Laertty Garcia de Sousa Cabral

Potencial antiproliferativo do monofosfoester 2-aminoetil dihidrogeno fosfato associado ao peptídeo penetrante de tumor BR2 em células tumorais de mama triplo-negativo

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2021

Laertty Garcia de Sousa Cabral

Potencial antiproliferativo do monofosfoester 2-aminoetil dihidrogeno fosfato associado ao peptídeo penetrante de tumor BR2 em células tumorais de mama triplo-negativo

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cabral, Laertty Garcia de Sousa

Potencial antiproliferativo do monofosfoester 2-aminoetil dihidrogeno fosfato associado ao peptídeo penetrante de tumor BR2 em células tumorais de mama triplo-negativo / Laertty Garcia de Sousa Cabral. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Neoplasias da mama
2.Nanocarreadores 3.Peptídeos 4.Monofosfoester

USP/FM/DBD-082/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho,
a minha vó **Maria Pereira Cavalcante**
que foi levada muito cedo para junto de Deus, vítima
dessa patologia que ainda ceifa muitas vidas, a todos
os pacientes oncológicos e suas famílias que sofrem
imensamente junto daquele que ama.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, essa força maior que nos move e nos inspira, e a toda espiritualidade benevolente que nos protege e auxilia nos momentos difíceis, não nos deixando cair.

Agradeço aos meus pais, Edicleide Garcia e Laecio Cabral, por me apoiarem em todas as decisões que tive na minha vida, sempre me dando forças para conseguir os meus sonhos e objetivos mesmo quando tudo está desfavorável. Agradeço a minha irmã Luma Cabral por sempre estar sempre comigo, e a toda minha família.

Agradeço aos amigos queridos, Monique Gonçalves, Manuela Laveli, Thais Conceição, Thalles Oliveira, Rosa Laiso, Henrique Hesse, Daniel Rabelo, Rosely Cabette, Sérgio Chamas e Denise Eulálio, por tornarem nossa caminhada mais leve, nos trazendo grandes ensinamentos e aprendizados.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria que além de orientador é um grande amigo, juntamente com o Prof. Arthur Cássio de Lima Luna, me possibilitaram grandes aprendizados, ambos servindo como modelo de profissional e dedicação nessa fase importante da minha vida.

Ao Prof. Vani Xavier de Oliveira Junior que abriu as portas do seu laboratório e me ensinou bastante, trazendo com os novos conhecimentos pessoas maravilhosas que me ajudaram muito, sem elas não teria conseguido concluir o meu trabalho, a Katielle Freire, Cyntia de Oliveira, Cibele Pedron e o Gustavo Moreira, vocês foram impar para a conclusão desse projeto.

Agradeço a todos os professores que ajudaram na minha formação tanto profissional quanto pessoal, podendo citar a Juliana Pereira, Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, David Holanda de Oliveira, Núbia Pereira da Costa Luna, Ângela Cristina Alves Albino e Anita Leocádia Pereira dos Santos, agradeço imensamente a todos vocês.

Agradeço a Angélica Belém e a Rose, por sempre estarem prontas para ajudar a resolver qualquer problema que fosse relacionado ao programa de pós-graduação, procurando sempre facilitar nossa vida.

E a todos os colegas que fazem parte do laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan pelo apoio.

“Aos outros, dou o direito de ser como são. A mim, dou o dever de ser cada dia melhor.”

(Chico Xavier)

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Câncer	22
1.2. Câncer de mama	24
1.3. 2-aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH ₂ F).....	27
1.4. Peptídeo Penetrante de Tumor BR2	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Síntese peptídica em fase sólida (SPPS), purificação e análise.....	33
3.2. Ensaios de atividade hemolítica	33
3.3. Cultura Celular	33
3.4. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT	34
3.5. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por Citometria de Fluxo	34
3.6. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo.....	35
3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	35
3.8. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser	36
3.8.1 Marcação das mitocôndrias com o MitoRed	36
3.8.2 Marcação do citoesqueleto com o Faloidina	36
3.9. Análise SynergyFinder 2.0 de múltiplas combinações de drogas	37
3.10. Análises Estatísticas	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Síntese e purificação do Peptídeo BR2	39
4.2. Determinação da atividade hemolítica do peptídeo BR2	41
4.3. Determinação da atividade citotóxica pelo ensaio colorimétrico MTT	42
4.4. Perfil de distribuição das células nas fases do ciclo celular	46
4.5. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular nas células de câncer de mama triplo negativo humano MDA MB-231	49

4.6. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo	54
4.7. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser	56
4.8. Análise do SynergiFinder 2.0.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO	71
6. BIBLIOGRAFIA.....	73
7. ANEXOS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
2-AEH ₂ F	2-aminoetil dihidrogeno fosfato
4T1	Linhagem de câncer mama triplo-negativo murino
AFF2	Membro da família AF4
Akt	A proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
APL	Leucemia promielocítica aguda
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B16-F10	Melanoma murino
Bax	Proteína pró-apoptótica
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
BRCA1	Gene de reparo por homologia (Câncer de mama 1)
CBFB	Subunidade beta do fator de ligação ao núcleo
CCND3	Ciclina-D3 específica de G1 / S
CD117	Proto-oncogene c-KIT
CD24	Proteína de adesão celular
CD34	Glicoproteína de fator de adesão celular
CD44	Glicoproteína adesão e migração celular
CD90	Glicofosfatidilinositol
CDH1	Caderina-1
CDKN1B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ER	Receptores de estrôgeno
FAO	β-oxidação de ácidos graxos
Fmoc	Fluorometiloxicarbonil
FN1	Fibroblasto humano normal
FOXM1	Proteína M1 da caixa da forquilha
GATA3	Fator de transcrição de ação "trans" específico de células T
H292	Linhagem de carcinoma de pulmão humano
HCT116	Linhagem de câncer de cólon humano
HeLa	Linhagem de câncer cervical humano

HepG2	Linhagem de hepatocarcinoma humano
HER2	Oncogene
HIF	Fator indicativo de hipóxia
HIF1	Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HUVEC	Linhagem de endotélio de veias umbilicais humanas
IC _{50%}	Concentração inibitória de 50% da viabilidade
INK4	Inibidores de quinase dependentes de ciclina
IRPTC	Linhagem de células normais do túbulo proximal imortalizadas de ratos
K562	Linhagem de leucemia mielóide crônica
LKB1	Proteína tipo quinase B1
MAPK	Proteínas-quinase, regula mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose.
MCF10	Linhagem de epitélio mamário normal
MCF-7	Linhagem de câncer de mama
MDA-MB-231	Linhagem de câncer de mama triplo-negativo humana
MDR+	Resistência a múltiplas drogas relacionada a Glicoproteína-P
MeWo	Linhagem de melanoma humano metastático
MLL3	Lisina N-metiltransferase 2C
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MTT	Ensaio colorimétrico de viabilidade celular
MYC	Genes reguladores e proto-oncogenes
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF1	Neurofibromatose tipo 1
Noxa	Promove ativação de caspases e apoptose
OCT1	Transportadores de cátion orgânico
p15	Inibidores de quinase dependentes de ciclina
p16	Inibidores de quinase dependentes de ciclina
p18	Inibidores de quinase dependentes de ciclina
p19	Inibidores de quinase dependentes de ciclina
p21	Proteína reguladora da transição
p53	Proteína reguladora de apoptose

p57	Glicosídeo esteroideal
PCNA	Antígeno nuclear de célula em proliferação
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PR	Receptor de progesterona
PTEN	A fosfatase homóloga à tensina
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase
PTPRD	Tirosina-proteína fosfatase delta do tipo receptor
PUMA	Modulador de apoptose regulado positivamente por P53
RB1	Proteína do retinoblastoma
Rho-123	Rodamina 123
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse	Enzima digestiva de RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
RUNX1	Fator de transcrição 1 relacionado à runt
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF3B1	Fator de emenda 3B, subunidade 1
SFB	Soro Fetal Bovino
Skmel-28	Linhagem de melanoma humano
TBX3	Fator de transcrição da caixa T TBX3
TP53	Gene codificante de p53
TSC2	Complexo 2 da Esclerose Tuberosa
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. As marcas do câncer. Adaptado Hanahan e Weinberg, (2000).

Figura 2. Marcas emergentes e características de habilitação. Adaptado Hanahan e Weinberg, (2011).

Figura 3. Subtipos do câncer de mama. Adaptado Rocky mountain cancer centers. In: <https://www.rockymountcancercenters.com/breast-cancer/types-hormone-receptors/>

Tabela 2. Tratamentos utilizados nas células tumorais e normais para avaliação do efeito dose-resposta e identificação dos valores de IC_{50%}

Figura 4. Projeções de roda helicoidal do peptídeo BR2 obtido pelo programa Heliquist Freeware. Círculos amarelos, cinza e verde indicam aminoácidos hidrofóbicos, azul e rosa representam aminoácidos hidrofílicos.

Tabela 3. Sequência do peptídeo BR2, peso molecular e propriedades físico-químicas.

Figura 5. (a) Cromatograma; (b) Varredura em massa do peptídeo BR2 em 17,899 min. O perfil do peptídeo BR2 foi obtido nas seguintes condições: coluna Phenomenex Gemini C18 (2,0 mm × 150 mm, partículas de 3,0 µm, poros de 110 Å. O solvente A (TFA a 0,1% em água) e o solvente B (90% de acetonitrila no solvente A). A eluição com um gradiente de 5–95% de B foi realizada durante 20 minutos, fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e o peptídeo foi detectado a 220 nm. As medidas de massa foram realizadas de modo positivo, com as seguintes condições: faixa de massa entre 100 a 2000 m/z, energia iônica de 5,0 V, fluxo de gás nitrogênio de 12,0 L min⁻¹, aquecedor de solvente de 250 °C, multiplicador de 1,0, capilar de 3,0 kV e tensão de cone de 35 V.

Figura 6. Atividade hemolítica do peptídeo BR2 em eritrócitos humanos dentro da faixa de concentração de 0,1 - 100 µmol L⁻¹ da solução peptídica em PBS (n = 3). O SDS a 1% em solução de PBS foi usado como controle positivo e o PBS como controle negativo.

Tabela 4. Valores de IC_{50%} para células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA MB-231 e 4T1 e normais HUVEC e FN1.

Figura 7. Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo BR2, do monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2, pelo período de 24 e 48h. (a) Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais do MDA MB-231 e 4T1 tratado no período de 24h; (b) O mapa de calor mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes.

Figura 8. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} do peptídeo BR2, do monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2, pelo período de 24. (a) Perfil de distribuição das células tumorais 4T1 nas fases do ciclo celular; (b) Perfil de distribuição das células tumorais MDA MB-231 nas fases do ciclo celular. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Tabela 5. Análise da expressão dos marcadores nas células tumorais MDA MB-231 após os tratamentos.

Figura 9. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC_{50%}. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de p53, p21, Ciclina D1, Bax e Bcl-2 dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Figura 10. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC_{50%}. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de Caspase 3, Caspase 8, liberação de citocromo c, expressão de CD44, CD34 e CD24 dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Figura 11. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC_{50%}. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de PCNA, VEGF e EGF dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Figura 12. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murinas 4T1 por citometria de fluxo. As células foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC_{50%} por um período de 24h. (a) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais 4T1; (b) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais MDA MB-231; Gráfico de barras e linha mostrando o $\Delta\Psi_m$ expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Figura 13. Fotomicrografias das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo murina 4T1 com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e citoesqueleto marcado em verde (faloidina), analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC_{50%} por um período de 24h.

Figura 14. Fotomicrografias das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e citoesqueleto marcado em verde (faloidina), analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC₅₀% por um período de 24h.

Figura 15. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1. (a) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais 4T1 e área total, analisadas pelo ImageJ; (b) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais MDA MB-231 e área total, analisadas pelo ImageJ. Gráfico de linhas mostrando o $\Delta\Psi_m$ e área total expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

Figura 16. Determinação do efeito aditivo e sinérgico da associação peptídeo BR2 com o monofosfoester 2-AEH₂F em células tumorais de câncer da mama triplo-negativo murina 4T1. (a) Os gráficos de barras mostram atividade aditiva ou sinérgica para concentrações dos tratamentos nas células tumorais. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (≤ 0), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho (> 0 e < 10 aditivo; > 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **(b)** Tabela mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essa combinação.

Figura 17. Determinação do efeito aditivo e sinérgico da associação peptídeo BR2 com o monofosfoester 2-AEH₂F em células tumorais de câncer da mama triplo-negativo humana MDA MB-231. (a) Os gráficos de barras mostram atividade aditiva ou sinérgica para concentrações dos tratamentos nas células tumorais. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (≤ 0), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho (> 0 e < 10 aditivo; > 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; **(b)** Tabela mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essa combinação.

