



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

Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da fosfolipase A₂ BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama MDA-MB-231: Uma análise sobre o ciclo celular.

Aluno: Makswell Almeida Silva

Orientador: Prof^a. Dra. Renata Santos Rodrigues

Co-Orientador: Dra. Daiana Silva Lopes

UBERLÂNDIA - MG
2016



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

Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da fosfolipase A₂ BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama MDA-MB-231: Uma análise sobre o ciclo celular.

Aluno: Makswell Almeida Silva

Orientador: Prof^a. Dr^a Renata Santos Rodrigues

Co-Orientador: Dr^a Daiana Silva Lopes

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
2016

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

S586a
2016 Silva, Makswell Almeida, 1992-
Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da fosfolipase A2 BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama MDA-MB-231 [recurso eletrônico] :uma análise sobre o ciclo celular / Makswell Almeida Silva. - 2016.

Orientadora: Renata Santos Rodrigues.

Coorientadora: Daiana SilvaLopes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5066>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. I. Rodrigues, Renata Santos, 1977-, (Orient.). II. Lopes, Daiana Silva, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Ata da Apresentação Pública de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Apresentação Pública: Dissertação de Mestrado

Local: Uberlândia/MG

Data: 29/07/2016

Hora de início: 16:00h

Hora de encerramento: 16:40h

Discente: Maxwell Almeida Silva

Matrícula: 11422GBI005

Título do Trabalho: Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da fosfolipase A2 BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama MDAMB-231: Uma análise sobre o ciclo celular.

Área de concentração: Bioquímica

Linha de pesquisa: Caracterização antitumoral e funcional de toxinas animais

Projeto de Pesquisa de vinculação: Potencial antitumoral e antiangiogênico de componentes bioativos isolados da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*.

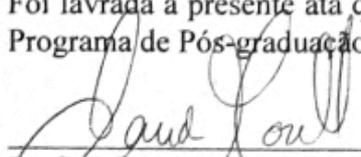
Aos 29 dias do mês de julho de dois mil e dezesseis, às 16:00 horas no Auditório 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, realizou-se a Apresentação Pública da Dissertação de Mestrado do (a) Discente.

A Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica foi assim composta: Profª. Drª. Renata Santos Rodrigues (Orientadora); Profª. Drª. Patrícia Bianca Clissa e Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, realizou o processo de avaliação não presencial e considerou o (a) candidato (a) APROVADO (A).

Caso haja mudança no Título da Dissertação, informe o novo título ou demais sugestões:

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.


Profª. Drª. Renata Santos Rodrigues
Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Genética e Bioquímica

Universidade Federal de Uberlândia

Profª. Dra. Renata Santos Rodrigues

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em

Genética e Bioquímica - Portaria R nº 867/2015

(34)3225-8438

Universidade Federal de Uberlândia - Av. Pará, nº 1720 - Bloco 2E, Sala 244 - Umuarama - - 38.400-902 - Uberlândia/MG

ppggb@ufu.br

Universidade Federal de Uberlândia

Profª. Dra. Sandra Morelli

Diretora do Instituto de Genética Bioquímica

Portaria R Nº 1758/2012

Agradecimentos

- A Deus, meu Senhor e Eterno Criador. A quem conheço não por ouvir falar, mas por experiência própria. Por ti eu vivo e existo. Me sustentou até aqui e sei que coisas maiores ainda estão por vir.
- A minha família, não tenho palavras para descrever o quanto vocês significam para mim. Amo vocês incondicionalmente. Vocês são meu ponto de equilíbrio. Minha esposa Jéssica. Meu bem, só você mesmo para me suportar, sem seu apoio e compreensão esse trabalho não seria da mesma forma. Aos meus pais, vocês são o meu exemplo de vida. Nunca os vi reclamar de nossa família, pelo contrário, vocês jamais mediram esforços para fazer de nossa casa e melhor lar de todos!
- As minhas 3 queridas orientadoras. Não é para qualquer um ter 3 orientadoras hahaha.! A vocês, igualmente meu muito obrigado! As professoras, Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e Dr^a. Renata Santos Rodrigues. E a Dr^a. Daiana Silva Lopes. Vocês três me ajudaram a amadurecer como profissional e ser humano, mesmo quando eu estava desanimado, vocês não me abandonaram, pelo contrário, foi neste momento que de fato se aproximaram de mim e me ajudaram a superar minha “crise científica” (hoje a gente ri, mas não foi engraçado no momento não.. kkkkk). Vocês me inspiraram a iniciar o mestrado e continuam a me inspirar para continuar meu caminho rumo a realização profissional. Quando eu crescer quero ser igual a vocês. Sou grato por Deus ter colocado vocês em minha vida!
- A minha orientadora oficial. Prof.^a Dr.^a Renata Santos Rodrigues. Rê, obrigado por não medir esforços sempre que sua ajuda é necessária. Sua humildade, sinceridade e disposição em ajudar sempre me ensinaram que se tivermos uma mente positiva, esforço e comprometimento não há como não sermos bem-sucedidos. Muito, muito obrigado mesmo... Espero ter andando na linha cordenadora... hahahaa
- Verí, desde minha graduação (Quando dava aula só para mim na sala, porque ninguém mais se interessava rsrs) você sempre dá bons conselhos e com sua sensibilidade consegue enxergar em seus alunos aquilo que ninguém mais vê, não deixa passar nada! Hahaha. Muito obrigado Veri, por me trazer ao laboratório, me ensinar, aconselhar e dar broncas quando foi preciso.
- A Dr^a. Daiana Silva Lopes. Dai, como agradecer? Desde o meu primeiro dia no laboratório quando você me disse que era só “colar em você que era sucesso” (e isso de fato é verdade!!!), até o dia hoje, meu muito obrigado! Sua alegria e humildade fazem de você uma orientadora única, agradeço por todos os de

alegrias e ensinamentos momentos compartilhados, e não menos importante, por toda a comida compartilhada ou não neh!? Kkkkkk Até mesmo pelas broncas e diferenças você me deu ensinamentos que foram além da área profissional.

- A técnica (técnica para os outros, para mim é amiga mesmo) do nosso laboratório. (Dr^a sem doutorado ¬¬') Marina... Marininhaaaaa... Sua ajuda vai muito mais além das continhas “cabulosas” de química (é sim...! nem vem!!!). Você é de fato uma amiga que com sua alegria, pensamentos positivos e sabedoria sempre me ajuda e fazem do laboratório um ambiente gostoso de se trabalhar. Muito obrigado por todo esse tempo de risadas, ensinamentos jurídicos e conversas “nada a ver”, que vão desde de viagens filosóficas até discussões sérias sobre o futuro das nossas series.
- A Fernanda... Feeeeeeer... Esposa do Mauro e mãe do Pedro e da Maria... a pessoa das furadas. Muito obrigado por ser sempre generosa e disposta a ajudar... sem você esse trabalho não existiria. Você proporcionou muitas risadas e ao mesmo tempo muitos ensinamentos que foram além dos científicos.
- A Sarah... Veeeeeei... valeus. Hahaha. Muito obrigado por tudo. Junto com a Dai, desde meu primeiro dia no laboratório (quando te vi furar a geladeira com a Carol.. hahaha) até o último momento você sempre esteve disposta a me ajudar, ensinar e fazer a pesquisa mais divertida. Obrigado por sempre estar disposta a ajudar e nunca medir esforços para isso. Sua amizade me fez crescer como profissional e como veei. =P
- A meu amigo Samuel. Samucaaa... Está pra nascer alguém mais de boa que você!!! Meu amigo, como você me ensina! Obrigado por tudo, pois além de contribuir imensamente para este trabalho você também contribui para o meu crescimento pessoal e espiritual! Amo sua vida irmão!
- Aos colegas de laboratório Denise, David, Isabela, Débora e Mônica e a prof^a. Dr^a. Kelly Yoneyama Tudini. Vocês são especiais e ajudaram a fazer desde trabalho o que é. Me ensinaram a crescer como pessoa e pesquisador.
- Aos técnicos, Tianinha pela companhia e alegria. E Janaína, nossa eficiente e alegre secretária da coordenação da Pós... seu trabalho mega eficiente facilita nossa vida conturbada de pós-graduandos uns 50%!! Hahaha.
- Aos demais colegas de laboratório, Eloá, Patrícia (coleguinha desde o PIBID), Lucas, Luana, Vítor, Cuevas, Letícia e Vagner. Vocês contribuíram para este trabalho com a alegria, presença e ajuda de vocês.

Sem cada um eu não teria chegado até aqui!

Sou grato a Deus pela vida de cada um!

Sumário

Agradecimentos	liv
Lista de abreviações.....	vii
Apresentação	1
Capítulo 1: Fundamentação teórica	3
1.1 - Câncer.....	3
1.1.1 – O Ciclo celular e Câncer.....	7
1.2 – O Câncer de Mama	16
1.3 – Peçonhas de Serpentes e sua composição	19
1.4 – Fosfolipases A ₂	22
1.4.1 – Fosfolipases A ₂ de peçonhas de serpentes (SVPLA ₂) e Câncer.....	26
Referências Bibliográficas	30
Capítulo 2: Efeito Citotóxico e Genotóxico de uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de Bothrops pauloensis sobre células de câncer de mama triplo negativo: Uma análise sobre o ciclo celular	41
Resumo	41
Abstract	42
1.0 - Introdução	43
2.0 – Materiais e métodos	45
2.1 – Peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	45
2.2 – Purificação da PLA ₂ BnSP-6	45
2.3 – Cultivo Celular	46
2.4 – Ensaio de Citotoxicidade	47
2.5 – Ensaio de Genotoxicidade.....	47
2.6 – Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	48
2.7 – Expressão Gênica	49
2.8 – Análises Estatísticas.....	50
3.0 - Resultados	50
3.1 – Purificação da PLA ₂ BnSP-6.....	50
3.2 - Citotoxicidade.....	51
3.3 - Genotoxicidade	52
3.4 – Análise do Ciclo Celular	53
3.5 – Expressão Gênica	54
4.0 – Discussão	56
5.0 – Conclusões	64
Referências:	66

Lista de Abreviações

CDKs	<i>Cinases dependentes de ciclinas</i>
CKIs	<i>Inibidores de ciclinas dependentes de cinases</i>
Rb	<i>Gene codificante da proteína Rb</i>
pRb	<i>Proteína Rb</i>
HER2	<i>Proteína presente em membranas de células altamente expressa em alguns tipos de câncer de mama (abreviação de Human Epidermal growth factor Receptor-type 2)</i>
ER/PR	<i>Receptor de estrógeno/Receptor de progesterona</i>
PLA	<i>Fosfolipases</i>
SVPLA₂	<i>Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes</i>
PLA_{2s}	<i>Fosfolipases A₂</i>
sPLA₂	<i>Fosfolipase secretória</i>
cPLA₂	<i>Fosfolipase citosólica</i>
iPLA₂	<i>Fosfolipase Ca²⁺ independentes</i>
PAF	<i>Fator de ativação agregação plaquetária</i>
ATP	<i>Adenosina trifosfato</i>
Chk1	<i>Checkpoint cinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint cinase 2</i>
SVMP	<i>Metaloproteases de peçonhas de serpentes</i>
ATM	<i>proteína ataxia-telangiectasia mutada associada a resposta celulares desencadeadas por danos no DNA</i>
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad9 related proteína associada a resposta celulares desencadeadas por danos no DNA</i>

Apresentação

Dentre as diversas alterações observadas em células cancerígenas, umas das mais expressivas são aquelas relacionadas as vias de proliferação e manutenção celular. O ciclo celular é o conjunto de processos que ocorrem em uma célula visando crescimento e divisão da célula. As alterações observadas no ciclo celular de células cancerígenas estão, geralmente, nos pontos de regulação e controle do ciclo, ocasionando alto índice de proliferação das mesmas. O principal motivo dessas alterações são mutações genéticas em genes que codificam proteínas que regulam e promovem os processos de reparação de danos na molécula de DNA, ou que induzem/controlam processos de morte celular. Grande parte dessas proteínas estão também relacionadas as quatro fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M). O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres em todo mundo e se configura no segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil. Esse tipo de câncer é classificado segundo seus subtipos moleculares e parte da estratégia terapêutica é baseada nas características moleculares de cada subtipo. O câncer de mama triplo negativo é o subtipo molecular que não apresenta nenhum marcador específico que permita uma terapêutica específica e eficaz, por isso, é constante a busca por novos agentes terapêuticos que sejam capazes de combater esse subtipo de câncer de mama. Peçonhas animais são ricas fontes de biomoléculas com grande potencial farmacológico a ser explorado. Com base nisso buscamos neste trabalho avaliar a atividade antitumoral de uma fosfolipase A₂ Lys-49, denominada BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, uma serpente comum em regiões do sudeste do Brasil. Para avaliarmos a ação antitumoral da toxina, buscamos por métodos que fossem capazes de elucidar a ação citotóxica e genotóxica da mesma, assim como a interferência da PLA₂ sobre o ciclo celular em células MDA-MB-231, uma linhagem de câncer de mama triplo negativo, com alta capacidade proliferativa e metastática.

Para a apresentação deste trabalho, foram utilizadas normas do programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas

(ABNT). Este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o Capítulo 1 a Fundamentação Teórica que descreve aspectos importantes no entendimento, relevância e objetivo deste estudo. O Capítulo 2 apresenta um artigo intitulado: “Efeito Citotóxico e Genotóxico de uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama triplo negativo: Uma análise sobre o ciclo celular”, nos moldes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e da ABNT.

Capítulo 01

1. Fundamentação teórica

1.1 Câncer

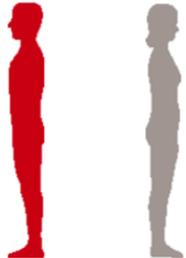
O câncer é resultante de uma neoplasia oriunda da alteração na expressão de múltiplos genes que levam a desregulação de processos celulares naturais, tais como, divisão e diferenciação. Essas alterações resultam em um desequilíbrio no balanço entre os processos de proliferação e morte celular favorecendo assim, um crescimento celular anormal que resulta num aglomerado de células desreguladas, formando o que é chamado de tumor. Dependendo da sua malignidade, tumores podem invadir tecidos vizinhos ou metastizar em tecidos distantes, causando morbidez e, se não tratado, morte do hospedeiro (RUDDON, 2007).

O câncer é causado por uma somatória de fatores internos e externos do indivíduo. Os fatores internos mais comuns são danos não reparados no DNA, pré-disposição genética, disfunções hormonais, obesidade e condição imune do indivíduo. Os fatores externos podem ser organismos infecciosos, tabagismo, consumo de álcool e alimentação não saudável, bem como a exposição a fatores mutagênicos (WHO, 2016; ACS, 2015).

Os cânceres são tradicionalmente classificados segundo o tecido e tipo de célula que os originam. Os carcinomas, originados de células epiteliais são os mais comuns, abrangendo cerca de 80% dos casos de câncer. Os sarcomas são cânceres originados de células de tecidos conjuntivos ou musculares. Há ainda cânceres oriundos de células do sistema sanguíneo e seus precursores, denominados leucemias. Existem também linfomas, que têm como precursoras células do sistema linfático e blastomas, que são tumores oriundos de células de tecidos embrionários ou de suas células precursoras (GOLUB, *et. al.*, 1999; PUBMED HEALTH, 2016; NCI, 2016).

Os cânceres mais comuns no mundo são os carcinomas, dentre eles, destacam-se o câncer de pulmão, fígado, estômago, intestino, colo-retal, mama e esôfago, com índices de incidência diferentes entre os homens e mulheres (WHO, 2016). No Brasil o cenário é um pouco diferente; o tipo de câncer mais comum é o de pele não melanoma, seguido do câncer de mama feminino,

próstata nos homens e cólon e reto em ambos os sexos. A figura 01 mostra a estimativa de novos casos dos dez tipos de cânceres mais comuns no Brasil para 2016 em homens e mulheres (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Próstata	61.200	28,6%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Colo do útero	16.340	7,9%	
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Estômago	12.920	6,0%		Estômago	7.600	3,7%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Corpo do útero	6.950	3,4%	
Esôfago	7.950	3,7%		Ovário	6.150	3,0%	
Bexiga	7.200	3,4%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Laringe	6.360	3,0%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Leucemias	5.540	2,6%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%					

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 01: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2016.

