



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Morte de células de adenocarcinoma de mama humano por BnSP-6, uma
fosfolipase A₂ Lys-49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

Orientadora: Prof^a Dr^a Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

UBERLÂNDIA-MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Morte de células de adenocarcinoma de mama humano por BnSP-6, uma
fosfolipase A₂ Lys-49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Co-orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA-MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A994m Azevedo, Fernanda Van Petten de Vasconcelos, 1980-
2015 Morte de células de adenocarcinoma de mama humano por BnSP-6,
uma fosfolipase A2 Lys-49 homóloga da peçonha de Bothrops
pauloensis / Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo. - 2015.
103 f. : il.

Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini.
Coorientadora: **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.**
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Esterases - Teses. 3. Bothrops - Teses. 4.
Mamas - Câncer - Teses. I. Tadini, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama.
II. **Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues.** III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Morte de células de adenocarcinoma de mama humano por BnSP-6, uma fosfolipase A₂ Lys-49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini
(Orientador)

Examinadores:

Dra. Máisa Esplendore della Casa

Dra. Lara Vecchi

Data da Defesa: 30 / 07 / 2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

(Profa. Dra. Kelly A.G. Yoneyama Tadini)

Dedicatória

À Deus, autor e consumidor da minha fé.

Ao meu amado Jesus que me conquistou e foi sempre meu sustento,

Ao meu amado e querido marido, sem sua força, ajuda, coragem e estímulo, com certeza não teria chegado até o fim. Muito obrigada, por dividir comigo sonhos, alegrias e nossos bens mais preciosos, Pedro e Maria Tereza, paixões da minha vida, por vocês faço tudo!!!

Aos meus pais, Roberto e Neusa, que me ensinaram tudo que sou. Obrigada pela ajuda constante, pelos sorrisos, estímulos e orações. Amo vocês!!

Aos meus irmãos (Gisa e Thiago) pela torcida, ajuda e orações e aos meus cunhados (Nara e Felipe) que sempre estiveram na torcida.

A igreja em Uberlândia, (Cida, Rejane, Gê, Mayara, Paulinha, Carol...), obrigada pela amizade, carinho e por sempre estarem intercedendo a Deus por minha vida. Vocês são especiais!

Agradecimentos

A minha orientadora e profa. Kelly A. G. Yoneyama, por abrir as portas do Laboratório de Bioquímica e toxinas animais (LaBiTox), por me introduzir no mundo da pesquisa e por aceitar o grande desafio de orientar-me, fazendo tudo sempre com muita atenção, carinho, dedicação e cuidado. A minha Co-orientadora, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, por abraçar meus sonhos durante essa caminhada, pela parceria, amizade, pelos puxões de orelha que tanto me fizeram crescer durante essa etapa e pela constante orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Á vocês, duas, minha eterna gratidão, admiração e respeito!

Ao “Grupo das amigas”, várias orientadoras que eu tive durante a elaboração deste trabalho, o meu muito obrigado à pessoas como: Daiana, que ouviu meus choros, riu comigo, esteve sempre disposta a ajudar, ensinar e acima de tudo me fez acreditar que poderia chegar até o fim. A minha amiga de longa data Denise, que mesmo longe no início, devido a percalços da vida, esteve sempre por perto, sorrindo comigo, torcendo e me dando força nos momentos finais do trabalho. A minha amiga e professora Renata, que foi companheira durante todo esse tempo, com a certeza de que iria desenvolver um bom trabalho e com uma alegria contagiante de que sempre iríamos comemorar as vitórias alcançadas e por último e não menos importante, a minha mais nova amiga, Sarah, foi chegando de mansinho e conquistou meu coração. Sua ajuda foi de grande importância no desenvolvimento do trabalho, pois sem você, seria muito mais árduo, difícil e sem graça....

Aos amigos do LaBiTox, pelos incentivos, momentos de alegria e sorrisos desejados a mim durante essa caminhada e um agradecimento especial aos amigos Maks, Vitor, David e Lucas pelos ensinamentos, sorrisos, idéias e por tornarem meus dias mais felizes.....

Às técnicas do laboratório, Tianinha e Marina, pela atenção, amizade e presteza no decorrer desses anos.

Aos amigos do INGEB, Madson, Ismair e Janaina, por estarem sempre dispostos a ajudar, esclarecer e permitir o bom desenvolvimento do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela parceria e por permitir que alguns experimentos pudessem ter sido realizados em seu laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, que sempre me ajudaram no decorrer desses anos, independente da situação. O meu obrigado especial a Patrícia Terra, por sempre sorrir, ensinar e colaborar para que esse trabalho pudesse terminar com qualidade, a Mariana, pelos constantes estímulos durante essa caminhada e ajuda com as células, a Lara, pela disposição em ensinar e pela ajuda nos experimentos nas diversas vezes em que precisei, a Larissa, Patrícia Tiemi e Paula por sempre estarem presentes, quando precisei.....o meu eterno obrigada.

Aos órgãos de fomento a pesquisa, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro, e a FAPEMIG por custear meus estudos e permitir que ele pudesse ser realizado com dedicação e tranquilidade.

A todos que contribuíram indiretamente para a concretização deste trabalho.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos ...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.

Por isso, meu ardente desejo é que você
NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.”

Augusto Cury

Lísta de Abreviaturas

ATP- Adenosina trifosfato

APAF-1- fator de ativação de apoptose 1

BRCA2- Câncer de mama receptor tipo A2

BFGF- Fator de crescimento fibroblástico básico

BPB- Brometo 4-bromofenacil

DCIS- Carcinoma ductal *in situ*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMT- Transição epitélio mesenquimal

HER-2- Fator de crescimento epidermal humano- receptor 2

HTRA-2- HtrA serina peptidase 2 (HTRA2 gene que codifica uma protease de serina)

MDC- Monodansilcadaverina

MEC- Matriz extracelular

MET- Epitélio de transição mesenquimal

MTT – Brometo de 2,5-difenil-terazolio-3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]

PBS- Tampão Fosfato Salina

PLA₂ – Fosfolipase A₂

qPCR – Reação em cadeia da polymerase- tempo real

RP- Receptor de progesterona

RE- Receptor de estrógeno

SDS – Dodecil-Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

TNBC- Câncer de mama triplo negativo

TNF- Fator de necrose tumoral

VEGF-A - Fator de crescimento endotelial vascular tipo A

Lísta de figuras e tabela

Figure 1. Cytotoxicity of BnSP-6 on MDA-MB-231 and MCF10A cells.

Figure 2. Autophagic vacuoles in MDA-MB 231 cells after incubation with BnSP-6.

Figure 3. Flow cytometric analyses demonstrating apoptotic and necrotic MDA-MB-231 cells.

Figure 4. Release of lactate dehydrogenase (LDH) by MDA-MB-231 cells after incubation with BnSP-6.

Figure 5. Interference of BnSP-6 in MDA-MB-231 cells adhesion.

Figure 6. Effect of BnSP-6 on cell migration of MDA-MB-231.

Table 1: Fold changes of up and down-regulated genes expressed in MDA-MB-231 treated with BnSP-6.

Sumário

Capítulo 1:	04
1.0 O Câncer	05
1.1. Câncer de mama	06
1.2. Migração, Invasão e metástase	11
1.3. Câncer e o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT)	12
1.4. Câncer e a morte celular	14
1.5. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama	20
2.0 Peçonhas de serpentes: Fontes de moléculas bioativas	24
2.1. As fosfolipases A ₂	25
Referências	30-40
Capítulo 2:	43
3.0 Artigo: Human breast cancer cell death induced by BnSP-6 a Lys-49 PLA₂ homologue from <i>Bothrops pauloensis</i> venom	43
Resumo	45
Abstract	46
1. Introduction	47
2. Materials and methods	48
2.1. Venom	49
2.2. Lys-49 BnSP-6 purification	49-50

2.3. Cell culture	51
2.4. Cytotoxicity assay	51
2.5. Autophagy assay	51
2.6. Apoptosis analysis	51
2.7. Cell necrosis analysis	52
2.8. Total RNA isolation and RT-PCR	53
2.9. Cell adhesion assay	53
2.10. Wound-healing assay.....	53
2.11. Statistical analysis	53
3. Results	54
3.1.Cytotoxic effect of BnSP-6 in MDA-MB-231	54
3.2. Cell death induced by BnSP-6 in MDA-MB-231 cells.....	54
3.3. Gene expression of apoptosis mediators in MDA cells induced by PLA2 BnSP-6.....	55
3.4. Influence of BnSP-6 on adhesion and migration of MDA-MB-231 cells ...	55
4. Discussion	56-62
References	63-80
Captions for figures and table	81-83
Figures	84-90

APRESENTAÇÃO

O Câncer de mama é uma doença heterogênea que compreende diferentes subtipos moleculares, os quais resultam em evoluções clínicas distintas, e que requerem formas diferenciadas de tratamento. O grande problema na progressão da doença é o desenvolvimento de metástases, que acarreta mudanças no perfil de expressão gênica e consequente alteração no fenótipo da doença. A GLOBOCAN (Agência Internacional de Investigação do Câncer), em 2012 relatou uma incidência do câncer de mama no mundo de 1,67 milhões de casos e 522 mil mortes. Em 2014, para o Brasil, 57.120 novos casos de câncer de mama, foram relatados, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Dados indicam que até 2050, no mundo, irão surgir 3,2 milhões de novos casos por ano. Dessa forma, os dados estatísticos revelam um crescente risco, deste tipo de câncer, para a população.

O tratamento sistêmico para o câncer de mama tem como objetivo diminuir o processo de divisão celular, reduzindo, consequentemente, o crescimento das células. Entretanto, muitos agentes anti-neoplásicos não possuem especificidade para as células tumorais e assim, afetam tanto células normais quanto as tumorais. As principais formas de tratamento sistêmico são: terapia hormonal, terapia-alvo, uso de agentes citotóxicos ou suas combinações. A complexidade para o tratamento do câncer, decorrente dos diversos subtipos existentes, torna-se outro problema no âmbito terapêutico e devido a isso, muito esforço tem sido focado na procura de drogas apropriadas para o tratamento.

A busca de novos fármacos em fontes de moléculas bioativas consiste em uma abordagem muito interessante. As peçonhas de serpentes são compostas por uma mistura complexa de peptídeos e proteínas. As enzimas mais abundantes nas peçonhas incluem fosfolipases A_2 (PLA₂s), hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAOs), metaloproteases e serinoproteases. Essas moléculas são responsáveis por diversas atividades farmacológicas que incluem: efeitos sobre a agregação plaquetária, inflamação, hipotensão, atividade antimicrobiana, antiparasitária, entre outras. Os potenciais farmacológicos das moléculas em peçonhas de serpentes, aliado as inovações em biotecnologia, constituem fatores importantes para o descobrimento ou o design de novos

fármacos, como promissora ferramenta para a síntese de novos compostos com ação antitumoral.

As PLA₂s (EC 3.1.1.4) são enzimas capazes de clivar fosfolipídeos na posição *sn*-2, gerando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. As PLA₂s de peçonhas de serpentes estão relacionadas com diferentes efeitos biológicos (formação de edema, hipotensão, agregação plaquetária, cardiotoxicidade e neurotoxicidade), gerados por meio de ativação de vias de sinalização celular, bem como devido a desestabilização de membranas biológicas. Ainda, as PLA₂s de peçonhas ofídicas estão associadas com atividades antibacteriana, antiparasitária e antitumoral, gerando grande interesse médico-científico.

Portanto, o presente estudo buscou avaliar o efeito citotóxico da PLA₂-BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231). Serão apresentados na sequência resultados da avaliação do efeito da PLA₂ na viabilidade celular e em diferentes mecanismos de morte celular (necrose, apoptose e autofagia). Posteriormente, será mostrada a interferência da BnSP-6 na adesão e migração celular, processos considerados essenciais para a progressão e invasão do tumor.

A apresentação da dissertação foi dividida em 2 capítulos, seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A formatação do trabalho seguiu também as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). O capítulo 1 consiste no levantamento bibliográfico referente ao assunto abordado incluindo tópicos sobre câncer de mama, aspectos epidemiológicos, subtipos do câncer de mama, terapêutica, bem como, tópicos sobre peçonhas de serpentes, classes de toxinas, fosfolipases A₂ e suas aplicações terapêuticas. Por fim, o capítulo 2 abordará a metodologia utilizada durante o desenvolvimento do trabalho, resultados e a discussão, apresentados no formato de artigo científico que será submetido à revista *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*.

CAPÍTULO 1

1.0. O Câncer

O funcionamento do corpo humano pode ser considerado como uma sociedade, cujos integrantes são as células, as quais se reproduzem através de divisões celulares e organizam-se em conjuntos (tecidos) que colaboram entre si. Assim, para coordenarem este comportamento as células enviam, recebem e interpretam um conjunto sofisticado de sinais. Cada célula comporta-se de uma maneira, podendo se dividir, diferenciar ou morrer. Qualquer alteração molecular que perturbe este comportamento harmonioso pode resultar em problemas para o organismo. No corpo humano, constantemente, muitas células sofrem mutações e, por vezes, tal mutação pode resultar em certa vantagem seletiva a uma célula, permitindo que ela cresça e se divida mais vigorosamente e sobreviva mais facilmente que as demais células, vindo a se tornar a fundadora de um clone mutante que passe a crescer fora do contexto normal (ALBERTS, 2010).

As células cancerosas apresentam propriedades diferenciadas, sendo elas: capacidade anormal de divisão celular, de invasão e de proliferação em regiões destinadas a outras células. Tais propriedades resultam na formação de um tumor, ou neoplasia. O tumor somente é considerado benigno quando as células não apresentam sinais de invasão para outros tecidos. Assim, neste estágio, é possível haver remissão completa da doença por meio da remoção cirúrgica da massa tecidual. Quando as células adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes, o tumor torna-se maligno. Ainda, a célula maligna pode desprender-se do tecido, penetrar na corrente sanguínea ou em vasos linfáticos e formar tumores em outros locais do corpo. Tal processo é denominado metástase, e neste caso, a erradicação da doença é considerada muito difícil, podendo resultar na morte do paciente (ALBERTS, JOHNSON, LEWIS et al., 2011).

Dentre as principais características que favorecem o crescimento maligno destacam-se a capacidade de produzir sinais de crescimento independentes, ativação incorreta dos genes, evasão dos sinais de morte celular programada, capacidade ilimitada de proliferação e angiogênese (ALBERTS, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A célula maligna também possui elevada capacidade de captação de aminoácidos, de síntese de proteínas e alta atividade glicolítica para geração de ATP. Dessa forma seu metabolismo fica totalmente voltado para o fornecimento de grande quantidade de energia para manutenção da alta taxa proliferativa que essas células possuem. Ainda, as células malignas, possuem expressão aumentada de moléculas de adesão, como é o caso das integrinas, que interagem com a matriz extracelular, permitindo o desenvolvimento e proliferação do tumor, bem como a capacidade de migrar para outros tecidos. As integrinas interagem, por meio de um domínio extracelular, com diferentes moléculas da matriz extracelular (MEC), tais como colágeno, laminina ou receptores de adesão vascular da célula (VCAM-1), permitindo assim, a conexão direta ou indireta com receptores de sinalização celular, bem como com o citoesqueleto de actina da célula (BRAKEBUSCH et al., 2002; FILHO, 2006).

Os cânceres podem ser classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais são derivados. Quando ele é originado de células epiteliais a doença passa a ser denominada de carcinoma, que é considerado o tipo mais comum de câncer em humanos. Outro tipo, os sarcomas, são tumores derivados do tecido conectivo ou de células musculares, que podem se desenvolver em alguns tecidos, ossos ou músculos. Existem também outros tipos de cânceres que incluem a leucemia e linfomas, derivados das células de linhagem branca ou de suas precursoras (células hematopoiéticas), assim como os cânceres do sistema nervoso central (SNC) que englobam os tumores que se originam no cérebro e na medula espinhal (INCA, 2014b).

1.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos. Em 2011 a Organização Mundial de Saúde, relatou em todo o mundo, mais de 508 mil mortes de mulheres por câncer de mama, (WHO, 2015). E, segundo a GLOBOCAN (Agência Internacional de Investigação do Câncer), em 2012 a

incidência estimada de câncer de mama no mundo era de 1,67 milhões de casos, com 522 mil mortes. Estimativas globais mostram que até 2050 irão surgir 3,2 milhões de novos casos por ano. Acredita-se que o câncer de mama ocorra em maior proporção em países desenvolvidos, com aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama, porém, 58% das mortes ocorrem nos países em desenvolvimento, onde a maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados da doença. Para o Brasil, em 2014, eram esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Os homens também podem ser acometidos pelo câncer de mama, porém a incidência é muito menor que em mulheres. Em nosso país cerca de 50 casos foram registrados no ano de 2014 (INCA, 2014a; BRASIL, 2015; FERLAY J, 2015; WHO, 2015). Dessa forma, os dados estatísticos revelam o grande impacto que essa doença trás para a população e apesar dos inúmeros avanços na compreensão desta neoplasia, infelizmente as estatísticas persistem.

As taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama podem variar de acordo com os diferentes fatores de risco associados à doença, citando-se principalmente a fatores genéticos, idade, sedentarismo e obesidade. Os fatores genéticos podem resultar em predisposição do indivíduo para o desenvolvimento de uma mutação, o qual geralmente ocorre em genes que atuam na maquinaria de reparo do DNA; ou no silenciamento de cromossomos em pontos de controle do ciclo celular (BOYD, 2014). O câncer de mama hereditário é caracterizado pelas mutações herdadas, geralmente em heterozigose, no qual envolvem genes que atuam no reparo do DNA como *BCRA1* em sua maioria, *BCRA2*, *TP53*, *ATM* e *CHEK2* (BOGDANOVA; HELBIG; DORK, 2013; BOYD, 2014). Quando ocorre a perda da heterozigose (LOH), seja por mutação somática, ou quando o promotor inativa a expressão do alelo normal, a célula passa a acumular mutações que ocasionam em instabilidade genômica e provavelmente em neoplasias (HA et al., 2012). Sabe-se que os alelos que são mutados aceleram o processo da neoplasia, porém eles não são determinantes e mutações adicionais são necessárias para manifestação do fenótipo maligno, sabe-se então que a predisposição familiar, apesar de sua importância, ocorre em menos de 5% dos casos de câncer de mama (ACKERMANN et al., 2006).

A idade constitui outro importante fator, sendo que quanto maior a idade maior é o risco de apresentar a doença. Entretanto, no caso de mulheres em menopausa, as chances de desenvolver a doença reduzem drasticamente (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000). Ainda, estudos indicam que o uso de terapia de reposição hormonal dobra o risco do paciente em desenvolver o câncer de mama. O sedentarismo e a obesidade, dois outros fatores de risco da doença, estão interligados com a menopausa e ao desenvolvimento do câncer de mama (PIEROBON; FRANKENFELD, 2013). Outros fatores, como a ingestão alcoólica e tabagismo, também estão associados ao mesmo e apresentam-se intimamente correlacionados, uma vez que mulheres tabagistas e que ingerem quantidades superiores a 10 g de álcool por dia aumentam em 7,1% o risco relativo em desenvolver a doença, porém, não há evidências de aumento do risco da doença devido ao uso exclusivo do tabaco (HAMAJIMA, 2002).

Outros fatores que elevam os riscos de desenvolver o câncer de mama são a exposição à radiação ionizante ou a carcinógenos químicos. Ainda, a gravidez, independentemente de idade, atividade física e dieta saudável, está associada diminuição do risco de desenvolver a doença (HELMRICH et al., 1983; MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000; HAMAJIMA, 2002; MCPHERSON, 2004; ELMORE et al., 2005; MCPHERSON, 2010; PIEROBON; FRANKENFELD, 2013).

O órgão mamário da mulher adulta, em condições normais, é formado por tecidos estromais e epiteliais que se encontram dispostos numa forma arborescente e ramificada. Os componentes epiteliais são formados por células ductais, lobulares e mioepiteliais. As células lobulares se agrupam formando os ácinos ou alvéolos, as ductais se organizam a fim de formar os ductos que se interligam com os ácinos com formação dos ductos lactíferos no qual se confluem desembocando no mamilo. As células mioepiteliais possuem a capacidade de revestir tanto os ácinos quanto os ductos que são responsáveis pela contração e encaminhamento do leite materno até a secreção final no mamilo. Finalmente, o componente estromal é composto por uma quantidade diversa de tecido adiposo e conjuntivo formando a maior parte do volume da mama normal sem lactação (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

Uma característica extremamente importante da diferenciação mamária consiste na formação da membrana basal, ela se encontra disposta entre o epitélio dos ductos-lobulares e do estroma subjacente. Essa diferenciação ocorre mediante sinais hormônios específicos, bem como sinais ambientais locais (STREULI; BAILEY; BISSELL, 1991). Seus principais constituintes são o nitrogênio, colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e proteoglicanos. Sabe-se também devido a relatos na literatura, que as células mioepiteliais agem como supressoras naturais de progressões neoplásicas mamárias, bem como possuem capacidade de regular negativamente a invasão dos tecidos, ou seja, a metástase. Isso ocorre devido à barreira física que é formada entre as células luminais e o estroma, bem como seu controle parácrino (STERNLICHT et al., 1997).

Na maioria dos casos, os carcinomas mamários tem origem nos epitélios dos lóbulos e/ou ductos pertencentes à glândula mamária. Quando originado na porção glandular é denominado de carcinoma lobular e quando originado na camada epitelial local dos ductos mamários, são chamados de carcinoma ductal. O tumor que se apresenta confinado ao tecido mamário e que não cause prejuízos ao restante do corpo, é denominado de carcinoma *in situ*. No caso de estágios mais avançados da doença, o tumor ultrapassa os limites do tecido mamário, disseminando-se para novos sítios, sendo, neste caso, usado o termo carcinoma invasivo (ELLIS, 2010).

O câncer de mama é considerado como uma doença heterogênea em suas características patológicas. O acompanhamento da doença é bastante complexo principalmente devido à existência dos diversos subtipos tumorais, os quais possuem perfil de expressão, resposta terapêutica e comportamento clínico diferenciados (FREITAS-JÚNIOR, 2011; TAO et al., 2014; FERLAY et al., 2015; TOMAO et al., 2015).

Morfologicamente o câncer de mama pode ser classificado em mais de 20 subtipos. Entretanto, a análise de características moleculares permite a distribuição dessas neoplasias em subgrupos. Esta classificação molecular está

baseada na avaliação da expressão de centenas de genes. Assim, a partir do ano de 2001 foi adotada uma nova classificação, no qual o carcinoma mamário pode ser distribuído entre 5 subgrupos moleculares, sendo eles: luminal A, luminal B, luminal híbrido, Her-2 e basal-símile. Cada subgrupo constitui um conjunto de neoplasias com semelhanças no que se refere aos genes que estão alterados e que, portanto, determinam características imuno-histoquímicas, prognósticas e terapêuticas distintas. Segue abaixo a descrição dos principais subgrupos moleculares de câncer de mama (EISEN; BROWN, 1999; PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2006; SARRIO et al., 2008; FREITAS-JÚNIOR, 2011; KAO et al., 2011; VOSS et al., 2011; TOMAO et al., 2015):

- 1) **Luminal A:** É o mais frequente e, de modo geral, apresentam baixo grau histológico. Ainda, apresenta alta expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e baixos índices de proliferação celular. Respondem bem frente à hormonioterapia como adjuvante ao tratamento cirúrgico.
- 2) **Luminal B:** Exibem maior grau histológico, se comparado ao subtipo luminal A, além de apresentarem maior índice de proliferação celular. Respondem bem aos quimioterápicos e hormonioterapia como tratamentos complementares ao tratamento cirúrgico.
- 3) **Her-2:** É negativo para RE e RP e possui elevada expressão do oncogene Her-2, o qual está associado ao perfil metastático. De modo geral, apresentam alto grau histológico e nuclear, além de elevada taxa de proliferação celular. No tratamento apresenta resistência a algumas terapias endócrinas. Entretanto, a droga Trastuzumabe (anticorpo monoclonal humanizado) melhora o prognóstico de pacientes com este subgrupo.
- 4) **Basal-símile:** Caracterizado morfológicamente por alto grau histológico e nuclear, infiltrado leucocitário e presença de áreas necróticas. Clinicamente é considerado o subtipo mais agressivo. Parte desses tumores é denominada de "triplo negativo", sendo que a maior parte deles não apresenta expressão imuno-histoquímica de nenhum dos marcadores prognósticos, ou seja, são RE,

RP e Her-2 negativos. Apesar da elevada agressividade desse subtipo, o comprometimento dos linfonodos axilares não é frequente.

Como se pode observar a classificação molecular dos tumores nos subtipos baseia-se principalmente na presença de alguns receptores, sendo considerados principalmente os receptores Her2 e os receptores hormonais de Estrógeno e Progesterona. O receptor Her2 (EGF2) é um dos quatro membros da família de receptores de crescimento epidermal, que são receptores transmembranares envolvidos com a transdução de sinais antiapoptóticos e proliferativos e desempenham importante papel na progressão tumoral e no seu desenvolvimento (PICCART-GEBHART, 2006; TANEJA et al., 2010). Ainda, a classificação molecular é de grande relevância e deve ser avaliada em associação com achados clínicos, exames complementares e demais parâmetros anatomopatológicos. As análises, em conjunto, irão determinar o prognóstico da doença (RAKHA et al., 2010; IAC LAKHANI, 2014), bem como a melhor opção terapêutica para o tratamento do câncer de mama.

Convém ressaltar que, embora a classificação molecular seja baseada na detecção de genes amplificados e/ou suprimidos, é possível determinar, com boa confiabilidade, por meio de análise imuno-histoquímica, que busca os marcadores RE, RP, Her-2 e Ki-67 (relacionado à proliferação celular), os 5 subgrupos principais para o qual o tumor pertence.

1.2 Migração, Invasão e Metástase

As causas de morte por câncer, principalmente no câncer de mama, estão relacionadas ao aparecimento de metástase. A metástase pode ser descrita como a migração de células tumorais a partir do tumor primário, que requer a penetração no estroma local, entrada no sistema circulatório ou linfático, ligação às plaquetas, interação com endotélios distantes, extravasamento e a colonização progressiva deste novo local (COLEMAN; RUBENS, 1987). Assim, as células tumorais precisam passar por mudanças fenotípicas e adquirir características que permitam realizar todas as etapas, além da capacidade de sobrevivência a essas

etapas envolvidas no processo de metástase. É por essa razão que após a invasão, apesar de um grande número de células tumorais conseguirem entrar no sistema circulatório ou linfático, somente uma pequena proporção destas células conseguirá fundar colônias metastáticas.

As células com capacidade de invasão possuem em seu citoesqueleto modificações que auxiliam nos prolongamentos membranares, ricos em F-actina que são chamados de invadopodia (WEAVER, 2006). A matriz extracelular começa a ser degradada pela invadopodia e por podossomos, estruturas ricas em actina que em contato permitem a invasão das células cancerígenas pelas membranas celulares com consequente migração para os vasos adjacentes, sanguíneos e ou linfáticos (LINDER, 2007; BUCCIONE; CALDIERI; AYALA, 2009)

Ainda, o papel da matriz extracelular no microambiente tumoral não está limitado somente a atuar como barreira física à neoplasia, uma vez que pode atuar como um reservatório para proteínas ligantes e fatores de crescimento que influenciam o comportamento das células tumorais. Por essa razão, o microambiente do tumor é conhecido por ser diferente do tecido saudável, com modificação da matriz extracelular e com elevados níveis de colágeno tipo I, fibronectina, fatores de crescimento, dentre outros (JOYCE; POLLARD, 2009; ASPARUHOVA et al., 2015).

1.3. Câncer e o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Um aspecto importante da progressão do câncer de mama é a ativação do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), que está associado com a metástase. Como comentado anteriormente, a fase inicial do processo de metástase requer que as células passem por uma modificação fenotípica. A EMT é uma alteração fenotípica reconhecida na biologia do desenvolvimento como um instrumento capaz de gerar rápidas mudanças morfogênicas em embriões de metazoários, como na gastrulação, durante a qual as células do epitélio são internalizadas para dar origem ao tecido mesodérmico; e também na formação da crista neural, coração, sistema muscular, e sistema nervoso periférico. Assim,

além do seu papel na organogênese, a EMT está associada com o processo de metástase.

Durante a EMT as células perdem sua polaridade e aumentam a resistência a apoptose, adquirem características migratórias e invasivas. Um importante evento na EMT é a diminuição na expressão de E-caderina, uma glicoproteína transmembrana, cálcio-dependente, que participa da formação das junções aderentes, desempenhando um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais de todos os órgãos e cuja perda de expressão tem sido relacionada ao fenótipo invasivo das células tumorais *in vitro*. A reduzida aderência das células cancerosas também resulta em alterações na morfologia celular devido a mudanças nos filamentos do citoesqueleto e, dessa forma, a célula fica mais alongada, lembrando um fibroblasto. O fenótipo alongado é devido a ciclos de polimerização e ou contração do citoesqueleto que levam à migração elevada. Isso acontece porque elas estão ligadas de forma menos firme tanto na matriz extracelular como nas células vizinhas. Ainda, na EMT, as células modificam seu padrão de expressão de integrinas na superfície celular e, além da perda da expressão de E-caderina, as células passam a expressar os marcadores mesenquimais N-caderina e vimentina (KARRETH, 2004; YANG et al., 2004; KALLURI; WEINBERG, 2009; WEI et al., 2015). Todas essas alterações resultam em diminuição da adesão, aumento na mobilidade e uma maior capacidade invasiva (KARRETH, 2004; JEANES; GOTTARDI; YAP, 2008; WEI et al., 2015).

O processo final de um epitélio de transição é a degradação da membrana basal, por meio do qual as células tumorais (com características mesenquimais), serão capazes de migrar para longe do epitélio de origem (KARRETH, 2004; KALLURI; WEINBERG, 2009; WEI et al., 2015). Ainda, alguns autores afirmam que a EMT pode induzir o aparecimento de células com características de células-tronco, devido ao potencial de auto renovação que adquirem. Esse potencial permite que grandes populações de células sejam geradas, a fim de constituir a metástase macroscópica (MARTIN; CANO, 2010).

1.4 Câncer e a morte celular

Desde as primeiras descrições dos mecanismos de morte celular, as quais datam de meados dos anos 1960, várias outras tentativas de classificação de morte celular foram realizadas tendo como base as características morfológicas durante o processo de morte. Os autores, (SCHWEICHEL; MERKER, 1973) propuseram uma classificação para as modalidades de morte celular, incluindo a morte celular tipo I, associada com heterofagia; a morte celular tipo II, associada com autofagia e a morte celular tipo III, que não foi associada com qualquer tipo de digestão; as quais correspondiam à necrose, autofagia e apoptose, respectivamente (GALLUZZI et al., 2012). Mais recentemente, o Comitê para Nomenclatura de Morte Celular (NCCD) formulou, em 2005 e 2009, recomendações para classificação dos tipos de morte celular com o intuito de facilitar o entendimento sobre os mecanismos e tipos de morte entre os pesquisadores desta área de conhecimento. Ainda, o NCCD recomenda que tal classificação tenha como base critérios bioquímicos. No entanto, tais características bioquímicas apresentam alguns inconvenientes, e sua interpretação exige bastante cautela, especialmente quando os parâmetros individuais estão sendo investigados (GALLUZZI et al., 2012).

A morte celular programada, também conhecida por apoptose é parte integrante do processo de diferenciação de muitos tipos celulares, sendo importante durante o desenvolvimento embrionário. No adulto, apoptose é responsável pelo balanço entre a proliferação celular e a manutenção do número de células nos tecidos durante a renovação celular. Ainda, o processo permite a eliminação de células danificadas ou potencialmente perigosas. Dessa forma, pode-se observar que a apoptose é relevante como um processo fisiológico, vital para manter a homeostase celular, bem como para o correto desenvolvimento e função dos organismos (SAMALI; GORMAN; COTTER, 1996; ELMORE, 2007; FERREIRA et al., 2010; NUNES et al., 2012).

Muitas células tumorais falham em atingir apoptose e, dessa forma, exibem aumento da duração de tempo de vida se comparada às células normais. Essa falha é crucial para o desenvolvimento do tumor primário, bem como para a sobrevivência e o crescimento de células tumorais metastáticas. O dano no DNA de células normais ativa a apoptose, porém, qualquer dano nas muitas células tumorais, como por exemplo, a irradiação, pode não levar essa célula a apoptose, devido à uma falha neste processo. Então, comprova-se a capacidade de resistência que algumas células tumorais possuem em relação à radiação e quimioterápicos que atuam na danificação do DNA (COOPER, 2007).

A apoptose é mediada pela atividade integrada de várias vias de sinalização. Diferentemente da morte acidental de células (necrose), decorrente de uma injúria aguda, a apoptose é um processo ativo, caracterizado por mudanças morfológicas e bioquímicas características. A célula em apoptose apresenta em geral DNA fragmentado, cromatina condensada e núcleo dissolvido em pequenos pedaços, diminuição do volume celular, e ao final do processo, são gerados fragmentos inclusos de membrana conhecidos como corpos apoptóticos.