RESUMO

Cabral LGS. *Potencial antiproliferativo do monofosfoester 2-aminoetil dihidrogeno fosfato associado ao peptídeo penetrante de tumor BR2 em células tumorais de mama triplo-negativo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. A maioria das mortes relacionadas ao câncer de mama é devido ao rápido crescimento de tumores e formação de metastase. As terapias atuais são limitadas e a resistência à quimioterapia constitui um importante obstáculo para o sucesso do tratamento. O 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) é um monofosfoester que está envolvido no *turnover* de fosfolipídios, apresentando efeitos antiproliferativos em uma ampla variedade de linhagens de células tumorais. O peptídeo BR2 é um derivado não específico de penetração celular derivado do buforin IIb, tendo mostrado maior especificidade às células tumorais. Foi avaliado os efeitos da toxicidade e determinado a concentração inibitória (IC_{50%}) pelo teste colorimétrico MTT. Foram avaliadas as alterações morfológicas e estruturais envolvidas no processo de apoptose pela marcação do citoesqueleto com faloidina e mitocôndria com a sonda MitoRED. A expressão de marcadores envolvidos nas vias de morte celular, proliferação, bem como o potencial elétrico mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que o peptídeo BR2 e a associação 2-AEH₂F+BR2 promoveu maior toxicidade nas linhagens tumorais, em comparação ao monofosfoester 2-AEH₂F, além disto, o peptídeo BR2 promoveu parada na fase S para célula tumoral MDA MB-231 e G0/G1 para a célula tumoral 4T1, já a associação 2-AEH₂F+BR2 ocasionou parada nas fases G0/G1, nas células tumorais 4T1 e MDA MB-231. As células tumorais MDA MB-231 foram sensíveis a todos os tratamentos. Os tratamentos levaram a mudanças na morfologia das células tumorais, principalmente nas mitocôndrias, que perdem sua integridade e se reorganizaram na região perinuclear, aumentando a porcentagem de células com mitocôndrias inativas. Os tratamentos com o peptídeo BR2 e a associação 2-AEH₂F+BR2 foram efetivos em induzir morte celular, modulando a via intrínseca do apoptose e promovendo: redução da expressão de marcadores CD44, CD34, CD24, ciclina D1 e Bcl-2, aumento de p53, p21, Bax e caspases 8 e 3 ativas e liberação do citocromo c nas células tumorais MDA MB-231. Houve diminuição considerável da resposta proliferativa das células tumorais após os tratamentos, corroborando a redução da expressão do marcador PCNA. Redução da expressão do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) foram observados após os tratamentos para células tumorais MDA MB-231. A associação 2-AEH₂F+BR2 se mostrou mais efetiva, provendo modulação das proteínas envolvidas na morte celular regulada e senescência, bem como citotoxicidade seletiva para as células tumorais, em comparação com as células normais.

Descritores: Neoplasias da mama; Nanocarreadores; Peptídeos; Monofosfoester.

ABSTRACT

Cabral LGS. *Antiproliferative potential of monophosphoester 2-aminoethyl dihydrogen phosphate associated with tumor penetrating peptide BR2 in triple-negative breast tumor cells* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Breast cancer is the most common type of cancer among women in the world. Most breast cancer-related deaths are due to the rapid growth of tumors and the formation of metastases. Current therapies are limited and resistance to chemotherapy is an important obstacle to successful treatment. 2-Aminoethyl dihydrogen phosphate (2-AEH₂P) is a monophosphoester that is involved in phospholipid turnover, with antiproliferative effects in a wide variety of tumor cell lines. The BR2 peptide is a non-specific cell penetration derivative derived from buforin IIb, having shown greater specificity to tumor cells. The effects of toxicity were evaluated and the MTT colorimetric test determined inhibitory concentration (IC_{50%}). The morphological and structural changes involved in the apoptosis process were evaluated by marking the cytoskeleton with Fhalloidin and mitochondria with the MitoRED probe. The expression of markers involved in the pathways of cell death, proliferation, as well as mitochondrial electrical potential was assessed by flow cytometry. The results obtained showed that the BR2 peptide and the association 2-AEH₂P+BR2 promoted greater toxicity in tumor lines, in comparison to the monophosphoester 2-AEH₂P, in addition, the BR2 peptide promoted stop in the S phase for MDA tumor cell MB-231 and G0/G1 for the 4T1 tumor cell, while the association 2-AEH₂P+BR2 caused a stop in the G0/G1 phases, in the 4T1 and MDA MB-231 tumor cells. MDA MB-231 tumor cells were sensitive to all treatments. The treatments led to changes in the morphology of the tumor cells, mainly in the mitochondria, which lose their integrity and reorganized in the perinuclear region, increasing the percentage of cells with inactive mitochondria. The treatments with the BR2 peptide and the association 2-AEH₂P+BR2 were effective in inducing cell death, modulating the intrinsic pathway of apoptosis and promoting: reduced expression of CD44, CD34, CD24, cyclin D1, and Bcl-2 markers, increased p53, p21, Bax, and active 8 and 3 caspases and release of cytochrome c in tumor cells MDA MB-231. There was a considerable decrease in the proliferative response of tumor cells after treatments, corroborating the reduction in the expression of the PCNA marker. Reduction of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor (EGF) was observed after treatments for tumor cells MDA MB-231. The association 2-AEH₂P+BR2 proved to be more effective, providing modulation of proteins involved in regulated cell death and senescence, as well as selective cytotoxicity for tumor cells, compared to normal cells.

Descriptors: Breast neoplasms; Nanocarriers; Peptides; Monofosfoester.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, estando entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países. A incidência e a mortalidade decorrente do câncer vêm aumentando e se dá por inúmeros fatores, em parte pelo envelhecimento da população, mudança na distribuição e prevalência de fatores de risco, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico ^{1,2}.

A mais recente estimativa mundial, aponta 18 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer ². Os tipos de câncer mais frequentes em homens são próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) são os principais ². Segundo a *International Agency for Research on Cancer* até o ano de 2040, esse número chegará a 29,5 milhões.

A proliferação tumoral apresenta características específicas às quais envolvem a sustentação da sinalização proliferativa, evitando os supressores de crescimento, resistindo assim à morte celular, levando a imortalidade replicativa, induzindo a angiogênese levando a invasão e a metástase (Figura 1). Adaptam o metabolismo celular para lidar com sua alta taxa de proliferação, como consequência direta e indireta de mutações oncogênicas. Além desses fatores, alterações no metabolismo das células tumorais, como a capacidade de aquisição de nutrientes essenciais de um ambiente frequentemente pobre em nutrientes e os utilizar para manter a viabilidade e construir nova biomassa ^{3,4}.

Figura 1. As marcas do câncer. Adaptado Hanahan e Weinberg, (2000).

Outras duas características foram propostas como sendo importantes na patogênese da maioria dos tumores, são elas, a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular a fim de apoiar de maneira mais eficaz a proliferação neoplásica, e permitir que as células tumorais evitem a destruição imunológica, o escape imunológico ^{5,6}. Outro ponto importante é a instabilidade genômica, pois promove às células tumorais alterações genéticas que impulsionam a progressão do tumor, bem como a inflamação por células imunes inatas projetadas para combater infecções e curar feridas, podendo, em vez disso, promover o desenvolvimento tumoral ⁷⁻⁹ (Figura 2).

Figura 2. Marcas emergentes e características de habilitação. Adaptado Hanahan e Weinberg, (2011).

Dentre os processos metabólicos, bem caracterizado e observado nas células tumorais é o efeito Warburg, que passa da geração de ATP através da fosforilação oxidativa para a geração de ATP pela glicólise, mesmo sob concentrações normais de oxigênio. Esse efeito é regulado pelas vias PI3K, fator indicativo de hipóxia (HIF), p53, MYC e proteína-quinase ativada por AMP (AMPK) - fígado cinase B1 (LKB1) ^{10,11}.

Na maioria dos tipos de câncer utilizam lipídeos e colesterol para atender as suas demandas limitadas de energia, sendo alcançado pelas vias da β -oxidação de ácidos graxos (FAO), utilizando tanto ácidos graxos exógenos quanto endógenos suportando o crescimento e a metastização ¹²⁻¹⁴.

Alterações no metabolismo do câncer provocados pelo o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH), funciona como um cofator e fornece poder redutor em várias reações enzimáticas cruciais para a biossíntese de macromoléculas, sendo também um antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (ROS), evitando senescência e apoptose ^{15,16}.

Além das alterações genéticas, que alteram o metabolismo das células tumorais, o microambiente anormal do tumor como hipóxia, pH e baixas concentrações de glicose tem um papel importante na determinação do fenótipo metabólico das células tumorais, bem como mutações em oncogenes e genes supressores de tumores como PTEN, AKT1, HIF1, MYC, TSC2 e OCT1 por exemplo. Essas mutações promovem alterações em várias vias de sinalização intracelular, que afetam o metabolismo das células tumorais e o re-projetam para permitir maior sobrevivência e crescimento ¹⁷⁻²⁰.

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é mais comum entre as mulheres no mundo, com uma estimativa de 2 milhões de casos diagnosticados, correspondendo a 25,2% de todos os cânceres femininos ¹. No Brasil, estima-se que 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres ^{2,21,22}. Também pode vir a acometer homens, sendo mais raro e representando apenas 1% do total da doença. Há uma tendência no aumento de casos de câncer de mama em todo mundo, no Brasil, em 2019 o número de óbitos decorrentes desse câncer foram de 15.403 ²³.

A interação de inúmeros fatores está associado ao surgimento e desenvolvimento do câncer de mama, bem como o aumento das taxas de mortalidade. Predisposições

genéticas, por exemplo, mulheres que têm mãe, irmã ou filha com história de câncer de mama têm duas vezes mais chances de desenvolver câncer de mama do que mulheres que não têm histórico familiar. Uso de terapia hormonal, hábito alimentar, meio ambiente, uso de contraceptivos orais, nuliparidade ou idade mais tardia no primeiro parto, pois a amamentação diminui o risco de câncer de mama, são alguns dos fatores que estão associados ao câncer de mama ²⁴.

É composto por subtipos distintos associados a diferentes desfechos clínicos devido a sua heterogeneidade, sendo de fundamental entendimento para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas (Figura 3). Embora o início e a progressão do tumor sejam predominantemente impulsionados por alterações genéticas adquiridas, dados recentes implicam também o papel das alterações microambientais e epigenéticas. Estudos imparciais e abrangentes de tumores em populações de pacientes aumentaram significativamente a compreensão molecular do câncer de mama, porém os resultados para a prática clínica continuam um desafio, além do desenvolvimento de resistência a quimioterapia constituindo um importante obstáculo para o sucesso ^{25,26}.

Figura 3. Subtipos do câncer de mama. Adaptado Rocky mountain cancer centers. In: <https://www.rockymountaincancercenters.com/breast-cancer/types-hormone-receptors/>

Clinicamente é uma doença heterogênea e categorizada em três grupos terapêuticos básicos. O grupo positivo do receptor de estrogênio (ER) é o mais numeroso e diversificado ^{27,28}. O grupo HER2, que levou a intensos esforços para caracterizar outras aberrações no número de cópias de DNA ^{29,30}, e os cânceres de mama triplo-negativos, sem expressão de receptores de estrôgeno (ER), receptor de progesterona (PR) e HER-2, também conhecidos como câncer de mama do tipo basal com incidência aumentada em pacientes com mutação de BRCA1 germinativa ou de ascendência africana ³¹⁻³³.

Tabela 1. Subtipos moleculares do câncer de mama.

	ER	PR	HER-2	Ki67
Luminal A	+	+	-	Baixo
Luminal B	+	±	-	Alto
Superexpressão HER-2	-	-	+	S/E
Basaloide	-	-	-	Alto
Triplo-negativo não basal	-	-	-	S/E

S/E = Sem efeito

Inúmeros genes, sejam oncogenes, supressores de tumor ou de reparo estão diretamente ligados ao desenvolvimento, progressão e resistência do câncer mama como por exemplo PIK3CA, PTEN, AKT1, TP53, GATA3, CDH1, RB1, MLL3, MAP3K1 e CDKN1B, vários outros foram recentemente identificados como tendo significância nesse processo, sendo eles, TBX3, RUNX1, CBFB, AFF2, PIK3R1, PTPN22, PTPRD, NF1, SF3B1 e CCND3 segundo o The Cancer Genome Atlas ³⁴.

O tumores com subtipo triplo negativo apresentam uma alta frequência mutações em TP53, que quando combinados com a atividade da via TP53, sugere uma perda na sua função ³¹. Outra característica desse tipo de câncer é a perda de RB1 e BRCA1, outro gene comumente mutado foi o PIK3CA, sendo inferida uma alta atividade seja do gene ou da proteína na via PI(3)K/AKT ³⁵⁻³⁷. Possuem uma alta expressão de genes associados a proliferação celular, como por exemplo uma superexpressão de genes como FOXM1, MYC e HIF1- α / RNT ^{38,39}.

1.3. 2-aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH₂F)

O monofosfoester 2-AEH₂F é uma molécula envolvida no *turnover* de fosfolipídios, agindo como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana, entre eles fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, ambos participam das vias de sinalização lipídica atuando como ligantes ou gerando substratos intermediários ^{40,41}. Nosso grupo de pesquisa utiliza o 2-AEH₂F, e vem relatando seus efeitos antiproliferativos em uma ampla variedade de linhagens de células tumorais. *In vivo* o tratamento de camundongos com o 2-AEH₂F exibe efeitos antiproliferativos em modelo de leucemia promielocítica aguda (APL) reduzindo o número de células mieloides imaturas CD117 e Gr-1 na medula óssea, baço e fígado. O 2-AEH₂F reduz a expansão de clones com expressão de CD34'/ CD117', CD34'e Gr-1' na medula óssea. Além disso, 2-AEH₂F induz a apoptose de células imaturas no baço e no fígado ⁴².