Em 2012, foram estimados 500 mil óbitos por câncer de mama em mulheres de todo mundo. Estas mortes correspondem a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres, sendo que 34% incidem em países desenvolvidos da Europa e América do Norte. Em geral, a incidência do câncer de mama é maior em regiões mais desenvolvidas socioeconomicamente. Entretanto, a morte por câncer de mama se configura como a principal causa de morte por câncer em mulheres nos países em desenvolvimento, já nos países desenvolvidos ocupa a segunda maior causa de morte por câncer entre as mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (INCA, 2016; WHO, 2016; SIEGEL, *et. al.*, 2016).

Uma das principais características utilizadas para distinguir tumores malignos de tumores benignos é a capacidade de invasão que as células tumorais malignas apresentam, invadindo inicialmente, o tecido de origem da neoplasia, incluindo linfonodos, bem como a capacidade dessas células de metastizar órgãos distantes via sangue periférico. Além disso, tumores malignos são capazes de destruir o tecido adjacente, por sua alta capacidade invasiva, já os tumores benignos geralmente, são encapsulados, não invadindo e assim, não destruindo o tecido circunvizinho (NCI, 2016; STEEG, 2016; WEINBERG, 2014).

Os tumores malignos sofrem um processo de desdiferenciação, também conhecido como anaplasia, assumindo fenótipo diferente das células do tecido de origem, enquanto que os tumores benignos geralmente não sofrem muitas mudanças fenotípicas e são definidos pelo acúmulo anormal de células. Outra distinção dos tumores malignos é que estes apresentam uma taxa de crescimento significativamente maior do que tumores benignos, podendo se desenvolver em semanas ou meses, enquanto que tumores benignos podem levar anos para serem percebidos devido seu tamanho e desenvolvimento lento (RUDDON, 2007; STEEG, 2016).

As células do câncer transgridem as regras básicas da biologia das células que constituem os organismos multicelulares. Essas transgressões ocorrem por que nessas células há diversas disfunções genéticas e bioquímicas que levam a alterações moleculares e teciduais. Essas alterações são relacionadas aos principais mecanismos de manutenção e regulação celular, como vias de sinalização e metabolismo da célula assim como, ciclo celular e apoptose (morte celular programada) (LI, *et. al.*, 2011; WEINBERG, 2014; RUDDON, 2007; STEEG, 2016).

As células tumorais apresentam metabolismo energético marcadamente diferente das células normais. Além de absorverem níveis mais altos de glicose, uma destacável diferença no metabolismo de tumores é a formação de lactato como principal produto de degradação da glicose absorvidas por estas células, ou seja, a maioria dos tumores, alguns até mesmo em um ambiente com alta disponibilidade de oxigênio, tendem a degradar a glicose pela via anaeróbica (WEINBERG, 2014; CAIRNS, *et. al.*, 2011; HEIDEN, *et. al.*, 2010).

Cerca de 90 % da glicose absorvida é degradada pela via anaeróbica em vários tipos de tumores e diversas pesquisas já demonstraram que essa peculiaridade das células tumorais, conhecida como efeito *Warburg*, é uma característica de cerca de 80% dos tumores. Ainda sabe-se pouco sobre o porquê dessas células apresentarem tal característica, mas alguns estudos apontam que essa é uma característica adquirida pelas células devido à hipóxia observada nesses tecidos durante o desenvolvimento da neoplasia. Outro fator que pode corroborar para o efeito *Warburg* é o fato de que vários intermediários da via aeróbica, bem como seus produtos finais, principalmente o ATP, regulam diversos processos celulares e a perda desses mecanismos de

regulação, pela deficiência desses compostos, podem favorecer o desenvolvimento do tumor (WEINBERG, 2014; HEIDEN, *et. al.*, 2010; WARBURG, *et. al.* 1927).

Outra importante alteração nas células tumorais é a disfunção nos mecanismos que acionam a morte celular programada, ou também chamada de apoptose. A apoptose é um processo celular que consiste em uma série de mudanças celulares distintas que ocorrem para garantir a eliminação de todos os traços celulares, muitas vezes em uma hora após o início do mesmo (CAIRNS, *et. al.*, 2011). O início da apoptose é marcado pela ativação da proteína p53, um dos principais pontos de regulação de toda a via (LI, *et. al.*, 2011; GASCO, *et. al.*, 2002; THEORET, *et. al.*, 2008).

A proteína p53 está relacionada com diversas desordens metabólicas, principalmente aquelas oriundas por danos e/ou desordens no material genético que podem ter ocorrido durante o crescimento ou em alguma fase do ciclo celular. Quando ativada por danos no DNA, essa proteína desencadeia uma resposta celular orquestrada e localizada para promover a reparação do dano. Entretanto, caso não seja possível reparar o dano, essa proteína leva a emissão de sinais que levarão a célula dar início a cascata de sinalização que conduzirá ao processo de morte celular programada (EGUREN, *et. al.*, 2013; GASCO, *et. al.*, 2002).

A presença de uma maquinaria apoptótica intacta, mesmo que latente, é um risco permanente para a célula cancerígena em desenvolvimento, uma vez que essa maquinaria pode induzir a morte celular a qualquer momento. Dessa forma é de se esperar que em células tumorais, a expressão da proteína p53, bem como outros pontos de regulação dessa via, estejam desativados, inibidos ou deficientes (GASCO, *et. al.*, 2002; WEIBERG, 2014; RUDDON, 2007).

O ciclo celular é o mecanismo no qual as células dos organismos eucariotos se replicam e é composto por uma sequência ordenada de eventos reproduzíveis que resultam na duplicação de uma célula, tendo como produto final duas células genética e fenotipicamente iguais (GUTIERREZ, 2016). Nas células tumorais, esse mecanismo encontra-se alterado, permitindo que essas células apresentem alta taxa de proliferação, sendo essa uma das características mais marcantes das células cancerígenas (WEIBERG, 2014).

1.1.1 O Ciclo Celular e Câncer

O ciclo celular é vital para a manutenção da vida nos organismos multicelulares, pois, por meio desse processo altamente apurado e fielmente orquestrado, células de um organismo são capazes de se replicar gerando outra célula idêntica a cada ciclo, permitindo a manutenção de tecidos e a reprodutibilidade de processos vitais para os organismos desde sua fase embrionária até a fase adulta. Por seu papel fundamental para a manutenção das células e tecidos, alterações no ciclo celular estão associadas à proliferação aberrante de células e, obviamente, ao câncer (MALUMBRES & BARBACID, 2001; GUTIERREZ, 2016; NURBURY & NURSE, 1992; GÉRARD & GOLDBETER, 2016).

O ciclo celular é composto de 4 fases, G1, S, G2 e M. G1 é o momento que a célula inicia a transcrição e tradução de proteínas necessárias para as fases seguintes do ciclo. Neste momento a célula aumenta seu tamanho devido ao aumento de atividade citoplasmática. Na fase S, ocorre a replicação de todo o DNA celular, ainda no envoltório nuclear. A fase G2 é marcada pela síntese de proteínas que serão necessárias para a fase seguinte do ciclo e pela duplicação de organelas. A última fase do ciclo celular é a divisão celular, definida como mitose (para as células tumorais), nesta fase as células dividem todo o material citoplasmático e genético. A mitose e citocinese representam apenas 5% de todo o tempo do ciclo celular, mas é uma das mais sensíveis fases do mesmo, devido às dramáticas mudanças que ocorrem na célula (BSCB, 2016; GUTIERREZ, 2016).

A fase G1, geralmente é precedida por um estado quiescente das células, também chamado de G0. Este estado quiescente ocorre quando as células se encontram em um ambiente desfavorável para a duplicação, devido a falta de nutrientes ou sinais externos que indicam pausa no ciclo. A fase G0 apenas indica que as células pararam o processo de divisão celular na fase G1, ou seja, indica que as células estão em quiescência. As células podem permanecer dias, semanas ou até mesmo anos neste estado. Algumas ficam

permanentemente em G0 e não voltando a se dividir depois de diferenciadas, como os neurônios, que permanecem até a morte tecidual ou do organismo em G0. Outras células permanecem neste estado quiescente até receberem os estímulos necessários para prosseguir no ciclo celular. Este estado também pode ser chamado de fase G1 tardia (GUTIERREZ, 2016; KAGAMI & YOSHIDA, 2016; BSCB, 2016; MORGAN, 2007).

Se as condições extracelulares forem favoráveis e houver sinais de crescimento e divisão presentes, as células iniciam o processo de divisão celular e prosseguem na fase G1 do ciclo. Esses fatores externos são os principais cofatores para que a célula prossiga na fase G1. G1 é a fase mais longa de todo o processo e é um ponto crucial para a divisão celular, pois antecede um importante e acurado processo, a duplicação do material genético, observada na fase S (GUTIERREZ, 2016; GÉRARD & GOLDBETER, 2016).

A fase G1 apresenta dois pontos centrais de regulação que são essenciais principalmente, para checagem da integridade do material genético, mas também são pontos importante para reconhecer outras disfunções que as células possam apresentar, assim como para avaliar se as condições, externas e internas, estão favoráveis para que a célula prossiga o ciclo. A primeira checagem é conhecida como ponto de restrição da fase G1 e acontece nos momentos finais da fase e é neste ponto que a célula avalia se as condições externas e internas estão favoráveis para a continuação do ciclo. Na segunda checagem é realizada a conferência da integridade do DNA para que a replicação e divisão ocorram corretamente, este pode ser chamado de *checkpoint* G1 e é o ponto de checagem mais importante de toda a fase G1. Após passar por esses monitoramentos e, se forem necessárias, as devidas correções, a célula segue para a fase S, que acontece mesmo sem os estímulos de fatores de crescimento e divisão (HATTORI, *et. al.*, 2015; MORGAN, 2007; GÉRARD & GOLDBETER, 2016).

A fase S é a fase de síntese de DNA e ocorre entre as fases G1 e G2. Através de uma sofisticada maquinaria proteica, as células duplicam todo o material genético, que se encontra organizado e condensado em cromossomos. Essa acurada replicação do DNA de cada cromossomo, bem como a duplicação das proteínas que compõem a cromatina é precisamente

regulada, cromossomo por cromossomo, através da origem de replicação (ORC) de cada molécula cromossômica. Cada ORC é iniciada apenas uma vez em cada ciclo celular para o início da replicação de cada cadeia de DNA, ou seja, cada cromossomo tem sua ORC iniciada apenas uma vez em cada ciclo celular e só poderá ser novamente usada, ou iniciada, na fase S do próximo ciclo da célula. É nesta fase que as cromátides irmãs são formadas, e são mantidas unidas pela proteína coesina, até a mitose (GUTIERREZ, 2016; HATTORI, *et. al.*, 2015; WEIBERG, 2014). O ponto de checagem desta fase é chamado de *checkpoint* de replicação do DNA e monitora danos que possam ocorrer durante a replicação dos pares de base das moléculas de DNA na forquilha de replicação (POLLARD & EARNSHAW, 2008).

Assim como G1, a fase G2 é um dos momentos em que as células estão se preparando para as fases do ciclo que causam alterações no material genético. Na fase G2, as células já estão com todas as moléculas de cromossomos duplicadas, e estão se preparando, por meio da transcrição e síntese de proteínas para o drástico evento da mitose. G2 é mais rápida que G1, e nela ocorre além da síntese de proteínas, a divisão de grande parte das organelas celulares. No final desta fase, há outro importante ponto de checagem do material genético, o *checkpoint 2*, neste as células passam por uma nova varredura que como em G1, buscará danos no material genético que se encontrados devem ser corrigidos, mas se a correção não for possível as células, normalmente, entrarão em apoptose pela ação da p53 e outras proteínas (GUTIERREZ, 2016; HATTORI, *et. al.*, 2015; MORGAN, 2007; MALUMBRES & BARBACID, 2001).

A fase M (mitose e subsequente citocinese) é a última fase do ciclo celular e é definida pela divisão das cromátides irmãs e de todo o material citoplasmático para as duas células. A mitose consiste em cinco eventos subsequentes. A prófase, pro-metáfase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase é a primeira fase da mitose e marca o início da mesma pela condensação dos cromossomos; subsequentemente, os nucléolos se desfazem, permitindo que proteínas do citoplasma (fibras de microtúbulos) organizem as cromátides irmãs em torno do núcleo, formando o fuso mitótico. O aparelho de golgi e o retículo endoplasmático fragmentam-se, se

transformando em vesículas (POLLARD & EARNSHAW, 2008; SCHOLEY, *et. al.*, 2003).

A pró-metáfase é marcada pelo início do rompimento do envoltório nuclear. Nesta fase os filamentos de microtúbulos se ligam randomicamente as cromátides irmãs emanando para os dois polos da célula e formando o fuso mitótico. Quando todos os cromossomos estão ligados aos microtúbulos e os polos da célula estão bem definidos, é dito que a célula está em metáfase. A anáfase é caracterizada pela separação abrupta das cromátides irmãs que ocorre pela degradação da proteína de coesão que mantém essas cromátides unidas, a coesina. Durante a telófase as cromátides irmãs já separadas, migram, cada uma, para um polo da célula e são novamente envoltas pelo envoltório nuclear, formando assim uma célula binucleada (POLLARD & EARNSHAW, 2008; SCHOLEY, *et. al.*, 2003).

O último passo do ciclo celular é a divisão da célula em duas, a citocinese. Enquanto a mitose é relacionada ao material genético, a citocinese é relacionada ao citoplasma e geralmente, inicia-se juntamente com a anáfase, mas só é finalizada quando os dois envelopes nucleares são formados. A citocinese é caracterizada pela formação do anel contrátil, uma estrutura baseada em filamentos de actina e miosina que promove um estrangulamento na região central da célula que culmina na separação das duas células (KAGAMI & YOSHIDA, 2016; GUTIERREZ, 2016).

Devido sua importância, todas as fases do ciclo celular, bem como sua inicialização precisam ser altamente reguladas. Para garantir a eficiência e precisão, esse sistema de controle é independente da maquinaria e dos eventos do ciclo celular e tem suas funções mantidas, mesmo que haja falhas na maquinaria e/ou nas fases do ciclo (MORGAN, 2007). Esse mecanismo de controle do ciclo celular é conhecido literalmente como sistema de controle do ciclo celular ou como relógio do ciclo celular, esse último termo foi estabelecido pela associação do ciclo com o sistema operacional de um relógio, que só pode repetir uma determinada hora depois que o ponteiro percorrer todo o ciclo do relógio, semelhantemente acontece no ciclo celular, em que cada fase só pode ocorrer um vez a cada ciclo e a partir no momento em que o ciclo passa da fase G1 o ciclo se completa, salvo as vezes em que um dano não pode ser

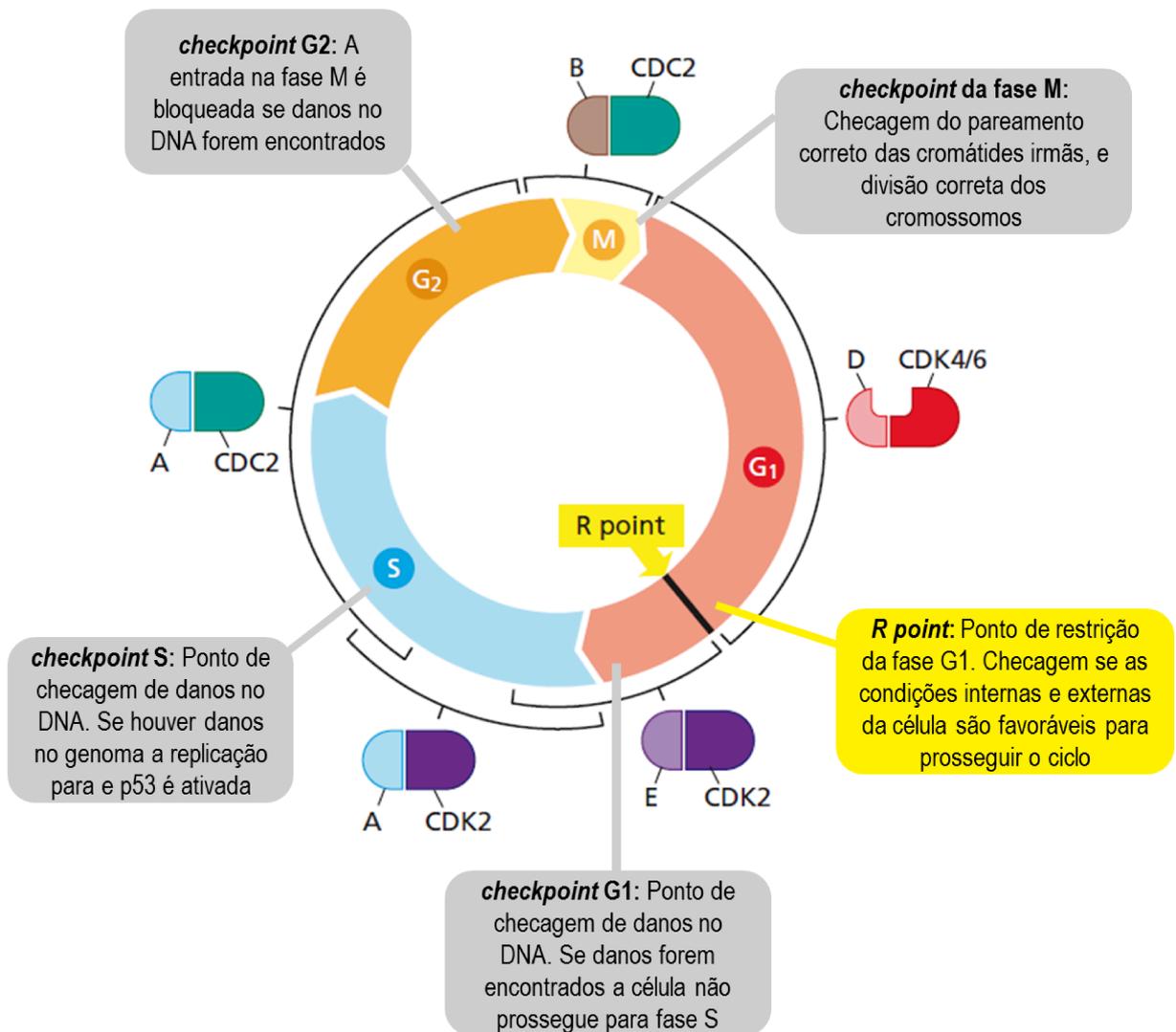


Figura 02: Sistema de controle do ciclo celular. A figura mostra as fases do ciclo celular e seus principais pontos de regulação e controle, bem como algumas moléculas reguladoras do ciclo em cada fase. Modificado de Weinberg (2014).

reparado e a célula entra em apoptose. A figura 02 sintetiza esse sistema de controle (WEINBERG, 2014; TANG, 2010; GUTIERREZ, 2016).

