráficos-5 a Gráfico-10.

Gráfico-5: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico-6: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama MDA-231 tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico-7: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama T47-D tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico-8: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células de adenocarcinoma de mama murina de Ehrlich tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico-9: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células normais endoteliais humanas HUVEC tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico-10: Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de LPO para as células de fibroblastos humanos FN-1 normais tratadas com o peptídeo INKKI em diferentes concentrações, sendo: 1 – meio de cultura sem tratamento; 2 – tratamento com peptídeo a 0,94 $\mu\text{g/mL}$; 3 - tratamento com peptídeo a 1,89 $\mu\text{g/mL}$; 4 - tratamento com peptídeo a 3,78 $\mu\text{g/mL}$; 5 - tratamento com peptídeo a 7,20 $\mu\text{g/mL}$ e; 6 - tratamento com peptídeo a 12,40 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados demonstraram que, com o tratamento do peptídeo INKKI na concentração de 3,78 $\mu\text{g/mL}$, representados nas colunas 4 e 5 dos gráficos, as células tumorais sofreram maiores índices de LPO em relação às células normais, demonstrando maior susceptibilidade das células tumorais ao peptídeo em relação às células normais.

6.6 Avaliação da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Inicialmente foram avaliadas a expressão das proteína p53, ciclina D1 e Bcl-2. Os marcadores envolvidos no controle do ciclo celular (pontos de checagem) mostraram que o INKKI controla significativamente a progressão, com o aumento da expressão da proteína p53, com consequente aumento da ciclina-D1 e diminuição de Bcl-2. Estes resultados foram ratificados com o aumento da expressão de p21, p27 e pRb.

Os marcadores Bax e Bad envolvidos na apoptose mostraram que o INKKI induz a apoptose via mitocondrial, não havendo diferença significativa na expressão das caspases 3 e 8 e TRAIL-receptor DR4 em relação ao grupo controle. Houve aumento significativo na expressão da p-gp.

Os dados das médias e desvios padrão de 3 experimentos independentes da primeira fase estão apresentados na Figura-4 e Gráfico-11. Os respectivos dados da segunda fase estão apresentados nas Figuras 5 a 13 e nos Gráficos 12 a 20.

Figura-4: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão dos marcadores Ciclina D1, p53 e da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas com e sem o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL].

Gráfico–11: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão dos marcadores ciclina D1, p53 e Bcl-2 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratado com o peptídeo INKKI [3,78 μ g/mL].

** *** Diferenças estatísticas significativas (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo, sendo ** $p < 0,01$ (muito significativo) e *** $p < 0,001$ (extremamente significativo).

Figura-5: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Caspase 3 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] e paclitaxel [3,75 µg/mL].

Gráfico-12: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Caspase 3 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Não houve nível de significância entre os grupos de acordo com o Teste de variância de ANOVA.

Figura-6: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Caspase 8 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Gráfico-13: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Caspase 8 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Não houve nível de significância entre os grupos de acordo com o Teste de variância de ANOVA.

Figura-7: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] e paclitaxel [3,75 µg/mL].

Gráfico-14: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

* Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo.

Figura-8: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Bax em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Gráfico-15: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Bax das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

* Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo;

& Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo tratado com o peptídeo e o grupo tratado com paclitaxel;

Figura-9: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador Bad em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Gráfico-16: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador Bad das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

*** Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo;

&& Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo tratado com o peptídeo e o grupo tratado com paclitaxel.

Figura-10: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador p21 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

Gráfico-17: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador p21 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

** Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo;

& Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo tratado com o peptídeo e o grupo tratado com paclitaxel.

Figura-11: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador p27 em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] e paclitaxel [3,75 µg/mL].

Gráfico-18: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador p27 das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

*** Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo;

&& Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo tratado com o peptídeo e o grupo tratado com paclitaxel.

Figura-12: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador P-gp em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] e paclitaxel [3,75 µg/mL].

Gráfico—19: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador P-gp das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

* Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo;

& Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo tratado com o peptídeo e o grupo tratado com paclitaxel.

Figura-13: Histogramas representativos adquiridos pelo programa Cell-Quest Pro da expressão do marcador pRb em células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 horas sem o tratamento e com o tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 µg/mL] e paclitaxel [3,75 µg/mL].

Gráfico-20: Médias $\pm$ desvio padrão da expressão do marcador pRb das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$] e paclitaxel [3,75 $\mu\text{g/mL}$].