O 2-AEH₂F apresenta efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos nas células do melanoma induzindo uma parada na fase G₂/M do ciclo celular com a perda do potencial mitocondrial e aumento da atividade da caspase-3 fosforilada. No modelo de carcinoma renal murino é mais sensível a 2-AEH₂F quando comparado às células normais do túbulo proximal imortalizadas de ratos (IRPTC) e células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC), também induz a fragmentação nuclear e afeta a organização do citoesqueleto através da ruptura dos filamentos de actina, potencializando inibição da formação de metástase pulmonar em camundongos nude, com uma eficácia superior quando comparado ao Sunitinibe ⁴³.

O 2-AEH₂F é citotóxico para células tumorais de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, já para células de mama humano normal MCF10, apenas em concentrações mais altas ⁴⁴. Induziu agregados de mitocôndrias no citoplasma e fragmentação de DNA, bem como apoptose seguido por um aumento na expressão da liberação do citocromo c e atividade da capase-3 fosforilada, induz uma parada do ciclo celular na fase G1, através da inibição da ciclina D1 e estimula fosforilação da p53. Um destaque adicional deste estudo foi à descoberta de que 2-AEH₂F modula a expressão de Bcl-2, inibindo-a ⁴⁵. Outros trabalhos mostram alterações nas distribuições das populações celulares nas fases do ciclo celular, apresentando um aumento do DNA fragmentado após 48 h e parada na fase G2/M após 24 h, e modulação da apoptose tardia ²⁶.

Em trabalhos recentes o 2-AEH₂F apresentou caráter citotóxico para as células de adenocarcinoma de mama humano triplo-negativo (MDA-MB-231) quando comparado com células de fibroblasto humano normal (FN1) o valor da IC_{50%} obtido foi 30 vezes maior, houve diminuição significativa dos lipoperoxidos, aumento do DNA fragmentado e diminuição das fases G0/G1 ⁴⁶. O 2-AEH₂F também apresentou uma significância terapêutica para a leucemia mielóide crônica (K562), promovendo apoptose independente do perfil de resistência molecular (MDR+) ⁴⁷.

1.4. Peptídeo Penetrante de Tumor BR2

BR2 é um peptídeo penetrante de tumor, que ativa a via de transporte endocítica distinta da macropinocitose. Realiza esse processo complexo, que envolve a ligação a um receptor primário específico do tumor, seguido por uma clivagem proteolítica e ligação a um segundo receptor. O segundo receptor, neuropilina-1 (ou neuropilina-2), ativa a via de transporte. São capazes de transportar as carga mais variadas, através das membranas celulares, o que é um dos maiores problemas na administração de medicamentos e na terapia alvo direcionada ⁴⁸⁻⁵⁰.

A distribuição do peptídeo é direcionada e demonstrou aumentar especificamente a acumulação de fármacos e anticorpos. Estudos em camundongos mostraram eficácia antitumoral melhorada e menor danos a tecidos normais com fármacos, que variam de quimioterápicos tradicionais a anticorpos e a fármacos nanoparticulados em tumores experimentais *in vivo* e em tumores humanos *ex-vivo* ⁵¹.

Para alcançar as células tumorais, uma molécula, partícula ou célula terapêutica transportada pelo sangue deve penetrar nos vasos sanguíneos do tumor e atravessar a parede do vaso até o interstício, pelo qual deve migrar. A distribuição limitada de drogas dentro dos tumores deve-se principalmente à arquitetura vascular mal organizada, aos vasos sanguíneos perfundido irregulares e à alta pressão intersticial que faz com que o fluido tecidual flua para fora do tumor ^{49,51,52}.

O peptídeo BR2 é um derivado não específico de penetração de células tumorais do peptídeo antitumoral buforin IIb, mostrando uma especificidade maior para células tumorais, conseqüentemente minimiza a toxicidade para células normais ^{53,54}. O peptídeo BR2 apresenta eficiência em translocação da membrana quatro vezes maior nas células tumorais que em células normais em comparação com a Tat, um peptídeo penetrante de tumor bem conhecido que mostrou eficiência em diversas linhagens

tumorais⁵⁵. Peptídeos usados como portadores de carga mostraram aumentar a absorção celular de drogas e, assim, fornece um benefício terapêutico eficiente sobre o fármaco⁵⁶.

A distribuição intracelular eficiente e a entrega direcionada ao local de ação são essenciais para superar as desvantagens atuais da terapêutica do câncer. Os peptídeos penetrantes de tumor oferecem a possibilidade de transporte intracelular eficiente e, portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos usando peptídeos de penetração tumoral como transportadores de moléculas é uma estratégia interessante para minimizar as desvantagens atuais. A possibilidade de incorporar peptídeos que direcionam drogas para o tumor aumentando a especificidade desses agentes terapêuticos é um método eficiente para melhorar os mecanismos intracelulares de liberação de drogas.

O câncer de mama está entre os tipos de câncer mais letais para as mulheres em todo o mundo, apesar das diversas abordagens convencionais como a radioterapia, quimioterapia e a terapia hormonal. A resistência de células tumorais à quimioterapia constitui um importante obstáculo clínico para o sucesso da terapia do câncer. Diante dos fatores limitantes das terapias ofertadas para o tratamento do câncer de mama, o desenvolvimento de fármacos que apresentem menor toxicidade sistêmica e tecidual é essencial, exigindo mais pesquisas com a finalidade de identificar novos compostos para essa terapia. A associação do monofosfoester 2-AEH₂F e BR2 se mostra promissora, diante dos resultados positivos já obtidos em separado com o 2-AEH₂F e como o peptídeo penetrante de tumor BR2.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antitumoral e pró-apoptótico do 2AEH₂F, peptídeo BR2 e a associação 2AEH₂F+BR2 em linhagens de células tumorais de mama triplo negativo murino 4T1 e células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231.

2.2. Objetivos Específicos

Todos os experimentos foram utilizados as seguintes condições experimentais: (I) Grupo controle, (II) 2-AEH₂F, (III) BR2, (IV) 2-AEH₂F+BR2, sendo realizados os seguintes experimentos:

- Avaliar o potencial hemolítico do peptídeo BR2;
- Determinar a viabilidade celular das células tumorais após os tratamentos e suas associações para a obtenção dos valores da IC₅₀%;
- Determinar a curva de crescimento para as células tumorais tratadas pelo método de viabilidade por azul de tripan;
- Analisar a distribuição das populações celulares nas das fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo;
- Avaliar por microscopia confocal a laser das alterações morfológicas decorrentes da toxicidade dos tratamentos;
- Determinar o potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese peptídica em fase sólida (SPPS), purificação e análise

O peptídeo BR2 foi sintetizado em um sintetizador de peptídeos (PS3-Sync Technologies) usando a metodologia de síntese em fase sólida e a estratégia fluorometiloxycarbonil (Fmoc), detalhada por Torres et al. (2017) ⁵⁶. Os ensaios de purificação foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa semi-preparativa (RP-HPLC) em Delta Prep 600 (Waters Associates). As frações selecionadas contendo o peptídeo BR2 purificado foram reunidas e liofilizadas. A pureza foi avaliada em um HPLC da Alliance (sistema Waters Associates) e caracterizada por espectrometria de massa por ionização por eletropulverização por cromatografia em fase líquida (LC/ESI-MS) usando um espectrômetro de massa modelo 6130 Infinity acoplado a um sistema modelo 1260 HPLC (Agilent).

3.2. Ensaios de atividade hemolítica

Os ensaios contra eritrócitos humanos recém-coletados foram realizados de acordo com Pedron et al. (2017) ⁵⁷. Resumidamente, alíquotas em uma concentração de 10 a 100 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ do peptídeo BR2 foi incubada com uma suspensão de eritrócitos. O surfactante Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi usado como controle positivo e o tampão PBS foi usado como controle negativo. Depois disso, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1h. As amostras foram centrifugadas e a absorbância foi medida a 405 nm ^{58,59}.

3.3. Cultura Celular

Foram utilizadas células tumorais de mama triplo negativo murino 4T1 (ATCC® CRL2539™), células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231 (ATCC® HTB-26™), células de endotélio humano normal HUVEC (ATCC® CRL1730™), ambas originárias da ATCC e fibroblasto humano normal FN1 (CAPPesq HCFMUSP nº 921/06). Todas as células são mantida e estocada no banco de células do Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm^2), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO_2 à 37°C. As células dispostas em monocamada foram submetidas a dissociação enzimática com solução de tripsina (0,2%) + EDTA (0,02%) (Etilenodiamino tetra-acético), para

que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi feita utilizando o mesmo meio de cultura RPMI contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10^5 células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.4. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células tumorais e normais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 1×10^5 células/mL durante 24 e 48h e tratadas com os grupos descritos abaixo (Tabela 2), em diversas concentrações. Após 24h de tratamento o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 μ L da solução de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, as células foram incubadas por 3h em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescenta-se 100 μ L de álcool metílico para dissolver os cristais de Formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que induz toxicidade em 50% das células (IC_{50%}) foi determinada no tratamento após 24 e 48h em diferentes concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

Tabela 2. Tratamentos utilizados nas células tumorais e normais para avaliação do efeito dose-resposta e identificação dos valores de IC_{50%}

Tratamentos	
Grupo I	Controle negativo – veículo/meio
Grupo II	2-AEH ₂ F
Grupo III	BR2
Grupo IV	2-AEH ₂ F+BR2

3.5. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por Citometria de Fluxo

As células tumorais e normais foram submetidas aos tratamentos por período de 12 e 24h. As células tratadas e do grupo controle foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em solução de etanol absoluto gelado com RNase e armazenado no freezer -20°C por 24h. As amostras foram

centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e ressuspensas em 200 μ L de tampão Facs, 20 μ L de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 μ g/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o *pellet* foi ressuspensão em tampão Facs Flow e transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.6. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo

Alíquotas de 100 μ L das suspensões de células tumorais obtidas dos tratamentos *in vitro* foram incubadas por 1h a 4°C, com 1 μ g de anticorpo específico caspase 3 e 8 ativa conjugado com ficoeritrina (PE) na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH. Foram utilizados diversos marcadores envolvidos na morte celular, reguladores da progressão do ciclo celular, adesão e angiogênese (p53, p21, CD44, CD34, CD24, Bax, Bcl-2, ciclina D1, VEGF, EGF e PCNA). Após este período as células foram centrifugadas a 1200 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensão em 200 μ L de Tampão Facs Flow contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Rho-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorescendo em verde. Alterações em nível de integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (Johnson, 1980) ⁶⁰. As amostras das células tumorais dos grupos tratados com o 2-AEH₂F, peptídeo BR2 e associação 2-AEH₂F+BR2 e os grupos controles foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 5 μ L

de Rho-123 (5 mg/mL^{-1} diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% CO_2 a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão FACS Flow. A leitura e análise da marcação da Rho-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FLH-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.8. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

3.8.1 Marcação das mitocôndrias com o MitoRed

As alíquotas das culturas de mama triplo negativo murino 4T1, mama triplo negativo humano MDA MB-231, células de endotélio humano normal HUVEC e células de fibroblasto humano normal FN1 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 24h. As amostras dos grupos controle e tratados foram submetidas ao processo de remoção do meio de cultura e lavadas com próprio meio de cultura RPMI. Em seguida, foi acrescentado $200 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de MitoRed+ meio de cultura RPMI a 10% de SFB (MitoRed a 200 nML^{-1}) (Sigma-Aldrich, USA), durante 1h no escuro a 37°C . Após a incubação, o excesso de MitoRed foi removido e as células lavadas com PBS. Após a incubação com o MitoRed para fixação adicionar $100 \text{ }\mu\text{L}$ de paraformaldeído a 2% por 30 min, em seguida lavar com PBS para posterior marcação do citoesqueleto com a Faloidina.

3.8.2 Marcação do citoesqueleto com o Faloidina

Após a marcação das mitocôndrias com MitoRed e fixação em paraformaldeído a 2%, as células foram permeabilizadas em Triton X-100 por 20 min em temperatura ambiente, posteriormente acrescentado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de faloidina (Sigma-Aldrich, USA), durante 1h no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de faloidina foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview TM 300) e as imagens fotodocumentadas e analisadas.

3.9. Análise SynergyFinder 2.0 de múltiplas combinações de drogas

Para determinar a sinergia potencial do fármaco, foi realizado um estudo de matriz com o peptídeo BR2 e o 2-AEH₂F. A matriz de combinação foi testada em duas linhas celulares: MDA MB-231 e 4T1. O software SynergyFinder 2.0 quantificou o grau de sinergia como o excesso sobre o efeito multiplicativo de drogas únicas como se agissem independentemente (*Bliss*), as seguintes formulações de ordem superior foram usadas para quantificar a sinergia da combinação de drogas (S) para o efeito de combinação de múltiplas drogas medido entre 2 drogas:

$$S_{BLISS} = E_{A,B} - (E_A + E_B)$$

$$SynergyScore = \frac{-\log(p)}{\log(0.05)} \times \frac{t}{|t|}$$

3.10. Análises Estatísticas

Todos os valores obtidos das diferentes linhagens celulares foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle, os resultados foram tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 5.0 e InStatPad Prism Version 7.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de três ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER, considerando como nível crítico para significância valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Síntese e purificação do Peptídeo BR2

Nossos resultados demonstraram que a atividade antitumoral pode ser atribuída à carga do peptídeo, possuindo carga líquida positiva de +5 conforme apresentado na Figura 4. O peptídeo BR2 foi sintetizado pela estratégia Fmoc de peptídeo em fase sólida ⁶¹, o peptídeo bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa e sua identificação confirmada por espectrometria de massa (Figura 5 A-B) evidenciando que o peptídeo purificado estava de acordo com os valores teóricos esperados com pureza > 97%. Os dados das propriedades físico-químicas, foram calculados através do programa Helquest Freeware ⁶², são mostrados na Tabela 3.