O sistema de controle do ciclo celular é um sistema celular operacional central que governa as respostas desencadeadas por estímulos externos à célula. Este sistema age decidindo qual caminho a célula deve tomar no seu desenvolvimento e funciona em cooperação com os receptores presentes na superfície da célula que ao receberem estímulos externos a célula, desencadeiam diversas respostas que são processadas, integradas e

sintetizadas pelo sistema de controle do ciclo celular. Este sistema, por sua vez, desencadeia duas possíveis respostas em nível de desenvolvimento e crescimento celular, quiescência ou progressão em G1 e subsequentes fases do ciclo celular (GUTIERREZ, 2016; WEINBERG, 2014; MORGAN, 2008; POLLARD & EARNSHAW, 2008).

Os componentes centrais de controle do ciclo celular são membros da família das proteínas cinases, conhecidas como cinases dependentes de ciclinas (Cdks do inglês *Cyclins-dependent kinases*) (GUTIERREZ, 2016; BUOLAMWINI, 2000).

As cinases dependentes de ciclinas são essenciais para o controle e bom funcionamento do ciclo celular. Essas enzimas são serina/treonina cinases, ou seja, essas proteínas fosforilam outras proteínas em resíduos serina/treonina específicos. (PAVLETICH, 1999). A atividade das Cdks é regulada por inúmeras moléculas como complexos enzimáticos e proteínas, entretanto, o mais importante regulador dessas proteínas são as ciclinas, que são uma classe de proteínas altamente expressas durante as fases do ciclo celular e posteriormente degradadas (MALUMBRES & BARBACID, 2009; ASGHAR, *et. al.*, 2015).

As ciclinas se ligam as Cdks, formando o complexo ciclina-Cdk e são elas as responsáveis por conferir atividade enzimática ao complexo, tendo duas funções principais quando conjugadas com as moléculas de Cdk; a primeira é a atividade catalítica que essas enzimas conferem ao complexo, possibilitando a transferência do grupamento fosfato aos resíduos serina/treonina de proteínas relacionadas ao ciclo celular, por meio da desfosforilação de moléculas de ATP (Adenosina trifosfato) e; como segunda e mais importante atividade dessas enzimas no complexo ciclina-Cdk é que as ciclinas servem como guias para o complexo, auxiliando no reconhecimento das proteínas que serão os alvos da ação enzimática do conjunto (GUTIERREZ, 2016; POLLARD & EARNSHAW, 2008; PAVLETICH, 1999; WEIBERG, 2014; MALUMBRES & BARBACID, 2009; ASGHAR, *et. al.*, 2015).

Os complexos ciclina-Cdk constituem a principal via de atuação da maquinaria de controle do ciclo celular e em cada fase do ciclo, os diferentes complexos desempenham funções regulatórias cruciais para a continuação ou parada do mesmo (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

Como já mencionado, a fase G1 é uma fase decisiva para as células, pois se passarem de G1 para S, as células seguirão para as outras fases do ciclo. A G1/S-Cdk-ciclina E, ou Cdk2-ciclina E, desempenha um papel crucial nesta passagem, o *checkpoint* G1, levando a checagem de danos no DNA e sinalizando para a célula o início de S. Ainda na fase G1, a Cdk4/6-ciclina D, ou também conhecida como G1-Cdk-ciclina D, é essencial no ponto de restrição, que acontece antes do ponto de *chk 1*. Este, por sua vez, é um importante momento de checagem se as condições externas à célula estão favoráveis para a célula prosseguir ou não o ciclo celular em S, conforme figura 2. (BUOLAMWINI, 2000; GÉRARD & GOLDBETER, 2016; POLLARD & EARNSHAW, 2008).

O complexo Cdk2-ciclina A, ou S-Cdk-ciclina A, faz parte do ponto de checagem de danos no DNA na fase S. Esse complexo é de extrema importância, pois caso haja danos no material genético é preciso repará-los antes que a célula prossiga para fase G2. A Cdk2-ciclina A é a responsável, juntamente com proteínas acessórias, por verificar e promover a correção de danos no DNA nessa fase (Figura 02) (POLLARD & EARNSHAW, 2008; GUTIERREZ, 2016). A transição da fase G2 para a mitose é marcada pela ativação de pelo menos dois complexos de ciclinas-Cdks. A Cdk1-ciclina B e Cdk1-ciclina A, sendo que a primeira está precisamente relacionada ao *checkpoint* G2 (POLLARD & EARNSHAW, 2008; WEINBERG, 2014).

Além dos complexos Cdks-ciclinas, várias proteínas e outros tipos de moléculas, como fatores de transcrição e proteínas como p53 e Cdh1, estão associadas ao controle do ciclo celular. Os complexos Cdks-ciclinas podem ser regulados por proteínas inibitórias de Cdks (CKIs do inglês *Cdks inhibitor proteins*), que fosforilam as Cdks em sítios específicos, inativando essas proteínas. Essa fosforilação não é definitiva e pode ser revertida por ação de fosfatases, que desfosforilam as Cdks nos seus sítios inibitórios (HE, *et. al.*, 2014; POLLARD & EARNSHAW, 2008).

Algumas fosfatases são capazes de desfosforilar as Cdks como as fosfatases da família Cdc25. São fosfatases dessa família conhecidas por sua interação no ciclo celular e são denominadas como Cdc25A, B e C. Cdc25A está envolvida na regulação dos complexos ciclina-Cdks envolvidos nos processos de transição de G1 para S, desfosforilando Cdk2-ciclina E, e de G2

para M, retirando o grupo fosfato do sítio inibitório de complexos Cdk1-ciclina B. Esta fosfatase é essencial para a vida da célula. Cdc25B, não é necessária para a mitose, mas essencial na produção de gametas na meiose; Cdc25C não é essencial para a vida da célula, mas é um mecanismo secundário para prevenir que as células prossigam para a mitose com danos no DNA (HE, *et. al.*, 2014; GUTIERREZ, 2016; POLLARD & EARNSHAW, 2008; CONTOUR-GALCERA, *et. al.*, 2007).

No câncer, quase todos os tipos de desregulações no ciclo celular e consequentemente, na proliferação, são resultados de alterações na fase G1, uma vez que essa é a fase de decisão para que as células prossigam no ciclo e se dupliquem ou não. Uma das mais frequentes alterações observadas na fase G1 em células cancerígenas é nos componentes do sistema p16/ciclina D/Cdk-4/Rb. A proteína de retinoblastoma (pRb) é uma das principais responsáveis pelo controle do ciclo celular nas células no ponto de restrição da fase G1 e na passagem de S para G2 e é sintetizada a partir do gene Rb, um gene supressor tumoral (GIACINTI & GIORDANO, 2006).

Além disso, outras moléculas como E2F, uma classe de fatores de transcrição participantes de muitos processos celulares, também estão envolvidos no ciclo celular, promovendo a transcrição de diferentes complexos Cdks-ciclina, bem como outras moléculas relacionadas ao ciclo (BUOLAMWINI, 2000; GÉRARD & GOLDBETER, 2016).

pRb se liga ao fator de transcrição E2F, isso faz com que esse fator não consiga formar um dímero através da ligação a um outro fator de transcrição (fator DP) para genes do ciclo celular. Sem a formação do dímero E2F-DP, a célula não pode prosseguir em G1, devido a falta de transcrição de proteínas necessárias para o avanço, ficando assim na fase G0, ou quiescente. Quando Cdk4/6-ciclinaD é ativada, o complexo fosforila pRb, que perde a afinidade por E2F, que então livre pode ligar-se a proteína DP, formando o dímero E2F-DP, que se liga a regiões promotoras de genes que codificam proteínas relacionadas a fase G1 e outras fases do ciclo celular (Ciclina A e E, Cdk1 e Cdc25) com isso, a célula prossegue no ciclo. No câncer, observa-se uma supressão do gene que codifica a proteína P16, que inibe o complexo Cdk4/6-ciclina D. Assim, caso esse complexo não seja inibido, haverá o favorecimento

da proliferação celular pelo mecanismo já descrito (POLLARD, & EARNSHAW, 2008; GUTIERREZ, 2016; O'LEARY, *et. al.*, 2016).

A pRb tem outras funções relacionadas ao ciclo celular. Essa proteína também pode interagir com a onco-proteína c-Myc, codificado do oncogene Myc, inibindo a atividade dessa molécula. A proteína c-Myc pode agir como um fator de transcrição, podendo ser encontrada no núcleo das células e é altamente expressa em diversos tipos de tumores. c-Myc pode formar um complexo com Max, uma proteína nuclear que também age como fator de transcrição pra proteínas da maquinaria do sistema de controle do ciclo celular que regulam positivamente o ciclo. Juntas essas proteínas se ligam a genes que transcrevem proteínas relacionadas ao ciclo celular (Cdk4, ciclina D, Cdk2 e ciclina E) e fatores de transcrição da família E2F (E2F1, E2F2, E2F3), aumentando a transcrição de proteínas promotoras do ciclo celular (WANG, *et. al.*, 2008; POLLARD & EARNSHAW, 2008).

Além disso, o complexo Myc-Max promove a inibição de processos de diferenciação celular pós mitose. A proteína c-Myc compete com a proteína Mad, uma proteína semelhante a c-Myc, para ligação ao fator de transcrição Max. O conjugado Mad-Max, liga-se a genes que promovem a diferenciação celular pós mitótica. Quando Myc é super-expressa na célula há um aumento dos níveis celulares de Myc-Max, uma vez que os níveis de Max são constantes na célula e por competição, mais moléculas de Myc se ligam a Max, com isso, ocorre a repressão de sinais pós mitogênicos, ou seja os sinais que irão promover a diferenciação da célula após a mitose, com isso Myc-Max promovem o processo chamado de dediferenciação ou anaplasia observados em tumores malignos, fazendo as células assumirem um fenótipo dediferenciado das células normais do tecido. Além disso, esse processo favorece a entrada das células no ciclo, já que a maquinaria proteica da célula não será direcionada para a diferenciação e manutenção tecidual (WANG, *et. al.*, 2008; WEINBERG, 2014; POLLARD & EARNSHAW, 2008; ALBERTS, *et. al.*, 2015).

Deficiências na tradução de genes de supressão tumoral como p53 e pRb são as principais causas do câncer (WITKIEWICZ & KNUDSEN, 2014; GASCO, *et. al.*, 2002). Essas proteínas estão intimamente relacionadas ao

ciclo celular e provocam alterações em todas as fases do ciclo. A p53 é um dos principais pontos de regulação da apoptose, mas também tem grande relação com o ciclo celular e é expressa em condições que indicam danos no DNA (GASCO, *et. al.*, 2002; THEORET, *et. al.*, 2008).

Os *checkpoints* são os responsáveis pela última conferência da integridade do DNA antes que o ciclo avance para a próxima fase. Caso o aparato proteico do *checkpoint* detecte danos, essa maquinaria promove a expressão de proteínas para promover o reparo. Diversas cinases estão associadas a resposta a danos no DNA, dentre elas, ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad9 related*) que quando ativadas fosforilam diversos substratos importantes para a correção do dano, incluindo a proteína p53 e duas *checkpoint*-cinases, Chek1 e Chek2 (MORGAN, 2007; NURBURY, 1992).

Chek1 ativada fosforila Cdc25A, levando a duas consequências: a primeira é que essa fosforilação leva a um bloqueio de Cdc25A provocando a inibição do complexo Cdk1-ciclina B, pausando G1. A segunda consequência da fosforilação de Cdc25A é o endereçamento desta fosfatase para a proteólise via mecanismo ubiquitina-proteassoma. Quando a proteína p53 é fosforilada pela Chk1, essa molécula atua como um fator de transcrição de proteínas que irão levar a célula parar a progressão do ciclo celular. Devido sua importância, alterações na expressão de Cdc25A, bem como nas Cdks são comuns em células cancerígenas (POLLARD & EARNSHAW, 2008; GASCO, *et. al.*, 2002; WEIBERNG, 2014; THEORET, *et. al.*, 2008).

1.2 O Câncer de Mama

O tecido mamário é constituído por uma série de ductos, ductulos e lóbulos, que se encontram num estroma que apresenta diferentes quantidades de tecido adiposo e tecido muscular fibroso que se organizam em forma de lobos que se iniciam nos mamilos. Os lobos se ramificam ao longo do tecido e juntamente com os dutos terminais formam o ducto-lobular terminal que representa a porção funcional e estrutural da mama. O epitélio que reveste todo o sistema de ductos e lóbulos do tecido mamário é constituído por camadas de células pertencentes a 3 tipos celulares. O primeiro tipo celular

encontrado e também a camada de células mais externa, são as células mioepiteliais; o segundo tipo celular e mais interno é a luminal; o terceiro tipo celular é constituído por células com propriedades progenitoras, que apresentam alta capacidade de diferenciação e são chamadas de células basais, ou células progenitoras de células que compõem o epitélio mamário e que também originam os outros dois tipos de células encontradas no epitélio da mama (ROSEN, 2014).

A carcinogênese do tecido mamário é um processo complexo e que envolvem múltiplas mutações. Para se entender a heterogenicidade, assim como, para a formulação de drogas e estratégias terapêuticas eficientes para o tratamento do câncer de mama é necessário identificar em primeiro lugar a origem e tipo de alteração molecular sofrida pela célula, bem como, os genes e/ou proteínas das células cancerígenas que podem servir como alvos para os agentes terapêuticos utilizados no tratamento (SCHNITT, 2010; BERTUCHI & BIRNBAUM, 2008; OSSOVSKAYA, *et. al.*, 2011).

Em uma correlação que considera a origem e fatores clínico-patológicos e moleculares, foi criada uma classificação molecular das neoplasias malignas do tecido mamário baseada principalmente nas células que as originam. Essa classificação definiu cinco subtipos moleculares possíveis de câncer de mama: Luminal A e B, HER2⁺, Basal-*like* e Normal-*like* (SCHNITT, 2010; KAO, *et al.*, 2009; BERTUCHI & BIRNBAUM, 2008; ZHAO, *et. al.*, 2015; OSSOVSKAYA, *et. al.*, 2011).