*** Diferença estatística significativa (Teste de variância de ANOVA), entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo.

6.7 Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico

Para a confirmação da morte por apoptose as células controle e tratadas com o peptídeo foram observadas ao microscópio óptico. A morte por apoptose foi confirmada pela morfologia apresentada pelas células após o tratamento, conforme Figura-14.

Figura-14: fotografia das células de adenocarcinoma de mama MCF-7 observadas ao microscópio óptico, sendo: A) células controle sem tratamento; B) células após 24 horas de tratamento com o peptídeo INKKI [3,78 $\mu\text{g/mL}$].

7 DISCUSSÃO

O tratamento de células de diversas linhagens tumorais de mama humana e murina e células normais (fibroblastos e endoteliais) mostraram que o peptídeo INKKI, na concentração de 3,78 µg/mL, apresenta citotoxicidade seletiva para células tumorais, não acarretando em alteração das funções metabólicas das células normais. Os resultados do LPO demonstraram maior susceptibilidade ao peptídeo destas células em relação às células normais.

A principal hipótese para a citotoxicidade seletiva dos PCAs como o INKKI sobre as células tumorais em relação às normais se deve ao fato das membranas plasmáticas de células tumorais apresentarem maior negatividade em relação às membranas de células normais devido à maior expressão de elementos aniônicos como o heparan sulfato, PS e ácido siálico, tornando as células tumorais mais susceptíveis à captação de PCAs. Outra característica de membranas citoplasmáticas de células tumorais é a maior presença de microvilosidades em relação a membranas de células sadias, aumentando a superfície de contato com PCAs. Ao passar pela membrana plasmática, o peptídeo irá atuar no interior da célula (HUANG et al., 2014; MULDER et al., 2013).

Além das diferenças nas membranas plasmáticas, células tumorais apresentam diferenças fenotípicas na membrana mitocondrial em relação às células normais, e isto decorre de alterações na bioquímica da produção energética, gerando um potencial elétrico mitocondrial mais elevado em relação às células normais. Estas alterações podem tornar a mitocôndria mais susceptível a PCAs como o INKKI, que atuam como agentes mitocondriotóxicos, agindo diretamente na ME, penetrando-a e gerando poros (FANTIN et al., 2002; FANTIN; LEDER, 2006; GALLUZZI et al., 2006). Além da atração decorrente do potencial elétrico diferenciado, outro fator contribui para a mobilização de PCAs para a mitocôndria: a MI apresenta-se carregada mais negativamente do que a ME devido a diferenças na sua composição lipídica, isto é, presença de fosfolípídeos ácidos, atraindo PCAs para o espaço intermembranoso (GALLUZZI et al., 2006).

A formação de poros provocada pela ação de PCAs promove a permeabilização da ME, denominada MOMP (do inglês: *mitochondrial outer membrane permeabilization*), fator principal a partir do qual se desencadeia a morte celular programada. Uma vez iniciado, o processo é irreversível e fatal (GALLUZZI et al., 2006). PCAs foram classificados por Galluzzi et. al. como agentes monoterápicos, pois induzem a apoptose via a MOMP sem necessidade de terapias combinadas. Dentre os peptídeos destacados com esta capacidade estão a molécula F16, o peptídeo (KLAKLAK)₂ e o peptídeo mastoparan. O peptídeo F16 é uma molécula anfótera catiônica, envolvida diretamente na permeabilização de membranas mitocondriais isoladas (GALLUZZI et al., 2006). Em modelos de tumores de próstata em camundongos, F16 foi capaz de inibir o seu crescimento (FANTIN; LEDER, 2006).

O mastoparan é um peptídeo bioativo derivado do veneno de vespas. O peptídeo INKKI é um análogo do mastoparan, com 60% de similaridade estrutural e apresentando características bioquímicas semelhantes (AZEVEDO et al., 2012). O mastoparan é capaz de induzir a MOMP e a abertura do PTP, atuando como agente proapoptótico (BRENNER; GRIMM, 2006).