Figura 4. Projeções de roda helicoidal do peptídeo BR2 obtido pelo programa Helquest Freeware. Círculos amarelos, cinza e verde indicam aminoácidos hidrofóbicos, azul e rosa representam aminoácidos hidrofílicos.

Tabela 3. Sequência do peptídeo BR2, peso molecular e propriedades físico-químicas.

Peptídeo	Sequência	Peso molecular (Da)		H	μH	z
		Calculado	Observado			
BR2	CRAGLQFPVGRLLRLLR	2122,2	2126	0,48	0,4	+6

H (hidrofobicidade), μH (momento hidrofóbico), z (carga líquida) de acordo com a projeção de roda helicoidal Helquest.

Figura 5. (a) Cromatograma; (b) Varredura em massa do peptídeo BR2 em 17,899 min. O perfil do peptídeo BR2 foi obtido nas seguintes condições: coluna Phenomenex Gemini C18 (2,0 mm × 150 mm, partículas de 3,0 µm, poros de 110 Å. O solvente A (TFA a 0,1% em água) e o solvente B (90% de acetonitrila no solvente A). A eluição com um gradiente de 5–95% de B foi realizada durante 20 minutos, fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e o peptídeo foi detectado a 220 nm. As medidas de massa foram realizadas de modo positivo, com as seguintes condições: faixa de massa entre 100 a 2000 m/z, energia iônica de 5,0 V, fluxo de gás nitrogênio de 12,0 L min⁻¹, aquecedor de solvente de 250 °C, multiplicador de 1,0, capilar de 3,0 kV e tensão de cone de 35 V.

4.2. Determinação da atividade hemolítica do peptídeo BR2

O potencial hemolítico do peptídeo BR2 foi avaliado em diferentes concentrações no período de 1h de tratamento em hemácias lavadas em PBS. Levando em consideração que peptídeos catiônicos tendem a ter potencial hemolítico alto e para terapêutica do câncer seria uma grande desvantagem, é essencial a avaliação da citotoxicidade do peptídeo em células sanguíneas.

Após o período de tratamento, foi observado que o peptídeo na concentração de 42 μ M causou 50 $\pm$ 3,5% de hemólise, e nas concentrações de 10 e 20 μ M correspondentes as faixas de tratamento para as células tumorais MDA MB-231 e 4T1 os valores percentuais de hemólise foram de 0,9 $\pm$ 0,6% e 14,7 $\pm$ 0,2% respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Atividade hemolítica do peptídeo BR2 em eritrócitos humanos dentro da faixa de concentração de 0,1 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da solução peptídica em PBS ($n = 3$). O SDS a 1% em solução de PBS foi usado como controle positivo e o PBS como controle negativo.

4.3. Determinação da atividade citotóxica pelo ensaio colorimétrico MTT

A capacidade de induzir citotoxicidade do 2-AEH₂F, do peptídeo BR2 e da associação 2-AEH₂F+BR2 foi analisada e fotodocumentada, utilizando um microscópio óptico invertido. As células 4T1 tratadas com o peptídeo BR2, com o 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 exibiram alterações morfológicas acentuadas, sendo possível observar células com aumento do volume citoplasmático e fragmentação celular (Figura 7 A-B).

Os resultados de avaliação da viabilidade celular nas células tumorais 4T1 demonstraram que o 2-AEH₂F induziu citotoxicidade nas concentrações de 0,7 - 200 mM, com valor de IC_{50%} de 17,4 e 2,6 mM nos períodos de 24 e 48h respectivamente (Tabela 4). O peptídeo BR2 promoveu citotoxicidade em todas as concentrações testadas, resultando no IC_{50%} para o BR2 nos períodos de 24 e 48h nos valores de 28 e 18 µM (Tabela 4). A associação 2-AEH₂F+BR2 também foi citotóxica em todas as concentrações avaliadas, com IC_{50%} de 17,5 e 10 µM de BR2 e o 2-AEH₂F em concentração fixa de 9 mM no período de 24 e 48h (Tabela 4).

As células tumorais de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 tratadas com 2-AEH₂F (0,7-200 mM), com o peptídeo BR2 (10-100µM) e associação 2-AEH₂F+BR2 apresentaram alterações morfológicas similares as verificadas nas células tumorais 4T1, descritas anteriormente (Figura 7 A-B). O tratamento destas células com 2-AEH₂F (0,7-200 mM) resultou em citotoxicidade significativa, com valor de IC_{50%} de 12 e 6,5 mM nos períodos de 24 e 48h (Tabela 4). O peptídeo BR2 reduziu significativamente a viabilidade celular, apresentando valores de IC_{50%} de 14 e 9,5 µM nos períodos de 24 e 48h respectivamente (Tabela 4). A associação 2-AEH₂F+BR2 induziu citotoxicidade, havendo redução de 89±2.3% da viabilidade celular na menor concentração testada (Figura 7 A-B).

Foi observado que as células endoteliais HUVEC, expostas aos tratamentos, mostraram baixa toxicidade do 2-AEH₂F e ao peptídeo BR2, promovendo poucas alterações na sua morfologia (Anexo 1). As células endoteliais tratadas com a associação 2-AEH₂F+BR2, nas concentrações de 16mM do 2-AEH₂F e concentrações de 10 a 100µM do peptídeo BR2, ocorreu fragmentação celular e degradação nuclear, semelhante aos efeitos observados nas linhagens tumorais (anexo 1).

O monofosfoester 2-AEH₂F (0,7-200 mM) não induziu citotoxicidade significativa nas células endoteliais HUVEC, obtendo o IC_{50%} de 32 e 27 mM nos períodos de 24 e 48h (Figura 9 A-B). O peptídeo BR2 promoveu citotoxicidade significativa nas concentrações mais altas testadas, tendo como IC_{50%} no período de 24 e 48h de 39 e 42 µM respectivamente (Figura 9 C-D). Por outro lado, a associação 2-AEH₂F+BR2 (2-AEH₂F 16mM) (peptídeo BR2 10-100µM) apresentou citotoxicidade semelhante aos tratamentos anteriores com IC_{50%} de 33,6 e 33,3 µM (Tabela 4).

Levando em conta as Fotomicrografias das células endoteliais HUVEC, foram mais sensível aos efeitos da associação, o que pode ser um ponto positivo, levando em

conta a necessidade das moléculas atravessar a barreira vascular para conseguir chegar ao microambiente tumoral.

Em fibroblasto humano normal FN1 o 2-AEH₂F (0,7-200 mM) não induziu citotoxicidade significativa, obtendo o IC_{50%} de 56 e 41 mM nos períodos de 24 e 48h (Tabela 4). O peptídeo BR2 promoveu citotoxicidade significativa nas concentrações mais altas testadas, sendo menos significativa, quando comparada com as células tumorais, com IC_{50%} de 35 e 36μM no período de 24 e 48h (Tabela 4). A associação 2-AEH₂F+BR2 (2-AEH₂F 28mM) (peptídeo BR2 10-100μM) apresentou citotoxicidade mais acentuada nos períodos de 24 e 48h com IC_{50%} de 29,5 e 27μM respectivamente (Tabela 4).

A associação 2-AEH₂F+BR2 apresentou maior efeito citotóxico, mas não induziu citotoxicidade significativa nas concentrações inibitórias de 50% utilizadas nas linhagens tumorais, sendo assim não comprometem significativamente a viabilidade das células endoteliais normais HUVEC e em fibroblasto FN1.

Tabela 4. Valores de IC_{50%} para células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA MB-231 e 4T1 e normais HUVEC e FN1.

	Treatment	IC _{50%} 24h	IC _{50%} 48h
MDA MB-231	BR2	14μM	9.5μM
	2-AEH ₂ F	12mM	6.5mM
	2-AEH ₂ F+BR2	6mM+5.4μM	6mM+3.3μM
4T1	BR2	28μM	18μM
	2-AEH ₂ F	17.4 mM	2.6 mM
	2-AEH ₂ F+BR2	8mM+17.5μM	8mM+10 μM
HUVEC	BR2	39μM	42μM
	2-AEH ₂ F	32mM	27mM
	2-AEH ₂ F+BR2	33.6μM	33.3μM
FN1	BR2	35μM	36μM
	2-AEH ₂ F	56 mM	41 mM
	2-AEH ₂ F+BR2	29.5μM	27μM

Figura 7. Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1 pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo BR2, do monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2, pelo período de 24 e 48h. (a) Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais do MDA MB-231 e 4T1 tratado no período de 24h; (b) O mapa de calor mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes.

4.4. Perfil de distribuição das células nas fases do ciclo celular

A análise da porcentagem de células tumorais 4T1 nas diferentes fases do ciclo celular demonstrou que o número de células na fase G0/G1 diminuiu significativamente após o tratamento com o 2-AEH₂F, aumentando assim a quantidade de células na fase S com valores percentuais de $37,7 \pm 3,2\%$ e $37,3 \pm 2,7\%$ respectivamente (Figura 8 A). O tratamento com o peptídeo BR2 apresentou resultado semelhante ao anterior, com valores de $21,2 \pm 2,1\%$, para fase G0/G1 e $65,4 \pm 1,9\%$ para fase S (Figura 8 A). A associação 2-AEH₂F+BR2 promoveu aumento significativamente da população de células na fase S, havendo redução na fase G2/M em todas as concentrações testadas. Os valores percentuais obtidos na fase S foram de $38,9 \pm 1,6\%$ e em G2/M foi de $27,9 \pm 2,5\%$ (Figura 8 A). Observa-se aumento extremamente significativo de DNA fragmentado, com $27,3 \pm 3,4\%$ para o tratamento com o 2-AEH₂F, $39,2 \pm 1,1\%$ quando tratada com o peptídeo BR2, houve um pequeno aumento para a associação 2-AEH₂F+BR2 ($11,7 \pm 4,1\%$).

A porcentagem de células tumorais MDA MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular. O tratamento com o 2-AEH₂F promoveu aumento significativo na fase G0/G1 com redução da população de células na fase S com valor de $68,3 \pm 2,4\%$ para fase G0/G1 de $21,9 \pm 1,8\%$ para a fase S (Figura 8 B). O tratamento com o peptídeo BR2 não apresentou diferença significativa na distribuição de células nas fases do ciclo celular quando comparado com o controle não tratado (Figura 8 B). A associação 2-AEH₂F+BR2 apresentou resultado similar ao tratamento com o 2-AEH₂F, havendo aumento significativo na fase G0/G1 e redução de células na fase S em ambos os tratamentos. Na fase G0/G1 os foram de $72,4 \pm 1,4\%$, na fase S o valor foi de $22,8 \pm 0,5\%$ (Figura 8 B). Houve aumento de DNA fragmentado para tratamento com o 2-AEH₂F de $20,9 \pm 2,6\%$, com o peptídeo BR2 esse aumento foi de $29,7 \pm 3,1\%$ e a associação apresentou um percentual de $36,6 \pm 3,9\%$.

A porcentagem de células HUVEC nas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento com o 2-AEH₂F foi observado aumento da fase G0/G1 sem alterações nas demais fases (Anexo 2 A). O tratamento com peptídeo BR2 apresentou uma redução na fase S e aumento das células na fase G2/M, com valores percentuais de $19,1 \pm 1,1\%$ para fase S e $14,4 \pm 0,9\%$ na fase G2/M (Figura 2 A). O tratamento com a associação 2-AEH₂F+BR2 promoveu aumento das células na fase G0/G1 e redução na fase S com valores de $68,7 \pm 0,5\%$ na fase G0/G1 e $16,9 \pm 0,9\%$ na fase S (Anexo 2 A).

O DNA fragmentado para a célula HUVEC quando tratada nas concentrações de $IC_{50\%}$ das células MDA MB-231, apresentou aumento somente no tratamento com o monofosfoester 2-AEH₂F, com valores percentuais de $4,9 \pm 1,0\%$. Quando tratadas com o valor de $IC_{50\%}$ das células tumorais 4T1 foi observado um aumento para os tratamentos com o monofosfoester 2-AEH₂F ($5,2 \pm 0,8\%$) e com o peptídeo BR2 ($5,4 \pm 1,0\%$), sem diferenças significativas para a associação 2-AEH₂F+BR2 (Anexo 2 A).