Os subtipos Luminais A e B (1 e 2) são cânceres oriundos de células luminais que geralmente não expressam HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), um oncogene que promove a progressão e crescimento tumoral. Esses subtipos representam cerca de 70% dos cânceres de mama invasivos e são ER/PR (*estrogen receptor/progesterone receptor*) positivos, super-expressando esses receptores e genes relacionados ao reconhecimento dos hormônios estrógeno e progesterona, respectivamente (SCHNITT, 2010; OSSOVSKAYA, *et. al.*, 2011).

O subtipo HER2⁺ (3) é representado por células que apresentam alta expressão da proteína HER2, mas ER/PR negativos, esse subtipo de câncer representa aproximadamente 15% dos cânceres de mama invasivos encontrados em humanos; (4) o Subtipo Basal-*like* é caracterizado pela alta

expressão de genes epiteliais basais e a citoqueratina basal. Os cânceres que pertencem a esse subtipo também representam cerca de 15% dos tumores invasivos de mama e são conhecidos por triplo negativos, por não expressarem receptores de estrogênio e progesterona assim como a proteína HER2, o que gera dificuldades na terapêutica de pacientes com esse tipo de tumor (KAO, *et al.*, 2009; BERTUCHI & BIRNBAUM, 2008; ZHAO, *et al.*, 2015).

O subtipo *Normal-like* (5) não apresenta grandes diferenças nos níveis de expressão de genes quando comparados com as células normais (KAO, *et al.*, 2009; BERTUCHI & BIRNBAUM, 2008; ZHAO, *et al.*, 2015).

Além das alterações que definem os subtipos de câncer de mama, alterações em genes e conseqüentemente, na síntese de proteínas relacionadas ao ciclo celular são observadas em células do câncer de mama. Uma das mais bem descritas alterações em tumores de mama é o acúmulo de ciclina D e Cdk4/6, que juntas formam o complexo ciclina D-Cdk4/6. Esse complexo é capaz de fosforilar pRb, essa fosforilação permitirá a formação do dímero E2F-DP que irá atuar como um fator de transcrição se ligando a genes relacionados ao ciclo celular resultando na transcrição de genes que irão promover a passagem das células pela fase G1 e continuação do ciclo celular (ASGHAR, *et al.*, 2015; WEINBERG, 2014; POLLARD & EARNSHAW, 2008; ZAFONTE, *et al.*, 2000; GUTIERREZ, 2016).

Outra alteração comum nos cânceres de mama é o aumento da expressão do fator de transcrição c-Myc, que se conjuga a Max e alteram o sistema de controle do ciclo celular, promovendo o avanço das células pelo ciclo, aumentando a proliferação das células pela alteração da expressão de genes como Cdks e Cdc25. Os níveis elevados de c-Myc favorecem a inibição dos fatores de diferenciação pós mitóticos pelo aumento dos níveis celulares de Myc-Max, que estimulam a expressão de genes promotores da proliferação celular, conforme já descrito. Myc também está envolvida em processos de angiogênese, promovendo crescimento o crescimento vascular endotelial (WEINBERG, 2014; ZAFONTE, *et al.*, 2000; LIU, *et al.*; 2005).

Diversos fármacos desenvolvidos para o combate do câncer de mama têm como alvos proteínas relacionadas ao ciclo celular e são baseados nas características moleculares que definem os subtipos. Os cânceres luminiais em sua maioria respondem bem ao tratamento com drogas que inibem os

receptores hormonais, como tamoxifeno e inibidores de aromatase, drogas de primeira escolha na endocrinoterapia. Esse tipo de câncer (Luminal B maior que Luminal A) também tem uma boa resposta a quimioterapia e em geral apresentam um prognóstico favorável (SCHNITT *et. al.*,2000).

Os cânceres do tipo HER2 positivos também apresentam uma resposta positiva a quimioterapia baseada em atraciclinas, que irão se ligar a moléculas de DNA, impedindo a replicação, e provocando outros danos que irão culminar na ativação da maquinaria apoptótica e morte celular. O tratamento mais eficiente para cânceres que super-expressam a proteína HER2 é o uso do fármaco Herceptin, que tem como princípio ativo o trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que se liga a proteína de superfície HER2, inibindo o crescimento e progressão tumoral (SCHNITT, *et. al.*, 2000; RAJ, *et. al.*, 2014).

Os cânceres do tipo triplo negativo são os que apresentam pior prognóstico e mais difícil tratamento. Devido às características moleculares das células desse tipo de câncer a terapêutica para essas células torna-se difícil e não específica, tendo principal estratégia terapêutica a quimioterapia. Algumas pesquisas mostraram avanços com uma classe de drogas chamadas inibidores de PARP, uma enzima celular ativada quando há danos no DNA, porém, essa terapia não se mostrou eficiente ao combate a todos os tipos de tumores de mama triplo negativos. Essa terapia mostrou-se relativamente seletiva, apresentando melhor resultado em mulheres com predisposição genética do câncer de mama. Além disso, PARP é uma proteína de reparo do DNA, e sua inibição em camundongos, demonstrou uma predisposição à neoplasia mamária e tumorigênese nos animais, portanto, essa terapia também pode trazer muitos riscos. (LAJUS, 2010; SCHNITT, *et. al.*, 2000). Com base nisso, pesquisas que buscam novos agentes terapêuticos para o combate do câncer de mama triplo negativo, bem como alvos moleculares nesses subtipos de câncer de mama são de extrema importância.

1.3 Peçonhas de Serpentes e sua Composição

Atualmente as drogas antitumorais utilizadas na terapia de quase todos os tipos de câncer, incluindo aqueles que não apresentam nenhum alvo específico ainda descoberto como os cânceres de mama triplo negativos, têm

como principal alvo proteínas envolvidas na síntese e manutenção da molécula de DNA, bem como aquelas envolvidas no ciclo celular e seu sistema de controle. Essas drogas, geralmente, são utilizadas para: (1) bloqueio da síntese de DNA, (2) provocar danos no DNA e (3) parar fases do ciclo celular (CALDERON, *et. al.*, 2014; JIANG *et. al.*, 2008; BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2012). Mesmo com alvos essenciais para o desenvolvimento das células cancerígenas, essas drogas não são alvo específico em grande parte dos tratamentos, o que torna o processo terapêutico mais nocivo para o organismo, além de também envolver procedimentos invasivos para quimioterapia, remoção de tumor (s), dentre outros. Em muitos casos a terapia envolve ainda radioterapia, tornando todo o processo desgastante e ainda mais prejudicial pra o corpo do hospedeiro que sofre com os efeitos colaterais do tratamento (KAMATH, & BUOLAMWINI, 2006; CALDERON, *et. al.*, 2014).

Neste cenário, estão sendo desenvolvidas em todo o mundo, pesquisas no campo da biotecnologia que buscam aprimorar e desenvolver novas drogas que sejam mais específicas para combater os cânceres. As indústrias farmacêuticas estão desenvolvendo vários produtos com esse potencial farmacológico, baseados na estrutura de toxinas e peptídeos presentes em peçonhas e venenos, bem como em metabólitos secundários de microorganismos, plantas e animais (RODRIGUES, *et. al.*, 2015; CALDERON, *et. al.*, 2014; LEWIS & GARCIA, 2003).

As peçonhas de serpentes são uma das mais abundantes fontes de moléculas com potencial farmacológico, e pesquisas que buscam encontrar moléculas que possam um dia ser utilizadas como fármacos ou modelo para formulação dos mesmos têm sido realizadas em todo mundo e apresentam resultados promissores (CALDERON, *et. al.*, 2014; VYAS, *et. al.*, 2013).

Peçonhas de serpentes são uma mistura complexa de moléculas biologicamente ativas e compostos inorgânicos, 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 nas presas animais ou do homem em casos de acidentes ofídicos. Essas ações fisiológicas provocadas pelos componentes de peçonhas ofídicas durante esses acidentes podem ser exploradas cientificamente, atribuindo um

grande potencial farmacológico para as peçonhas ofídicas e seus componentes isolados (CALDERON, *et. al.*, 2015; RODRIGUES, *et. al.*, 2015).

No Brasil, os acidentes ofídicos mais comuns são aqueles causados por serpentes do gênero *Bothrops*, devido a abundância dessas serpentes no país. Esses acidentes são mais conhecidos por causar grande dano tecidual local e pouca letalidade (CARDOSO, 2009; BERBADES, 2010). Esse grande dano tecidual é devido principalmente, aos componentes proteicos presentes na peçonha dessas serpentes, sendo os mais abundantes: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂, peptídeos potencializadores de bradicinina, desintegrina e lectinas tipo C. Assim, do ponto de vista farmacológico, essas peçonhas são ricas fontes de moléculas com grandes potenciais a serem explorados em pesquisas científicas que visam a bioprospecção e aplicação de novos agentes terapêuticos (RODRIGUES, *et. al.*; 2010; RODRIGUES, *et. al.*, 2015).

Dentre os componentes enzimáticos que apresentam esse potencial farmacológico, destacam-se as PLA₂s pela abundância e atividade antitumoral, antibacteriana e antiparasitária (GEBRIM *et. al.*, 2009; CALDERON, *et. al.*, 2014; RODRIGUES, *et. al.*, 2015). Além disso, outras atividades biológicas interessantes estão associadas a outros componentes dessas peçonhas, como as metaloproteases, capazes de promover a degradação de componentes da matriz extracelular (DE MORAES & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; RODRIGUES, *et. al.*, 2015; ACHE, *et. al.*, 2015).

As PLA₂s e SVMPs são capazes de provocar inibição da adesão e migração de células tumorais (BAZAA *et al.*, 2009 ACHE, *et. al.*, 2015; RODRIGUES, *et. al.*, 2015; CALDERON, *et. al.*, 2014). Assim, dadas às inúmeras ações farmacológicas associadas aos componentes das peçonhas de serpentes, estas apresentam grande potencial para a terapêutica do câncer (VYAS, *et al.* 2013), seja atuando na destruição de células tumorais ou inibindo a adesão e migração celular.

Em relação ao câncer de mama, pesquisas tem demonstrado que componentes de peçonhas são promissores moléculas com potencial antitumoral a serem estudados. A peçonha de *Walterinnesia aegyptia*, conjugada com nanopartículas de sílica foi capaz de diminuir os níveis de fosforilação de AKT, ERK e IκBα, assim como diminuir a expressão de ciclina

D1 em células de câncer de mama e próstata. Esses são fatores antiapoptóticos e de proliferação que são relacionados a sobrevivência desses tumores (BADR, *et. al.*, 2013). De carvalho, *et. al.* (2001), demonstraram ação de uma lectina (BJcuL) isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* capaz de interferir na adesão de células de carcinomas de ovário e mama. Essa proteína também foi capaz de inibir o crescimento de células endoteliais.

A espécie *Bothrops pauloensis* é encontrada, comumente, no Estado de São Paulo e na zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba (VALLE & BRITES, 2008) e a análise de proteômica da peçonha dessa serpente (Figura 03) mostrou que as proteínas mais abundantes dessa peçonha são metaloproteases e fosfolipases A₂ (RODRIGUES, *et. al.*, 2010).

São diversas as proteínas isoladas da peçonha de *B. pauloensis* com potencial farmacológico. Dentre as atividades farmacológicas apresentadas por essas toxinas, destacam-se atividade antiparasitária, antibacteriana, assim como potencial antitumoral tendo atividades que vão desde a inibição da angiogênese e capacidade citotóxica promovendo apoptose e morte celular (RODRIGUES, *et. al.*, 2015; AZEVEDO, *et. al.*, 2016; ACHÊ, *et. al.*, 2015; NUNES, *et. al.*, 2013; FERREIRA, *et. al.*, 2013).

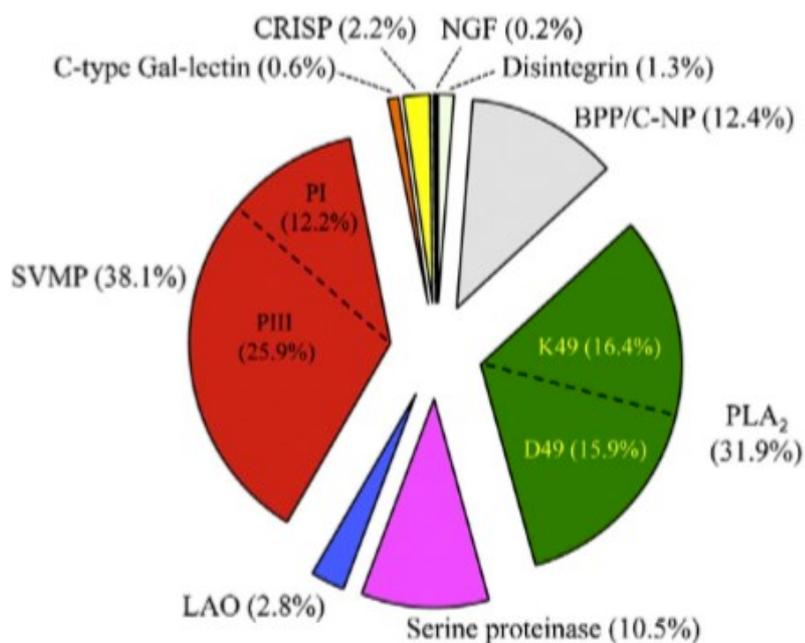


Figura 03: Análise proteômica da composição da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Adaptado de Rodrigues, *et. al.*, 2012.

1.4 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que atuam sobre membranas celulares clivando fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios e são classificadas segundo o sítio de hidrólise na cadeia do fosfolipídeo (WITTCOFF, 1951).

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) (E.C. 3.1.1.4) hidrolisam especificamente fosfolipídios na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 04) numa reação que é dependente de cálcio. Essas foram as primeiras PLAs descobertas, e sua atividade foi observada a partir da análise da ação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise da fosfatidilcolina (ARNI & WARD, 1996; KINI, 2003; WITTCOFF, 1951).

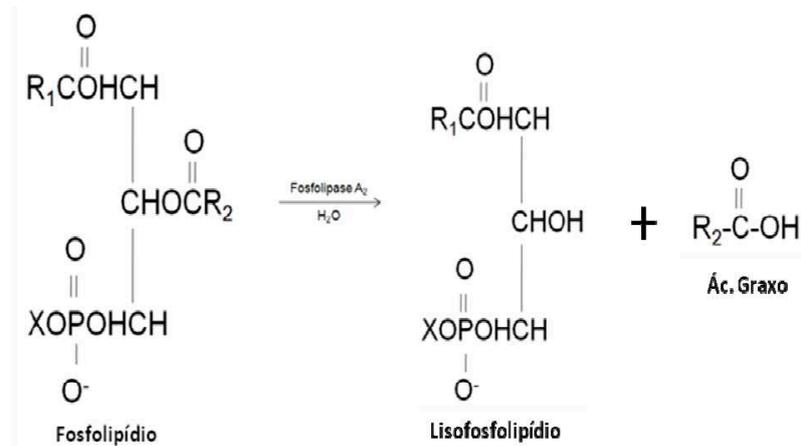


Figura 04: Hidrólise de um fosfolípido por uma PLA₂. A PLA₂ realiza uma quebra na estrutura do fosfolípido. Liberando lisofosfolípido e ácido graxo. Fonte: Santos-Filho, 2009.

As PLA₂s apresentam um importante papel fisiológico, tendo capacidade de influenciar em várias funções celulares, incluindo a manutenção dos fosfolípidos das membranas celulares, participação na transdução de sinais, proliferação celular e nos processos de contração muscular (DENNIS, *et. al.*, 1991; OLIVEIRA, *et. al.*, 2009). Sabe-se ainda que essas enzimas estão envolvidas em processos inflamatórios humanos, pois os ácidos graxos liberados pela hidrólise das moléculas de fosfolípidos, são precursores dos eicosanóides como prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxinas. Esses por sua vez, são lipídeos bioativos e mediadores da inflamação, dor e ativação plaquetária.

Os lisofosfolípidos oriundos da hidrólise dos fosfolípidos pelas PLA₂s, estão relacionados com os processos de sinalização celular e na remodelagem de fosfolípidos de membrana. Além disso, esses lisofosfolípidos podem atuar como precursores de mediadores lipídicos para desencadear outras respostas celulares, como ácido lisofosfatídico, que está relacionado com processos de proliferação, sobrevivência e migração celular (SIX & DENNIS, 2000; SCHALOSKE & DENNIS, 2006; DENNIS, 1997; SANTOS-FILHO, 2009).