A MOMP acarreta na permeabilização da MI, despolarização de ambas as membranas mitocondriais, acúmulo de água no interior do espaço intermembranoso e no interior da organela, com ruptura da ME e, conseqüentemente, liberação de agentes proapoptóticos como o citocromo c, apoptossomo e Smac/Diablo para o citoplasma (BRENNER; GRIMM, 2006). Compostos citotóxicos efetores de morte caspase-independentes também são liberados, incluindo endonuclease G, o AIF e outras nucleases e proteases, os quais podem rapidamente iniciar sua atividade no núcleo de forma autônoma (GRIVICICH et al. 2007). A permeabilização da MI contribui para a morte celular na medida em que afeta a via metabólica de produção energética e função de oxirredução da organela (ARMSTRONG, 2006; GALLUZZI et al., 2006; FANTIN et al., 2002). O citocromo c, encarregado do transporte de elétrons na respiração celular, é extravasado. Sua ausência irá prejudicar a continuidade do processo de fosforilação oxidativa, contribuindo para a morte celular (DEBATIN et al., 2002).

Neste trabalho, nossos resultados mostraram que, na determinação do potencial elétrico mitocondrial através do uso da sonda fluorescente Rodamina 123, o peptídeo INKK é capaz de reduzir a atividade mitocondrial em $36,4 \pm 5,8\%$, quando comparado ao controle.

Além das consequências diretas da penetração de peptídeos como o INKKI na ME, a liberação dos compostos proapoptóticos da mitocondria para o citoplasma acarreta na ativação de outros agentes que irão atuar em um arco de amplificação sobre a permeabilização das membranas mitocondriais, atingindo o PTP, um complexo multiproteico situado em ME e MI. Principal encarregado da manutenção do potencial elétrico mitocondrial, à medida que controla a condutância de suas membranas, o PTP desempenha um importante papel na indução ou inibição da morte celular (BRENNER; GRIMM, 2006).

O PTP é composto por duas unidades principais: o VDAC, na ME, e o ANT, na MI. A principal função do VDAC é viabilizar a troca de metabólitos entre o citoplasma e o espaço intermembranoso mitocondrial. O controle da abertura e fechamento do PTP, assim como da MOMP, é realizado pelo equilíbrio das proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2, respectivamente (BRENNER; GRIMM, 2006; GALLUZZI et al., 2006). A abertura do VDAC permite a passagem de citocromo c e outros metabólitos para o citoplasma. O ANT é responsável pela troca de moléculas de ATP (do inglês: *Adenosine triphosphate*) e ADP (do inglês: *Adenosine diphosphate*) e, em caso de despolarização de MI, pode se transformar em um canal poroso, acarretando em acúmulo de água na matriz mitocondrial. O VDAC e o ANT são mantidos fechados principalmente pela proteína antiapoptótica Bcl-2 (GALLUZZI et al., 2006).

A abertura do PTP pode ser o evento principal ou um efeito secundário da ação de agentes proapoptóticos. Independente do que promova sua abertura, ela é primordial para o mecanismo da apoptose, seja via caspase-dependente ou caspase-independente (BRENNER; GRIMM, 2006; DEBATIN et al., 2002; FANTIN; LEDER, 2006). Nos casos onde a apoptose ocorre de forma caspase-independente, as proteínas da família Bcl-2 executam papel fundamental na morte celular programada (DEBATIN et al., 2002).

As células de adenocarcinoma de mama MCF-7 podem apresentar deficiência na expressão da caspase-3 decorrente da depleção de 47 pares de base no éxon 3 do gene CASP-3, gene da caspase 3 (ESSMANN et al., 2004; FOO et al., 2014; LIANG et al., 2001). Os resultados da citometria de fluxo para os marcadores caspase-3 e caspase-8 revelaram não haver diferenças significativas nos níveis das expressões de caspase-3 e caspase-8 entre as células controle e as células tratadas, sugerindo que o mecanismo da apoptose induzida pelo INKKI ocorra de forma caspase-independente. Em células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com o mastoparan, também não houve diferenças significativas na expressão de caspase 8 sobre estas células em relação ao grupo controle (AZEVEDO et al., 2015). Ainda que, em teoria, o mecanismo de ação de INKKI, assim como de outros PCAs sobre a morte celular não envolva a via extrínseca da apoptose, o marcador caspase-8 foram utilizados para confirmar a hipótese inicial de que PCAs induzam a morte celular pela via mitocondrial. Realmente não houve diferença significativa na expressão destes marcadores nas células tratadas em relação ao controle. Houve aumento da expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 das células tratadas com o INKKI em relação às demais, mas isto ao que tudo indica se relaciona ao aumento da expressão da p53, a qual pode induzir a expressão de receptores de morte independentemente da expressão de caspases (MCILWAIN et al., 2013; SIDDIK, 2010).