As células de fibroblasto humano normais FN1, quando tratadas com o 2-AEH₂F apresentaram alterações consideráveis na distribuição das fases do ciclo celular, com redução do número de células na fase G0/G1 e aumento da fase S, com valores percentuais de $35,8 \pm 2,1\%$ e $38,5 \pm 1,8\%$ respectivamente (Anexo 2 B). O tratamento com o peptídeo BR2 não causou nenhuma alteração significativa nas concentrações testadas. A associação 2-AEH₂F+BR2 promoveu aumento da fase G0/G1, com valor de $36,8 \pm 2,1\%$, (Anexo 2 B).

O DNA fragmentado da célula FN1 quando tratadas nas concentrações de $IC_{50\%}$ da MDA MB-231, não apresentou aumento significativo. Para os tratamentos nas concentrações das células tumorais 4T1, há um aumento significativo para todos os tratamentos, com o 2-AEH₂F o valor foi de $16,3 \pm 1,6\%$, com o peptídeo BR2 o valor foi de $14,85 \pm 0,4\%$ e a associação 2-AEH₂F+BR2 o valor foi de $19,4 \pm 2,3\%$ (Anexo 2).

Figura 8. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} do peptídeo BR2, do monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2, pelo período de 24. **(a)** Perfil de distribuição das células tumorais 4T1 nas fases do ciclo celular; **(b)** Perfil de distribuição das células tumorais MDA MB-231 nas fases do ciclo celular. Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

4.5. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular nas células de câncer de mama triplo negativo humano MDA MB-231

Após o período de tratamento, foi possível observar que a expressão da proteína p53 aumentou significativamente com os tratamentos com o peptídeo BR2 ($66,2 \pm 3,2\%$) e a associação 2-AEH₂F+BR2 ($64,5 \pm 2,4\%$) em relação ao controle não tratado (Figura 9 A). Em contrapartida, a expressão da proteína ciclina D1 diminuiu em todos os tratamentos, 2-AEH₂F ($45,7 \pm 0,3\%$), peptídeo BR2 ($41,1 \pm 0,2\%$) e associação 2-AEH₂F+BR2 ($41,9 \pm 0,7\%$) (Figura 9). A expressão da proteína p21 aumentou significativa após o tratamento das células MDA MB-231 com o peptídeo BR2 ($67,1 \pm 2,3\%$) e associação 2-AEH₂F+BR2 ($68,2 \pm 3,5\%$) (Figura 9).

Foi verificado o aumento significativo da expressão da proteína Bax com o peptídeo BR2 ($67,1 \pm 2,7\%$) e associação 2-AEH₂F+BR2 ($66,4 \pm 1,9\%$), não foi observado alterações significativas para o tratamento com o 2-AEH₂F (Figura 9). Em contraste, a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 diminuiu significativamente após o tratamento com o 2-AEH₂F ($50,4 \pm 0,8\%$), peptídeo BR2 ($40,8 \pm 0,8\%$) e associação 2-AEH₂F+BR2 ($40,6 \pm 0,5\%$) (Figura 9).

Todos os tratamentos demonstraram especificidade em modular a via apoptótica nesta linhagem tumoral, mediando o aumento na expressão das caspases 3 e 8 ativas e a liberação do citocromo c. O tratamento que proporcionou um aumento significativo foi a associação 2-AEH₂F+BR2 com valores percentuais de $72,2 \pm 1,4\%$ (Caspase 3), $64,7 \pm 3,2\%$ (Caspase 8) e $65,8 \pm 3,9\%$ (Citocromo C) (Figura 10).

Os marcadores CD44, CD34 e CD24 também foram quantificados, e foi observado diminuição na expressão do CD44 após o tratamento com o 2-AEH₂F ($46,5 \pm 0,7\%$), peptídeo BR2 ($41 \pm 2,1\%$) e associação 2-AEH₂F+BR2 ($45,2 \pm 2,4\%$) (Figura 10). Similarmente, a expressão do CD24 diminuiu significativamente com todos os tratamentos, onde a associação 2-AEH₂F+BR2 reduziu expressivamente com valores percentuais de $40,2 \pm 2,1\%$. Os tratamentos não promoveram modulação significativa para expressão do marcador CD34 (Figura 10).

A expressão do PCNA reduziu significativamente para os tratamentos com o peptídeo BR2 e associação 2-AEH₂F+BR2, com valores percentuais de $30,2 \pm 1,0\%$ e $38,1 \pm 1,2\%$ respectivamente (Figura 11). Houve redução na expressão do fator de crescimento endotelial VEGF e fator de crescimento epidérmico EGF

significativamente para o tratamento com o peptídeo BR2 com valores de $42,2 \pm 1,9\%$ e $41,5 \pm 0,8\%$ respectivamente (Figura 11).

Tabela 5. Análise da expressão dos marcadores nas células tumorais MDA MB-231 após os tratamentos.

Marcadores	Tratamentos		
	Peptídeo BR2	2-AEH ₂ F	2-AEH ₂ F+BR2
p53	↑	n/s	↑
p21	↑	n/s	↑
Ciclina D1	↓	↓	↓
Bax	↑	n/s	↑
Bcl-2	↓	↓	↓
Caspase 3	↑	↑	↑
Caspase 8	↑	↑	↑
Citocromo C	↑	↑	↑
CD44	↓	↓	↓
CD34	↓	n/s	n/s
CD24	↓	↓	↓
PCNA	↓	↓	↓
VEGF	↓	↓	↓
EGF	↓	↓	↓

↑ = aumento de expressão; ↓ = redução de expressão; n/s = Não significativo

Figura 9. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC₅₀%. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de p53, p21, Cyclina D1, Bax e Bcl-2 dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média ± DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

Figura 10. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC₅₀%. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de Caspase 3, Caspase 8, liberação de citocromo c, expressão de CD44, CD34 e CD24 dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 11. Análise da expressão de marcadores em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231. A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento nos valores de IC₅₀%. (a) Gráficos de densidade representativos mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência; (b) Expressão de PCNA, VEGF e EGF dependendo dos tratamentos. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.6. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo

As células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais HUVEC e FN1 foram tratadas por um período de 24h com o 2-AEH₂F, o peptídeo BR2 e associação 2-AEH₂F+BR2 e as análises realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123.

Houve redução no potencial elétrico mitocondrial das células tumorais 4T1. Os tratamentos com o peptídeo BR2 a redução foi de $9\pm 1,21\%$, o 2-AEH₂F promoveu redução de $11,5\pm 2,8\%$, e a associação promoveu redução de $14,7\pm 1,25\%$ (Figura 12 A). A redução do potencial elétrico das células tumorais MDA MB-231 foi significativo quando comparado com as células tumorais 4T1, com aumento das células com mitocôndrias inativas. As células tumorais tratadas com o peptídeo BR2 a redução do potencial elétrico foi de $28,3\pm 3,8\%$, tratadas com o 2-AEH₂F os valores percentuais foram de $18,9\pm 1,9\%$ e a associação 2-AEH₂F+BR2 atingiu valores de $57,8\pm 2,9\%$ (Figura 12 B).

As células normais HUVEC apresentaram baixa redução do potencial elétrico mitocondrial quando tratadas com os valores de IC_{50%} da célula MDA MB-231. Os valores percentuais para mitocôndrias inativas foram de $2,7\pm 1,8\%$, quando tratada com peptídeo BR2, $9,3\pm 1,4\%$ para o 2-AEH₂F e $10,4\pm 1,6\%$ para associação 2-AEH₂F+BR2 (Anexo 3 A). Quando tratadas nas concentrações de IC_{50%} correspondente a células 4T1 os valores percentuais foram de $37,2\pm 3,4\%$ para o peptídeo BR2, $9,3\pm 0,9\%$ para o 2-AEH₂F e $41,4\pm 2,5\%$ para a associação 2-AEH₂F+BR2 (Anexo 3 A).

Em células normais FN1 tratadas concentrações de IC_{50%} equivalente a células tumorais MDA MB-231, o tratamento com peptídeo BR2 não promoveu redução significativa do potencial elétrico mitocondrial ($2,5\pm 0,7\%$) em relação ao controle ($1,3\pm 0,2\%$), o tratamento com o 2-AEH₂F obteve valor de $10,5\pm 1,5\%$ e a associação $10,7\pm 1,2$ (Anexo 3 B). Quando tratadas nos valores de IC_{50%} correspondente as células tumorais 4T1, os valores foram de $36,6\pm 1,3\%$ para o tratamento com o peptídeo BR2, $15,8\pm 2,5\%$ para o 2-AEH₂F e $42,4\pm 1,2\%$ para a associação 2-AEH₂F+BR2 (Anexo 3 B). Houve redução significativa quando tratadas com os valores de IC_{50%} das células tumorais

Figura 12. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1 por citometria de fluxo. As células foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC₅₀% por um período de 24h. **(a)** $\Delta\Psi_m$ das células tumorais 4T1; **(b)** $\Delta\Psi_m$ das células tumorais MDA MB-231; Gráfico de barras e linha mostrando o $\Delta\Psi_m$ expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.7. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

Nas células tumorais 4T1, o grupo controle não tratado é possível observar marcação intensa das mitocôndrias com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto bem distribuídos, mantendo a conformação original das células (fluorescência verde). As células tumorais tratadas com o peptídeo BR2 e associação 2-AEH₂F+BR2 é possível observar contração citoplasmática decorrente da despolarização e reorganização dos filamentos do citoesqueleto para região pericelular (Figura 13).

Os tratamentos para célula 4T1 promoveram redução no potencial elétrico mitocondrial quando analisando a fluorescência e área ocupada no campo observado. O peptídeo BR2 promoveu redução do $\Delta\Psi_m$ em $35\pm3,7\%$, o 2-AEH₂P em $50,7\pm4,1\%$ e a associação 2-AEH₂F+BR2 o valor foi de $89,6\pm3,5\%$ (Figura 15 A). Foi possível observar que as mitocôndrias ativas foram movidas para a região perinuclear. Na associação observa-se extravasamento do citoplasma para o meio extracelular. O monofosfoester 2-AEH₂F promoveu redução da densidade e é possível observar que algumas células apresentam reorganização mitocondrial com deslocamento perinuclear. Em todos os grupos tratados foi possível observar que ocorreram alterações morfológicas correspondentes ao processo apoptótico, como os *blebs* de membrana. (Figura 13).

As células tumorais MDA MB-231, o grupo controle foi observado intensa marcação intensa das mitocôndrias com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto organizados e bem distribuídos, mantendo a conformação original das células (fluorescência verde). Nas células tumorais tratadas com o peptídeo BR2 e com o 2-AEH₂F é possível observar alterações morfológicas decorrente da despolarização e reorganização dos filamentos do citoesqueleto para região pericelular, redução potencial elétrico e migração para região perinuclear, pode-se observar a formação das *blebs* de membrana (Figura 14).

Houve redução do potencial elétrico mitocondrial quando analisando a fluorescência e área ocupada no campo observado. O tratamento com o peptídeo BR2 promoveu redução de $71,2\pm2,1\%$, o 2-AEH₂F a redução foi de $82,6\pm1,1\%$ e associação o valor obtido foi de $87,6\pm1,8\%$ (Figura 15 B). O tratamento com a associação 2-AEH₂F+BR2 causou danos significantes as células, como, degradação de boa parte do

citoesqueleto e fragmentação nuclear já que a marcação com o MitoRed encontra-se disperso por todo citoplasma. Também pode ser observada a presença de vacúolos (Figura 14).

Nas células endoteliais HUVEC, o grupo controle foi observado com a marcação intensa das mitocôndrias com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto bem distribuídos, mantendo a conformação original das células (fluorescência verde). Nas células HUVEC tratadas, não foi visto alterações morfológicas significativas, somente uma redução da confluência dessas células. Quando tratadas com o 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 houve despolarização dos filamentos do citoesqueleto e redução do potencial elétrico mitocondrial. Pode-se observar no tratamento com associação 2-AEH₂F+BR2 que houve extravasamento do conteúdo intracelular. (Anexo 4).

As células de fibroblasto humano normal FN1, o grupo controle foi observado com a marcação intensa das mitocôndrias com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto bem distribuídos, mantendo a conformação original das células (fluorescência verde). Características observadas nas células FN1 após tratamento foi bem similar aos observados nas células normais HUVEC, não havendo alterações significativas. É possível observar redução da confluência e extravasamento de citoplasmas quando tratadas com a associação 2-AEH₂F+BR2 (Anexo 4).

Figura 13. Fotomicrografias das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo murina 4T1 com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e citoesqueleto marcado em verde (faloidina), analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC_{50%} por um período de 24h.

Figura 14. Fotomicrografias das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e citoesqueleto marcado em verde (faloidina), analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC₅₀% por um período de 24h.

Figura 15. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 e murina 4T1. (a) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais 4T1 e área total, analisadas pelo ImageJ; (b) $\Delta\Psi_m$ das células tumorais MDA MB-231 e área total, analisadas pelo ImageJ. Gráfico de linhas mostrando o $\Delta\Psi_m$ e área total expresso como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.8. Análise do SynergiFinder 2.0

O efeito sinérgico significativo foi observado para as células tumorais MDA MB-231 quando tratadas com a associação 2-AEH₂P+BR2, apresentando um efeito sinérgico com uma pontuação de sinergia de 10,17 (Figura 16). Para as células tumorais 4T1, a pontuação de sinergia obtida foi de 5,97, mostrando o efeito aditivo das moléculas (Figura 17).