Ainda, durante a apoptose, o fosfolípídeo fosfatidilserina, que em geral está localizado na camada interna das membranas biológicas, desloca-se para a camada externa nas células apoptóticas, atuando como marcador dessas células, sinalizando para que macrófagos e células vizinhas as fagocitem (ALBERTS, 2010). Assim, as células em apoptose são removidas dos tecidos. Em contrapartida, as células que morrem por injúria (necrose) aumentam seu volume e sofrem lise, liberando seu conteúdo no espaço extracelular e gerando, consequentemente, uma inflamação (COOPER et al., 2007)

De modo geral, a apoptose é dependente de uma cascata proteolítica intracelular mediada por caspases. As caspases compõem uma família de proteases que têm uma cisteína no seu sítio ativo e clivam suas proteínas-alvo em ácidos aspárticos específicos (ALBERTS, 2010).

Essas proteases são sintetizadas na célula na forma de precursores inativos, conhecidos como procaspases, que são ativadas por clivagem

proteolítica, gerando duas subunidades, uma grande e uma pequena. Essas subunidades unem-se para formar um heterodímero e por fim, dois heterodímeros juntam-se para formar um tetrâmero ativo. Após a ativação outras procaspases serão ativadas, resultando em uma cascata proteolítica amplificada. As caspases que iniciam a via de apoptose são chamadas de caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), as quais clivam e ativam procaspases executoras (caspases 3, 6 e 7), que por sua vez, clivam proteínas-alvo na célula. Diferentes proteínas celulares são alvos das caspases executoras, sendo elas: lâminas nucleares, proteínas que mantêm as endonucleases (enzimas que degradam DNA) inativas, componentes do citoesqueleto, proteínas de adesão célula-célula (RENATUS et al., 2001; ALBERTS, 2010; YUAN; AKEY, 2013).

O processo de apoptose pode ocorrer por 2 vias principais, sendo elas: a via intrínseca e a via extrínseca. A via extrínseca indica os casos de morte celular por apoptose que são induzidos por sinais de estresse extracelulares, os quais são detectados e propagados via receptores de morte. Tais receptores são proteínas transmembrana que contêm um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembrana único e um domínio de morte intracelular, o qual é requerido para ativar o programa apoptótico (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2002; KLIONSKY et al., 2008; SCHUTZE; TCHIKOV; SCHNEIDER-BRACHERT, 2008; MEHLEN; BREDESEN, 2011). A via intrínseca de apoptose é resultado de múltiplas condições de estresse intracelular.

A via extrínseca pode ser iniciada pela ligação de ligantes letais, tais como o FAS/CD95 ligante, fator de necrose tumoral (TNF α) e superfamília TNF, membro 10, a vários receptores de morte como, FAS/CD95, receptor TNF α , entre outros (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2002). A sinalização nestes receptores de morte resulta em ativação da caspase-8, que ativa outras caspases, iniciando o processo apoptótico (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003; ELMORE, 2007).

Como dito anteriormente, a via intrínseca de apoptose é resultado de múltiplas condições de estresse intracelular, incluindo danos no DNA, estresse

oxidativo, sobrecarga citosólica de Ca^{+2} , hipóxia, entre outros. Assim, sinais de sobrevivência e de morte são gerados e convergidos para um mecanismo de controle centralizado nas mitocôndrias da célula. Quando sinais de morte prevalecem, ocorre permeabilização da membrana mitocondrial, que resulta em dissipação do potencial transmembrana mitocondrial, impedimento da síntese de ATP e de transportes dependentes do potencial transmembrana. Ainda, ocorre desacoplamento da cadeia respiratória, causando aumento em relação a espécies reativas do oxigênio. Proteínas que normalmente estão localizados exclusivamente na mitocôndria são encontradas no citosol, como é o caso do citocromo c, que em conjunto com a proteína APAF1 e dATP formam o apoptossomo, um complexo multiproteico que dispara a via de cascata proteolítica caspase-9-caspase-3 (LI et al., 1997; ZOU et al., 1997).

Ainda na via intrínseca, o estresse intracelular pode resultar na ativação do fator indutor de apoptose e endonuclease G, que resultaria em apoptose independente de caspases. Neste caso, a apoptose decorreria da fragmentação de DNA em larga escala. A serino-protease HTRA2 também contribui para a apoptose independente de caspase, através da clivagem de uma grande variedade de substratos celulares, incluindo as proteínas do citoesqueleto. A ativação desta via independente de caspase está normalmente associada com parada na síntese de ATP, excesso de espécies reativas do oxigênio e parada da cadeia respiratória. Assim, atualmente, tem sido sugerida a diferenciação de apoptose intrínseca em dependente e independente de caspases (GALLUZZI et al., 2012).

Devido às características da via intrínseca de apoptose, este tipo é firmemente regulado para assegurar que as células morram apenas quando for apropriado. A principal classe de reguladores intracelulares de apoptose é a família de proteínas Bcl-2, que, assim como a família das caspases, tem sido conservada evolutivamente. Proteínas Bcl-2 de mamíferos regulam a via intrínseca de apoptose principalmente pelo controle da liberação do citocromo c e de outras proteínas mitocondriais no citosol. Algumas proteínas da família Bcl-2 são pro-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_L) e promovem a apoptose pelo aumento da

liberação de proteínas mitocondriais, enquanto outras são anti-apoptóticas (Bax e Bak) e inibem a apoptose bloqueando essa liberação (ALBERTS, 2010; WILLIAMS; COOK, 2015). Proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas e anti-apoptóticas podem se ligar umas às outras em várias combinações formando dímeros, nos quais as duas proteínas inibem as funções umas das outras. O balanço entre as atividades dessas duas classes funcionais de proteínas Bcl-2 determina se células de mamíferos sobrevivem ou morrem pela via intrínseca de apoptose (FERREIRA et al., 2010).

Além de apoptose e necrose, outro tipo de morte celular, merece destaque, é a morte celular autofágica. Morfologicamente, este tipo de morte é marcado por vacuolização citoplasmática massiva (MORSELLI et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012), uma vez que durante o processo substratos intracelulares e extracelulares são entregues para os lisossomos para degradação ou reciclagem (MIZUSHIMA, 2007; RAVIKUMAR et al., 2010). A autofagia, que caracteriza este tipo de morte celular, consiste em um processo essencial para a manutenção da homeostasia celular (GOZUACIK et al., 2008), e pode ser estimulado por estresse de qualquer natureza, como privação de nutrientes ou por danos ocorridos em organelas celulares. Portanto, a autofagia exerce um importante papel fisiológico e atua também na manutenção do metabolismo energético (KLIONSKY et al., 2008; MATHEW; WHITE, 2011), uma vez que permite a utilização de componentes intracelulares e vários nutrientes estocados para a produção de energia e/ou biossíntese (KUMA; MIZUSHIMA, 2010; RABINOWITZ; WHITE, 2010). A autofagia, também pode ser induzida por estímulos extracelulares como hormônios ou tratamentos terapêuticos, presença de microrganismos e drogas citotóxicas que afetam componentes das células tais como: mitocôndria, retículo endoplasmático, DNA e proteínas (MEIJER; CODOGNO, 2004).

Embora a autofagia tenha sido descrita pela primeira vez a mais de 40 anos atrás, foi na última década que o assunto mostrou grande interesse por parte de diversos pesquisadores, os quais explicitaram a clara conexão entre a autofagia e várias doenças (RUBINSZTEIN; CODOGNO; LEVINE, 2012) e

diversas situações de estresse (KROEMER; MARINO; LEVINE, 2010), bem como o seu papel fisiológico no desenvolvimento (LEVINE; KLIONSKY, 2004) e envelhecimento (RUBINSZTEIN; CODOGNO; LEVINE, 2012).

Diversas drogas anticâncer, incluindo agentes que causam danos ao DNA, drogas que atuam em microtúbulos, em receptores agonistas de morte, agentes hormonais, agentes anti-angiogênicos, inibidores do proteassoma, inibidores de histona-desacetilase e inibidores de quinase afetam a autofagia. Inclusive não há conhecimento de agentes anticancerígenos que tenham claramente demonstrado não afetar o processo autofágico. Apesar da frequente associação desse processo com drogas anti-tumorais, os mecanismos moleculares que fundamentam os efeitos dessas drogas sobre a autofagia ainda não estão completamente elucidados (THORBURN; THAMM; GUSTAFSON, 2014).

Embora um grande número de evidências indiquem que a inibição da apoptose é crítica para o desenvolvimento do tumor, também existem indícios de que a diminuição da autofagia está relacionada com a formação do tumor (QU et al., 2003; SHIMIZU et al., 2014), pois baixos níveis de Beclin-1, proteína que participa dos eventos moleculares de ativação da autofagia, estão associados com o desenvolvimento de câncer de mama, ovário e próstata. Ainda, ratos heterozigotos para o gene Beclin-1 apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de tumor (QU et al., 2003; YUE et al., 2003). Portanto, esses resultados sugerem que a insuficiência das células em sofrer autofagia contribuiria para a progressão do tumor.

Apesar de a autofagia desempenhar um papel importante na supressão de tumores, ela também pode promover o crescimento de células tumorais através do fornecimento de nutrientes devido às condições de hipóxia característica das células tumorais. Isso acontece porque as células tumorais necessitam de vários nutrientes para acelerar sua proliferação. Estudos têm mostrado que a privação de nutrientes compromete o crescimento do tumor em células tumorais deficientes de autofagia (MATHEW et al., 2009).

Dessa forma, concluiu-se que a autofagia desempenha um papel duplo no câncer e que sua função dependerá do contexto da doença. De qualquer forma, é importante que o papel da morte autofágica seja sempre considerado. Inclusive, em algumas células tumorais a autofagia parece ser responsável pela morte, especialmente quando há falta de alguns moduladores apoptóticos (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005; BURSCH et al., 2008).

1.5 Diagnóstico e Tratamento do câncer de mama

Atualmente não é possível realizar a prevenção primária do câncer de mama, nem erradicar a doença, devido às características genéticas e fatores de risco relacionados à doença. Assim, até o momento, as realizações do autoexame, do exame clínico da mama e, em maior escala, do exame de mamografia continuam sendo as principais estratégias para rastreamento da doença, uma vez que o principal objetivo é a detecção precoce (D'ORSI et al., 2005; ELMORE et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a mamografia é recomendada anualmente para mulheres acima de 40 anos. Em um estudo realizado na Espanha, entre os anos 1992 a 2006, foi observado um crescimento no índice de carcinoma ductal *in situ*, com consequente diminuição no número de carcinoma invasivo, sendo que tal declínio foi explicado pela elevada utilização dos exames de mamografia como técnica de rastreio em mulheres acima de 40 anos. Assim, o diagnóstico em estágio inicial, possibilita um tratamento mais efetivo, com menores chances de recidiva e menos agressividade (ROMÁN et al., 2013).

Tradicionalmente, fatores clínicos e histopatológicos são utilizados para orientação da escolha da terapia. Esses fatores incluem o estágio do tumor, tamanho do tumor, estado nodal, e características como grau histológico, expressão de RE, RP e Her-2, os quais podem indicar o prognóstico da doença, a agressividade do tumor, a probabilidade de recaída sem terapia sistêmica e resposta frente a tratamentos específicos. Devido aos atuais avanços na tecnologia, como o sequenciamento do genoma humano e popularização da ideia

de "Medicina personalizada" houve um interesse significativo em determinar como as diferenças genéticas poderiam ser usadas para predição da eficácia e segurança do tratamento utilizado. E assim, um número crescente de estudos têm investigado o papel da farmacogenética no tratamento de câncer de mama e outros cânceres (WESTBROOK; STEARNS, 2013).

Em pacientes com câncer de mama em estágio inicial ou apresentando carcinoma *in situ*, o tratamento tem intenção curativa e normalmente envolve a combinação de tratamento local (cirurgia e/ou radioterapia) e tratamento sistêmico (CHENG; UENO, 2012).

O processo de remoção cirúrgica, seja por mastectomia total ou conservativa (parcial), é muito importante. Entretanto, essa cirurgia gera impactos psicológicos e na autoestima da paciente, mas é adotada como medida principal por ser a opção terapêutica com menor chance de recidiva. Ainda, o alto risco no tratamento do câncer de mama será determinado pela ocorrência de metástases, que pode desencadear uma doença sistêmica de prognóstico bem desfavorável (VERONESI et al., 2002; ROMÁN et al., 2013).

A radioterapia isolada ou em combinação com a quimioterapia é amplamente utilizada após cirurgia de retirada do tumor mamário e a sua efetividade pode ser mensurada pela redução na incidência de recidiva. Porém, estudos relatam que as recidivas que ocorrem após a radioterapia estão associadas ao aumento do potencial metastático do tumor, bem como sua disseminação para órgãos com maior propensão para a doença, como é o caso dos ossos, fígado, pulmão. Isso acontece devido ao fato de que a radiação causa danos ao DNA, sendo esperada a ativação de apoptose para a remoção da célula, e como comentado anteriormente, muitas células tumorais apresentam falha no processo de apoptose. Dessa forma, tumores recém-irradiados poderiam ser mais invasivos e mais agressivos, sendo que isso está relacionado ao microambiente tumoral (ASPARUHOVA et al., 2015).

O tratamento sistêmico tem por objetivo diminuir o processo de divisão celular, reduzindo, conseqüentemente, o crescimento das células. Entretanto,

muitos agentes anti-neoplásicos usados, não possuem especificidade para as células tumorais e assim, afetam tanto células normais quanto as tumorais. Por essa razão uma série de efeitos colaterais graves está associada com a quimioterapia, incluindo complicações cardiovasculares, isquemia do miocárdio, hipertensão, eventos tromboembólicos, bloqueio do sistema linfático gerando linfedema, além do risco elevado em desenvolver outras neoplasias (BODAI; TUSO, 2015). As principais formas de tratamento sistêmico são: terapia hormonal, terapia-alvo, uso de agentes citotóxicos ou suas combinações.

Quase dois terços dos cânceres de mama são positivos para receptores de estrogênio. Para este tipo é possível a aplicação de terapia hormonal, que prevê uma capacidade de resposta frente às manipulações endócrinas. A ligação do estrogênio em seus receptores é responsável pela regulação de uma grande variedade de efeitos celulares e condições fisiológicas, incluindo a proliferação de células do câncer de mama. Para o câncer de mama as terapias hormonais são, de certa forma, terapias-alvo, uma vez que bloqueiam receptores específicos, inibindo o crescimento tumoral. Entre os agentes hormonais, aprovados para o tratamento do câncer de mama, estão os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs): tamoxifeno, raloxifeno, bem como a terceira geração de inibidores da aromatase (HATAJIMA et al.) anastrozol, letrozol e exemestane. Para ambos, SERMs e Als, ocorrerá ao final a interrupção da sinalização do estrogênio. Entretanto, SERMs e Als diferem bastante quanto as rotas metabólicas utilizadas para impedir a sinalização do estrogênio e assim, devido as variações genéticas, diferentes proteínas poderiam estar envolvidas nesse processo, gerando diferentes respostas nos pacientes. Ainda, fatores genéticos podem resultar em absorção ou distribuição diferenciada, contribuindo ainda mais para diferenças na efetividade terapêutica (WESTBROOK, STERN, 2013).

A Terapia-alvo tem por intenção atuar diretamente nas células cancerosas e causar o menor número possível de danos às células saudáveis. Para este tipo de terapia são utilizados anticorpos monoclonais, capazes de limitar o crescimento do tumor. Os principais anticorpos utilizados até o momento são trastuzumabe e bevacizumabe. O trastuzumabe consiste em um anticorpo monoclonal

humanizado capaz de se ligar especificamente a receptores Her-2, suprimindo a proliferação de células em tumores que apresentam alta expressão da proteína Her-2. A combinação de trastuzumabe com quimioterapia levou a uma redução significativa na recorrência do câncer de mama e mortalidade de tumores Her2-positivos, quando utilizado como terapia adjuvante (PICCART-GEBHART et al., 2005; ROMOND et al., 2005; SLAMON et al., 2011). Por fim, bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra o fator de crescimento do endotelial vascular A (VEGF-A) que estimula a angiogênese, processo imprescindível para promoção do crescimento tumoral (WESTBROOK; STEARNS, 2013).

Entre os agentes citotóxicos citam-se:

1. Antimetabólicos: capecitabina, um pró-fármaco administrado por via oral e que é análogo da pirimidina 5-flourouracil (5-FU), utilizado com frequência no tratamento de cancer da mama metastático. Esse pró-fármaco é enzimaticamente convertido em 5-FU, que inibe a síntese de DNA em tumores, inibindo seu crescimento. Outro antimetabólico, a gemcitabina, um análogo de nucleosídeo, também interfere com a síntese do DNA, induzindo a apoptose em células tumorais;

2. Antimicrotúbulos: os taxanos paclitaxel e docetaxel que perturbam a despolimerização de microtúbulos e interferem com a formação do fuso mitótico durante a replicação celular, causando a morte celular;

3. Antraciclinas: a doxorrubicina e a epirrubicina foram amplamente utilizados no tratamento do câncer de mama durante várias décadas. Esta classe de drogas inibe a topoisomerase II e assim, induz a apoptose de células;

4. Ciclofosfamida: Consiste em um pró-fármaco muito importante para o tratamento do câncer de mama. Normalmente é incorporada a quimioterapia do câncer de mama como um adjuvante (WESTBROOK; STEARNS, 2013).