Os estímulos apoptóticos gerados pela permeabilização e despolarização das membranas mitocondriais irão induzir a ação das proteínas da família Bcl-2, fundamentais na apoptose caspase-independente. O processo se inicia com a sensibilização do estresse pelas proteínas BH3 proapoptóticas (DEBATIN et al., 2002).

As proteínas BH3 são as iniciadoras do processo da via intrínseca da apoptose, e são classificadas como detectoras de sinais apoptóticos ou ativadoras do mecanismo da apoptose. Puma e Noxa se encontram presentes na mitocôndria, enquanto que Bad, em condições normais, está localizado no citoplasma. Noxa e Bad são classificadas como as principais detectoras dos sinais apoptóticos, os quais incitam o deslocamento de Bad para a mitocôndria. Puma apresenta-se principalmente como ativadora de outras proteínas

envolvidas no processo da apoptose. As proteínas ativadoras podem estar presentes em forma livre-inativas ou sequestradas (e mantidas inativas) por proteínas antiapoptóticas. Após estímulos apoptóticos, as proteínas ativadoras livres podem se tornar ativas por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais ou pós-traducionais. As proteínas sequestradas podem ser ativadas após liberadas de seus sequestradores pelas proteínas detectoras. Uma vez liberadas, as proteínas ativadoras como Puma, Bid e Bim irão interagir diretamente com Bax e Bak, proteínas classificadas como efetoras da apoptose (SHAMAS-DIN, et al., 2010).

Membros antiapoptóticos da família Bcl-2, residentes na ME, exercem sua função agindo diretamente no PTP ou de forma indireta à medida que sequestram proteínas proapoptóticas, incluindo Bax e Bak em sua forma ativa (WESTPHAL et al., 2011). Puma é capaz de interagir diretamente com todas as representantes antiapoptóticas da família Bcl-2 e a função principal de Bad é interagir com Bcl-2, neutralizando sua atividade protetora contra a MOMP e a abertura do VDAC e liberando Bax e Bak sequestrados (SHAMAS-DIN, et al., 2010).

Bax e Bak são essenciais para a MOMP (LANDES; MARTINOU, 2011). Bak está normalmente presente na ME (GALLUZZI et al., 2006; LANDES; MARTINOU, 2011) enquanto que Bax se encontra principalmente no citoplasma e, em menor proporção, próximo à ME (LINDSAY et al., 2011). Após estímulo apoptótico e mediado pela expressão de Puma, Bax migra para a ME (HAUPT et al., 2003). Após a interação de Bax e Bak com proteínas BH3 ativadoras, estas proteínas efetoras passam por alterações conformacionais que permitem sua oligomerização com a ME e sua consequente permeabilização (LANDES; MARTINOU, 2011).

A MOMP permite a liberação do AIF e da endonuclease G, que se translocam para o núcleo. O AIF ativa DNases (enzimas que degradam a molécula de DNA), e inicia o processo de condensação da cromatina por um mecanismo ainda desconhecido (DEBATIN et al., 2002). Juntos, AIF e endonuclease G promoverão a condensação, clivagem do DNA e eventual fragmentação do núcleo (LINDENBOIM et al., 2011). AIF também desempenha

um papel na respiração anaeróbia, e sua liberação compromete esta principal função mitocondrial (TAIT; GREEN, 2008).

Em condições fisiológicas normais, a proteína p53 está presente em níveis basais e de forma quiescente. Danos ao DNA, estresse celular e hipóxia promovem a indução e supregulação desta proteína (BHARATHAM et al., 2011). Os danos ao DNA provocados por AIF e endonuclease G induzem a atividade da ATM e a liberação da p53 de seu complexo com a Mdm2 (BROOKS; GU, 2010), bem como induzem o aumento da expressão da p53 (LINDENBOIM et al., 2011), dado confirmado pelos resultados da citometria de fluxo para o marcador p53 neste trabalho. Em sua forma ativa, a p53 irá atuar de diferentes formas, como a promoção da parada do ciclo celular, reparo ao DNA, senescência celular ou apoptose (BHARATHAM et al., 2011).