As PLA₂s podem ser encontradas em diversos organismos. Essas enzimas podem ser divididas em cinco grupos fundamentais, secretórias (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), Ca²⁺ independentes (iPLA₂), PAF acetilhidrolases (fator de ativação da agregação plaquetária) e as lisossômicas. Essa divisão se dá conforme a sequência de aminoácidos, origem, mecanismo catalítico e as

peculiaridades estruturais e funcionais dessas proteínas. A classe das fosfolipases A₂ pode ainda ser subdividida em quinze grupos de acordo com sua origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfeto em sua estrutura. A tabela 1 mostra essa classificação (DE MORAES & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; SANTOS-FILHO, 2009).

As fosfolipases das peçonhas de serpentes (SVPLAs) pertencem a classe de fosfolipases secretórias (ARNI & WARD, 1996; KETELHUT *et. al.*, 2003). Essas fosfolipases secretórias, apresentam massa molecular de 14 a 18 KDa e apresentam de 5 a 8 ligações dissulfeto em sua estrutura. Essas moléculas apresentam uma histidina em seu sítio ativo, são dependentes da interação com o íon cálcio (Ca²⁺) para catálise e pertencem aos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII e XIV, conforme mostrado na tabela 1 (SCHALOSKE & DENNIS, 2006). As fosfolipases A₂ encontradas nas peçonhas de serpentes são reunidas nos grupos I e II (tabela 1) (SCHALOSKE & DENNIS, 2006; WARD, *et. al.*, 2001).

Grupo	PLA ₂	Fonte	Massa relativa (Mr)	Características
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13–15	7 pontes dissulfeto
IB	sPLA ₂	Pâncreas suíno e humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIA	sPLA ₂	Crotalinae, fluido sinovial humano	13–15	7 pontes dissulfeto
IIB	sPLA ₂	Víbora de Gaboon	13–15	6 pontes dissulfeto
IIC	sPLA ₂	Testículo de rato e murino	15	8 pontes dissulfeto
IID	sPLA ₂	Baço/pâncreas humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIE	sPLA ₂	Cérebro/coração/útero humano e murino	14–15	7 pontes dissulfeto
IIF	sPLA ₂	Testículo/embrião humano e murino	16–17	6 pontes dissulfeto
III	sPLA ₂	Humano/murino/lagarto/abelha	15–18; 55 (humano/murino)	8 pontes dissulfeto
IVA	cPLA ₂	Humano/murino	85	Domínio C2
IVB	cPLA ₂	Humano	114	Domínio C2
IVC	cPLA ₂	Humano	61	Acilado
IVD	cPLA ₂	Humano/murino	92–93	Domínio C2
IVE	cPLA ₂	Murino	100	Domínio C2
IVF	cPLA ₂	Murino	96	Domínio C2
V	sPLA ₂	Macrófago/pulmão/coração de humano e murino	14	6 pontes dissulfeto
VIA-1	iPLA ₂	Humano/murino	84–85	8 repetições de sequência consenso
VIA-2	iPLA ₂	Humano/murino	88–90	7 repetições de sequência consenso
VIB	iPLA ₂	Humano/murino	88–91	Ligada a membrana
VIC	iPLA ₂	Humano/murino	146	Proteína integral de membrana
VID	iPLA ₂	Humano	53	Triacilglicerol lipase
VIE	iPLA ₂	Humano	57	Triacilglicerol lipase
VIF	iPLA ₂	Humano	28	Triacilglicerol lipase
VIIA	PAF-AH	Humano, murino, suíno, bovino	45	Secretada, α/β hidrolase
VIIB	PAF-AH	Humano, bovino	40	Intracelular, PAF α/β hidrolase
VIIIA	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
VIIIB	PAF-AH	Humano	26	Intracelular, tríade Ser/His/Asp, homodímero ou heterodímero
IX	sPLA ₂	Caracol (conodipine-M)	14	6 pontes dissulfeto
X	sPLA ₂	Leucócito/timo/baço humanos	14	8 pontes dissulfeto
XIA	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-I)	12.4	6 pontes dissulfeto
XIB	sPLA ₂	Broto verde de arroz (PLA2-II)	12.9	6 pontes dissulfeto
XII	sPLA ₂	Humano/murino	19	7 pontes dissulfeto
XIII	sPLA ₂	Parvovírus	<10	sem pontes dissulfeto
XIV	sPLA ₂	Fungo simbiótico/bactéria	13–19	2 pontes dissulfeto
XV	PLA ₂ lisossomal	Humano, murino, bovino	45 (deglicosilada)	Triade Ser/His/Asp, glicosilada, sequência sinal N-terminal

Tabela 1: Classificação das PLA₂s.

As SVPLA₂s são subdividas em dois grupos principais, as Asp-49 e Lys-49, de acordo com a posição do aminoácido presente na posição 49 do sítio catalítico, se o aminoácido é um Aspartato, a PLA₂ pertence ao grupo das Asp-49, que são enzimas com expressiva capacidade catalítica sobre substratos artificiais, se a PLA₂ apresenta uma Lisina na posição 49, pertence ao grupo das Lys-49, que apresentam baixa ou nenhuma atividade catalítica sobre substratos artificiais. Outras variantes de SVPLA₂s também têm sido descritas, a saber: Ser49, Asn49 ou Arg49 (ARNI & WARD, 1996; KETELHUT *et. al.*, 2003; KRIZAJ *et. al.*, 1991; POLGAR *et. al.*, 1996; TSAI *et. al.*, 2004; WEI *et. al.*, 2006).

As PLA₂s de peçonhas de serpentes apresentam diversos efeitos tóxicos no envenenamento, podendo atuar em membranas de células de tecidos específicos através do mecanismo catalítico ou não dessas enzimas. Dentre as diversas alterações que podem ser causadas pela ação das PLA₂s, destacam-se a miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária e edema, dentre outras (RODRIGUES, *et. al.*, 2007; NUNES, *et. al.*, 2013; RODRIGUES, *et. al.*, 2015; POLGAR, *et. al.*, 1996; OWNBY, *et al.*, 1999; KETLHUT, *et. al.*, 2003; KRIZAJ, *et. al.*, 1991). Por sua ação no processo de envenenamento, as PLA₂s são promissores modelos de agentes terapêuticos e baseado nisso, diversas pesquisas demonstraram vários efeitos farmacológicos dessas toxinas, tais como, atividade antiparasitária, antitumoral, antiplaquetária e antiangiogênica (SOARES, *et. al.*, 2000; NUNES, *et. al.*, 2013; RODRIGUES, *et. al.*, 2004; RODRIGUES, *et. al.*, 2007; FERREIRA, *et. al.*, 2013).

1.4.1 Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes (SVPLA₂) e Câncer

A utilização das fosfolipases A₂ como moléculas com potencial terapêutico pode ser explicada por dois mecanismos: atividade citotóxica direta sobre as células, desencadeando mecanismos de morte celular seja por apoptose ou não, ou por mudanças em processos

Fonte: Santos Filho, 2009

essenciais para o desenvolvimento e progressão do tumor, como inibição da adesão, angiogênese e alterações no ciclo celular (RODRIGUES, *et. al.*, 2015; CALDERON, *et. al.*, 2014; AZEVEDO, *et. al.*, 2016; YAN, *et. al.*, 2007; PINHOLATO, *et. al.*, 2015; BAZAA, *et. al.*, 2010).

A ação citotóxica de SVPLA₂ é bem descrita na literatura. PLA₂s como a BpPLA₂-TX-I, uma fosfolipase A₂ ácida, isolada da peçonha de *B. pauloensis* é capaz de induzir efeitos citotóxicos sobre células de sarcoma TG-180 e carcinoma ovariano OVCAR-3 (FERREIRA, *et. al.*, 2013). Essas toxinas também podem induzir células de câncer de mama a autofagia, um mecanismo que pode ser desencadeado em células que sofreram danos graves e é um mecanismo de autodestruição independente e é também denominado como morte celular programada tipo II. Yan, e colaboradores (2007) demonstraram essa capacidade das PLA₂s com Crotoxina, uma PLA₂ oriunda da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxina foi capaz de induzir a autofagia em células da linhagem MCF-7, contribuindo também para a apoptose dessas células. Outra ação demonstrada por representantes dessa classe de toxinas sobre células de câncer é a capacidade de agirem como moléculas anti-integrinas, inibindo a adesão e migração de células de HMEC-1 (*Human microvascular endothelial cells*) (BAZAA, *et. al.*, 2010).

Prinholato da Silva e colaboradores (2015) demonstraram o potencial dessa classe de toxinas na promoção de alterações sobre o ciclo celular de células cancerígenas. BthTX-I, uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararacuçu* foi capaz de induzir alterações no ciclo celular das células tumorais murinas PC-12 e B16F10. A inibição do ciclo celular foi observada pelo acúmulo de células na fase G₀-G₁ promovido nos grupos de células tratados com a toxina. Além disso, BthTX-I foi capaz de induzir a apoptose em células B16F10, uma linhagem de melanoma murino altamente metastática.

Outro estudo que avaliou a toxicidade de três PLA₂s isoladas da peçonha de *B. mattogrossensis*, duas Lys-49 (cataliticamente inativas) denominadas BmatTX-I e BmatTX-II e uma PLA₂ Asp-49 (cataliticamente ativa), BmatTX-III, em células de leucemia humana de células T (JURKAT) e adenocarcinoma de mama Her-2 positivas (SK-BR-3). As PLA₂s Lys-49 analisadas foram mais citotóxicas do que BmatTX-III às células de leucemia. Neste trabalho os autores discutem que essa diferença na capacidade

citotóxica pode ser pelas diferenças estruturais que esses dois tipos de toxinas apresentam. As PLA₂ Asp-49 são enzimaticamente ativas e em contato com células provocam, principalmente, alterações na membrana pela degradação de fosfolípidos que compõem a mesma, desencadeando processos de morte celular por apoptose. Já as PLA₂ Lys-49 não apresentam atividade catalítica, mas continuam apresentando capacidade citotóxica. Essa capacidade citotóxica observada em PLA₂s Lys-49, se deve ao fato dessas toxinas apresentarem uma sua região C-terminal uma sequência de aminoácidos com alta atividade citotóxica (DE MOURA *et. al.*, 2014).

A citotoxicidade de PLA₂s de peçonhas de serpentes 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, essa modificação não alterou a atividade antitumoral da toxina sobre células de melanoma e fibrosarcoma, sugerindo que a ação citotóxica é distinta do sítio catalítico da toxina (BAZAA *et. al.*, 2009).

Outro estudo que buscou avaliar atividade citotóxica dessa promissora região C-terminal de PLA₂ foi realizado por Araya e Lomonte (2007). Neste trabalho, foi sintetizado um peptídeo homólogo a região C-terminal de uma PLA₂ Lys-49 que se mostrou capaz de reduzir a massa tumoral de EMT6, um carcinoma mamário murino.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade antitumoral de BnSP-6, uma PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Essa PLA₂ Lys-49, relativamente abundante na peçonha de *B. pauloensis*, isolada primeiramente, por Rodrigues e colaboradores (1998), foi capaz de inibir a adesão e migração de células MDA-MB-231, uma linhagem de células triplo negativa e altamente metastática, além disso, BnSP-6 foi capaz de estimular a autofagia promovendo a formação de vacúolos autofágicos e induzindo a célula a morte celular programada por apoptose, confirmada pelo aumento da expressão de genes relacionados a via apoptótica, como TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A e CASP8. Além disso, BnSP-6 foi capaz de provocar um aumento da expressão de genes BRCA2 e TP53, genes supressores de tumor (AZEVEDO, *et. al.*, 2016).

Novos estudos precisam ser realizados para a compreensão da ação dessa toxina sobre células de câncer de mama, mas esses resultados demonstram o grande potencial terapêutico da BnSP-6, sendo um possível modelo para produção de agentes terapêuticos para o combate a cânceres de mama, dentre eles o triplo negativo. Nesta perspectiva, este trabalho visa elucidar a ação de BnSP-6 sobre o ciclo celular de uma linhagem de células triplo negativas do câncer de mama (MDA-MB-231), assim como, aprofundar os conhecimentos do potencial terapêutico dessa molécula.

Referências Bibliográficas

Achê, D. C.; Gomes, M. S.; de Souza, D. L.; Silva, M. A.; Brandeburgo, M. I.; Yoneyama, K. A.; Rodrigues, R. S.; Borges, M. H.; Lopes, D. S.; Rodrigues, V. M. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol.** v. 72, p. 445-453. 2015.

ACS, American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. **American Cancer Society.** Atlanta. 2015.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2010. Molecular biology of the cell. **Garland Science, Taylor & Francis Group.** 6th ed. New York, 2015.

Aragão, E. A. Efeito bactericida de Fosfolipases A2-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais. **Tese de doutorado.** Universidade de São Paulo, p. 118, 2005.

Araya, C.; Lomonte, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. **Cell Biol Int.** v. 31 (3), p. 263-268. 2006.

Arni, R. K.; Ward, R. J. Phospholipase A2 – A structural review. **Toxicon,** v. 34, p. 827 – 841, 1996.

Asghar, U.; Witkiewicz, A.K.; Turner, N. C.; Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 14, p. 130–146. 2015.

Azevedo, F. V.; Lopes, D. S.; Cirilo-Gimenes, S. N.; Achê, D. C.; Vecchi, L.; Alves, P. T.; Guimarães, D. de O.; Rodrigues, R. S.; Goulart, L. R.; Rodrigues, V. M.; Yoneyama, K. A. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Int J Biol Macromol.** v. 86, p. 671–677. 2016.

Badr, G.; Al-Sadoon, M. K.; Rabah, D. M. Therapeutic efficacy and molecular mechanisms of snake (*Walterinnesia aegyptia*) venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer- and prostate cancer-bearing experimental mouse models. **Free Radic Biol Med.** v. 65, p.175-189. 2013.

Bazaa, A.; Luis, J.; Srairi-Abid, N.; Kallech-Ziri, O.; Kessentini-Zouari, R.; Defilles, C.; Lissitzky, J. C.; El-Ayeb, M.; Marrakchi, N. MVL-PLA₂, a

phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol.** v. 28, p. 188-193. 2009.

Bazaa, A.; Pasquier, E.; Defilles, C.; Limam, I.; Kessentini-Zouari, R.; Kallech-Ziri, O.; El Battari, A.; Braguer, D.; El Ayeb, M.; Marrakchi, N.; Luis, J. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS ONE.** v. 5 (4),p. 01-10. 2010.

Bernardes, P.S. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. **Anolis Books.** 1ª ed. São Paulo, SP. 2014.

Bertucci, F.; Birnbaum, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. **Journal of Biology.** v. 7 (6), p. 6.1-6.4. 2008.

Brannon-Peppas L.; Blanchette, O. J. Nanoparticles and systems, target for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 64, p. 206–212. 2012.

BSBC, British Society for Cell Biology. The Cell Cycle Control. Disponível em: <http://bscb.org/learning-resources/softcell-e-learning/cell-cycle-control/>. Acess in: Maio de 2016.

Buolamwini, J. K. Cell Cycle Molecular Targets in Novel Anticancer Drug Discovery. **Current Pharmaceutical Design.** v. 6, p. 379-392. 2000.

Calderon, L. A.; Sobrinho, J. C.; Zaqueo, K. D.; de Moura, A. A.; Grabner, A. N.; Mazzi, M. V.; Marcussi, S.; Nomizo, A.; Fernandes, C. F.; Zuliani, J. P.; Carvalho, B. M.; da Silva, S. L.; Stábeli, R. G.; Soares, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in câncer therapy. **BioMed Reserach International.** v. 2014, p. 01-19. 2014.

Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry,** v. 42(11), p. 1405-1414. 2007.

Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Wen, F. H.; Málaque, C. M. S.; Junior, V. H. Animais peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Editora Sarvier.**ed.2, p. 540, 2009.

Cairns, R. A.; Harris, I. S.; Tak M. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer.** v. 1, p. 85-95. 2011.

Contour-Galcera, M. O.; Sidhu, A.; Prévost, G.; Bigg, D.; Ducommun, B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 115, p. 01-12. 2007.

Costa, H. C. & Bérnils, R. S. Répteis Brasileiros: Lista de Espécies 2015. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. v. 4 (5), p. 75-93. 2015.

De Moraes, C. K.; Selistre-De-Araujo, H. S. Effect of rACLIF, a recombinant snake venom metalloproteinase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. **Toxicon**. v. 48, p. 641-648, 2006.