Por fim, a associação de terapias pode ser uma alternativa interessante, uma vez que pode melhorar a eficácia do tratamento e prolongar a vida do paciente.

Tradicionalmente, a cura do câncer tem sido considerada quando a doença é completamente eliminada do paciente e este passa a ter uma expectativa de vida normal, sem o risco de recorrência (HAYBITTLE, 1991). No entanto, mesmo com os mais avançados métodos de imagem ou laboratoriais de vigilância radiológica, é muito difícil ter a certeza de que o câncer foi totalmente erradicado, uma vez que o câncer apresenta tanto a doença macroscópica quanto a microscópica. Assim, mesmo quando a doença macroscópica foi eliminada, a doença microscópica pode persistir, e neste caso o câncer pode retornar após anos de remissão (LI et al., 2012).

2.0 Peçonhas de serpentes: fonte de moléculas bioativas

Devido à complexidade de tratamento do câncer, e aos diversos subtipos existentes, muito esforço tem sido focado na procura de drogas apropriadas para seu tratamento. Assim, a busca de novos fármacos em fontes alternativas de moléculas bioativas, consiste em uma abordagem bastante interessante.

O Brasil é um país com uma rica biodiversidade. As serpentes em nosso país são consideradas referencia para outros países tropicais, tanto zologicamente quanto ecologicamente (CHIPPAUX, 2015). As peçonhas de serpentes são fontes de substâncias bioativas com diversas atividades farmacológicas. Assim, os potenciais farmacológicos de componentes da peçonha, aliado as inovações em biotecnologia, possibilitam o descobrimento ou o design de novos fármacos.

As peçonhas de serpentes são compostas por uma mistura complexa de peptídeos e proteínas, sendo que sua composição pode variar de acordo com o gênero da serpente. Entretanto, independentemente do gênero, todas as peçonhas são ricas em substâncias biologicamente ativas (IWANAGA, 1979) que

atuam em importantes alvos fisiológicos das presas dos animais ou do homem, em casos de acidentes. Os principais tecidos-alvo das peçonhas são os sistemas nervoso e circulatório, os quais apresentaram intensas reações inflamatórias, causando a necrose do tecido.

As enzimas são abundantes nas peçonhas e incluem fosfolipases A_2 (PLA_2 s), hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAAOs), esterases, 5'-nucleotidases, NAD nucleosidades, metaloproteases e serinoproteases (STOCKER, 1990). Outros componentes também estão presentes: citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e em menor proporção lipídeos e aminoácidos livres (BIEBER, 1979; FREITAS et al., 1992).

Dentre os componentes enzimáticos que apresentam citotoxicidade, destacam-se as LAAOs e as PLA_2 s (PERUMAL SAMY et al., 2007; CISCOTTO et al., 2009; GEBRIM et al., 2009; COSTA TORRES et al., 2010), com ações antitumoral, antibacteriana e antiparasitária. Além disso, outras atividades biológicas interessantes estão associadas com componentes da peçonha, como a degradação de matriz extracelular (DE MORAES; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006) e inibição da adesão e migração de células tumorais (BAZAA et al., 2009).

Assim, dada às inúmeras ações farmacológicas associadas aos componentes das peçonhas de serpentes, estas apresentam grande potencial para a terapêutica do câncer (VYAS, BRAHMBHATT et al. 2013), seja atuando na destruição de células tumorais ou inibindo a adesão e migração celular.

2.1. As Fosfolipases A_2

As fosfolipases A_2 (PLA_2 s, EC 3.1.1.4) são enzimas capazes de clivar fosfolipídeos na posição *sn*-2, gerando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (ARNI; WARD, 1996; KINI, 2005). Fisiologicamente, as PLA_2 s são responsáveis pela liberação de ácido araquidônico, um ácido graxo que é precursor na produção de hormônios eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e

leucotrienos) (FUNK, 2001). Assim, as PLA₂s estão relacionadas com diferentes efeitos biológicos, gerados por meio de ativação de vias de sinalização celular.

As PLA₂s encontram-se amplamente distribuídas em diversos organismos vivos e de acordo com a origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfeto são divididas em 15 classes, as quais podem ser agrupadas em 5 categorias, a saber: PLA₂ secretória (sPLA₂), PLA₂ citosólica (cPLA₂), PLA₂ independente de Ca²⁺ (iPLA₂), PAF–acetilhidrolases (PAF-AH) e por fim, as PLA₂s lisossomais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

O grupo das iPLA₂ possuem massa molecular entre 28 e 146 kDa e no sítio catalítico apresentam um resíduo de Serina. As PAF-AH são abundantes em mamíferos, principalmente no sistema nervoso central e em plaquetas. As cPLA₂ tem ação catalítica dependente de Ca²⁺ e são caracterizadas por apresentar massa molecular variando de 61 a 114 kDa; por conter no sítio catalítico resíduos de Serina e Aspartato; e por hidrolisar preferencialmente glicerofosfolídeos contendo ácido araquidônico na posição *sn*-2. As PLA₂s lisossômicas contém uma tríade conservada dos resíduos Ser-His-Asp e quatro resíduos de Cisteína, essenciais para a atividade catalítica (BURKE; DENNIS, 2009b).

As sPLA₂ constituem a classe de PLA₂s com maior diversidade e melhor descrição na literatura. As sPLA₂ apresentam baixo peso molecular, sua catálise é dependente de Ca²⁺ e podem ser distribuídas entre os grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII e XIV. As sPLA₂ presentes nas peçonhas de serpentes estão reunidas nos grupos I e II (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; BURKE; DENNIS, 2009b) e apresentam de 119 a 143 resíduos de aminoácidos, com peso molecular variando de 13 a 18 kDa. As enzimas do grupo I são comumente encontradas em peçonhas da família *Elapidae* e *Hydrophidae*, enquanto que as do grupo II são encontradas principalmente em peçonhas de serpentes da família *Viperidae* (DE OLIVEIRA et al., 2001).

Ainda, as sPLA₂ isoladas de peçonhas de serpentes podem ser divididas em dois subgrupos principais, Asp-49 (D49) e Lys-49 (K49), dependendo de qual aminoácido está presente na posição 49 da estrutura primária (OWNBY et al.,

1999; BURKE; DENNIS, 2009a; BURKE; DENNIS, 2009b; VYAS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). As PLA₂s com Asp-49 são enzimaticamente ativas, enquanto que as Lys-49 tem pouca ou nenhuma atividade enzimática, embora ambos os tipos sejam biologicamente ativos (COGO et al., 2006). A falta de atividade é devido à presença da Lisina na posição 49, que impede a ligação do íon cálcio à proteína, que constitui um passo essencial para a atividade fosfolipásica. Apesar da falta de atividade catalítica, as PLA₂s Lys-49 possuem atividade citotóxica, a qual é atribuída a uma coleção de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos presentes na região C-terminal da PLA₂ (PERUMAL SAMY et al., 2007; NEVALAINEN; GRAHAM; SCOTT, 2008).

As PLA₂s de peçonhas ofídicas estão envolvidas normalmente em diversos processos fisiológicos, tais como edema, hipotensão, agregação plaquetária, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (DENNIS, 1994; TEIXEIRA et al., 2003; KINI, 2005; DE ALVARENGA et al., 2011; GUIMARAES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015), o que gera grande interesse médico-científico. As maiorias das atividades biológicas estão relacionadas com a desestabilização de membranas biológicas e geração de moléculas sinalizadoras (DENNIS, 1994; BURKE; DENNIS, 2009a; ALOULOU et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015). Assim, as PLA₂s de peçonhas tornaram-se alvos constantes de investigação.

Uma Lys49-PLA₂, purificada da peçonha da serpente *Daboia russelli pulchella* e denominada VRV-PL-VIII-A, exibe potente atividade antibacteriana, atuando contra bactérias patogênicas humanas gram-positivas e gram-negativas, (SUDHARSHAN; DHANANJAYA, 2015). Além da ação antibacteriana, as PLA₂s podem apresentar atividade antiparasitária, como é o caso de uma Lys49-PLA₂ (BnSP-7) da peçonha de *Bothrops pauloensis* que mostrou atividade citotóxica contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, reduzindo a viabilidade e interferindo na capacidade infecciosa do parasito (NUNES et al., 2013).

Ainda, algumas PLA₂s de peçonha de serpentes tem sido associada com atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro*. Três Asp49-PLA₂s purificadas da peçonha

de *Naja naja naja* (NN-I2C-PLA₂, NN-I2D-PLA₂ e NN-I2C-PLA₂) enzimaticamente ativas apresentaram efeito citotóxico *in vitro* em células de tumor de Ehrlich (RUDRAMMAJI; GOWDA, 1998). Outra atividade interessante foi a citotoxicidade de três PLA₂s de *Bothrops mattogrossensis*, denominadas BmatTX-I e BmatTX-II homólogas (Lys-49) e BmatTX-III (Asp-49), em células de leucemia humana de células T (JURKAT) e adenocarcinoma da mama Her-2 positivas (SK-BR-3). As toxinas BmatTX-I e BmatTX-III foram citotóxicas para ambas as linhagens tumorais reduzindo em aproximadamente 80% o crescimento *in vitro* (DE MOURA et al., 2014). Yan e colaboradores investigaram a atividade antitumoral de uma crotoxina (CrTx), uma PLA₂ formada por um complexo não covalente com duas subunidades (uma ácida e uma básica) de *Crotalus durissus terrificus*, que foi capaz de induzir a morte celular em linhagens de leucemia (K562) por apoptose e autofagia. Neste caso, a citotoxicidade foi associada com dano mitocondrial e consequente ativação da caspase-3. (YAN et al., 2006) Em outro trabalho o mesmo grupo avaliou a citotoxicidade por MTT e atividade da LDH em células de câncer de mama (MCF-7) tratadas com diferentes concentrações da crotoxina, na presença e na ausência de inibidores de caspase. Foi observada uma redução na viabilidade celular do tipo dose-tempo-dependente e um estímulo no processo autofágico revelado pelo aumento na formação de autofagossomas e presença de vacúolos fluorescentes marcados monodansilcadaverina, um marcador de autofagia (YAN et al., 2007).

Como comentado anteriormente, a citotoxicidade de PLA₂s pode estar associada com a porção C-terminal da proteína. Um estudo mostrou que a modificação química de uma Asp49-PLA₂ da peçonha de *Macrovipera lebetina transmediterranea* (MVL-PLA₂) com p-bromo-phenacyl bromide (BPB), promoveu inibição da atividade enzimática da toxina. Entretanto, tal modificação não resultou em alteração da atividade anti-tumoral em células de melanoma e fibrosarcoma, sugerindo que a ação citotóxica é distinta do sítio catalítico da toxina (BAZAA et al., 2009).

Em nosso Laboratório foram purificadas duas Lys49-PLA₂s cataliticamente inativas (BnSP-6 e BnSP-7) obtidas da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Ambas

as fosfolipases estão associadas com diversos efeitos biológicos, incluindo miotoxicidade, formação de edema, inflamação, neurotoxicidade e necrose. A PLA₂-BnSP-7, como comentado anteriormente, exibe potencial citotóxico contra *Leishmania*, reduzindo a viabilidade e proliferação do parasito, além de causar mudanças relevantes na ultraestrutura do promastigota (NUNES et al., 2013). Essa mesma toxina apresentou atividade bactericida em concentrações variando de 20 a 60 µM (SOARES et al., 2000). A PLA₂-BnSP-6 possui massa molecular de 13.420 Da, 122 resíduos de aminoácidos, apresenta-se na forma dimérica, possui alto conteúdo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos e ponto isoelétrico (PI) de 8.6. Essa fosfolipase também não apresenta atividades fosfolipásica ou coagulante (RODRIGUES et al., 1998; MAGRO et al., 2003). Por fim, sua estrutura exibe semelhança com outras PLA₂-Lys-49, bem como em sua composição de aminoácidos.

A PLA₂-BnSP-6, homóloga a PLA₂-BnSP-7, ainda não foi submetida a ensaios que avaliem seu potencial citotóxico em microrganismos ou células tumorais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico da PLA₂-BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB 231). Na sequência serão apresentados os resultados da avaliação do efeito da toxina na viabilidade celular e em diferentes mecanismos de morte celular (necrose, apoptose e autofagia). Adicionalmente, foi analisada a capacidade da toxina em interferir com a adesão e migração celular, processos considerados essenciais para a progressão do tumor.

Referências

ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. . **Biologia Molecular da Céula**. Artmed, 2010.

ALOULOU, A. et al. Phospholipases: an overview. **Methods Mol Biol**, 861, 63-85,2012.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂--a structural review. **Toxicon**, 34, 827-841,1996.

ASPARUHOVA, M. B. et al. Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling. **Mol Oncol**, 2015.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol**, 28, 188-193,2009.

BIEBER, A. L. Metal and non-protein constituents in snake venoms. **Springer**, pp. 295–304,1979.

BODAI, B. I.; TUSO, P. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations. **Perm J**, 19, 48-79,2015.

BOYD, J. Genetic predisposition to breast cancer: the next chapters. **Cancer**, 120, 932-934,2014.

BRAKEBUSCH, C. et al. Integrins in invasive growth. **J Clin Invest**, 109, 999-1006,2002.

BRASIL, M. D. S. Estimativas câncer mama 2014. 2015. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=13> >. Acesso em: maio.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther**, 23, 49-59,2009a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 50 Suppl, S237-242,2009b.

BURSCH, W. et al. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. **Toxicology**, 254, 147-157,2008.

CHENG, Y. C.; UENO, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer**, 19, 191-199,2012.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 21, 13,2015.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, 53, 330-341,2009.

COGO, J. C. et al. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, 88, 1947-1959,2006.

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **Br J Cancer**, 55, 61-66,1987.

COOPER, D. M. et al. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **J Appl Physiol** (1985), 103, 700-709,2007.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, 55, 795-804,2010.

D'ORSI, C. et al. Current realities of delivering mammography services in the community: do challenges with staffing and scheduling exist? **Radiology**, 235, 391-395,2005.

DE ALVARENGA, E. S. et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 57, 100-108,2011.

DE MORAES, C. K.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metallopeptidase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. **Toxicon**, 48, 641-648,2006.

DE MOURA, A. A. et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **Biomed Res Int**, 2014, 195356,2014.

DE OLIVEIRA, A. H. et al. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, 40, 6912-6920,2001.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, 269, 13057-13060,1994.

EISEN, M. B.; BROWN, P. O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Methods Enzymol.**, 303, 179-205,1999.

ELLIS, I. O. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. **Mod Pathol**, 23 Suppl 2, S1-7,2010.

ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **Jama**, 293, 1245-1256,2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, 35, 495-516,2007.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 **Breast Cancer**

Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, p. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013, 2015. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx >. Acesso em: 25 junho de 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, E359-386,2015.

FERREIRA, C. D. S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 56, 715-718,2010.

FILHO, G. B. **BOGLIOLO PATOLOGIA**. 8. 2006.

FREITAS-JÚNIOR, M. B. C. M. A. R. M. L. R. S. R. Molecular subtypes of breast cancer. **Femina**, 39 n°10, 2011.

FREITAS, M. A. et al. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, 30, 461-464,1992.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, 294, 1871-1875,2001.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, 19, 107-120,2012.

GEBRIM, L. C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, 37, 222-229,2009.

GOZUACIK, D. et al. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. **Cell Death Differ**, 15, 1875-1886,2008.

GUIMARAES, C. L. et al. Alkylation of histidine residues of *Bothrops jararacussu* venom proteins and isolated phospholipases A₂: a biotechnological tool to improve the production of antibodies. **Biomed Res Int**, 2014, 981923,2014.

HAMAJIMA, N. H., K. TAJIMA, K. ROHAN, T. CALLE, E. E. HEATH, C. W., JR. COATES, R. J. LIFF, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer**, 87, 1234-1245,2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, 646-674,2011.

HAYBITTLE, J. L. Curability of breast cancer. **Br Med Bull**, 47, 319-323,1991.

HELMRICH, S. P. et al. Risk factors for breast cancer. **Am J Epidemiol**, 117, 35-45,1983.

IAC LAKHANI, S. R., ELLIS. I.O., SCHNITT, S.J., TAN, P.H., VAN DE VIJVER, M.J. **WHO Classification of Tumours of the breast**. 4: 240 p. 2014.