Ainda no núcleo, p53 pode ampliar a indução da MOMP através de atividade transcrição-dependente, ativando a transcrição inicialmente de Puma e logo após de Bax, Bak, Noxa (DEBATIN et al., 2002; GALLUZZI et al., 2006; MOLL et al., 2006; SHAMAS-DIN, et al., 2010) e Bad (JIANG et al., 2006). p53 pode inibir a transcrição de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (LINDENBOIM et al., 2011; MOLL et al., 2006). Neste trabalho, foram avaliadas as expressões de Bad, Bax e Bcl-2 nas células tratadas com o peptídeo INKKI. As células tratadas apresentaram aumento na expressão de Bad e Bax e diminuição da expressão de Bcl-2. Estes resultados, ao que tudo indica, são decorrentes do aumento da expressão da p53. Em estudos realizados com o mastoparan em células de melanoma murino B16F10-Nex2, houve aumento da expressão de Bax, Bak e Bim e diminuição da expressão de Bcl-2 (AZEVEDO et al., 2015).

Paralelamente e concomitantemente à ação da p53 no núcleo, os primeiros sinais apoptóticos irão induzir uma rápida migração de uma fração desta proteína para o citoplasma e depois para a mitocôndria. O mecanismo que sinaliza a migração de p53 para a mitocôndria ainda não foi esclarecido. (Moll) Esta fração irá se somar a outra porção de p53 que naturalmente reside no espaço intermembranoso e é responsável por regulações das atividades do mtDNA (do inglês: *Mitochondrial DNA*) (lindenboim)(Moll) Na mitocôndria, p53 pode interagir diretamente com a ME, aumentando a MOMP, sem a

necessidade de associação com outras proteínas, e por si só pode acarretar na liberação de compostos proapoptóticos como citocromo c, endonuclease G e AIF para o citoplasma (MOLL et al., 2006).

Além da interação direta entre p53 e ME, a ação proapoptótica transcrição-independente de p53 ocorre através de interação direta com as antiapoptóticas Bcl-2/Bcl-x, liberando destas proteínas as ativadoras BH3 e as efetoras Bax e Bak em forma ativa (DEBATIN et al., 2002; GALLUZZI et al., 2006; SHAMAS-DIN, et al., 2010). p53 pode interagir diretamente com Bax livre, ativando-o (JIANG et al., 2006) e Bak livre, ativando-o, além de interagir com BclXL citossólico liberando Bax ativo. As ações transcrição-independentes da p53 ocorrem simultaneamente às ações transcrição-dependentes, porém em uma velocidade mais rápida, assim, os resultados das ações de p53 no citoplasma e na mitocôndria podem ser percebidos mais rapidamente do que as suas ações no núcleo (MOLL et al., 2006).

Paralelamente aos efeitos proapoptóticos de p53 acima mencionados, p53 também irá atuar de forma a promover a parada do ciclo celular e eventualmente a senescência mitótica, em uma resposta fisiológica aos danos provocados ao DNA, com o objetivo de dar tempo à célula se reparar. Dentre os genes cuja transcrição é diretamente ativada pela p53 estão o gene da proteína p21 e GADD45 (BROOKS; GU, 2010).

Os resultados deste trabalho mostraram que o peptídeo INKKI, na concentração de 3,78 µg/mL, obtida na determinação da IC₅₀ pelo método MTT, inibiu significativamente cerca de 28% a resposta proliferativa das células MCF-7, indicando a efetividade do INKKI em promover a parada da progressão do ciclo celular. A parada do ciclo celular deu-se na fase G0/G1, o que pode ser explicado pelos resultados dos marcadores relacionados aos pontos de checagem do ciclo celular, analisados por citometria de fluxo.

Neste trabalho foi observado aumento da expressão de p21, associado ao aumento da expressão de p53, e aumento da p27. Em condições normais os níveis de mRNA de p27 são mantidos em um nível basal, e sua expressão pode ser aumentada de acordo com a necessidade, como por exemplo em casos de necessidade de parada do ciclo celular, por mecanismos ainda controversos. p21 é um inibidor universal de todos os complexos de

ciclinas/CDKs, e juntamente com p27 inibe os complexos ciclinas/CDKs envolvidos em G0/G1 (ABUKHDEIR; PARK, 2009). Nas células de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas com o peptídeo INKKI foi observada a parada do ciclo celular nestas fases específicas e diminuição da expressão da Ciclina D1, resultado coerente com o aumento da expressão dos marcadores p21 e p27. O aumento de p21 e p27 também é responsável pelo aumento do marcador pRb, o que foi observado nos resultados da citometria de fluxo para esta proteína (P.SINGH et al., 2003). Com a inibição dos complexos de ciclinas/CDKs, a proteína pRb mantém-se acumulada em forma desfosforilada, sequestrando os fatores de transcrição da família E2F. A este fator deve-se em parte, a parada do ciclo celular em G1, conforme o resultados observados neste trabalho (P.SINGH et al., 2003).