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
4T1	BR2 (uM) - 2-AEH ₂ F (mM)	5.97	Aditivo	Bliss

Figura 16. Determinação do efeito aditivo e sinérgico da associação peptídeo BR2 com o monofosfester 2-AEH₂F em células tumorais de câncer da mama triplo-negativo murina 4T1. (a) Os gráficos de barras mostram atividade aditiva ou sinérgica para concentrações dos tratamentos nas células tumorais. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (≤ 0), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho (> 0 e < 10 aditivo; > 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; (b) Tabela mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essa combinação.

(b)

Células	Combinação	Escore de Sinergia	Efeito	Método
MDA MB-231	BR2 (uM) - 2-AEH ₂ F (mM)	10.17	Sinérgico	Bliss

Figura 17. Determinação do efeito aditivo e sinérgico da associação peptídeo BR2 com o monofosfester 2-AEH₂F em células tumorais de câncer da mama triplo-negativo humana MDA MB-231. (a) Os gráficos de barras mostram atividade aditiva ou sinérgica para concentrações dos tratamentos nas células tumorais. O efeito antagônico é observado no espaço colorido entre o branco e o verde (≤ 0), o efeito aditivo e o sinergismo são observados no espaço colorido entre o branco e o vermelho (> 0 e < 10 aditivo; > 10 sinérgico). A saturação da cor é proporcional à magnitude da diferença entre esses valores; (b) Tabela mostrando a combinação de drogas e a pontuação de sinergia para essa combinação.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos a capacidade do peptídeo penetrante de tumor BR2 em potencializar os efeitos da terapia *in vitro* quando associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas (MDA MB-231) e murina (4T1). Após a associação (2-AEH₂F+BR2), com metade dos valores de IC_{50%} obtidos para ambos os tratamentos, foram observados resultados mais significativos e com melhor resposta em menor concentração. Houve modulação na expressão de proteínas envolvidas na morte e progressão celular, bem como despolarização e degradação de importantes estruturas intracelulares como o citoesqueleto e distribuição das mitocôndrias, evidenciando a capacidade dos tratamentos em possivelmente modular as vias de senescência e regular seletivamente a morte celular para esse tipo de neoplasia.

A atividade de drogas antitumorais é frequentemente limitada devido à falta de especificidade e biodisponibilidade satisfatórias no tumor. Conjugar fármacos antitumorais a sistemas de entrega específico, podem aumentar a seletividade a tumores, podendo alcançar o microambiente tumoral e potencializar sua atividade. Ainda é um longo desafio, o desenvolvimento de nanocompostos que possuam seletividade e penetração de células tumorais.

A nanomedicina tem buscado estratégias variadas para novas terapêuticas, como anticorpos, peptídeos e lipossomas com alta afinidade por receptores de membrana de células tumorais ^{63,64}. As terapias a base de proteínas/peptídeos possuem vantagens únicas, como alta potência farmacológica, especificidade molecular, multifuncionalidade e baixa toxicidade, e, portanto, possuem grande potencial para uso na terapia do câncer. Os peptídeos catiônicos de penetração celular apresentam propriedades antiproliferativas com alvos dos mais variados possíveis, indo desde o núcleo, a mitocôndrias, modificando diversas estruturas intracelulares e desencadeando, assim morte celular regulada com alta especificidade para células tumorais ⁶⁵⁻⁶⁹.

O peptídeo BR2 é um análogo não específico de penetração tumoral do peptídeo buforin IIb, derivado de histona H2A, atravessa a membrana celular de células tumorais sem danificá-las por meio de interação com gangliosídeos ^{54,70}. Estudos demonstraram que o peptídeo BR2 apresenta potencial antitumoral, induzindo citotoxicidade em várias linhagens tumorais *in vitro*, como HepG2 (Hepatocarcinoma); HeLa (câncer cervical humano); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); HCT116 (câncer de cólon humano); B16-F10 (melanoma murino) ^{54,71-73}.

Uma das principais hipóteses para a citotoxicidade seletiva de peptídeos catiônicos em células tumorais se deve ao fato de que as membranas plasmáticas das células tumorais apresentam maior eletronegatividade em comparação com as membranas celulares normais, devido a uma expressão aumentada de elementos aniônicos, como o sulfato de heparano, fosfatidilserina e ácido siálico, tornando as células tumorais mais suscetíveis à captação de peptídeos catiônicos. Outra característica das membranas plasmáticas das células tumorais é o aumento da presença de microvilosidades, aumentando a superfície de contato com esse tipo de peptídeo ^{74,75}.

O monofosfoester 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) é uma molécula envolvida no *turnover* dos fosfolipídios, atuando como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana. Este composto apresenta amplo potencial antitumoral, induzindo citotoxicidade em diversas linhagens de células tumorais, como por exemplo: EAT (tumor ascítico de Ehrlich); células B16F10 (melanoma murino); células MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); células MDA MB-231 (câncer de mama triplo negativo humano); células H292 (carcinoma de pulmão humano); células Skmel-28, Mewo (melanoma humano); células Hepalclc7 (hepatocarcinoma); K562 e K562-Lucena (Leucemia mieloide crônica - MDR⁺) ^{42-47,76-78}.

Apesar dos monofosfoesteres consistirem em uma nova classe de agentes antitumorais, efeitos secundários, tais como toxicidade gastrointestinal, hemólise e disfunções hepáticas e renais são descritos para algumas moléculas dessa família como, por exemplo, a edelfosina, ilmofofosina e miltefosina ⁷⁸. Efeitos adversos como hemólise são vistos em alguns tratamentos com peptídeos catiônicos polares ⁵⁶. Estudos de atividade hemolítica realizados nesse trabalho mostram que nas concentrações de IC_{50%} para as células tumorais há uma baixa porcentagem de hemólise.

Os ensaios de citotoxicidade demonstram que o monofosfoester 2-AEH₂F, nas concentrações testadas, foi citotóxico para todas as linhagens tumorais estudadas, corroborando dados descritos na literatura. Estes resultados indicam que o 2-AEH₂F promoveu seus efeitos antitumorais por meio de um mecanismo que, provavelmente, é comum em todas as linhagens, sem promover efeitos citotóxicos significativos nas células endoteliais HUVEC e fibroblasto FN1. Os nossos dados comportam a hipótese de que a sensibilidade e os valores inibitórios de 50% obtidos para as células tumorais independem do perfil molecular destas, tais como, resistência e agressividade ^{42-47,76-78}.

Para o tratamento com o peptídeo BR2, as concentrações testadas apresentaram citotoxicidade para as células tumorais, com efeito menor nas células normais, corroborando com dados já descritos na literatura ^{54,71-73}. A associação farmacêutica dessas duas moléculas em concentrações mais baixas tiveram também resultados positivos, apresentando citotoxicidade para as células tumorais. Os dados corroboram um possível efeito aditivo e sinérgico da combinação, potencializando assim os seus efeitos. Inúmeros trabalhos mostram que peptídeos de penetração tumoral potencializam a ação de outras moléculas, na imunoterapia facilitando a permeabilização dessas células ao microambiente tumoral e como direcionador de fármacos em terapias alvo-específico ⁷⁹⁻⁸⁴.

A progressão e a parada do ciclo celular são controladas por um complexo mecanismo de modulação nas células normais. Após danos no DNA, o ciclo celular é interrompido na transição da fase G1 para S (ponto de verificação G1) ou da fase G2 para M (ponto de verificação G2). Estudos demonstraram que alguns fatores nucleares estão envolvidos nesse controle. As quinases dependentes de ciclina (CDKs) são as enzimas que regulam a progressão do ciclo celular. As proteínas da família CDK ativadas fosforilam o retinoblastoma (Rb) para liberar fatores de transcrição como E2F, resultando na progressão do ciclo celular ^{85,86}.

Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo evidenciaram que um monofosfoester de ação semelhante ao 2-AEH₂F, inibiu a proliferação e migração, levando ao acúmulo das células melanoma B16-F10 e tumorais de mama MCF-7 na fase G2/M do ciclo celular, resultado semelhante encontrado para a célula tumoral 4T1, havendo aumento das células nas fases S e G2/M ^{76,87,88}. Não foi observado o mesmo resultado para a célula tumoral de mama humano MDA MB-231, havendo aumento na fase G0/G1, evidenciado que há outra possível rota de ação. O 2-AEH₂F atende a uma das pretensões do desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos, que é atuar no checkpoint do ciclo celular, promovendo o controle proliferativo. A maioria dos quimioterápicos convencionais, que causam danos ao DNA, não matam diretamente a célula tumoral; agem, inicialmente, ativando os checkpoints e bloqueando a progressão do ciclo celular. Como resultado, as células desencadeiam mecanismos que promovem o reparo do DNA ou, na presença de danos cromossômicos, o bloqueio da síntese de DNA ou da divisão celular, resultando na ativação da cascata apoptótica ^{89,90}.

O efeito citotóxico do peptídeo BR2 foi maior que o do monofosfoester 2-AEH₂F, levando em consideração os valores de IC_{50%} obtidos e as concentrações necessárias para causar redução de proliferação e morte celular. Resultados observados para o peptídeo BR2 são similares a encontrados na literatura para peptídeos catiônicos, inibindo proliferação e migração. Houve o acúmulo das células tumorais 4T1 na fase S do ciclo e na fase G0/G1 para célula tumoral MDA MB-231, havendo também aumento considerável do DNA fragmentado em relação aos demais tratamentos, desencadeando morte celular ^{91,92}. Entretanto, a citotoxicidade da associação 2-AEH₂F+BR2 em concentrações menores que as testadas em isolado para as moléculas, apresentou citotoxicidade mais acentuada, inibindo a proliferação e migração celular, com aumento das células tumorais 4T1 nas fases G0/G1 e S, e na fase G0/G1 para célula tumoral MDA MB-231, evidenciando o potencial farmacológico sinérgico das moléculas. Nesse contexto, alguns estudos demonstram que moléculas, quando associadas a peptídeos catiônicos de penetração células apresentam efeito antitumoral e antiproliferativo potencializado ⁹³⁻⁹⁷. Fármacos que promovem aumento da população de células das fases G0/G1 e S apresentam citotoxicidade dirigida ao DNA ⁸⁶.

Ambas as moléculas podem ter pontos de ação específicos nas cascatas reguladoras do ciclo celular. Compreender melhor as alterações induzidas na dinâmica molecular da regulação do ciclo celular pode ser útil para as aplicações clínicas dessas moléculas.

O possível mecanismo pelo qual os compostos induziram parada na fase G0/G1 e apoptose nas células tumorais MDA MB-231 envolve a ativação da via intrínseca de morte, pela modulação da atividade da proteína p53, a qual, provavelmente, foi responsável pelo aumento das proteínas Bax e p21, e diminuição da expressão da ciclina D1. A modulação da expressão destas proteínas foi observada após o tratamento com o peptídeo BR2 e associação 2-AEH₂F+BR2. Este mecanismo também envolveu redução da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Neste estudo, o tratamento com o 2-AEH₂F não promoveu aumento significativo da p53, efeito similar também não foi observado, para a expressão das proteínas que tem ativação transcricional regulada pela p53, como Bax e p21, havendo alteração significativa da expressão.

Especialmente, dois complexos enzimáticos se correlacionam com a progressão para G1: complexo ciclina D (D1, D2 e D3)-CDK4/6 e complexo ciclina E-CDK2. O complexo ciclina D-CDK4 / 6 regula uma fase G1 inicial, enquanto o complexo ciclina

E-CDK2 regula uma fase G1 tardia ^{85,98}. Os inibidores de CDK (CKIs) se ligam aos complexos ciclina-CDK e inativa a atividade de quinase das CDKs, fosforilando os aminoácidos do terminal N do domínio catalítico da CDK. Os CKIs podem ser agrupados em duas categorias com base em sua homologia e afinidade de sequência para complexos ciclina-CDK: a família CIP / KIP (p21, p27 e p57) e a família INK4 (p16, p15, p18 e p19) ^{85,99,100}.

O mecanismo de *checkpoint* mediado pela p53 pode ocasionar o reparo dos danos no DNA ou levar a ativação dos mecanismos de morte celular regulada, mediados pelo aumento das proteínas pró-apoptóticas, como Bax, PUMA e Noxa, e redução das proteínas antiapoptóticas, entre elas a Bcl-2 ¹⁰¹.

Considerando, a importância da redução da ciclina D1 no tratamento antitumoral, os tratamentos com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 mostraram-se eficazes, pois promoveram a diminuição da expressão da ciclina nas células tumorais MDA MB-231. Em concordância, estudos demonstraram a capacidade de monofosfoesteres em mediar a redução do RNAm da ciclina D1 em células tumorais de mama MCF-7 e de reduzir a expressão da CDK4/6 no modelo de células de carcinoma de pulmão de não pequenas células H460/Bcl-2 ^{42,102}. Neste aspecto, sabe-se ainda que a ciclina D1 é um importante regulador da progressão da fase G1 para S em diversas linhagens celulares ¹⁰³⁻¹⁰⁶. Alguns agentes terapêuticos têm mostrado induzir a degradação de ciclina D1 *in vitro*, oferecendo uma via útil para intervenção terapêutica ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Por estes motivos, há uma grande relevância na diminuição da ciclina D1 induzido pelo tratamento com essas moléculas.