INCA, I. N. D. C. Câncer de mama feminino: Estimativas 2014. 2014a. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: Junho.

INCA, I. N. D. C. Tipos de Câncer. 2014b. Disponível em: < www.inca.gov.br/ >. Acesso em: Maio.

IWANAGA, S. S., T. Enzymes in snake venom. In: SPRINGER (Ed.). In: **Lee CY (ed.) Snake venoms**. Berlin Heidelberg New York, 1979. p.91-102.

JEANES, A.; GOTTARDI, C. J.; YAP, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, 27, 6920-6929, 2008.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, 9, 239-252, 2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, 119, 1420-1428, 2009.

KAO, K. J. et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. **BMC Cancer**, 11, 143, 2011.

KARRETH, F. T., D. A. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. **Cancer Biol Ther**, 3, 1058-1059, 2004.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, 45, 1147-1161, 2005.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, 4, 151-175,2008.

KROEMER, G.; MARINO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell**, 40, 280-293,2010.

KUMA, A.; MIZUSHIMA, N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. **Semin Cell Dev Biol**, 21, 683-690,2010.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**, 6, 463-477,2004.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, 91, 479-489,1997.

LI, X. R. et al. DW-MRI ADC values can predict treatment response in patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. **Med Oncol**, 29, 425-431,2012.

MARTIN, A.; CANO, A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. **Nat Cell Biol**, 12, 924-925,2010.

MATHEW, R. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. **Cell**, 137, 1062-1075,2009.

MATHEW, R.; WHITE, E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 76, 389-396,2011.

MCPHERSON, K. Where are we now with hormone replacement therapy? **Bmj**, 328, 357-358,2004.

MCPHERSON, K. Screening for breast cancer--balancing the debate. **Bmj**, 340, c3106,2010.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj**, 321, 624-628,2000.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. **Sci Signal**, 4, mr2,2011.

MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, 2445-2462,2004.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes Dev**, 21, 2861-2873,2007.

MORSELLI, E. et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1793, 1524-1532,2009.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochim Biophys Acta**, 1781, 1-9,2008.

NUNES, D. C. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, 140, 844-854,2013.

NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, 59, 667-671,2012.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, 37, 411-445,1999.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406, 747-752,2000.

PERUMAL SAMY, R. et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **J Appl Microbiol**, 102, 650-659,2007.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 353, 1659-1672,2005.

PIEROBON, M.; FRANKENFELD, C. L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, 137, 307-314,2013.

QU, X. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. **J Clin Invest**, 112, 1809-1820,2003.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, 330, 1344-1348,2010.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, 12, 207,2010.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, 90, 1383-1435,2010.

RENATUS, M. et al. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, 14250-14255,2001.

RODRIGUES, V. M. et al. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Curr Top Med Chem**, 15, 670-684,2015.

RODRIGUES, V. M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 121, 215-222,1998.

ROMÁN, M. et al. Trends in Detection of Invasive Cancer and Ductal Carcinoma *In Situ* at Biennial Screening Mammography in Spain: A Retrospective Cohort Study. **PLoS ONE**, 8, 2013.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 353, 1673-1684,2005.

RUBINSZTEIN, D. C.; CODOGNO, P.; LEVINE, B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 11, 709-730,2012.

RUDRAMMAJI, L. M.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, 36, 921-932,1998.

SAMALI, A.; GORMAN, A. M.; COTTER, T. G. Apoptosis -- the story so far. **Experientia**, 52, 933-941,1996.

SARRIO, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res**, 68, 989-997,2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, 1761, 1246-1259,2006.

SCHULTZ, D. R.; HARRINGTON, W. J., JR. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Semin Arthritis Rheum**, 32, 345-369,2003.

SCHUTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHER, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, 655-662,2008.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, 7, 253-266,1973.

SHIMIZU, M. et al. A newly synthesized compound, 4'-geranyloxyferulic acid-N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in male mice. **Int J Cancer**, 135, 774-784,2014.

SLAMON, D. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 365, 1273-1283,2011.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, 378, 201-209,2000.

SORLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, 7, 127,2006.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: (Ed.). **Medical Use of Snake Venom Proteins**: CRC Press, 1990. p.33 - 56. .

SUDHARSHAN, S.; DHANANJAYA, B. L. Antibacterial potential of a basic phospholipase A₂ (VRV-PL-VIIIa) from *Daboia russelii pulchella* (Russell's viper) venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 21, 17,2015.

TAO, Z. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochem Biophys**, 2014.

TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, 42, 947-962,2003.

THORBURN, A.; THAMM, D. H.; GUSTAFSON, D. L. Autophagy and cancer therapy. **Mol Pharmacol**, 85, 830-838,2014.

TOMAO, F. et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. **Onco Targets Ther**, 8, 177-193,2015.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, 12 Suppl 2, 1528-1534,2005.

VERONESI, U. et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **N Engl J Med**, 347, 1227-1232,2002.

VOSS, M. J. et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. **BMC Cancer**, 11, 158,2011.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, 3, 156-162,2013.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. **Apoptosis**, 7, 449-459,2002.

WEI, X. L. et al. ERalpha inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing Bmi1 in breast cancer. **Oncotarget**, 2015.

WESTBROOK, K.; STEARNS, V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. **Pharmacol Ther**, 139, 1-11,2013.

WHO, W. H. O.-. Breast cancer: prevention and control. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html> >. Acesso em: 25 junho.

WILLIAMS, M. M.; COOK, R. S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? **Oncotarget**, 6, 3519-3530,2015.

YAN, C. H. et al. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, 47, 521-530,2006.

YAN, C. H. et al. Autophagy is involved in cytotoxic effects of *crotoxin* in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin**, 28, 540-548,2007.

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell**, 117, 927-939,2004.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, 21, 501-515,2013.

YUE, Z. et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, 15077-15082,2003.

ZOU, H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, 90, 405-413,1997.

CAPÍTULO 2

**Human breast cancer cell death induced by BnSP-6 a Lys-49 PLA₂
homologue from *Bothrops pauloensis* venom**

Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo¹, Daiana Silva Lopes¹, Sarah Natalie Gimenes¹, David Collares Achê, Lara Vechi², Patrícia Terra Alves², Denise de Oliveira Guimarães¹, Renata Santos Rodrigues^{1, c}, Luiz Ricardo Goulart², Veridiana de Melo Rodrigues^{1, c, *}, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama^{1, *}.

¹Laboratory of Biochemistry and Animal Toxins, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, UFU, Uberlandia-MG, Brazil;

²Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, UFU, ^cINCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Dr. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama

E-mail: kelly@ingeb.ufu.br, veridiana@ingeb.ufu.br

Phone: +55 34-3225-8436 r 22 Fax: +55 34-3225-8436 r 24.

Laboratory address: Pará Avenue, 1720. CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brazil.

Resumo

PLA₂s isoladas da peçonha de serpentes exibem várias atividades biológicas e atualmente, tem sido relacionadas com várias propriedades antitumorais e anti-angiogênicas. Neste trabalho mostramos os efeitos da fosfolipase A₂ (BnSP-6), uma Lys-49, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em células MDA-MB-231 de câncer da mama humano. A PLA₂-BnSP-6, apresentou citotoxicidade dose-dependente nas concentrações de 12,5 a 100 mg/mL e inibiu a adesão celular. Interessantemente, o potencial citotóxico da BnSP-6 foi relativamente menor em MCF10A, uma linhagem de célula epitelial mamária normal, sugerindo uma possível preferência da PLA₂ por alvos em células tumorais. Nas análises de morte celular a BnSP-6 estimulou o processo de autofagia em células MDA-MB-231, como observado pela marcação de vacúolos autofágicos. Em ensaios de apoptose/necrose as células MDA-MB-231 cultivadas na presença de BnSP-6 (10 e 50 ug/mL) apresentaram indução tanto na apoptose inicial quanto tardia. A apoptose também foi confirmada em células MDA-MB-231 pelo aumento na expressão de vários genes relacionados às vias de apoptose, tais como TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A e CASP8 e também pela diminuição na expressão de genes anti-apoptóticos (BCL2 e BCL2L). Além da influencia na expressão de genes de vias apoptóticas, a BnSP-6 também causou notável aumento na expressão dos genes de supressão tumoral BRCA2 e TP53. Finalmente, a BnSP-6 induziu redução na expressão do gene de Angiopoietina-1 (fator pró-angiogênico), bem como na adesão e migração de células MDA-MB-231, sugerindo aplicações terapêuticas para esta PLA₂ como agente anti-angiogênico e anti-metastático. Em conjunto, nossos resultados confirmam que a PLA₂-BnSP-6 apresenta potencial antitumoral, podendo ser explorada como protótipo para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer.

Palavras chave: Fosfolipases A₂, Câncer de mama, Toxinas de serpentes, Apoptose, Autofagia, Migração celular.

Abstract

PLA₂s from snake venom display various biological activities and currently, has been reported that have antitumor and antiangiogenic properties. This work shows the effects of phospholipase A₂ (BnSP-6), a Lys 49 isolated from *Bothrops pauloensis* venom, on human breast cancer MDA-MB-231 cell. PLA₂ BnSP-6 caused a dose-dependent cytotoxicity at concentrations of 12.5 - 100 µg/mL and inhibited the cell adhesion. Interestingly the cytotoxic potential of BnSP-6 was significantly lower against MCF10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell line, suggesting that the PLA₂ presented a possible preference for targets in cancer cells. Analysis of cell death showed that BnSP-6 stimulated the autophagy process on MDA-MB-231 cell, as evidenced by labeling of autophagic vacuoles. Moreover, apoptosis/necrosis assays showed that MDA-MB-231 cell cultured in presence of BnSP-6 (10 and 50 µg/mL) presented induction of both early and late apoptosis. Apoptosis of MDA-MB-231 cells was also confirmed by up regulation of different genes related to apoptosis pathway, such as TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A and CASP8 and decrease of anti-apoptotic genes expression (BCL2 and BCL2L). In addition, BnSP-6 caused remarkable gene expression increased of tumors suppressor BRCA2 and TP53. Finally, BnSP-6 induced down-regulation of Angiopoetin 1 gene (potent pro-angiogenic factor) and inhibited adhesion and migration of MDA-MB-231 cells suggesting pharmaceutical applications to this PLA₂ as an antiangiogenic and anti-metastatic therapeutic agent. Taken together our results showed that PLA₂ BnSP-6 presented antitumor potential that can be exploited as prototype for the design of new anticancer therapies.

Keywords: Phospholipases A₂, Snake venom, Breast cancer, Apoptosis, Autophagy, Cell migration.

1. Introduction

Cancer is a multifactorial disease, characterized by uncontrolled cell division due to molecular changes such as mutations and chromosomal instabilities. These alterations can result in self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth-inhibitory (antigrowth) signals, limitless replicative potential, evasion of programmed cell death (apoptosis), sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis (HANAHAH; WEINBERG, 2000; SORLIE et al., 2006; HANAHAH; WEINBERG, 2011).

This disease has been considered an important public health problem since it is among the leading causes of morbidity and mortality worldwide, accounting for 8.2 million deaths in 2012 (STEWART, 2014). In this scenario, breast cancer has been characterized as the second most common disease worldwide among women (WHO, 2014).

Breast cancer is a complex disease that presents many subtypes with different biological features and that consequently requires different therapies. The search for new drugs for cancer therapy from natural resources is one important topic of biomedical research. In this context many toxins from snake venoms have been investigated as a possible treatment for cancer (RUDRAMMAJI; GOWDA, 1998; YAN et al., 2006; YAN et al., 2007; DE MOURA et al., 2014); among these compounds are metalloproteinases, disintegrins, C-type lectins and phospholipases A₂ (ANDRILAO-ESCARSO et al., 2002; CORREA et al., 2006; GEBRIM et al., 2009; KLEIN et al., 2011; VYAS et al., 2013; CALDERON et al., 2014).

PLA₂s are enzymes responsible for some toxic and/or pharmacological effects such as myotoxicity, neurotoxicity, hemolysis, hypotension, anticoagulant action, edema and platelet disturbances (TEIXEIRA et al., 2003; DE ALVARENGA et al., 2011). Besides their pathophysiological effects, they have also shown therapeutic potential, due to their microbicide, antiplatelet, anti-angiogenesis, antiparasitic, hypotensive and antitumor activities (YAN et al., 2006; YAN et al., 2007; NUNES et al., 2013; SUDHARSHAN; DHANANJAYA, 2015).

Many studies have explored the antitumor effect of PLA₂s by assessing their capacity to inhibit tumor mass growth (RUDRAMMAJI; GOWDA, 1998), cell adhesion and migration (BAZAA et al., 2009) and angiogenesis (BAZAA et al., 2009; KESSENTINI-ZOUARI et al., 2010). These toxins are also able to interfere with viability by inducing cell death by autophagy or apoptosis (YAN et al., 2006; YAN et al., 2007).

About 27% of *Bothrops pauloensis* venom consists of PLA₂s, according to proteomic studies (RODRIGUES et al., 2012), which are considered a promising source of therapeutic models (RODRIGUES et al., 2015) for treatment of different illness. From this venom, different Lys-49 and Asp-49 PLA₂ isoforms including basic (BnSP-6, BnSP-7, BnpTX-I and BnpTX-II) (RODRIGUES et al., 1998; MAGRO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004) and acidic phospholipases A₂ (Bp-PLA₂ and BpPLA₂ TX-I) (RODRIGUES et al., 2007; FERREIRA et al., 2013) have already been isolated and analyzed, both biochemically and structurally. Some of these toxins were capable of inhibiting bacteria, parasites and tumor growth (RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; FERREIRA et al.,

2013; NUNES et al., 2013). BnSP-6 is a Lys-49 PLA₂ homologue isolated from *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 1998), but in contrast to other PLA₂s from this venom, it has not yet been investigated in relation to its therapeutic potential. Thus, considering all the pharmacological potential of PLA₂s as a structural model for drug design for cancer therapy, herein we describe the mechanisms of cell death induced by the Lys-49 PLA₂ known as BnSP-6 in the human breast cancer cell MDA-MB-231 (Basal-like subtype).

2. Materials and methods

2.1. Venom

Bothrops pauloensis crude venom was collected from snakes kept at Serpentarium Bioagents, LTDA, Batatais-SP, Brazil. This serpentarium is registered in the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (number 471301). This study was authorized by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil for access to and remittance of genetic patrimony (number 010 453/2014-8).

2.2. Lys-49 BnSP-6 purification and N-terminal sequence

BnSP-6 was purified from *Bothrops pauloensis* venom as previously described by Rodrigues et al., 1998 with minor modifications. Briefly, crude venom (200 mg) was dissolved in 2 mL of 50 mM ammonium bicarbonate (AMBIC) pH 7.8 and centrifuged at 3000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was submitted to an ion-exchange chromatographic column CM-Sepharose (Amersham Biosciences, Brazil) fast flow and fractions of 1mL/tube were collected at 6.5 mL/h

(flow rate by a collector Redifrac fraction (Amersham Biosciences of Brazil Ltda). Fractions containing PLA₂ (BnSP-6) were monitored by Ultrospec 1000 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Brazil) by absorbance at 280 nm, lyophilized and stored at -20 °C. BnSP-6 was rechromatographed by reverse-phase chromatography (RP-HPLC) C18 column (GE healthcare-Life sciences, Brazil). The column was equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid, 4% acetonitrile) and eluted with a concentration gradient of solvent B (0.1% trifluoroacetic acid, 80% acetonitrile) from 0% to 100%, at a flow rate of 0.5 mL/min for 33 min. The single peak ABS 280 nm was lyophilized and stored at -20°C and later was submitted on 12.5% SDS PAGE (v/v) according to a previous description (LAEMMLI, 1970).

The amino-terminal sequence of the first 34 amino acid residues of BnSP-6 was obtained by the Edman degradation method of protein sequencing (EDMAN; BEGG, 1967). Purified proteins were directly applied on a glass fiber membrane (Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, JP) and subjected to analysis in an PPSQ-33A automatic protein sequencer (Shimadzu, Columbia, US). PTH-amino acids were chromatographed on a reverse phase column with isocratic gradient. The quantification and identification of amino acid residues were carried out by comparing the retention times of the standard amino acids (25 pmol), chromatographed before sequencing. The N-terminal amino acid sequence of BnSP-6 was aligned with sequences available in the Gene Bank and Swiss-Prot databases using the Clustal program (THOMPSON; FRENCH, 1994).