As células tumorais, independente do tecido de origem, podem apresentar superexpressão da glicoproteína-P (P-gp), uma proteína transmembrana. A P-gp tem como substratos os mais variados tipos de drogas, incluindo quimioterápicos, identificando-os e expulsando-os do interior da célula. Esta função da P-gp confere à célula tumoral uma resistência generalizada a drogas, ou MDR (do inglês: *Multidrug resistance*), um dos fatores responsáveis pela resistência destas células à quimioterapia. Normalmente a expressão da P-gp é aumentada quando da exposição da célula às drogas aos seus substratos originais, mas fatores como estresse e drogas não identificadas como seu substrato também podem induzir o aumento de sua expressão (BREIER et al., 2013). O mastoparan e seus análogos são capazes de ativar a expressão da P-gp (PFEIFFER et al., 1995). Em nossos estudos o peptídeo INKKI provou modular esta expressão positivamente, no entanto, o aumento da P-gp não impediu a continuidade do processo da apoptose.

8 CONCLUSÃO

- O peptídeo INKKI demonstrou atividade citotóxica seletiva dose-dependente *in vitro* em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama humanas e murina em relação às linhagens celulares normais;
- As análises relativas ao potencial elétrico mitocondrial revelaram que o peptídeo INKKI afetou a atividade mitocondrial, modulando-a negativamente;
- O peptídeo INKKI demonstrou inibir em percentual significativo a proliferação de células de adenocarcinoma de mama MCF-7;
- A expressão dos marcadores envolvidos no controle e progressão do ciclo celular e morte por apoptose indicaram que o INKKI induziu a parada do ciclo celular em G0/G1 e promoveu a morte por apoptose através da via intrínseca mitocondrial de forma caspase-independente;
- O aumento na expressão do marcador TRAIL-receptor DR4 é um indicativo da modulação da morte celular via p53;
- O peptídeo INKKI demonstrou potente ação proapoptótica, ainda que modulando positivamente a expressão do marcador P-gp.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKAREEM, I.H; ZURMI, I.B. Review of hormonal treatment of breast cancer. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 15, ed. 1, p. 9-14, 2012.

ABUKHDEIR, A. M; PARK, B. H. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. **Expert Rev Mol Med**, v. 10, e. 19, p.1-18, 2009.

AN, H-X.; BECKMANN, M. W.; REIFENBERGER, G.; BENDER, H. G.; NIEDERACHER, D. Gene Amplification and Overexpression of CDK4 in Sporadic Breast Carcinomas Is Associated with High Tumor Cell Proliferation. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 1, p. 113-118, 1999.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondria: a target for cancer therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 239–248, 2006.

AZEVEDO, R. A.; FERREIRA, A. K.; AUADA, A. V. V.; PASQUALOTO, K. F. M.; MARQUES-PORTO, R.; MARIA. D. A.; LEBRUN, I. Antitumor Effect of Cationic INKKI Peptide from Bovine β -Casein on Melanoma B16F10. **Journal of Cancer Therapy**, v.3, p237-244, 2012.

AZEVEDO, R. A.; FIGUEIREDO, C. R.; FERREIRA, A. K.; MATSUO, A. L.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; AUADAA, A. V. V.; FARIAS, C. F.; PASQUALOTO, K. F. M.; RODRIGUES, C. P.; BARBUTO, J. A.; LEVYE, D.; BYDLOWSKI, S. P.; SÁ-JUNIOR, P. L.; TRAVASSOS, L. R.; LEBRUN, I. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo. **Peptides**, Elsevier, v. 68, p. 113–119, 2015.

BARTKOVA, J.; LUKAS, U.; MULLER, H.; STRAUSS, M.; GUSTERSON, B.; BARTEK, J. Abnormal Patterns of D-Type Cydin Expression and G1 Regulation in Human Head and Neck Cancer. **Cancer Research**, v. 55, p. 949-956, 1995.