A indução de morte celular pela via intrínseca nas células tumorais MDA MB-231, exercida pelos tratamentos, foi confirmada pela avaliação do potencial elétrico mitocondrial. As células MDA MB-231 reduziram de forma expressiva, o potencial elétrico mitocondrial para todos os tratamentos. Corroborando dados já descritos na literatura verificaram que a célula de adenocarcinoma de mama humana MCF-7 tratadas com monofosfoesteres e peptídeos catiônicos de penetração celular promoveram redução do potencial elétrico mitocondrial ^{66,102}.

O aumento das caspases 8 e 3 ativas, e a liberação do citocromo c na linhagem tumoral MDA MB-231 demonstrou a eficácia dos tratamentos em maximizar o potencial apoptótico. Na maioria dos eventos apoptóticos são requeridas a participação das caspases, as quais são divididas em iniciadoras (8, 9 e 12) e executoras (3, 6 e 7),

sendo estas últimas as responsáveis pelas alterações morfológicas no núcleo e no citoesqueleto^{107,108}.

Outro efeito verificado após os tratamentos foi à redução significativa da expressão dos marcadores CD44, CD34 e CD24 nas células tumorais MDA MB-231. Estudo realizado em camundongos mostrou que as células CD44+/CD90+ apresentaram um fenótipo mais agressivo que às células CD44-/CD90+, formando lesões metastáticas no pulmão de camundongos imunodeficientes. O bloqueio da expressão do CD44 evitou a formação local e metastática de nódulos tumorais¹⁰⁹. No nosso estudo, a quantificação destes biomarcadores nas células tumorais MDA MB-231 confirmou o perfil tumorigênico, agressivo e metastático desta linhagem celular, havendo a redução após os tratamentos.

A redução do PCNA (antígeno nuclear de célula em proliferação) foi observada para todos os tratamentos, sendo menor para o tratamento com o 2-AEH₂F. O PCNA é uma proteína essencial, mais conhecida por seus papéis na replicação e reparo de DNA, surgindo na última década como um alvo interessante para terapêutica do câncer^{110,111}. Recentemente, tornou-se evidente que o PCNA também funciona como um andaime fora do núcleo e é importante para a regulação de mecanismos celulares vitais, como apoptose, invasão imunológica em células tumorais, glicólise, e sinalização celular envolvendo as vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK¹¹²⁻¹¹⁷. Essas funções descobertas do PCNA são independentes do ciclo celular¹¹⁷. Foi observado que três linhagens de câncer de próstata (LNCaP, Du145 e PC3) apresentaram redução da expressão de PCNA quando tratados com o peptídeo APIM¹¹⁸.

Um fator importante é a angiogênese, que desempenha um papel na progressão e metástase tumoral, sendo determinante na terapêutica. A via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha um papel crítico na angiogênese. VEGF sinaliza principalmente através do receptor tirosina-quinases receptor VEGFR1 (VEGF-R1, flt-1) e 2 (VEGF-R2, flk2 / kdr). Os sinais VEGF para induz angiogênese através de seu receptor VEGFR1/flt-1 (R1) ainda é controverso, mas acredita-se que a maioria de seus efeitos angiogênicos e proliferativos se dão através do VEGFR2/flk-1/kdr (R2). Alguns estudos associam um pior prognóstico a um aumento da expressão de VEGFR2¹¹⁹⁻¹²¹. Alguns estudos mostraram que a utilização de peptídeos inibiu significativamente o crescimento e as metástases de tumor em modelo 4T1, por bloqueio simultâneo de VEGFR1 e R2 como observado no presente trabalho^{122,123}.

Resultados similares são observados para uso de monofosfoesteres em células de hepatocarcinoma Hepa1c1c7, contendo proliferação e migração celular, com redução de massa tumoral ⁷⁷.

Estudos adicionais deverão ser conduzidos, a fim de elucidar o mecanismo de ação diretamente envolvido no efeito apoptótico do peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a sua associação. Contudo, os dados apresentados demonstram, de forma efetiva, o envolvimento da via intrínseca da apoptose. O conjunto de todos os resultados evidencia que a associação apresenta maior potencial antitumoral, que as moléculas isoladamente.

6. CONCLUSÃO

- O peptídeo BR2 nas concentrações inibitórias de 50% das células tumorais, não apresentando efeito hemolítico acentuado;
- O peptídeo BR2 e a associação 2-AEH₂F+BR2 promoveu citotoxicidade nas linhagens tumorais estudadas, em comparação ao monofosfoester 2-AEH₂F; Além disto, o peptídeo BR2 promoveu parada na fase S para células tumorais MDA MB-231 e G0/G1 para a célula tumoral 4T1, já a associação 2-AEH₂F+BR2 ocasionou parada nas fases G0/G1, nas células tumorais 4T1 e MDA MB-231;
- As células tumorais MDA MB-231 foram sensíveis a todos os tratamentos com valores de IC_{50%} significantes;
- Todos os tratamentos levaram a mudanças na morfologia celular das células tumorais de mama 4T1 e MDA MB-231, principalmente nas mitocôndrias, que perdem sua integridade e se localizam na região perinuclear, aumentando a porcentagem de células com mitocôndrias inativas;
- O peptídeo BR2 e a associação 2-AEH₂F+BR2 foram efetivos em induzir morte nas células tumorais MDA MB-231, modulando as vias intrínseca da apoptose e promovendo: diminuição da expressão de marcadores CD44, CD34, CD24, ciclina D1 e Bcl-2, aumento de p53, p21, Bax e caspases 8 e 3 ativas e liberação do citocromo c em relação ao monofosfoester 2-AEH₂F;
- Valores obtidos com a taxa de proliferação mostram diminuição considerável da resposta proliferativa das células tumorais após os tratamentos, corroborando com a redução a expressão do marcador PCNA;
- Redução da expressão do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) foi observado após os tratamentos para células tumorais MDA MB-231;
- Os resultados *in vitro* demonstram que os tratamentos apresentaram citotoxicidade seletiva para células tumorais obtendo IC_{50%} de duas a três vezes menores que as células normais.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD. Cancer Statistics , 2020. *CA CANCER J CLIN*. 2020;0(0):1-24. doi:10.3322/caac.21590
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimate/2020 – Cancer Incidence in Brazil*. Rio de Janeiro; 2020. doi:10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0
4. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021
5. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. 2010;11(March):220-228. doi:10.1038/nrm2858
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
7. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. 2008;454(July). doi:10.1038/nature07205
8. Jackson SP, Bartek J. biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-1078. doi:10.1038/nature08467
9. Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational Heterogeneity in Human Cancers : Origin and Consequences. 2010. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102113
10. Warburg O. Otto warburg: “on the origin of cancer cells.” *Science* (80-). 1957;10(4):412-421. doi:10.1016/0030-4220(57)90167-6
11. Semenza GL. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 2001;107(1):1-3. doi:10.1016/S0092-8674(01)00518-9
12. Cao M, Chen W. Epidemiology of lung cancer in China. *Thorac Cancer*. 2019;10(1):3-7. doi:10.1111/1759-7714.12916
13. Iwamoto H, Abe M, Yang Y, et al. Cancer Lipid Metabolism Confers Antiangiogenic Drug Resistance. *Cell Metab*. 2018;28(1):104-117.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.005
14. Beloribi-Djefaffia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 2016;5(1):e189-e189. doi:10.1038/oncsis.2015.49
15. Nathan C, Ding A. Snapshot: Reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*. 2010;140(6):8-10. doi:10.1016/j.cell.2010.03.008
16. Delehaunty KD, Mcgrath SD, Fulton LA, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med*. 2011;361(11):1058-1066. doi:10.1056/NEJMoa0903840.Recurring
17. Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S. Erratum: Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-Dependent ERK and JNK activation. *PLoS One*. 2016;11(7):2-3. doi:10.1371/journal.pone.0159352
18. Vousden KH, Ryan KM. P53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):691-700. doi:10.1038/nrc2715
19. Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, et al. HIF2 α inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2009;106(34):14391-14396. doi:10.1073/pnas.0907357106
20. Almeida VL, Leitão A, Reina LDC., Montanari CA, Donnici CL. Cancer and non-specific cyclo-cell and non-specific cyclo-cell antineoplastic agents that interact with DNA: an introduction. *Quim Nov.* 2005;28(1):118-129. doi:10.17877/DE290R-7556
 21. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
 22. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016.*; 2016. doi:978-85-7318-283-5
 23. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
 24. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688
 25. Polyak K. Breast cancer: Origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3155-3163. doi:10.1172/JCI33295
 26. Laveli-Silva MG. Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana. *Diss apresentada à Fac Med da Univ São Paulo.* 2016;42(1):1-99.
 27. Melisko M. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *Women's Oncol Rev.* 2005;5(1):45-47. doi:10.3109/14733400500093379
 28. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5(1):57-58. doi:10.1186/bcr562
 29. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10(6):515-527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
 30. Riehn M, Klopocki E, Molkentin M, Reinhardt R, Burmeister T. A BACH2-BCL2L1 Fusion Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer.* 2011;396(January):389-396. doi:10.1002/gcc
 31. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *J Am Med Assoc.* 2006;295(21):2492-2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
 32. Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418-8423. doi:10.1073/pnas.0932692100
 33. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(19):1482-1485. doi:10.1093/jnci/djg050
 34. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013;45(10):1113-1120. doi:10.1038/ng.2764
 35. Wright MH, Robles AI, Herschkowitz JI, et al. Molecular analysis reveals heterogeneity

- of mouse mammary tumors conditionally mutant for Brca1. *Mol Cancer*. 2008;7:1-12. doi:10.1186/1476-4598-7-29
36. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):253-260. doi:10.1007/s10911-010-9173-1
 37. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, et al. MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*. 2010;70(8):3119-3127. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4250
 38. Vaske CJ, Benz SC, Sanborn JZ, et al. Inference of patient-specific pathway activities from multi-dimensional cancer genomics data using PARADIGM. *Bioinformatics*. 2010;26(12):237-245. doi:10.1093/bioinformatics/btq182
 39. Chandriani S, Frengen E, Cowling VH, et al. A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One*. 2009;4(8). doi:10.1371/journal.pone.0006693
 40. Ellison DW, Beal MF, Martin JB. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Res*. 1987;417(2):389-392. doi:10.1016/0006-8993(87)90471-9
 41. Eyster KM. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: Lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Am J Physiol - Adv Physiol Educ*. 2007;31(1):5-16. doi:10.1152/advan.00088.2006
 42. Ferreira AK. Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais. 2013;210. doi:doi:10.11606/T.5.2013.tde-20052013-145336
 43. Ferreira AK, Meneguelo R, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces apoptosis through caspase-3 pathway by decreasing expression of Bax/Bad protein and changes cell cycle in melanoma. *J Cancer Sci Ther*. 2011;3(3):53-59. doi:10.4172/1948-5956.1000058
 44. Laveli-Silva MG, Cabral LGDS, Alves MG, et al. 2-aminoethyl Dihydrogen Phosphate as a Modulator of Proliferative and Apoptotic Effects in Breast Cancer Cell Lines. *J Pharm Pharmacol*. 2021;9:83-97. doi:10.17265/2328-2150/2021.03.001
 45. Ferreira AK, Santana-Lemos BAA, Rego EM, Filho OMR, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *Br J Cancer*. 2013;109(11):2819-2828. doi:10.1038/bjc.2013.510
 46. Laveli-Silva MG, Luciana Bastianelli Knop, Durvanei Augusto Maria. Meclizine Chloridrate and Methyl- β -Cyclodextrin Associated with Monophosphoester Synthetic Phosphoethanolamine Modulating Proliferative Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J Pharm Pharmacol*. 2019;7(7):408-420. doi:10.17265/2328-2150/2019.07.006
 47. Conceição T de O, Laveli-Silva MG, Maria DA. Phosphomonoester Phosphoethanolamine Induces Apoptosis in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells. *J Pharm Pharmacol*. 2019;7(7):434-450. doi:10.17265/2328-2150/2019.07.009
 48. Kersemans V, Cornelissen B. Targeting the tumour: Cell penetrating peptides for molecular imaging and radiotherapy. *Pharmaceuticals*. 2010;3(3):600-620. doi:10.3390/ph3030600
 49. Qiao R, Wang K, Zhong J. *Tumor-Penetrating Peptides*. Elsevier Ltd; 2018.