De Moura, A. A.; Kayano, A. M.; Oliveira, G. A.; Setúbal, S. S.; Ribeiro, J. G.; Barros, N. B.; Nicolete, R.; Moura, L. A.; Fuly, A. L.; Nomizo, A.; da Silva, S. L.; Fernandes, C. F.; Zuliani, J. P.; Stábeli, R. G.; Soares, A. M.; Calderon, L. A. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **Biomed Res**. v. 2014, p. 01-13, 2014.

Dennis, E. A.; Rhee, S. G.; Billah, M. M.; Hannun, Y. A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB J**. v.5 p.2068-2077; 1991.

Ferreira, F. B.; Gomes, M. S.; de Souza, D. L.; Gimenes, S. N.; Castanheira, L. E.; Borges, M. H.; Rodrigues, R. S.; Yoneyama, K. A.; Brandeburgo, M. I.; Rodrigues, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, v.5(12), p. 2403-2419. 2013.

Ferreira, F. B.; Gomes, M. S.; de Souza, D. L.; Gimenes, S. N.; Castanheira, L. E.; Borges, M. H.; Rodrigues, R. S.; Yoneyama, K. A.; Brandeburgo, M. I.; Rodrigues, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**. v, 5(12), p. 2403-2419. 2013.

Gasco, M.; Shami, S.; Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Reserch**. v. 4, p. 70-76. 2002.

Gebirim, L. C.; Marcussi, S.; Menaldo, D. L.; de Menezes, C. S.; Nomizo, A.; Hamaguchi, A.; Silveira-Lacerda, E. P.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Sampaio, S. V.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**. v. 37 (4), p. 222-229. 2009.

Gérard, C.; Goldbeter, A. Dynamics of the Mammalian Cell Cycle in Physiological and Pathological Conditions. **WIREs System Biological and Medicine**. v. 8, p. 140-156. 2016.

Giacinti, C; Giordano, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**. v. 25, p. 5220-5227. 2006.

Golub, T. R.; Slonim, D. K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J. P.; Coller, H.; Loh, M. L.; Downing, J. R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D.; Lander, E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**. v. 286 (5439), p. 531-537. 1999.

Gutierrez, C. 25 Years of Cell Cycle Research: What's Ahead? **Trends Plant Sci**. [Epub ahead of print]. 2016.

Hattori, Y.; Yokoya, A.; Watanabe, R. Cellular automaton-based model for radiation-induced bystander effects. **BMC Syst Biol**. v. 9 (90), p. 01-22. 2015.

He, R.; Yu, Z; Zhang, R.; Zhang, Z. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutics targets. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 35, p. 1227–1246. 2014.

Heiden, M.G. V.; Cantley, C. L.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**. v. 324, p. 1029-1033. 2010.

INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**. v. 11. Rio de Janeiro, 2015.

Iwanaga, S. S., T. Enzymes in snake venom. **SPRINGER**. Berlin Heidelberg, New York. 1979.

Jiang, N.; Wang, X.; Yang, Y.; Dai, W. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment,” **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 6 (8), p. 885–895, 2006.

Kagami, Y.; Yoshida, K. The functional role for condensin in the regulation of chromosomal organization during the cell cycle. **Cell Mol Life Sci**. [Epub ahead of print]. 2016.

Kamath, S.; Buolamwini, J. K. Targeting EGFR and HER-2 receptor tyrosine kinases for cancer drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**. v. 26 (5). p. 569–594. 2006.

Kang, T. S.; Georgieva, D.; Genov, N.; Murakami, M. T.; Sinha, M.; Kumar, R. P.; PunitKaur, P.; Kumar, S.; Dey, S.; Sharma, S.; Alice Vrieling, A.; Betzel, C.; Takeda, S.; Raghuvir K.; Arni, R. K.; Singh, T. P.; Kini, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**. v. 278. p. 4544-4576. 2011.

Kao, J.; Salari, K.; Bocanegra, M.; Choi, Y. L.; Girard, L.; Gandhi, J.; Kwei, K. A.; Hernandez-Boussard, T.; Wang, P.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Pollack, J. R. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **PLoS ONE**. v. 4(7), p. 01-16. 2009.

Ketelhut, D. F. J.; Homem De Mello, M.; Veronese, E. L. G.; Esmeraldino, L. E.; Murakami, M. T.; Arni, R. K.; Giglio, J. R.; Cintra, A. C. O.; Sampaio, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochim.**, v. 85, p. 983-991, 2003.

Kini, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

Kini, R. M.; Evans, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.

Krizaj, I.; Bieber, A. L.; Ritonja, A.; Gubensek, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 1165-1168, 1991.

Lajus, T. B. P. A utilização de inibidores de PARP na profilaxia e no tratamento do câncer de mama deficiente no gene BRCA1. **R. Ci. méd. biol.** v. 9 (3), p. 252-256. 2010.

De Carvalho D. D.; Schmitmeier, S.; Novello, J. C.; Markland, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**. v. 39, p. 1471-1476. 2001.

Lewis, R. J.; Garcia, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2 (10), p. 790–802. 2003.

Liu, S.; Dontu, G.; Wicha, M. S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. **Breast Cancer Research**. v. 7, p. 86-95. 2005.

Mackessy, S. P. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. **CRC Press: Taylor and Francis Group**. New York, USA, 2010.

Malumbres, M.; Barbacid, M. To Cycle or not to Cycle: A Critical Decision in Cancer. **Nature reviews Cancer**. v. 1, p. 222-231. 2001.

Maluumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs in cancer: A changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**. v. 9; p. 153-166. 2009.

Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA**, v.1477, p. 146-156. 2000.

Morgan, D. O. The Cell Cycle: Principles of Control. **New Science Press Ltd**. London, UK. 2007.

NCI, National Cancer Institute – EUA. What Is Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 14 de Julho de 2016.

NCI, National Cancer Institute – EUA. What Is Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer/metastatic-fact-sheet> . Acesso em: 19 de Julho de 2016.

Nunes, D. C.; Figueira, M. M.; Lopes, D. S.; De Souza, D. L.; Izidoro, L. F.; Ferro, E. A.; Souza, M. A.; Rodrigues, R. S.; Rodrigues, V. M.; Yoneyama, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**. v. 140 (7), p. 844-854. 2013.

Nurbury, C.; Nurse, P. Animal Cell Cycles and Their Control. **Annu. Rev. Biochem.** v. 61, p. 441-470. 1992.

O'Leary, B.; Finn, R. S.; Turner, N. C. Treating Cancer with selectives CDK-4/6 inhibitors. **Nature Reviews | Clinical Oncology**. v. 26, p. 01-14. 2016.

Oliveira, C. F.; Lopes, D. S.; Mendes, M. M.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Hamaguchi, A.; Alcântara, T. M.; Clissa, P. B.; Rodrigues, V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 53, p. 560-569. 2009.

Ossovskaya, V.; Wang, Y.; Budoff, A.; Xu, Q.; Lituev, A.; Potapova, O.; Vansant, G.; Monforte, J.; Daraselia, N. Exploring molecular pathways of triple-negative breast cancer. **Genes Cancer**. v. 9, p. 870-879. 2011.

Ownby, C. L.; Selistre de Araujo, H. S.; White, S. P.; Fletcher, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37 (3), p. 411- 445. 1999.

Ketelhut, D. F.; de Mello, M. H.; Veronese, E. L.; Esmeraldino, L. E.; Murakami, M. T.; Arni, R. K.; Giglio, J. R.; Cintra, A. C.; Sampaio, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacuçu* snake venom. **Biochimie**. v. 85 (10), p. 983-991. 2003.

Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. **Journal of Molecular Biology**. v. 287 (5), p. 821-828. 1999.

Pinho, F. M. O.; Pereira, L. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 24-29, 2001.

Polgar, J.; Magnenat, E. M.; Peitsch, M. C.; Wells, T. N.; Clemeteson, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modeling of an anzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S. from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Journal of Biochemistry**, v. 319, p. 961-968, 1996.

Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. Cell Biology. 2th ed. **Saunders: Elsevier**. Philadelphia, PA, USA. 2008.

Prinholato da Silva, C.; Costa, T. R.; Paiva, R. M.; Cintra, A. C.; Menaldo, D. L.; Antunes, L. M.; Sampaio, S. V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v. 21 (44), p. 01-08. 2015.

PubMed Health. Cancer (Malignant Neoplasm). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>. Acess in: 25 de Julho de 2016.

Raj, S.; Franco, V. I.; Lipshultz, S. E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment.

Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine. v. 16 (6), p. 315-325. 2014.

Rodrigues, R. S.; Izidoro, L. F.; Teixeira, S. S.; Silveira, L. B.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M. I.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Giglio, J. R.; Fuly, A. L.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 50 (1), p. 153-165. 2007.

Rodrigues, R. S.; Izidoro, L. F.; Teixeira, S. S.; Silveira, L. B.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M. I.; Selistre-de-Araujo, H. S.; Giglio, J. R.; Fuly, A. L.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** 2007, v. 50 (1), p. 153-165. 2007.

Rodrigues, R.S. Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*). **Tese de doutorado.** Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

Rodrigues, R.S.; Boldrini-França, J.; Fonseca, F. P.; de la Torre, P.; Henrique-Silva, F.; Sanz, L.; Calvete, J. J.; Rodrigues, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J Proteomics.** v. 75(9), p. 2707-2720. 2012.

Rodrigues, V. M.; Lopes, D. S.; Castanheira, L. E.; Gimenes, S. N. C.; Naves-de-Souza D. L.; Ache, D. C.; Borges, I.P.; Yoneyama, K. A. G.; Rodrigues R. S. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry.** v. 15, n. 7, p. 670 – 684, 2015.

Rodrigues, V. M.; Marcussi, S.; Cambraia, R. S.; de Araujo, A. L.; Malta-Neto, N. R.; Hamaguchi, A.; Ferro, E. A.; Homs-Brandeburgo, M. I.; Giglio, J. R.; Soares, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 44(3), p. 305-314. 2004.

Rosen, P. P. *Rosen's Breast Pathology.* 4th edition. **Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer business.** Philadelphia, PA, USA. 2014.

Ruddon, R. W. *Cancer biology.* **Oxford University Press.** 4th ed. New York, USA. 2007.

Santos Filho, N. A. Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A₂ Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops moojeni*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. 2009.

SBH, Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Lista de espécies de répteis do Brasil. 2015. Disponível em: <
<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2015-03-Repteis.pdf>>.

Acesso em: Abril de 2016.

Schaloske, R. H.; Dennis, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**. v. 1761 (11), p. 1246-1259. 2006.

Scholey, J. M.; Brust-Mascher, I.; Mogilner, A. Review article Cell division. **Nature**. v. 422, p. 746-752. 2003.

Schnitt, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern pathology**. v. 23, p. S60-S64. 2010.

Soares, A. M.; Guerra-Sa, R.; Borja-Oliveira, C. R.; Rodrigues, V. M.; Rodrigues-Simioni, L.; Rodrigues, V.; Fontes, M. R.; Lomonte, B.; Gutierrez, J. M.; Giglio, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 378 (2), p. 201-209. 2000.

Souza J. R. F., Monteiro R. Q., Castro H. C., Zingali R. B., Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, **Toxicon**, v. 39, p 787-792, 2001.

Steeg, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**. v. 16, p. 201–218. 2016.

Tang, Z. I. The Domino and Clock Models of Cell Cycle Regulation. **Nature Education**. v. 3 (9), p. 56-61. 2010.

Theoret, M. R.; Cohen, C. J.; Nahvi, A. V.; Ngo, L. T.; Suri, K. B.; Powell, D. J.; JR Dudley, M. E.; Morgan. R. A.; Rosenberg, S. A. Relationship of p53 overexpression on cancers and recognition by anti-p53 T cell receptor-transduced T cells. **Human Gene Therapy**. v. 19 (11), p. 1219-1232. 2008.

Tsai, I. H.; Wang, U. M.; Chen, Y. H.; Tsai, T. S.; Tu, M. C. Venom phospholipase A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular

characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **J. of Biochemistry**, v. 377, p. 215-223, 2004.

Valle, L. A. & Brites, C. L. V. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**. v. 10, p. 155-161, 2008.

Vyas, V. K.; Brahmbhatt, K.; Bhatt, H.; Parmar, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**. v. 3 (2), p. 156-162. 2013.

Wang, H.; Mannava, S.; Grachtchouk, V.; Zhuang, D.; Soengas, M. S.; Gudkov, A. V.; Prochownik, E. V.; Nikiforo, M. A. c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. **Oncogene**. v. 27, p. 1905-1915. 2008.

Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of tumors in the Body. **J Gen Physiol**. v. 8 (6), p. 519–530. 1927.

Ward, R. J.; Oliveira, A. H.; Bortoleto, R. K.; Rosa, J. C.; Faca, V. M.; Greene, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I a Lys- 49 phospholipase A2 Homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichi coli*. **Prto. Expr. Purif.**, v. 21, p. 134-140, 2001.

Wei, J. F.; Wei, X. L.; Chen, Q. Y.; Huang, T.; Qiao, L. Y. Wang, W. Y.; Xiong, Y. L.; He, S. H. N49 phospholipase A2, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A2. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, p. 462-471, 2006.

Weinberg, R. A. The Biology of Cancer. 2th ed. **Garland Science, Taylor & Francis Group**. New York, 2014.

WHO, World Health Organization. Cancer: Media center – Fact sheets. Disponível em: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs297/en>. Acesso em: Maio de 2016.

Witkiewicz, A. K.; Knudsen, E. S. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. **Breast Cancer Research**. v. 16 (207), p. 01-12. 2014.

Wittcoff, H. The Phosphatides. **Ed. Reinhold Publising Corporation**. New York, p. 99-115. 1951.

Yan, C.; Yang, Y.; Qin, Z.; Reid, P.; Liang, Z. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin.** v. 38 (4), p. 540-548. 2007.

Zafonte, B. T.; Hult, J.; Amanatullah, D. F.; Albanese, C.; Wang, C.; Rosen, E.; Reutens, A.; Sparano, J. A.; Lisanti, M, P.; Pestell, R. G. Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. **Frontiers in Bioscience.** v. 5, p. 938-961. 2000.

Zhao, X.; Andreas Rodland, E. A.; Tibshirani, R.; Plevritis, S. Molecular subtyping for clinically defined breast cancer subgroups. **Breast Cancer Research.** 2015, p. 01-09. 2015.

Capítulo 02

Efeito Citotóxico e Genotóxico de uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama triplo negativo: Uma análise sobre o ciclo celular.

Resumo

A ação genotóxica de fármacos utilizados na terapia do câncer é o mecanismo mais comum dessa classe de compostos e a busca por novas moléculas que sejam mais eficientes neste processo e ao mesmo tempo, menos nocivas para células saudáveis do organismo são crescentes. Nesta perspectiva, proteínas isoladas das peçonhas de serpentes, como a BnSP-6, uma PLA₂ relativamente abundante na peçonha de *Bothrops pauloensis*, são promissores modelos de agentes terapêuticos. Neste trabalho, avaliamos a citotoxicidade e genotoxicidade da BnSP-6 em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio da atividade da enzima mitocondrial tetrazólio-succinato-desidrogenase e a genotoxicidade foi avaliada pelo teste de micronúcleo a através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo e da expressão de genes relacionados ao ciclo celular. Os resultados mostraram que BnSP-6 é capaz de induzir a genotoxicidade nas células MDA-MB-231 mais do que em células não tumorigênicas (MCF-10A). A PLA₂ foi capaz de alterar o ciclo celular das células MDA-MB-231 promovendo diminuição da proliferação pelo acúmulo de células na fase G₀-G₁. Além disso, BnSP-6 diminuiu a expressão de genes relacionados ao avanço das células pelo ciclo celular, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo. Com isso, BnSP-6 se mostrou um promissor modelo de agente terapêutico capaz de alterar o ciclo celular de células de câncer de mama triplo negativo, podendo servir como base para a produção de moléculas a partir da estrutura dessa PLA₂ assim como estudos que visem elucidar ainda mais os mecanismos de ação dessa toxina sobre células de câncer de mama.

Palavras Chave: PLA₂; BnSP-6; Câncer de mama; Genotoxicidade; Ciclo celular, *Bothrops pauloensis*.