BHARATHAM, N.; CHI, S-W.; YOON, H. S. Molecular Basis of Bcl-XL-p53 Interaction: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **PLoS ONE**, v. 6, ed. 10, p 1-12, 2011.

BREIER, A.; GIBALOVA, L.; SERES, M.; BARANCIK, M.; SULOV, Z. New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Bentham Science Publishers, v. 13, p. 159-170, 2013.

Brenner, C.; Grimm, S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. **Oncogene**, Nature Publishing Group, p. 4744–4756, 2006.

BROOKS, C. L.; GU, W. New insights into p53 activation. **IBCB**, Nature Publishing Group, v. 20, p. 614-621, 2010

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.**, v. 326, p. 1-16, 1997.

DEBATIN, K-M.; PONCET, D.; KROEMER, G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 21, p. 8786–8803, 2002.

DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG S. A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, ed. 7, p. 83-102/1.208-1.411, 2005.

DUMITRESCU, R.G.; COTARLA I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, ed. 1, p. 208-221, 2005.

ESSMANN, F.; ENGELS, I. H.; TOTZKE, G.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; JANICKE, R. U. Apoptosis Resistance of MCF-7 Breast Carcinoma Cells to Ionizing Radiation Is Independent of p53 and Cell Cycle Control but Caused by the Lack of Caspase-3 and a Caffeine-Inhibitable Event. **CANCER RESEARCH**, v. 64, p. 7065–7072, 2004.

FANTIN, V. R.; BERARDI, M. J.; SCORRANO, L.; KORSMEYER, S. J.; LEDER, P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. **CANCER CELL**, v. 2, p. 29-42, 2002.

FANTIN, V. R.; LEDER, P. Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 25, p. 4787–4797, 2006.

FOIJER, F.; te RIELE, H. Check, Double Check: The G2 Barrier to Cancer. **Cell Cycle**, Landes Bioscience, v. 5, ed. 8, p. 831-836, 2006.

FOO, J. B.; YAZAN, L. S.; TOR, Y. S.; ARMANIA, N.; ISMAIL, N.; IMAM, M. U.; YEAP, S. K.; CHEAH, Y. K.; ABDULLAH, R.; ISMAIL, M. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in caspase-3 deficient MCF-7 cells by Dillenia suffruticosa root extract via multiple signalling pathways. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 197-208, 2014.

GALLUZZI, L.; LAROCLETTE, N.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 25, p. 4812–4830, 2006.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2. ed., cap. 31, p.527-540, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, ed. 3, p. 335-343, 2007.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis – the p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 4.077-4.085, 2003.

HUANG, W.; SEO, J.; WILLINGHAM, S. B.; CZYZEWSKI, A. M.; GONZALGO, M. L.; WEISSMAN, I. L.; BARRON, A. E. Learning from Host-Defense Peptides: Cationic, Amphipathic Peptoids with Potent Anticancer Activity. **PLoS ONE**, v. 9, ed. P. 1-10, 2, 2014.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Databases. Disponível em: < <http://www-dep.iarc.fr/>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

IVO LEBRUN, I.; CAVALLARO, V.; JULIANO, L.; MARIA A. JULIANO; SILVA, M. C. C. DE S. Effects of 'casoparan', a peptide isolated from casein hydrolysates with mastoparan-like properties. **Mediators of Inflammation**, Taylor & Francis healthsciences, v. 13, ed. 4, p. 263-268, 2004.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

JIANG, P.; DU, W.; HEESE, K.; WU, M. The Bad Guy Cooperates with Good Cop p53: Bad Is Transcriptionally Up-Regulated by p53 and Forms a Bad/p53 Complex at the Mitochondria To Induce Apoptosis. **Molecular And Cellular Biology**, v. 26, p. 9.071–9.082, 2006.

KAY, J. G.; GRINSTEIN, S. Review Sensing Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Sensors**, v. 11, p. 1.744-1.755, 2011.

KUMOSINSKI, T.F. et al. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: An energy-minimized β -casein structure. **J. Dairy**, v. 76, n. 4, p. 931-945, 1993.

Landes, T.; Martinou, J. C. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1813, ed. 4, p. 540-545, 2011.

LIANG, Y.; YAN, C.; SCHOR, N. F. Apoptosis in the absence of caspase 3. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 20, p. 6.570-6.578, 2001.