- doi:10.1016/B978-0-08-100736-5.00014-4
50. Ruoslahti E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;110-111:3-12. doi:10.1016/j.addr.2016.03.008
 51. Alberici L, Roth L, Sugahara KN, et al. De Novo Design of a Tumor-Penetrating Peptide Luca. *Cancer Res.* 2013;23(1):1-7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1668.De
 52. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(8):583-592. doi:10.1038/nrc1893
 53. Jang JH, Kim YJ, Kim H, Kim SC, Cho JH. Buforin IIb induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in HeLa cells. *Peptides.* 2015;69:144-149. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.024
 54. Lim KJ, Sung BH, Shin JR, et al. A Cancer Specific Cell-Penetrating Peptide, BR2, for the Efficient Delivery of an scFv into Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066084
 55. Torchilin V, Levchenko T. TAT-Liposomes: A Novel Intracellular Drug Carrier. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;4(2):133-140. doi:10.2174/1389203033487298
 56. Torres MDT, Pedron CN, Araújo I, Silva PI, Silva FD, Oliveira VX. Decoralin Analogs with Increased Resistance to Degradation and Lower Hemolytic Activity. *ChemistrySelect.* 2017;2(1):18-23. doi:10.1002/slct.201601590
 57. Pedron CN, Torres MDT, Lima JA da S, Silva PI, Silva FD, Oliveira VX. Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity. *Eur J Med Chem.* 2017;126:456-463. doi:10.1016/j.ejmech.2016.11.040
 58. Vernon AE, Bakewell SJ, Chodosh LA. Deciphering the molecular basis of breast cancer metastasis with mouse models. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(3):199-213. doi:10.1007/s11154-007-9041-5
 59. Love LH. THE HEXOLYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES. *J Cell Comp Physiol.* 1950;2(36):133-148.
 60. Johnson L V., Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(2 II):990-994. doi:10.1073/pnas.77.2.990
 61. FIELDS GB, NOBLE RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990;35(3):161-214. doi:10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x
 62. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics.* 2008;24(18):2101-2102. doi:10.1093/bioinformatics/btn392
 63. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k
 64. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-951. doi:10.1038/nbt.3330
 65. Gan BK, Yong CY, Ho KL, Omar AR, Alitheen NB, Tan WS. Targeted Delivery of Cell Penetrating Peptide Virus-like Nanoparticles to Skin Cancer Cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13. doi:10.1038/s41598-018-26749-y

66. Czupiel PP, Delplace V, Shoichet MS. Cationic block amphiphiles show anti-mitochondrial activity in multi-drug resistant breast cancer cells. *J Control Release*. 2019;305(April):210-219. doi:10.1016/j.jconrel.2019.04.045
67. Yang W, Xia Y, Fang Y, et al. Selective Cell Penetrating Peptide-Functionalized Polymersomes Mediate Efficient and Targeted Delivery of Methotrexate Disodium to Human Lung Cancer In Vivo. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(7):1-8. doi:10.1002/adhm.201701135
68. Liu X, Wu F, Ji Y, Yin L. Recent Advances in Anti-cancer Protein/Peptide Delivery. *Bioconjug Chem*. 2019;30(2):305-324. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00750
69. Tripathi PP, Arami H, Banga I, Gupta J, Gandhi S. Cell penetrating peptides in preclinical and clinical cancer diagnosis and therapy. *Oncotarget*. 2018;9(98):37252-37267. doi:10.18632/oncotarget.26442
70. Lee HS, Park CB, Kim JM, et al. Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Lett*. 2008;271(1):47-55. doi:10.1016/j.canlet.2008.05.041
71. Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):1-15. doi:10.1186/s12929-017-0328-x
72. Shafiee F, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A. Production and evaluation of cytotoxic effects of DT386-BR2 fusion protein as a novel anti-cancer agent. *J Microbiol Methods*. 2016;130:100-105. doi:10.1016/j.mimet.2016.09.004
73. Zhang X, Lin C, Lu A, et al. Liposomes equipped with cell penetrating peptide BR2 enhances chemotherapeutic effects of cantharidin against hepatocellular carcinoma. *Drug Deliv*. 2017;24(1):986-998. doi:10.1080/10717544.2017.1340361
74. Huang W, Seo J, Willingham SB, et al. Learning from host-defense peptides: Cationic, amphipathic peptoids with potent anticancer activity. *PLoS One*. 2014;9(2):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0090397
75. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol*. 2013;4(October):1-23. doi:10.3389/fmicb.2013.00321
76. Ferreira AK, Meneguelo R, Marques FLN, et al. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. *Biomed Pharmacother*. 2012;66(7):541-548. doi:10.1016/j.biopha.2012.04.008
77. Luna AC, Viegas Saraiva GK, Ribeiro Filho OM, et al. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1577-1591. doi:10.2147/IJN.S90850
78. Ferreira AK, Freitas VM, Levy D, et al. Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Activity of Synthetic Phosphoethanolamine. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0057937
79. Lee YW, Hwang YE, Lee JY, Sohn JH, Sung BH, Kim SC. VEGF siRNA delivery by a cancer-specific cell-penetrating peptide. *J Microbiol Biotechnol*. 2018;28(3):367-374. doi:10.4014/jmb.1711.11025
80. McKeon AM, Noonan J, Devocelle M, Murphy BM, Griffith DM. Platinum(IV) oxaliplatin-peptide conjugates targeting memHsp70+ phenotype in colorectal cancer cells. *Chem Commun*. 2017;53(82):11318-11321. doi:10.1039/c7cc04764a

81. Jabir MS, Taha AA, Sahib UI, Taqi ZJ, Al-Shammari AM, Salman AS. Novel of nano delivery system for Linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line. *Mater Sci Eng C*. 2019;94:949-964. doi:10.1016/j.msec.2018.10.014
82. Wei Y, Gao L, Wang L, et al. Polydopamine and peptide decorated doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles as a targeted drug delivery system for bladder cancer therapy. *Drug Deliv*. 2017;24(1):681-691. doi:10.1080/10717544.2017.1309475
83. Ayalew L, Acuna J, Urfano SF, et al. Conjugation of Paclitaxel to Hybrid Peptide Carrier and Biological Evaluation in Jurkat and A549 Cancer Cell Lines. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8(8):814-819. doi:10.1021/acsmedchemlett.7b00117
84. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(18):4205-4210. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
85. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131-134. doi:10.1038/374131a0
86. Li MH, Ito D, Sanada M, et al. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol*. 2004;40(1):63-70. doi:10.1016/S1368-8375(03)00136-2
87. Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Filho OMR, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(6):481-487. doi:10.1016/j.biopha.2013.01.012
88. Luna AC de lima, Viegas Saraiva GK, Ribeiro Filho OM, et al. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1577-1591. doi:10.2147/IJN.S90850
89. Visconti R, Della Monica R, Grieco D. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):1-8. doi:10.1186/s13046-016-0433-9
90. Gabrielli B, Brooks K, Pavey S. Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. *Front Pharmacol*. 2012;3 FEB(February):1-6. doi:10.3389/fphar.2012.00009
91. Verenhitch MD, Garcia L, Cabral DS, Alves CB, Maria DA. Evaluation of the antitumor and antiproliferative effects of the INKKI peptide on MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Int J Herb Med*. 2020;8(1):46-53.
92. Lu YZ, Li PF, Li YZ, et al. Enhanced anti-tumor activity of trichosanthin after combination with a human-derived cell-penetrating peptide, and a possible mechanism of activity. *Fitoterapia*. 2016;112:183-190. doi:10.1016/j.fitote.2016.03.019
93. Mäe M, Myrberg H, El-Andaloussi S, Langel Ü. Design of a tumor homing cell-penetrating peptide for drug delivery. *Int J Pept Res Ther*. 2009;15(1):11-15. doi:10.1007/s10989-008-9156-x
94. Myrberg H, Zhang L, Mäe M, Langel Ü. Design of a Tumor-Homing Cell-Penetrating Peptide. 2008;(Table 1):70-75.
95. Kebebe D, Liu Y, Wu Y, Vilakhamxay M, Liu Z, Li J. Tumor-targeting delivery of herb-based drugs modified nanocarriers. *Int J Nanomedicine*. 2018:1425-1442.
96. Dissanayake S, Denny WA, Gamage S, Sarojini V. Recent developments in anticancer

- drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides. *J Control Release*. 2017;250:62-76. doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.006
97. Al-azzawi S, Masheta D. Designing a drug delivery system for improved tumor treatment and targeting by functionalization of a cell-penetrating peptide. *J Pharm Investig*. 2019;49(6):643-654. doi:10.1007/s40005-018-00424-w
 98. Albanese C, Johnson J, Watanabe G, et al. Transforming p21(ras) mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23589-23597. doi:10.1074/jbc.270.40.23589
 99. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501-1512. doi:10.1101/gad.13.12.1501
 100. De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgant DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 1993;363(6430):595-602. doi:10.1038/363595a0
 101. Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem*. 2016;85(April):375-404. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014710
 102. Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Filho OMR, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(6):481-487. doi:10.1016/j.biopha.2013.01.012
 103. Mendes LST, Peters N, Attygalle AD, Wotherspoon A. Cyclin D1 overexpression in proliferation centres of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2017;70(10):899-902. doi:10.1136/jclinpath-2017-204364
 104. Núñez KG, Gonzalez-Rosario J, Thevenot PT, Cohen AJ. Cyclin D1 in the liver: Role of noncanonical signaling in liver steatosis and hormone regulation. *Ochsner J*. 2017;17(1):56-65. doi:10.1043/1524-5012-17.1.56
 105. Chen H, Xu X, Wang G, et al. CDK4 protein is degraded by anaphase-promoting complex/ cyclosome in mitosis and reaccumulates in early G1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2017;292(24):10131-10141. doi:10.1074/jbc.M116.773226
 106. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):558-572. doi:10.1038/nrc3090
 107. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
 108. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2015;16(6):2129-2144. doi:10.7314/APJCP.2015.16.6.2129
 109. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(2):153-166. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.013
 110. Choe KN, Moldovan G. Conductor At the Replication Fork. 2018;65(3):380-392. doi:10.1016/j.molcel.2016.12.020.Forging
 111. Wang SC. PCNA: A silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(4):178-186. doi:10.1016/j.tips.2014.02.004
 112. Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, et al. Proliferating cell nuclear antigen acts as a

- cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med*. 2010;207(12):2631-2645. doi:10.1084/jem.20092241
113. Yin L, Xie Y, Yin S, et al. The S-nitrosylation status of PCNA localized in cytosol impacts the apoptotic pathway in a Parkinson's disease paradigm. *PLoS One*. 2015;10(2):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0117546
 114. Olaisen C, Müller R, Nedal A, Otterlei M. PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. *Cell Signal*. 2015;27(7):1478-1487. doi:10.1016/j.cellsig.2015.03.009
 115. Horton NC, Mathew SO, Mathew PA. Novel Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen and HLA I on the Surface of Tumor Cells Inhibits NK Cell Function through Nkp44. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0059552
 116. Naryzhny SN, Lee H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Lett*. 2010;584(20):4292-4298. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.021
 117. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor Nkp44 Benyamin. *J Addict Nurs*. 2013;24(3):166-167. doi:10.1097/jan.0000000000000000
 118. Søgaaard CK, Moestue SA, Rye MB, et al. APIM-peptide targeting PCNA improves the efficacy of docetaxel treatment in the TRAMP mouse model of prostate cancer. *Oncotarget*. 2018;9(14):11752-11766. doi:10.18632/oncotarget.24357
 119. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(4):1076-1081. doi:10.1073/pnas.0404984102
 120. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Délérís G. Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*. 2003;3(2):95-117. doi:10.2174/1568011033353452
 121. Bao Q, Zhao Y, Niess H, et al. Mesenchymal stem cell-based tumor-targeted gene therapy in gastrointestinal cancer. *Stem Cells Dev*. 2012;21(13):2355-2363. doi:10.1089/scd.2012.0060
 122. Farzaneh Behelgard M, Zahri S, Mashayekhi F, Mansouri K, Asghari SM. A peptide mimicking the binding sites of VEGF-A and VEGF-B inhibits VEGFR-1/-2 driven angiogenesis, tumor growth and metastasis. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-13. doi:10.1038/s41598-018-36394-0
 123. Sadremomtaz A, Mansouri K, Alemzadeh G, Safa M, Rastaghi AE, Asghari SM. Dual blockade of VEGFR1 and VEGFR2 by a novel peptide abrogates VEGF-driven angiogenesis, tumor growth, and metastasis through PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathway. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2018;1862(12):2688-2700. doi:10.1016/j.bbagen.2018.08.013

7. ANEXOS

Anexo 1. Fotomicrografias da análise morfológica das células normais do endotélio humano HUVEC e do fibroblasto humano FN1. As células foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo BR2, o monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 no período de 24h.

Anexo 2. Análise das fases do ciclo celular nas células normais do endotélio humano HUVEC e nas células de fibroblasto humano FN1. As células foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC₅₀% por um período de 24h. **(a)** Gráfico de barras que mostra a correlação do efeito dos tratamentos no ciclo celular em células normais HUVEC; **(b)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito dos tratamentos no ciclo celular em células FN1 normais. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas ANOVA e Tukey-Kramer. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001

Anexo 3. Análise do potencial elétrico mitocondrial do endotélio humano HUVEC e células de fibroblasto humano FN1 por citometria de fluxo. As células foram tratadas com o peptídeo BR2, o monofosfoester 2-AEH₂F e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC_{50%} por um período de 24h. **(a)** Gráficos de barras dos valores médios $\pm$ DP da porcentagem do potencial mitocondrial de células HUVEC normais ativas e inativas; **(b)** Gráficos de barras de valores médios $\pm$ DP da porcentagem do potencial mitocondrial de células FN1 normais ativas e inativas. Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Anexo 4. Fotomicrografias de fibroblastos FN1 normais e endotélio vascular humano HUVEC com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e citoesqueleto marcado em verde (faloidina), analisadas por microscopia confocal a laser. Células normais tratadas com o peptídeo BR2, com o monofosfoester 2-AEH₂F, e a associação 2-AEH₂F+BR2 nos valores de IC_{50%} por um período de 24h.