2.3. Cell culture

MDA-MB-231 (Basal-like subtype), a human breast cancer cell line, and MCF10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell line, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA). The MDA-MB-231 cells were maintained in IMDM medium (Sigma, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (complete IMDM) at 37°C and 5% CO₂. MCF10A cells were maintained in DMEM F12 medium (Sigma, Brazil) supplemented with EGF 20 ng/mL, hydrocortisone 0.5 µg/mL and insulin 10 µg/mL (Invitrogen, Brazil) with 10% FBS (Cultilab, Brazil), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma, Brazil) at 37°C and 5% CO₂.

2.4. Cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays on MDA-MB-231 and MCF10A cells treated with BnSP-6 were performed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method as described below. The cells (4×10^4 cells/well) were placed on a 96-well plate to test for adhesion. Adhering cells were incubated with complete IMDM in the absence (control cells) or presence of different concentrations of BnSP-6 for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h the cells were incubated with MTT reagent (5 mg/mL, 20 µL/well) for 3 h. The formazan crystals were dissolved by 100 µL of phosphate buffered saline (PBS) containing 10% SDS and 0.01 N HCl. The optical density was determined at 570 nm in a plate reader (Multiskan GO Thermo Scientific, USA).

2.5. Autophagy assay

Autophagic vacuoles were labeled with monodansylcadaverin (MDC, Sigma Brazil). Briefly, cells were placed into microplates and incubated with BnSP-6 (50 µg/mL) for 24 h. IMDM complete containing 0.05mmol/L MDC was added and the cells were incubated at 37°C for 10 min. After incubation, cells were washed with PBS and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde for 15 min. Lastly the cells were washed with PBS 3 times and the microplates were analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss LSM510, Germany).

2.6. Apoptosis analysis

MDA-MB-231 cells (2×10^5 /well) were placed in 12-well culture plates and maintained at 37°C, in 5% CO₂, for 24 h. Adhering cells were incubated for 24 h with complete IMDM in the absence (control cells) or presence of BnSP-6 (10 and 50 µg/mL). In the next step, the cells were incubated with a specific binding buffer containing 5 µL of annexin V-FITC and 2 µg/mL propidium iodide (BD Bioscience, Brazil) for 30 min at 25°C, protected from light. After incubation the cells were analyzed by flow cytometry (BD Accure C6, USA). The percentages of apoptotic cells were determined using the software FlowJo.

2.7. Total RNA isolation and RT-PCR

MDA-MB-231 cells were incubated with BnSP-6 (50 µg/ml) for 24h and total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen, Brazil) according to the manufacturer's protocol. The cDNAs were synthesized by a reverse transcription system (GoScript® Kit PROMEGA, Brazil). The reverse transcription was carried

out at 42°C for 1 h followed by incubation at 70°C for 15 min. Real-time PCR experiments were performed using SYBR Green PCR master mix (LGC Biotecnologia, Brazil) in a Thermal Cycler (ABI 7300 - Applied Biosystem, USA). The following thermal cycling protocol was used: 95°C for 10 sec, 58°C for 45 sec (50 cycles). The primers were purchased from GO GENONE – HCAN-1®, Brazil). The results were normalized using β -actin as a housekeeping gene and analyzed by a comparative threshold cycle method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.8. Cell Adhesion assay

MDA-MB-231 cells (4×10^4 cells/well) previously incubated for 30 min at 37°C with complete IMDM containing BnSP-6 (3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$) or without BnSP-6 (control cells) were added to a 96-well plate. After 2 h, the detached cells were removed by two careful washes with PBS. The adherent cells were quantified by the MTT assay as described in item 2.4. The reaction intensity was measured by optical density at 570 nm using a microplate reader (Multiskan GO Thermo Scientific, USA).

2.9. Wound-healing assay

Cell migration was examined by a wound-healing assay (CHIU et al., 2011). Briefly, a total of 3×10^6 cells/well were seeded onto 24-well plates. After complete confluence was achieved, the culture cell monolayers were scratched using a plastic pipette tip. Then, the cell monolayers were incubated for 24h with IMDM medium in the absence (control cells) or presence of BnSP-6 (50 $\mu\text{g/mL}$). The

cellular confluence was analyzed in an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100, Japan).

2.10. Statistical analysis

The results were presented as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significance values were compared to controls with either Student's t-test or one-way ANOVA, followed by Tukey's test using the software Prism GraphPad 5 (GraphPad Software, Inc). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Isolation of BnSP-6 PLA₂

BnSP-6 PLA₂ was purified after a combination of two chromatography steps, CM Sepharose chromatography (Fig. 1A) and reverse-phase chromatography (RP-HPLC) (Fig. 1B). The homogeneity of this PLA₂ was corroborated by SDS-PAGE and N-terminal sequence (Fig. 1C and Fig. 1D). The purified protein consists of a single polypeptide chain with M_r (13.4 kDa) and its N-terminal sequence (thirty-four amino acid residues) was identical with protein sequence described in protein data bank (PDB access number: 1PC9A) (Fig. 1 D).

3.2. Cytotoxic effect of BnSP-6 on MDA-MB-231 cells

BnSP-6 displayed cytotoxicity against the MDA-MB-231 cell line. The PLA₂ reduced the viability in a dose-dependent manner, damaging about 10 to 45% of MDA-MB-231 cells at concentrations of 12.5-100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2A). Interestingly,

the cytotoxic potential of BnSP-6 was significantly lower against MCF10A, a non-tumorigenic breast epithelial cell line (Fig. 2B).

3.3. Cell death induced by BnSP-6 in MDA-MB-231 cells

BnSP-6 stimulated autophagic processes in MDA-MB-231 cells as evidenced by the appearance of punctuate monodansylcadaverine (MDC) fluorescence in the cytoplasm cells whereas no fluorescence was observed in the cytoplasm of control cells (Fig. 3). Furthermore, analysis by flow cytometry of cells after binding with annexin V/FITC and propidium iodide showed increase of apoptotic cells in MDA-MB-231 incubated with BnSP-6 for 24h (Fig. 4A). PLA₂ transformed 19.5% and 27.7% of MDA-MB-231 cells into early apoptotic cells and 35.6% and 65.3% of cells into late apoptotic cells when incubated with 10 and 50 µg/mL of PLA₂, respectively. Low percentages of necrotic cells were observed in BnSP-6-treated cells. Control MDA-MB-231 cells showed, as expected, low percentages of necrotic and apoptotic cells (Fig. 4B).

3.4. Gene expression of apoptosis mediators in MDA-MB-231 cells induced by PLA₂ BnSP-6

Gene expression of apoptosis-inducing signaling molecules was evaluated in MDA-MB-231 cells after culturing in the presence of BnSP-6 (Table 1). TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A and CASP8 genes were up-regulated while BCL2, BCL2L, BAX and BAD were down-regulated in MDA-MB-231 cells. P53 and BRCA2 genes, which are related to tumor suppressor markers, were stimulated by

BnSP-6 treatment. Furthermore, BnSP-6 was able to decrease expression of BIRC5 (anti-apoptotic gene) and ANG1 (pro-angiogenic factor) (Table 1).

3.5. Influence of BnSP-6 on adhesion and migration of MDA-MB-231 cells

Cell adhesion and migration play a key role in the metastatic process. As shown in Fig. 6, BnSP-6 inhibited the adhesion of MDA-MB-231 cells even in the presence of very low concentrations (3.125 µg/mL), an inhibitory effect that was dose-dependent. In addition, the wound healing assay (Fig. 7) showed that BnSP-6 (50 µg/mL) significantly abolished cellular migration when compared to control cells.

4.0. Discussion

BnSP-6 is a Lys49 PLA₂ previously isolated from *B. pauloensis* venom by Rodrigues et al. (1998). Some studies have provided evidence that snake venom toxins, such as PLA₂, show great potential as a prototype for the design of anti-tumor drugs (ARAYA; LOMONTE, 2007; MAITY et al., 2007; YAN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; KHUNSAP et al., 2011). Thus, in this present study we report antitumoral effect of Lys49-PLA₂ BnSP-6 upon a breast-cancer-cell line. Initially, we isolated BnSP-6 PLA₂ (Fig. 1) and the N-terminal sequence (thirty-four amino acid residues) of BnSP-6 PLA₂ isolated in the present study revealed complete identity with protein sequence previously (Fig. 1 D).

After confirming the homogeneity of BnSP-6, we evaluated the capacity of this protein to induce MDA-MB-231 cellular death by different approaches. This PLA₂ induced a dose-dependent cytotoxic activity on MDA-MB-231 cells (Fig. 2A) and interestingly, sub-toxic doses (6.25 µg/ml) of this toxin produced a remarkable effect on cell adhesion (Fig. 6). Furthermore, BnSP-6 exhibited a selective cytotoxic action according to cell type, showing lower toxicity in MCF10A cells when compared to toxicity in MDA-MB-231 cells (Fig. 2B). MCF10A cells corresponding to a non-tumorigenic breast epithelial cell line, suggesting thereby that the toxin presents a possible preference for targets in cancer cells. Some Lys49-PLA₂s have been investigated as to their cytotoxic potential upon different cancer cell lines. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induced cytotoxicity on Jurkat, B16F10 and S180 cell lines (GEBRIM et al., 2009). MjTX-II, a myotoxic PLA₂ from *Bothrops moojeni* displayed antitumoral activity against Erlich ascitic tumor, human breast adenocarcinoma (SK-BR-3) and Jurkat cells (STABELI et al., 2006).

In order to investigate the cytotoxic mechanism induced by the Lys-49 BnSP-6, we evaluated three death mechanisms: autophagy, apoptosis and necrosis. Autophagy is a survival mechanism that is activated in cells deprived of nutrients or growth factor and can protect cells from various apoptotic stimuli (LUM et al., 2005; RAVIKUMAR et al., 2006). Nevertheless, cytotoxic stimuli can activate autophagic death in cells expressing anti-apoptotic genes (Bcl-2 or Bcl-xL) and not undergoing apoptosis (SHIMIZU et al., 2004). Therefore, autophagy can develop as a primary response to stress stimuli and then trigger apoptosis or necrotic cell

death and could be especially important in apoptosis-resistant cell lines (GOZUACIK; KIMCHI, 2004).

BnSP-6-induced formation of autophagic vacuoles in MDA-MB-231 cells was revealed by punctuate MDC staining in the cytoplasm (Fig. 3), suggesting that autophagy plays a significant role in MDA-MB-231 cell death by PLA₂. This toxin also induced early and late apoptosis in MDA-MB-231 cells when compared with the control cells (Fig. 4). There is no clear distinction between different death mechanisms, which are dependent on the molecular event that is most prominent at the time of cell death (THORBURN, 2008). Yan, 2007 showed that both autophagy and apoptosis are activated in breast cancer cell (MCF-7) death by crotoxin (CrTX), a cytotoxic PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus*.

The ability of cancer cells to escape from apoptosis is one of the important hallmarks of cancer and is a major target of cancer treatment (IGNEY; KRAMMER, 2002). In order to elucidate the molecular mechanism used by BnSP-6 to activate apoptosis in MDA-MB-231 cells, we examined the expression of apoptosis-related genes such as TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A, CASP8, BCL2, BCL2L, BIRC5, BAX and BAD (Table 1). Apoptosis can be triggered through either the extrinsic and/or the intrinsic pathways. The extrinsic pathway involves transmembrane receptor-mediated interactions known as death receptors, such as TNFR-1 or Fas receptor and, in this case, the apoptosis is induced through the activation of cellular caspases (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001). The intrinsic pathway is mediated through a mitochondria-dependent mechanism that is regulated by members of the Bcl-2 family, which can be subdivided into anti-

apoptotic members, (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 and Mcl-1) and pro-apoptotic members (Bax, Bak, Bad, Bid, Bmf, and others) (BORNER, 2003).

Our results showed that BnSP-6 up-regulated the expression of important genes associated with the extrinsic pathway such as TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A and CASP8 (Table 1) and down-regulated BCL2 and BCL2L (Table1), which are anti-apoptotic genes related to the mitochondrial pathway. In contrast, BnSP-6 decreased expression of the pro-apoptotic genes BAX and BAD. Cardiotoxin III from *Naja naja atra* also inhibited cell proliferation and apoptosis in breast cancer lines (MCF-7 and MDA-MB-231) correlated to up-regulation of Bax, and down-regulation of Bcl-XL and Bcl-2 (CHIU et al., 2009; LIN et al., 2010). Our data support the hypothesis that BnSP-6 exerts its apoptosis-inducing effect on MDA-MB-231 cell presumably by both intrinsic and extrinsic pathways.

Furthermore, we investigated the modulation of tumor suppressor genes BRCA2 and TP53 (Table1). The TP53 gene provides instructions for biosynthesis of p53 protein that acts as a tumor suppressor. The p53 protein is a fundamental mediator in cellular processes of growth arrest and apoptosis (LOWE et al., 1993; AGARWAL et al., 1998). In the same manner, BCRA2 gene contains information for the biosynthesis of a protein that acts as a tumor suppressor and is involved in repairing damaged DNA (PATEL et al., 2008). Breast cancer susceptibility has been linked to the BCRA2 gene and interestingly, our results showed remarkable increase gene expression of BRCA2 and TP53. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by snake venom toxin from *Vipera lebetina* was accompanied by a significant increase of pro-apoptotic proteins expression such as p53, Bax,

caspase-3, and caspase-9 (SON et al., 2007). It was also shown that the PLA₂ CrTX induces significant anti-tumor effects by inducing cell apoptosis probably due to activation of caspase-3 and by cell cycle arrest mediated by increased p53 expression (YE et al., 2011).

BnSP-6 induced down-regulation of the BIRC5 gene in MDA-MB-231 cells (Table I), as did Cardiotoxin III (LIN et al., 2010). The protein BIRC5 is a member of the family known as inhibitors of apoptosis (IAPs), and is able to inhibit caspase activation (AMBROSINI; ADIDA; ALTIERI, 1997; TAMM et al., 1998; CHIOU; JONES; TARNAWSKI, 2003). Therewithal BIRC5 is overexpressed in breast cancer lines and its regulation seems to be linked to the protein p53 that represses BIRC5 expression at both the mRNA and protein levels (MIRZA et al., 2002). Finally BnSP-6 induces down-regulation of the gene ANGPT1 (Table1), which express Angiopoietin-1, a potent pro-angiogenic factor (HAYES et al., 1999) that acts to protect endothelial cells from apoptosis (KWAK et al., 1999). Beside their physiological role, angiogenic factors are essential for tumor growth and metastasis. The metastatic potential and invasiveness of tumor cells are major properties of various malignant tumors and the main causes of treatment failure. A vital step in the invasive processes is adhesion, cell migration and angiogenesis (TRACEY A. MARTIN, 2013). BnSP-6 inhibited the adhesion and cell migration (Fig.s 5 and 6), in agreement with the action of other PLA₂ such as CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2 from *Cerastes cerastes* and MVL-PLA2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea*, which inhibit cell adhesion, migration and angiogenesis of endothelial cells (BAZAA et al., 2009; KESSENTINI-ZOUARI et al., 2010; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013). Thus, these results demonstrated that BnSP-

6 represents a potential target for the development of anti-angiogenic and anti-metastatic therapies.

The study of mechanisms involved in antitumoral effects of PLA₂s is very important for designing specific anti-cancer drugs based on snake venom PLA₂s, thus stimulating the investigation of the structure–function relationships of these enzymes. Antitumoral activity of Lys49 PLA₂ is related to a region composed of hydrophobic and cationic amino residues (115–129) that are located near the C-terminal region of the molecule (ARAYA; LOMONTE, 2007; GEBRIM et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009). However, antitumoral effects can be attributed to other mechanisms and additional molecular motifs which could participate in enhancing or complementing the action of this toxic effector site (LOMONTE; ANGULO; CALDERON, 2003; STABELI et al., 2006). MVLPLA2 is able to prevent adhesion and migration of tumor cells independent of the catalytic activity, an effect that was mediated through the integrins $\alpha 5\beta 1$ and αv (BAZAA et al., 2009). Moreover, Lys49 PLA₂ homologues from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* inhibited the proliferation of endothelial cells by interaction with vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (YAMAZAKI et al., 2005).

Our study summarizes the antitumoral effect of the PLA₂ BnSP-6 on MDA-MB-231 breast cancer cells, with special focus on cell death. BnSP-6 induces events characteristic of cell death by autophagy and apoptosis and regulated the expression of many genes involved in apoptosis. Despite the highly relevant evidence that PLA₂ induces apoptosis, our data suggest that BnSP-6 causes cell death in MDA-MB-231 through an integrated mechanism that involves apoptotic and autophagic components working together to induce cell death. Nevertheless

the mechanisms of cell death induced by BnSP-6 remain to be studied. Thus, it is very important to carry out further investigations of the proteins involved in signaling pathways of apoptosis and autophagy that would facilitate the discovery of PLA₂ targets in cancer cells, which could be exploited to develop new therapeutic approaches.