LINDENBOIM, L.; BORNER, C.; STEIN, R. Nuclear proteins acting on mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - Molecular Cell Research, v. 1813, ed. 4: Mitochondria: The Deadly Organelle, p. 584–596, 2011.

LINDSAY, J.; ESPOSTI, M. D.; GILMORE, A. P. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1813, ed. 4, p. 532-539, 2011.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. **When Cells Die II: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death**. Wiley-Liss: United States of America, p. 3-26/257-404/461-482, 2005.

MADANI, F.; LINDBERG, S.; LANGE, U.; FUTAKI, S.; GRASLUND, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. **Journal of Biophysics**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2011, ID 414729, 10 pg, 2011.

MANGONE, F. R.; MIRACCA, E. C.; FEILLOTTER, H. E.; MULLIGAN, L. M. NAGAI, M. A. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. **Springerplus**, v. 15, p. 4-23, 2015.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, p. 8.656-8.684, 2013.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopolymers**, v. 43, p. 119-128, 1997.

MOLL, U.; MARCHENKO, N.; ZHANG, X-K. p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 25, p. 4.725–4.743, 2006.

MULDER, K. C.; LIMA, L. A.; MIRANDA, V. J.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, ed. 321, p. 3.389-3.412, 2013.

OKAMOTO, A.; DEMETRICK, D. J.; SPILLARE, E. A.; HAGIWARA, K.; HUSSAIN, S. P.; BENNETT, W. P.; FORRESTER, K.; GERWIN, B.; SERRANO, M.; BEACH, D. H.; HARRIS, C. C. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Medical Sciences, v. 91, p. 11.045-11.049, 1994.

OZEN, M.; ITTMANN, M. Increased Expression and Activity of CDC25C Phosphatase and na Alternatively Spliced Variant in Prostate Cancer. **Human Cancer Biology**, v. 11, ed. 13, p. 4.701-4.706, 2005.

P.SINGH, R.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDKI-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 555–563, 2003.

PFEIFFER, D. R.; GUDZ, T. I.; NOVGORODOV, S. A.; ERDAHL, W. L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270(9), p. 4.923-4.932, 1995.

PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: buried secrets in proteins. **Peptides**, Elsevier, v. 28(12), p. 2.403-2.410, 2007.

SHAMAS-DIN, A.; BRAHMBHATT, H.; LEBER, B.; ANDREWS, D. W. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Elsevier, v. 1813(4), p. 508-520, 2010.

SHAPIRO, G. I.; HARPER, J. W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. **The Journal of Clinical Investigation**, Series on targets for cancer therapy, v. 104, n. 12, p. 1.645-1.653, 1999.

SIDDIK, H. Z. **Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy**. Cancer Drug Discovery and Development Series. Humana Press: Houston, Texas, USA, cap. 1-2, p. 3-36, 2010.

STRACHAN, T.; READ, A. **Human Molecular Genetics**. Garland Science, ed. 4, ch. 17, p. 537-558, 2010.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Publishing, North Berwick: United Kingdom, cap. 2, p. 5-23, 2003.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Caspase independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, PMC, v. 27(50), p. 6.452–6.461, 2008.

TENGA, M. J.; LAZAR, M. I. Proteomic study reveals a functional network of cancer markers in the G1-Stage of the breast cancer cell cycle. **BMC Cancer**, v. 14, p. 710-724, 2014.

WESTPHAL, D.; DEWSON, G.; CZABOTAR, P. E.; KLUCK, R. M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. Series: Mitochondria: The Deadly Organelle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - Molecular Cell Research., Elsevier, v. 1813, ed. 4, p. 521–531, 2011.

WOLGEMUTH, D. J.; MANTEROLA, M.; VASILEVA, A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. **Int J Dev Biol.**, UBC Press, v. 57(0), p. 159–168, 2013.

YOUNIS, R. H.; WEI CAO, W.; LIN, R.; XIA, R.; LIU, Z.; EDELMAN, M. J.; MEI, Y.; MAO, L.; REN, H. CDC25AQ110del: A Novel Cell Division Cycle 25A Isoform Aberrantly Expressed in Non-Small Cell Lung Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, ed. 10, p. 1-10, 2012.

ZHENG, L-H.; WANG, Y-J.; SHENG, J.; WANG, F.; ZHENG, Y.; LIN, X-K.; SUN, M. Antitumor Peptides from Marine Organisms. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1840-1859, 2011.