Abstract

The genotoxic action of drugs used in cancer therapy is the most common mechanism of this class of compounds and the search for new molecules that are more efficient in this process and at the same time less harmful to healthy cells of the organism is growing. In this perspective, compounds of snakes, such as BnSP-6, an relatively abundant PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom are promising models of therapeutic agents. In this work, we evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of BnSP-6 in breast cancer cells MDA-MB-231. The cytotoxic was evaluated by the assay of activity of the succinate-dehydrogenase-tetrazolium mitochondrial enzyme and the genotoxicity was evaluated by the micronucleus test and through cell cycle analysis by flow cytometry and the expression of genes related to the cell cycle. The results showed that BnSP-6 was capable to induce genotoxicity in MDA-MB-231 cancer cells more than in non-tumorigenic cells (MCF-10A). Cell cycle analysis revealed the accumulation of cells in the G₀-G₁ phase induced by BnSP-6. Furthermore, BnSP-6 decreases the expression of genes related to the progression in the cell cycle. Thus, BnSP-6 proved to be a promising model of therapeutic agent, capable to alter the cell cycle of triple negative cancer cells, it could serve as a basis to production of molecules from the structure of this PLA₂ as well as studies aimed to elucidate the mechanisms of action of this toxin on breast cancer cells.

Keywords: PLA₂; BnSP-6; Breast cancer; Genotoxicity; Cell cycle, *Bothrops pauloensis*.

1. Introdução

O câncer de mama triplo negativo é um dos maiores desafios para pesquisas que visam o aprimoramento e desenvolvimento de novos agentes para a terapêutica do câncer de mama, uma vez que as pesquisas atuais ainda não encontraram um alvo específico nessas células, como acontece nos subtipos de cânceres de mama HER2 positivos e ER/PR (receptores de estrógeno/ receptores de progesterona) positivos (KAMATH & BUOLAMWINI, 2006; KAO, *et. al.*, 2009; SCHNITT, 2010; ZHAO, *et. al.*, 2015).

Geralmente, os fármacos utilizados na terapia celular de cânceres têm como alvo moléculas relacionadas ao ciclo celular, uma vez que esta via é essencial para a proliferação e manutenção tecidual, e apresenta diversas alterações em células cancerígenas, inclusive câncer de mama (GUTIERREZ, 2016; O'LEARY, *et. al.*, 2016; MALUMBRES & BARBACID, 2001; GÉRARD & GOLDBETER, 2016).

Um dos principais mecanismos relacionados ao ciclo celular que se encontram alterados nas células cancerígenas são os relacionados as vias de reparo e manutenção da integridade do DNA (WEINBERG, 2014; GÉRARD, *et. al.* 2016; HELLEDAY, *et. al.*, 2008). No câncer de mama, alterações nos genes CHEK2, p53 e Cdh1 são bem descritas, e provocam alterações graves do ciclo celular dessas células, levando a um aumento da taxa de proliferação e invasão, assim como inibição dos processos de morte celular programada nessas células (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2012; GÉRARD, *et. al.*, 2016; GASCO, *et. al.*, 2002; GAO, *et. al.*, 2009; HELLEDAY, *et. al.*, 2008; KAO, *et. al.*, 2009).

Toxinas de serpentes são fontes abundantes de moléculas como potencial terapêutico e têm sido o foco de pesquisas que buscam a bioprospecção e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (CALDERON, *et. al.* 2014). Dentre os componentes dessas peçonhas, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) apresentam diversas atividades farmacológicas e têm sido exploradas ao longo dos anos por pesquisadores de todo mundo (CALDERON, *et. al.*, 2014; RODRIGUES *et. al.*, 2010; RODRIGUES, *et. al.*, 1998; VYAS, *et. al.*, 2015), sendo enzimas capazes de induzir citotoxicidade, apoptose e autofagia em células tumorais, além de apresentar atividade antimicrobiana e antiparasitária, assim como a capacidade genotóxica e de interferir no ciclo celular de células cancerígenas (RODRIGUES, *et. al.*, 2015; VYAS, *et. al.*, 2015; CALDERON, *et. al.* 2014; AZEVEDO, *et. al.*, 2016; YAN, *et. al.*, 2007; MARCUSSI, *et. al.*, 2011; DOUMANOV, *et. al.*, 2015; PINHOLATO, *et. al.*, 2015; BAZAA, *et. al.*, 2010).

Recentemente em nosso grupo de pesquisas, Azevedo e colaboradores (2016), realizaram um estudo com BnSP-6, uma PLA₂ Lys-49 (não enzimática) isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Neste estudo, BnSP-6 foi capaz de induzir apoptose em células MDA-MB-231, ação comprovada pelo aumento da expressão de genes relacionados a via apoptótica. Além disso, a PLA₂ foi capaz de induzir a formação de vacúolos autofágicos e provocar um aumento da expressão de genes BRCA2 e TP53, genes supressores de tumor.

Neste trabalho avaliamos a ação citotóxica e genotóxica da BnSP-6 sobre células de câncer de mama, através de análises da capacidade de indução da formação de micronúcleos e ação da PLA₂ sobre o ciclo celular nas

linhagens de mama MDA-MB-231 (tumorigênica) e MCF-10A (não tumorigênica).

2. Materiais e métodos

2.1 Peçonha de *Bothrops pauloensis*

A peçonha bruta (PB) da serpente *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidos no Serpentário Proteína Bioativas LTDA, estabelecido na Fazenda Boa Esperança S/N – Zona Rural – Batatais/SP. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 471301). Este trabalho possui certificação para acesso ao patrimônio genético pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo seguinte número de acesso: 010 453/2014-8.

2.2 Purificação da PLA₂ BnSP-6

A PLA₂ BnSP-6 foi isolada conforme descrito por Rodrigues *et. al.*, (1998), com modificações. Aproximadamente 200 mg de peçonha bruta de *B. pauloensis* foram dissolvidos em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM pH 7.8 e centrifugado a 3.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna CM-Sephrose (Amersham Biosciences, Brasil) *fastflow*. As amostras foram eluídas por um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio 50 mM a 500 mM (pH 7,8), em temperatura ambiente. As frações foram coletadas em fluxo de 6,5 mL/h (1 mL/tubo) em um coletor de frações *Redifrac* (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Durante as coletas, as frações foram monitoradas por absorvância em comprimento de onda a 280 nm em um

espectrofotômetro (*Ultrospec 1000 – Amersham Pharmacia Biotech*). As frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE a 12,5%. As amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. A fração contendo BnSP-6 foi recromatografada em cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) em coluna C18 (*GE healthcare-Life sciences, Brasil*). A coluna foi equilibrada com solvente A (0,1% ácido trifluoroacético, 4% de acetonitrila) e a fração foi eluída em um gradiente de concentração de 0 a 100% do solvente B (0,1% ácido trifluoroacético, 80% de acetonitrila) em um fluxo de 0,5 mL/min por 33 minutos. A fração correspondente ao único pico de ABS a 280 nm foi liofilizada e estocada a -20°C e posteriormente submetida a análise por eletroforese SDS-PAGE a 12,5%, conforme descrito por Laemmli (1970).

2.3 Cultivo celular

A linhagem celular de câncer de mama, de subtipo basal-like, MDA-MB-231, e a linhagem celular não tumorigênica de células do epitélio mamário, MCF-10A foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection; Manassas, USA*). As células MDA-MB-231 foram cultivadas e mantidas em meio IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), U/mL penicillina e 100 µg/mL de streptomina a temperatura de 37°C e 5% de CO₂. As células de linhagem não tumorigênica, MCF-10A foram mantidas em meio DMEM F12 (*Sigma Aldrich, Brasil*), suplementado com EGF20 ng/mL, hidrocortisona 0.5 µg/mL, insulina 10 µg/mL (*Invitrogen, Brasil*), 10% SFB (*Cultilab, Brasil*) e sulfato de gentamicina (25 mg/mL) (*Sigma, Brasil*) a temperatura de 37°C e 5% CO₂.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade de BnSP-6 nas duas linhagens celulares foi avaliada pelo reagente MTT ((4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) que avalia a atividade da enzima mitocondrial tetrazólio-succinato desidrogenase. As células (MDA-MB-231 e MCF-10A) foram adicionadas em placas de cultura celular de 96 poços (2×10^4 células/poço) contendo meio e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de BnSP-6 (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL) e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle de células não tratadas, foi adicionado somente meio de cultura. Após 24 horas de incubação foi adicionado 20 µl/poço de solução de MTT (5mg/mL). Após 3 horas de incubação foi acrescentado 100 µL/poço de uma solução de SDS 10% contendo 0,01 M de HCl. A densidade óptica (DO) foi determinada a 570 nm em leitor de placas (*Multiskan GO Thermo Scientific*, USA) após 18 horas de adição da solução de SDS. O valor de IC 50 foi calculado utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 5.00.288) por regressão não linear.

2.5 Ensaio de Genotoxicidade

A genotoxicidade de BnSP-6 foi avaliada conforme o teste de micronúcleos *in vitro*. Esse ensaio foi realizado segundo protocolo da OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*). As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram incubadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poços) contendo meio com 10% de SFB. Após 24 horas as células foram tratadas com 0,1 mg/mL mitomicina C (controle positivo), meio de cultura (controle negativo), peçonha bruta de *B. pauloensis* (1 µg/mL) ou BnSP-6 (100

$\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas o meio com tratamento foi retirado, as células foram lavadas com PBS e novamente incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂ com meio suplementado com 10% SFB. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, coradas com o marcador de DNA Hoechst (0,1 M em PBS) e analisadas em microscópio de fluorescência EVOS FL *Imaging System* (Thermo Fisher Scientific, USA). Para avaliar a genotoxicidade foram contadas 2.000 células por poço de tratamento. A genotoxicidade foi obtida pela comparação dos números de micronúcleos contados entre as células que receberam os tratamentos e com os grupos controle.

2.6 Análise do Ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular foi realizada segundo Crissman and Steinkamp (1973) e Krishan (1975), com modificações. As células (MDA-MB-231 e MCF-10A) foram plaqueadas em placa de 24 poços (1,5x10⁵ células/poço) e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após, o ciclo celular das células foi sincronizado na fase G₀/G₁, pela incubação das células na placa com meio de cultura com 0,2% de SFB, conforme descrito por Rosner e Hengsthchlager (2011) por cerca de 12 a 16 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de BnSP-6 em meio com 10% de SFB e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células então foram coletadas e fixadas em formaldeído 4% por 40 minutos a temperatura ambiente. Para mensurar apenas o DNA celular as células foram tratadas com solução de RNase (100 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos a 4°C e em seguida, as células foram marcadas com solução de iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos a temperatura ambiente. O ciclo celular foi analisado em citometro de fluxo FACS

Canto II (BD *Bioscienc*), e os dados foram obtidos utilizando o *software* FlowJo (versão 7.6.3).

2.7 Expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada pela da extração do RNA total das células tratadas e posterior ensaio de RT-PCR realizada pela metodologia SYBR Green RT-PCR. As células MDA-MB-231 foram tratadas com BnSP-6 (50 µg/mL) por 24 horas a 37° C em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂. Após a incubação, o RNA total foi extraído usando o kit *Tri-Reagent Sigma* e estocados a -80° C. A concentração e pureza do RNA extraído foi estimada por densidade óptica a 230 e 260nm, respectivamente. Para a síntese das moléculas de cDNA, foi utilizado o kit *GoScript* composto por um sistema de transcrição inversa (*GoScript Reverse Transcription System Kit* Promega, Brasil) de acordo com o manual do fabricante.

A expressão gênica foi analisada por qPCR em tempo real. Os *primers* iniciadores dos seguintes genes: CDH1, CCND1, CCNE1, CDC25A, CHEK2, E2F1 e NF-KB, foram obtidos de GO GENONE HCAN-1 (*Human Cancer Pathway Primer Library*) e o ensaio foi realizado seguindo as especificações do manual do fabricante. As reações foram realizadas utilizando 0.1 µM de cada primer, separadamente, e 2µL de cDNA. Foram realizados 50 ciclos, cada um com 95° C por 10 segundos e 58° C por 45 segundos. Os dados obtidos foram analisados pelo método *Comparative threshold cycle* (CT), conforme Livak & Schmittgen (2001). Os dados foram normalizados utilizando como gene constitutivo β-actina e os resultados foram expressos comparando a expressão nos grupos tratados com BnSP-6 com a expressão nos grupos controle.

2.8 Análises estatísticas

A significância foi determinada utilizando o teste *One-way* ANOVA, teste t de Student ou teste de comparações múltiplas de Tukey para os dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos, de acordo com o desenho experimental (GraphPad Prism Software versão 5.00.288). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Purificação da PLA₂ BnSP-6

A PLA₂ BnSP-6 foi purificada em dois passos cromatográficos, uma cromatografia de troca iônica em coluna CM-*Sheparose* (Figura 1A) e uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Figura 1C). O primeiro passo da purificação resultou em 6 frações denominadas de CM1 a CM5b, essas frações foram analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5% (Figura 1B). A fração correspondente a BnSP-6 foi CM5a. Essa fração foi liofilizada e eluída numa cromatografia de fase reversa em coluna C18. O fracionamento obtido resultou um único pico que foi recolhido e liofilizado. A pureza da fração foi confirmada pela análise em gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5% (Figura 1D).

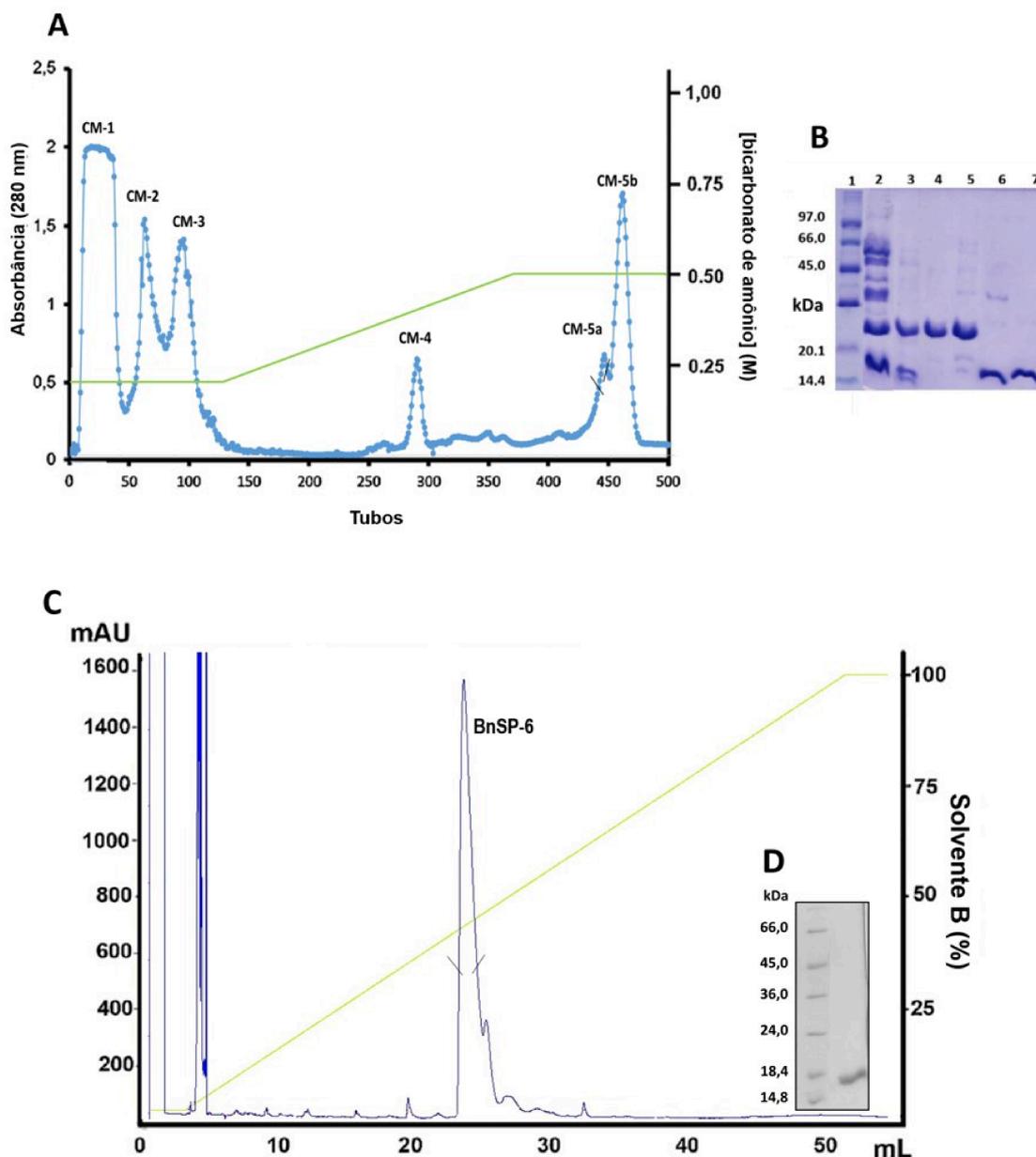


Figura 1: Purificação da PLA₂ BnSP-6. (A) cromatografia de troca iônica em coluna CM-*Sepharose* da peçonha de *B.pauloensis*. (B) SDS-PAGE 12,5% das frações obtidas do fracionamento em coluna CM-*Sepharose*, 1- padrão de massa molecular; 2- fração CM1; 3- fração CM2; 4- fração CM3; 5- fração CM4; fração CM5a; 6- fração CM5b (C) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da fração CM5a. (D) SDS-PAGE 12,5% da única fração obtida no fracionamento em C18, mostrando a PLA₂ isolada, análise do gel contendo o padrão de massa molecular e BnSP-6 isolada.