Conflicts of interest

The authors declared that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), National Institute of Science and Technology (INCT) in Nano-Biopharmaceutical, Brazil. We thank the Dr. Eliane Candiani Arantes and Dr. Karla Bordon of laboratory animal toxins, for sequencing the protein.

References

ACKERMANN, S. et al. Acceptance for preventive genetic testing and prophylactic surgery in women with a family history of breast and gynaecological cancers. **Eur J Cancer Prev**, 15, 474-479,2006.

AGARWAL, M. L. et al. The p53 network. **J Biol Chem**, 273, 1-4,1998.

ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. . **Biologia Molecular da Céula**. Artmed, 2010.

ALLOULOU, A. et al. Phospholipases: an overview. **Methods Mol Biol**, 861, 63-85,2012.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, 3, 917-921,1997.

ANDRIO-ESCARSO, S. H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochem Pharmacol**, 64, 723-732,2002.

ARAYA, C.; LOMONTE, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. **Cell Biol Int**, 31, 263-268,2007.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2--a structural review. **Toxicon**, 34, 827-841,1996.

ASPARUHOVA, M. B. et al. Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling. **Mol Oncol**, 2015.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from Macrovipera lebetina transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol**, 28, 188-193,2009.

BIEBER, A. L. Metal and non-protein constituents in snake venoms. **Springer**, pp. 295–304,1979.

BODAI, B. I.; TUSO, P. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations. **Perm J**, 19, 48-79,2015.

BOGDANOVA, N.; HELBIG, S.; DORK, T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. **Hered Cancer Clin Pract**, 11, 12,2013.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol**, 39, 615-647,2003.

BOYD, J. Genetic predisposition to breast cancer: the next chapters. **Cancer**, 120, 932-934,2014.

BRAKEBUSCH, C. et al. Integrins in invasive growth. **J Clin Invest**, 109, 999-1006,2002.

BRASIL, M. D. S. Estimativas câncer mama 2014. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=13>>. Acesso em: maio.

BUCCIONE, R.; CALDIERI, G.; AYALA, I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. **Cancer Metastasis Rev**, 28, 137-149,2009.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther**, 23, 49-59,2009a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 50 Suppl, S237-242,2009b.

BURSCH, W. et al. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. **Toxicology**, 254, 147-157,2008.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**, 2014, 203639,2014.

CHENG, Y. C.; UENO, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer**, 19, 191-199,2012.

CHIOU, S. K.; JONES, M. K.; TARNAWSKI, A. S. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. **Med Sci Monit**, 9, Pi25-29,2003.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 21, 13,2015.

CHIU, C. C. et al. Effects of cardiotoxin III on NF-kappaB function, proliferation, and apoptosis in human breast MCF-7 cancer cells. **Oncol Res**, 17, 311-321,2009.

CHIU, C. C. et al. Goniiothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability. **J Agric Food Chem**, 59, 4288-4293,2011.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, 53, 330-341,2009.

COGO, J. C. et al. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of Bothrops insularis (jararaca ilhoa). **Biochimie**, 88, 1947-1959,2006.

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **Br J Cancer**, 55, 61-66,1987.

COOPER, D. M. et al. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **J Appl Physiol (1985)**, 103, 700-709,2007.

CORREA, L. C. et al. Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, 62, 765-767,2006.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, 55, 795-804,2010.

D'ORSI, C. et al. Current realities of delivering mammography services in the community: do challenges with staffing and scheduling exist? **Radiology**, 235, 391-395,2005.

DE ALVARENGA, E. S. et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 57, 100-108,2011.

DE MORAES, C. K.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metalloproteinase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. **Toxicon**, 48, 641-648,2006.

DE MOURA, A. A. et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **Biomed Res Int**, 2014, 195356,2014.

DE OLIVEIRA, A. H. et al. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca^{2+} -independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, 40, 6912-6920,2001.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, 269, 13057-13060,1994.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, 1, 80-91,1967.

EISEN, M. B.; BROWN, P. O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Methods Enzymol.**, 303, 179-205,1999.

ELLIS, I. O. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. **Mod Pathol**, 23 Suppl 2, S1-7,2010.

ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **Jama**, 293, 1245-1256,2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, 35, 495-516,2007.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 **Breast Cancer**

Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, p. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013, 2015. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx >. Acesso em: 25 junho de 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, E359-386,2015.

FERREIRA, C. D. S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 56, 715-718,2010.

FERREIRA, F. B. et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from Bothrops pauloensis snake venom. **Toxins (Basel)**, 5, 2403-2419,2013.

FILHO, G. B. **BOGLIOLO PATOLOGIA**. 8. 2006.

FREITAS-JÚNIOR, M. B. C. M. A. R. M. L. R. S. R. Molecular subtypes of breast cancer. **Femina**, 39 n°10, 2011.

FREITAS, M. A. et al. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, 30, 461-464,1992.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, 294, 1871-1875,2001.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, 19, 107-120,2012.

GEBRIM, L. C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, 37, 222-229,2009.

GOZUACIK, D. et al. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. **Cell Death Differ**, 15, 1875-1886,2008.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, 23, 2891-2906,2004.

GUIMARAES, C. L. et al. Alkylation of histidine residues of Bothrops jararacussu venom proteins and isolated phospholipases A2: a biotechnological tool to improve the production of antibodies. **Biomed Res Int**, 2014, 981923,2014.

HA, G. et al. Integrative analysis of genome-wide loss of heterozygosity and monoallelic expression at nucleotide resolution reveals disrupted pathways in triple-negative breast cancer. **Genome Res**, 22, 1995-2007,2012.

HAMAJIMA, N. et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer**, 87, 1234-1245,2002.

HAMAJIMA, N. H., K. TAJIMA, K. ROHAN, . Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer**, 87, 1234-1245,2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, 57-70,2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, 646-674,2011.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clin Anat**, 26, 29-48,2013.

HAYBITTLE, J. L. Curability of breast cancer. **Br Med Bull**, 47, 319-323,1991.

HAYES, A. J. et al. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. **Microvasc Res**, 58, 224-237,1999.

HELMRICH, S. P. et al. Risk factors for breast cancer. **Am J Epidemiol**, 117, 35-45,1983.

IAC LAKHANI, S. R., ELLIS. I.O., SCHNITT, S.J., TAN, P.H., VAN DE VIJVER, M.J. **WHO Classification of Tumours of the breast**. 4: 240 p. 2014.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **J Leukoc Biol**, 71, 907-920,2002.

INCA, I. N. D. C. Câncer de mama feminino:Estimativas 2014. 2014a. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp> >. Acesso em: Junho.

INCA, I. N. D. C. Tipos de Câncer. 2014b. Disponível em: < www.inca.gov.br/ >. Acesso em: Maio.

IWANAGA, S. S., T. Enzymes in snake venom. In: SPRINGER (Ed.). In: **Lee CY (ed.) Snake venoms**. Berlin Heidelberg New York, 1979. p.91-102.

JEANES, A.; GOTTARDI, C. J.; YAP, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, 27, 6920-6929,2008.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, 9, 239-252,2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, 119, 1420-1428,2009.

KAO, K. J. et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. **BMC Cancer**, 11, 143,2011.

KARRETH, F. T., D. A. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. **Cancer Biol Ther**, 3, 1058-1059,2004.

KESSENTINI-ZOUARI, R. et al. CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two Cerastes cerastes venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. **Lab Invest**, 90, 510-519,2010.

KHUNSAP, S. et al. Purification of a phospholipase A(2) from Daboia russelii siamensis venom with anticancer effects. **J Venom Res**, 2, 42-51,2011.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, 45, 1147-1161,2005.

KLEIN, A. et al. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicon**, 57, 1-8,2011.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, 4, 151-175,2008.

KROEMER, G.; MARINO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell**, 40, 280-293,2010.

KUMA, A.; MIZUSHIMA, N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. **Semin Cell Dev Biol**, 21, 683-690,2010.

KWAK, H. J. et al. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. **FEBS Lett**, 448, 249-253,1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685,1970.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**, 6, 463-477,2004.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, 91, 479-489,1997.

LI, X. R. et al. DW-MRI ADC values can predict treatment response in patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. **Med Oncol**, 29, 425-431,2012.

LIN, K. L. et al. Down-regulation of the JAK2/PI3K-mediated signaling activation is involved in Taiwan cobra cardiotoxin III-induced apoptosis of human breast MDA-MB-231 cancer cells. **Toxicon**, 55, 1263-1273,2010.

LINDER, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. **Trends Cell Biol**, 17, 107-117,2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, 402-408,2001.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42, 885-901,2003.

LOWE, S. W. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**, 74, 957-967,1993.

LUM, J. J. et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, 120, 237-248,2005.

MAGRO, A. J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun**, 311, 713-720,2003.

MAITY, G. et al. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A2 from Russell's viper venom. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 845, 232-243,2007.

MARTIN, A.; CANO, A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. **Nat Cell Biol**, 12, 924-925,2010.

MATHEW, R. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. **Cell**, 137, 1062-1075,2009.

MATHEW, R.; WHITE, E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 76, 389-396,2011.

MCPHERSON, K. Where are we now with hormone replacement therapy? **Bmj**, 328, 357-358,2004.

MCPHERSON, K. Screening for breast cancer--balancing the debate. **Bmj**, 340, c3106,2010.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj**, 321, 624-628,2000.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. **Sci Signal**, 4, mr2,2011.

MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, 2445-2462,2004.

MIRZA, A. et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. **Oncogene**, 21, 2613-2622,2002.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes Dev**, 21, 2861-2873,2007.

MORSELLI, E. et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1793, 1524-1532,2009.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. **Biochim Biophys Acta**, 1781, 1-9,2008.

NUNES, D. C. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from Bothrops pauloensis snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Parasitology**, 140, 844-854,2013.

NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by Bothrops leucurus venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, 59, 667-671,2012.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, 37, 411-445,1999.

PATEL, M. I. et al. Cytosolic phospholipase A2-alpha: a potential therapeutic target for prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 14, 8070-8079,2008.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406, 747-752,2000.

PERUMAL SAMY, R. et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **J Appl Microbiol**, 102, 650-659,2007.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 353, 1659-1672,2005.

PIEROBON, M.; FRANKENFELD, C. L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, 137, 307-314,2013.

QU, X. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. **J Clin Invest**, 112, 1809-1820,2003.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, 330, 1344-1348,2010.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, 12, 207,2010.

RAVIKUMAR, B. et al. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. **Hum Mol Genet**, 15, 1209-1216,2006.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, 90, 1383-1435,2010.

RENATUS, M. et al. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, 14250-14255,2001.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J Proteomics**, 75, 2707-2720,2012.

RODRIGUES, R. S. et al. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. **Protein Pept Lett**, 16, 894-898,2009.

RODRIGUES, R. S. et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from Bothrops pauloensis snake venom. **Toxicon**, 50, 153-165,2007.

RODRIGUES, V. M. et al. Bothrops pauloensis snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Curr Top Med Chem**, 15, 670-684,2015.

RODRIGUES, V. M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from Bothrops neuwiedi pauloensis snake venom. **Toxicon**, 44, 305-314,2004.

RODRIGUES, V. M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from Bothrops neuwiedi snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 121, 215-222,1998.

ROMÁN, M. et al. Trends in Detection of Invasive Cancer and Ductal Carcinoma In Situ at Biennial Screening Mammography in Spain: A Retrospective Cohort Study. **PLoS ONE**, 8, 2013.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 353, 1673-1684,2005.

RUBINSZTEIN, D. C.; CODOGNO, P.; LEVINE, B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 11, 709-730,2012.

RUDRAMMAJI, L. M.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A2 from Indian cobra (Naja naja naja) venom. **Toxicon**, 36, 921-932,1998.

SAMALI, A.; GORMAN, A. M.; COTTER, T. G. Apoptosis -- the story so far. **Experientia**, 52, 933-941,1996.

SARRIO, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res**, 68, 989-997,2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, 1761, 1246-1259,2006.

SCHULTZ, D. R.; HARRINGTON, W. J., JR. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Semin Arthritis Rheum**, 32, 345-369,2003.

SCHUTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHERT, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, 655-662,2008.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, 7, 253-266,1973.

SHIMIZU, M. et al. A newly synthesized compound, 4'-geranyloxyferulic acid-N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in male mice. **Int J Cancer**, 135, 774-784,2014.

SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nat Cell Biol**, 6, 1221-1228,2004.

SLAMON, D. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, 365, 1273-1283,2011.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom. **Arch Biochem Biophys**, 378, 201-209,2000.

SON, D. J. et al. Inhibitory effect of snake venom toxin from Vipera lebetina turanica on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. **Mol Cancer Ther**, 6, 675-683,2007.

SORLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, 7, 127,2006.

STABELI, R. G. et al. Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 142, 371-381,2006.

STERNLICHT, M. D. et al. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. **Clin Cancer Res**, 3, 1949-1958,1997.

STEWART, B. W. A. W., CHRISTOPHER P. World Cancer Report 2014 p. Global battle against cancer won't be won with treatment alone

Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis, 2014. ISSN 978-92-832-0429-9.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: (Ed.). **Medical Use of Snake Venom Proteins**: CRC Press, 1990. p.33 - 56. .

STREULI, C. H.; BAILEY, N.; BISSELL, M. J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. **J Cell Biol**, 115, 1383-1395,1991.

SUDHARSHAN, S.; DHANANJAYA, B. L. Antibacterial potential of a basic phospholipase A2 (VRV-PL-VIIIa) from Daboia russelii pulchella (Russell's viper) venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 21, 17,2015.

TAMM, I. et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**, 58, 5315-5320,1998.

TAO, Z. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochem Biophys**, 2014.

TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, 42, 947-962,2003.

THOMPSON, D. I.; FRENCH, R. M. The use of computerized risk adjustment tools in clinical process improvement. **Healthc Inf Manage**, 8, 45-52,1994.

THORBURN, A. Studying autophagy's relationship to cell death. **Autophagy**, 4, 391-394,2008.

THORBURN, A.; THAMM, D. H.; GUSTAFSON, D. L. Autophagy and cancer therapy. **Mol Pharmacol**, 85, 830-838,2014.

TOMAO, F. et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. **Onco Targets Ther**, 8, 177-193,2015.

TRACEY A. MARTIN, L. Y., ANDREW J. SANDERS, JANE LANE, AND WEN G. JIANG. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. **Landes Bioscience**, 2013.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, 12 Suppl 2, 1528-1534,2005.

VERONESI, U. et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **N Engl J Med**, 347, 1227-1232,2002.

VOSS, M. J. et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. **BMC Cancer**, 11, 158,2011.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, 3, 156-162,2013.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. **Apoptosis**, 7, 449-459,2002.

WEAVER, A. M. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. **Clin Exp Metastasis**, 23, 97-105,2006.

WEI, X. L. et al. ERalpha inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing Bmi1 in breast cancer. **Oncotarget**, 2015.

WESTBROOK, K.; STEARNS, V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. **Pharmacol Ther**, 139, 1-11,2013.

WHO, W. H. O.-. Breast cancer: prevention and control. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html> >. Acesso em: 25 junho.

WHO, W. H. O. Cancer - Media Center. 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >. Acesso em: 25 junho de 2015.

WILLIAMS, M. M.; COOK, R. S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? **Oncotarget**, 6, 3519-3530,2015.

YAMAZAKI, Y. et al. C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. **Pathophysiol Haemost Thromb**, 34, 197-199,2005.

YAN, C. H. et al. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, 47, 521-530,2006.

YAN, C. H. et al. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin**, 28, 540-548,2007.

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell**, 117, 927-939,2004.

YE, B. et al. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549. **Acta Pharmacol Sin**, 32, 1397-1401,2011.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, 21, 501-515,2013.

YUE, Z. et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, 15077-15082,2003.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, 92, 57-70,2001.

ZOU, H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, 90, 405-413,1997.

ZOUARI-KESSENTINI, R. et al. Antitumoral potential of Tunisian snake venoms secreted phospholipases A2. **Biomed Res Int**, 2013, 391389,2013.

Captions for figures and table

Figure 1. Cytotoxicity of BnSP-6 on MDA-MB-231 and MCF10A cells. MDA-MB 231 **(A)** and MCF10A **(B)** cultures were treated with varying concentrations (100, 50, 25, 12.5 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$) of BnSP-6 for 24 h. The cytotoxicity's were analyzed by MTT assay. Data show the mean \pm standard deviation (S.D.). * Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 2. Autophagic vacuoles in MDA-MB 231 cells after incubation with BnSP-6. Cells cultured in presence of BnSP-6 (50 $\mu\text{g/mL}$) **(A)** or medium **(B)** for 24 h were incubated with MDC (for labeling of autophagic vacuoles), fixed with paraformaldehyde, as described in materials and methods, and analyzed by fluorescence microscopy. These results are representative of at least 2 independent experiments.

Figure 3. Flow cytometric analyses demonstrating apoptotic and necrotic MDA-MB-231 cells. Cells cultured in presence of BnSP-6 (10 and 50 $\mu\text{g/mL}$) or in absence (control) for 24 h were incubated with annexin V/FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. **A)** The representative dot plot acquisitions show the distribution of MDA-MB-231 cells presenting necrosis (upper left quadrant), early apoptosis (lower right quadrant) and late apoptosis (upper right quadrant). **B)** The graphs display the percentages of apoptotic cells showed in **A**. Results are expressed as mean \pm S.D. * Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 4. Release of lactate dehydrogenase (LDH) by MDA-MB-231 cells after incubation with BnSP-6. Supernatants of cells incubated in absence (control) or in presence of BnSP-6 (40 µg/mL) for 24 h were used to LDH activity dosage. Maximal LDH release was considered for cells incubated with 0.01% Triton X-100 for 24 h. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control. #Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with Triton X-100.

Figure 5. Interference of BnSP-6 in MDA-MB-231 cells adhesion. Cells were incubated with BnSP-6 (3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/mL) for 30 min. After incubation, the cells were placed in 96-well plates for 2 h at 37°C. The inhibitions of adhesion percentages were determined by MTT assay. Cells cultured in the absence of BnSP-6 were considered as 100% of adhesion. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 6. Effect of BnSP-6 on cell migration of MDA-MB-231. Cells were cultured until complete confluence. A line was scraped through the monolayer of cells with a sterile pipette tip. After 24 h, the capacity of migrations cell were evaluated in absence **(A)** and presence of BnSP-6 (50µg/mL) **(B)** by extent of wound closure using an optical microscopy. These results are representative of at least 2 independent experiments.

Table 1: Fold changes of up and down-regulated genes expressed in MDA-MB-231 treated with BnSP-6. MDA - MB -231 cells after culturing in the presence of BnSP - 6 expression of genes that induce apoptosis signaling. TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A and CASP8 were upregulated while BCL2 , BCL2L , BAX , BAD , BIRC5 and ANGPT1 were downregulated.

Figure 1.

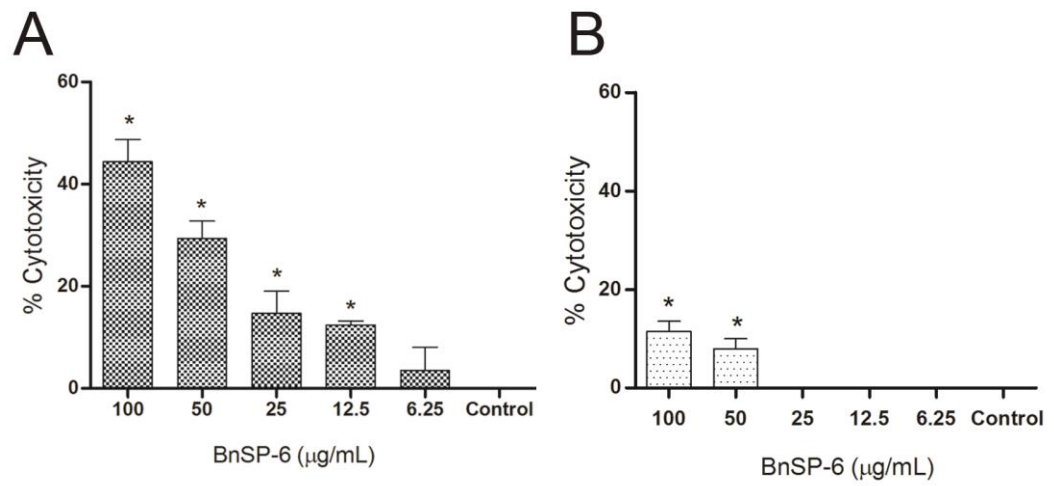


Figure 2.

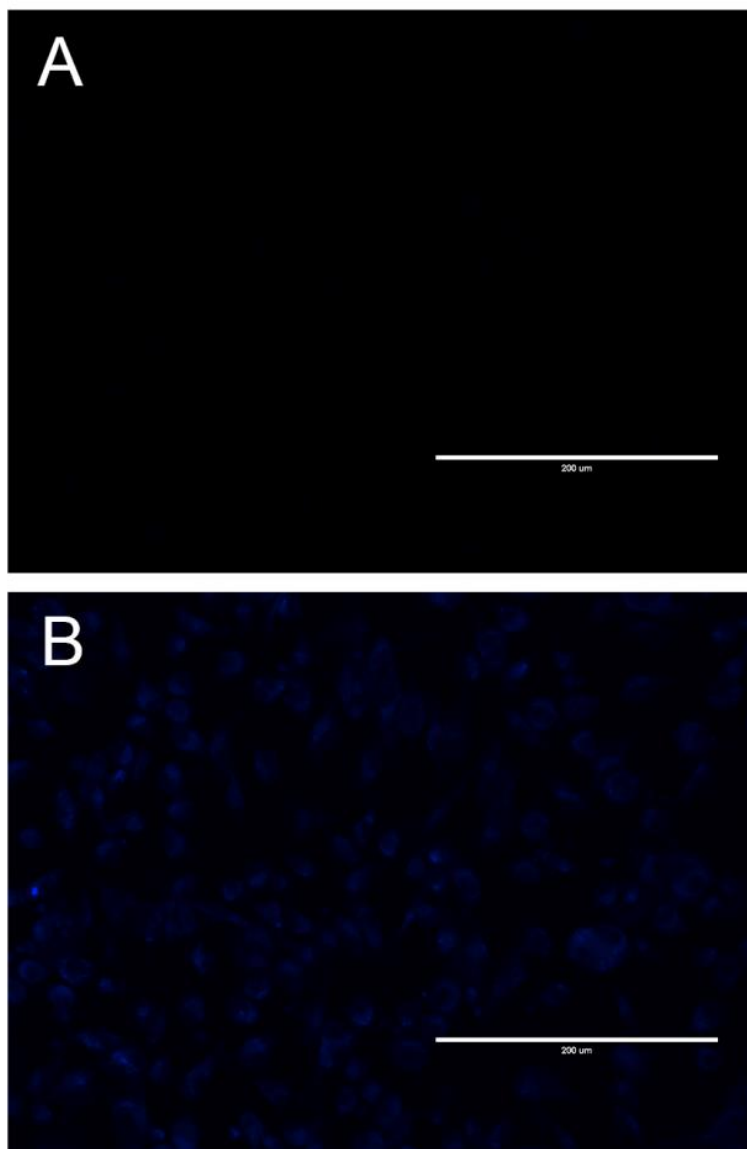


Figure 3.

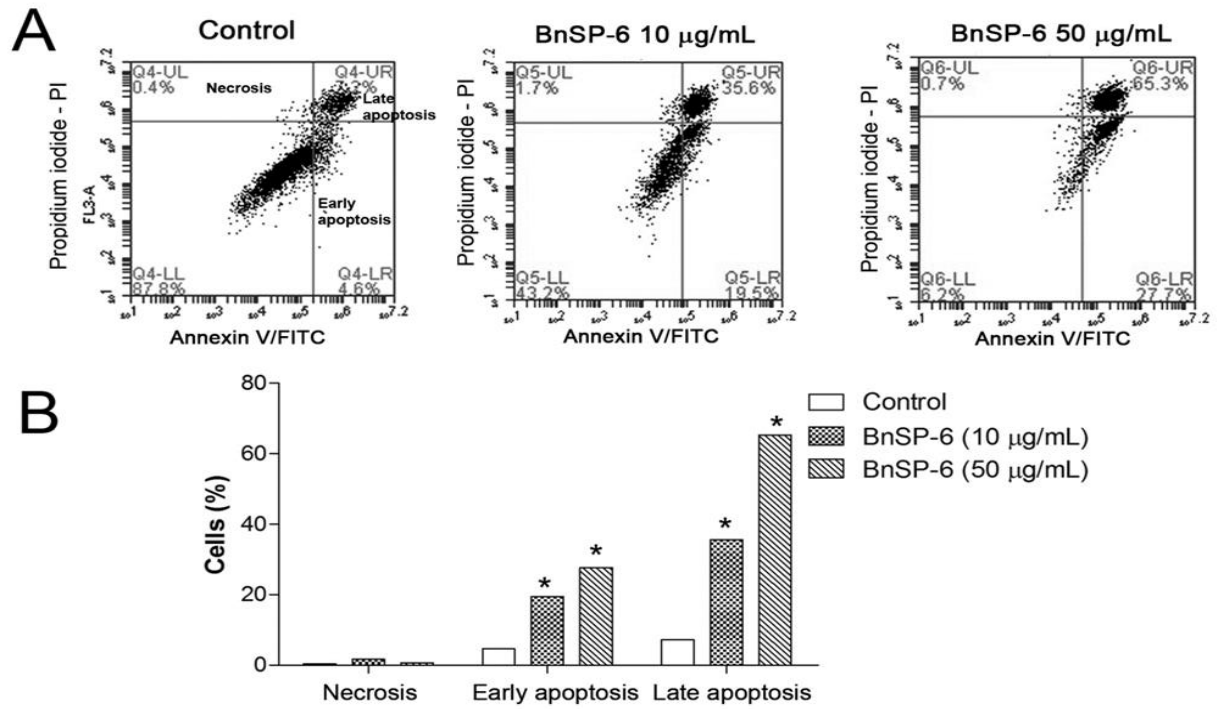


Figure 4.

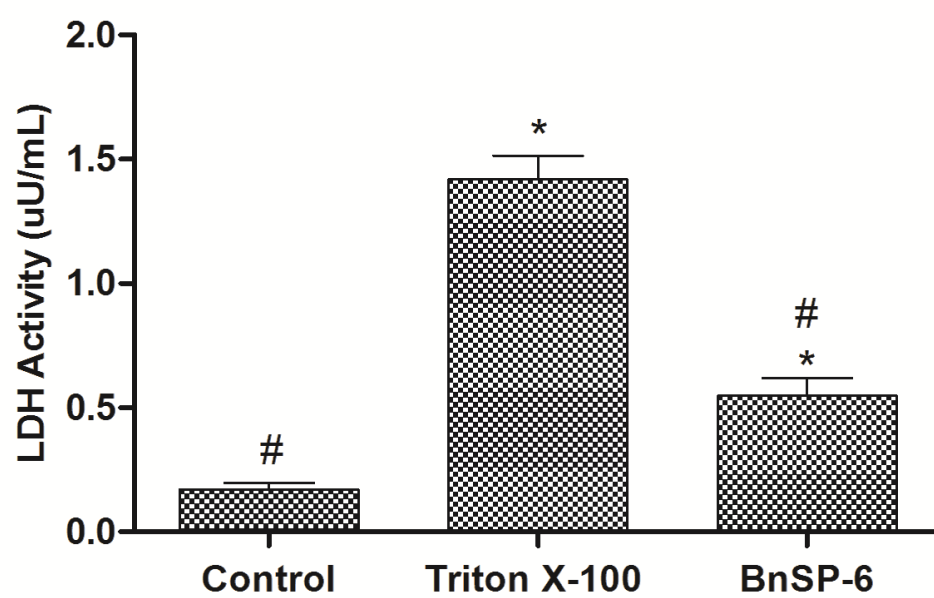


Figure 5.

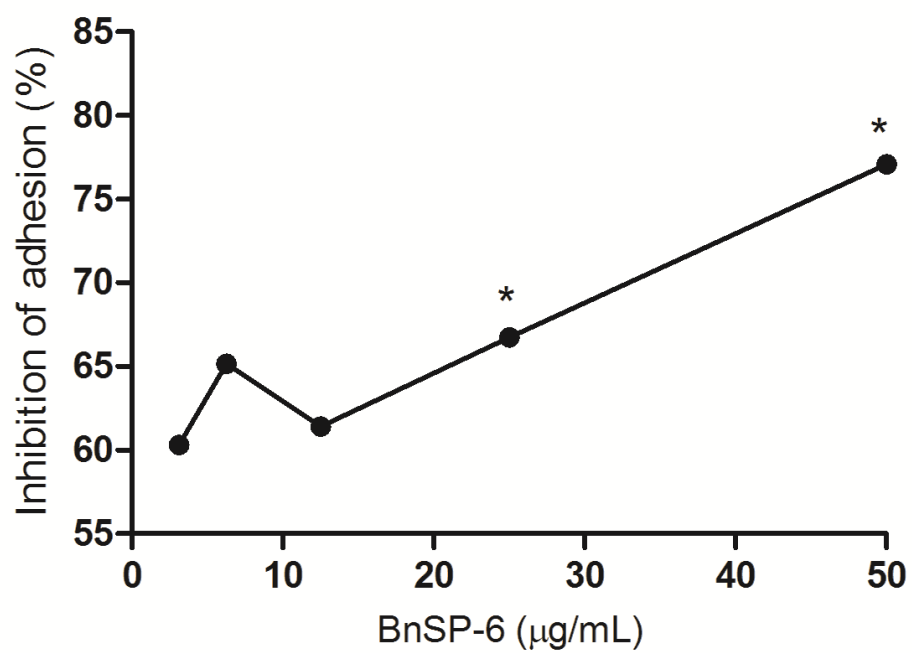


Figure 6.

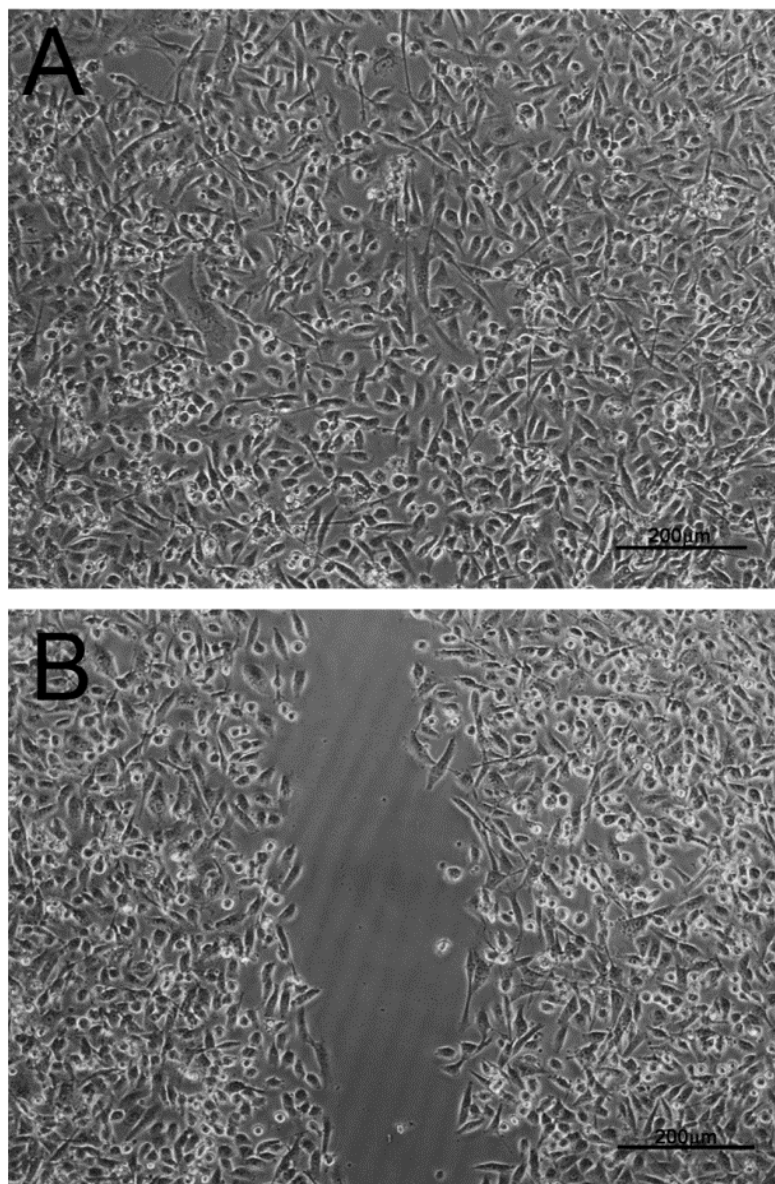


Table 1.

Table 1: Fold changes of up and down-regulated genes expressed in MDA-MB-231 treated with BnSP-6.

Symbol	Gene name	*Fold change
ANGPT1	Angiopoetin 1	0.60
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	0.41
BAX	BCL2-associated X protein	0.29
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0.08
BCL2L1	BCL2-like 1	0.60
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	0.53
BRCA2	Breast cancer 1, early onset	1.58
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	1.64
TNF	Tumor necrosis factor	63.0
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	9.6
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	65.0
TP53	Tumor protein p53	2,38

* Fold change values represent mean \pm SD of three independent experiments. A p value < 0.05 was considered as statistically significant for real-time experiments.