3.2 Citotoxicidade

BnSP-6 apresentou capacidade citotóxica para as células de tecido mamário de maneira dose-dependente, porém com efeitos significativamente maiores em MDA-MB-231 do que em MCF-10A. Nas células MDA-MB-231 a

análise estatística revelou que o IC50 (dose de toxina capaz de ser citotóxica a 50% das células) de BnSP-6 foi de aproximadamente 48 µg/mL, enquanto que para as células MCF-10A, BnSP-6 foi pouco citotóxica. As células MCF-10A tratadas com dose de 12,5 µg/ml não apresentaram alterações na viabilidade celular, enquanto que o tratamento com 12,5 µg/ml de BNSP-6 foi capaz de reduzir a viabilidade de células MDA-MB-231 em aproximadamente 40%, demonstrando assim, certa especificidade da toxina para esse tipo celular.

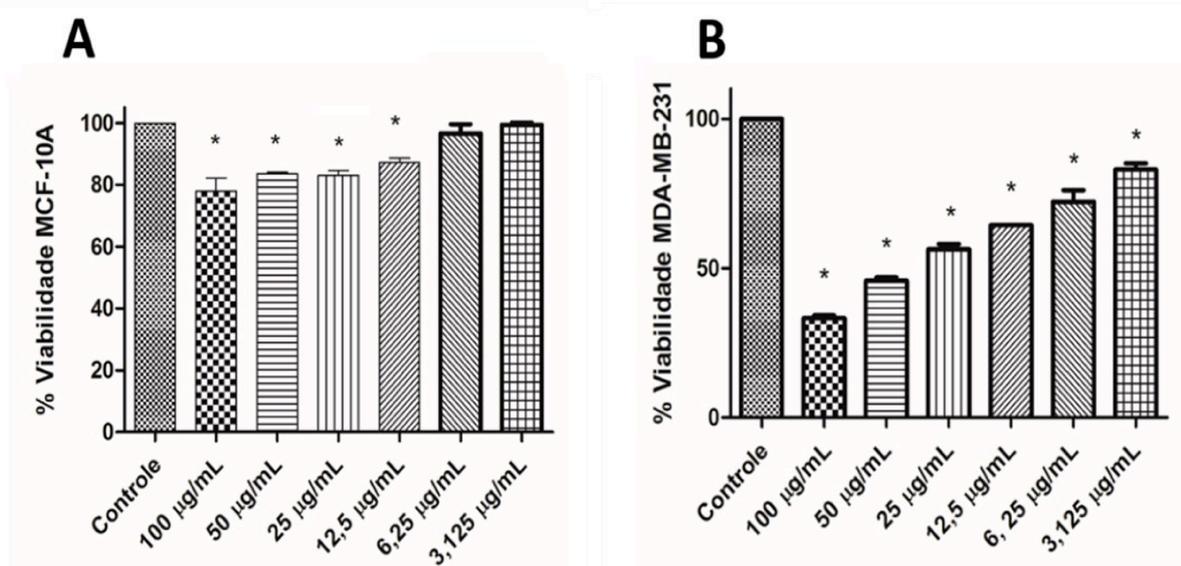


Figura 2: Viabilidade celular das linhagens MCF-10A (A) e MDA-MB-231 (B). As células foram tratadas com diferentes concentrações de BnSP-6 por 24 horas e a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. *Análises que mostraram resultados com valores significativos em relação ao grupo controle.

3.3. Genotoxicidade

Nos ensaios de genotoxicidade, a BnSP-6 apresentou maior capacidade genotóxica nas células cancerígenas do que em MCF-10A, apresentando também uma relação dose-dependente na indução da formação de micronúcleos em células MDA-MB-231, conforme mostra a figura 3. Os tratamentos com as maiores concentrações de BnSP-6 (100 e 50 µg/mL) não

mostraram significância em relação ao tratamento com mitomicina C, porém todos os tratamentos apresentaram valor de $p < 0,05$ quando comparados com o controle negativo (células não tratadas), revelando a capacidade genotóxica da BnSP-6. As análises revelaram que a peçonha bruta de *B. pauloensis* não foi significativamente genotóxica para células MDA-MB-231 quando comparado com o controle negativo (meio celular) e ainda não apresentou diferença significativa quanto a genotoxicidade da proteína isolada sobre células controle MCF-10A. Além disso, os valores de genotoxicidade da peçonha bruta sobre as duas linhagens foram semelhantes.

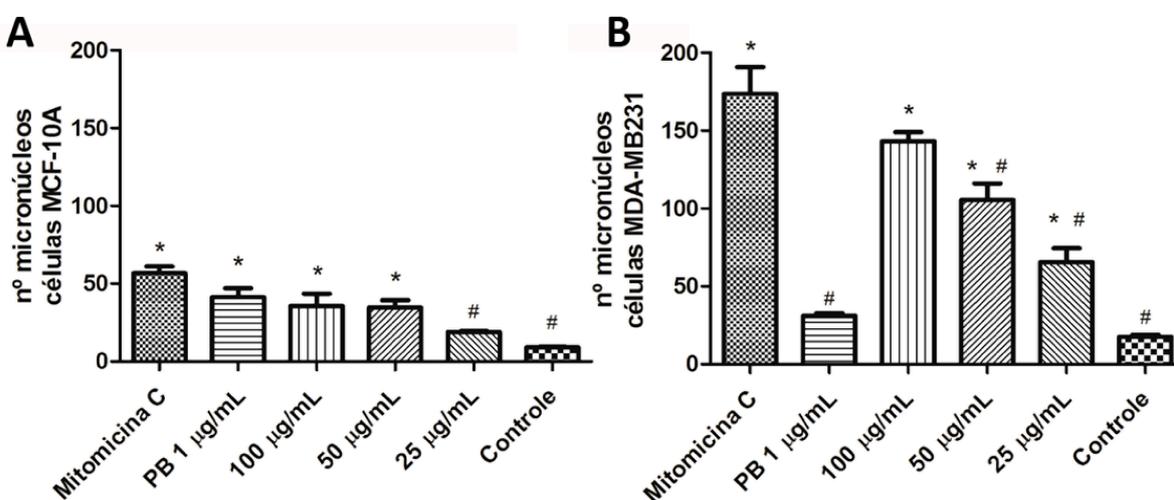


Figura 3: Genotoxicidade pela avaliação da formação de micronúcleos das linhagens MCF-10A (A) e MDA-MB-231 (B) após tratamento com Mitomicina (10 µg/ mL); peçonha bruta de *B. pauloensis* (1 µg/ mL) 100, 50 e 25 µg/ mL de BnSP-6 e meio de cultura celular (controle), respectivamente.

* Diferença estatística $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo. # Diferença estatística $p < 0,05$ de amostras quando comparadas com o controle positivo do ensaio (Mitomicina C).

3.4 Análises do ciclo celular

BnSP-6 foi capaz de interferir no ciclo celular de células MDA-MB-231, levando a um acúmulo de células na fase G0-G1, cerca de 59,4% do total de células tratadas. Em MCF-10A, BnSP-6 também provocou um aumento de

células na fase G0-G1 (27,7%), porém menor do que o observado nas células cancerígenas. Conforme mostrado na figura 4, a enzima foi capaz de reduzir de forma significativa a taxa de proliferação das duas linhagens, levando a um aumento das células na fase G0-G1, assim como a redução das células em G2-M, porém não foi capaz de alterar significativamente a quantidade de células da linhagem MCF-10A na fase S, contrário do que pôde ser observado nas células MDA-MB-231.

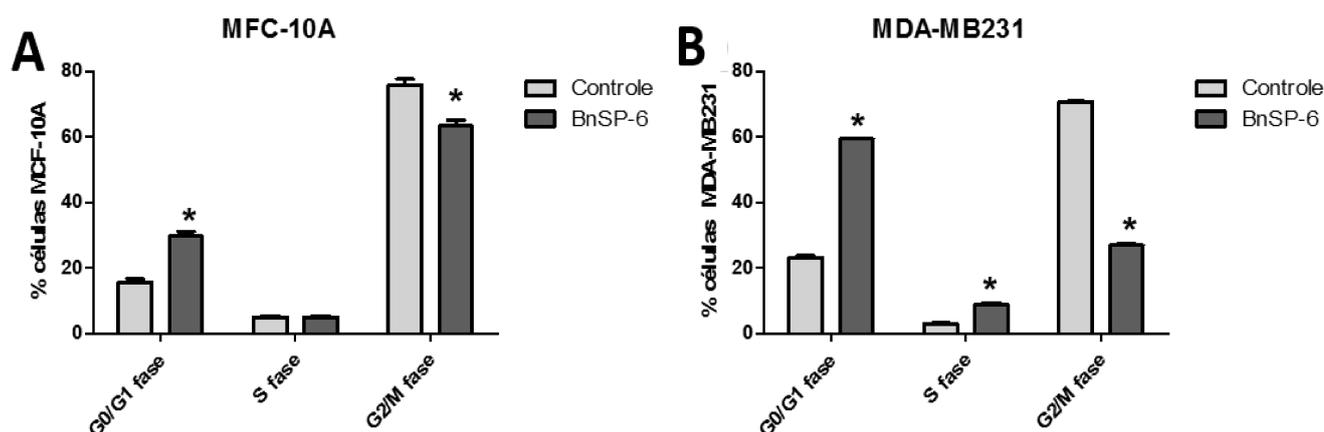


Figura 4: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Análise do ciclo celular de células MCF-10A tratadas ou não com BnSP-6 por 24 horas. (B) Análise do ciclo celular de células MDA-MB-231 tratadas ou não com BnSP-6 por 24 horas.

O gráfico representa a % de células em cada fase do ciclo celular em relação ao total de células analisadas em cada grupo.

* identifica amostras que apresentaram valores significativos, quando comparados com o grupo controle.

3.5 Expressão gênica

Corroborando com os resultados da análise do ciclo celular por citometria de fluxo, as análises da expressão dos genes descritos na tabela 1 mostrou que a PLA₂ BnSP-6 (figura 5) foi capaz de induzir um acúmulo de células MDA-MB-231 na fase G0-G1, comprovado pela diminuição da expressão dos genes CCND1, CCNE1, Cdc25A e E2F1, que estão

relacionados a promoção e avanço das células pelo ciclo celular. Além disso, BnSP-6 foi capaz de induzir a diminuição da expressão gênica de CHEK 2, 3 vezes menor em relação ao controle. De forma semelhante, a enzima também foi capaz de reduzir quase 3 vezes a expressão do gene NF-KB, um gene que promove a proliferação celular e que é geralmente super-expresso em tumores. A toxina ainda foi capaz de induzir uma super expressão do gene Cdh1, conforme a figura 5.

Tabela 1: Genes analisados por qPCR.

<i>Gene</i>	<i>Nome do gene</i>	<i>Função/Relação com o ciclo celular</i>
<i>CCND1</i>	<i>Ciclina D tipo 1</i>	<i>Fase G1; Reconhecimento e ativação de proteínas relacionadas ao R-point da fase G1 do ciclo celular</i>
<i>CCNE1</i>	<i>Ciclina E tipo 1</i>	<i>Fases G1 e S; Reconhecimento e ativação de proteínas do Checkpoint G1 e de transição de G1 para S</i>
<i>Cdc25A</i>	<i>Ciclina dependente de quinase 25^a</i>	<i>Fases G1, S, G2 e M; Fosfatase envolvida na ativação de complexos Cdks-ciclins por meio da desfosforilação de ciclins no sítio inibitório dessas proteínas</i>
<i>E2F1</i>	<i>Fator de transcrição da família E2F tipo 1</i>	<i>Fases G1, S, G2 e M; Fator de transcrição que promove a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, especialmente Cdks e Ciclinas</i>
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint cinase tipo 2</i>	<i>Fases G1, G2 e M; ativada por danos no DNA. Se danos que ocorrerem na fase G1 ativarem Chek2 esta por sua vez, leva a ativação de p-53 que levará parada do ciclo em G1; se ativada em G2, inibe a transição de G2 para M</i>
<i>Cdh1</i>	<i>Caderina tipo 1</i>	<i>Fases G1, S, G2 e M; inibição de G1 e S e avanço por G2 e M</i>
<i>NF-KB</i>	<i>NF-κβ</i>	<i>Fator de expressão que promove a transcrição de proteínas relacionados a proliferação e sobrevivência celular assim como proteínas associadas as fases G1 e G2</i>

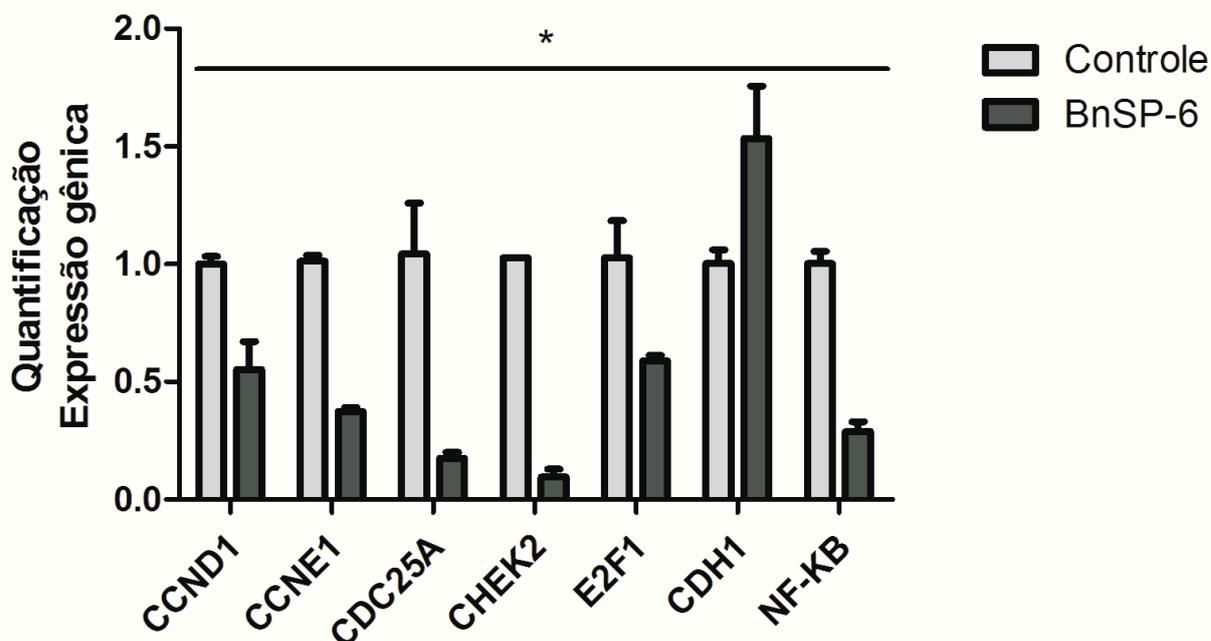


Figura 5: Análise da expressão de genes relacionados a regulação do ciclo celular: CCND1; CCNE1; CDC25A; CHEK2; E2F1, CDH1 e NF-KB. As células foram tratadas com BnSP-6 (50 µg/mL) por 24h. Posteriormente o RNA foi extraído e submetido à transcrição reversa seguida da quantificação por PCR em tempo real. * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras controle.

4. Discussão

A PLA₂ Lys49 BnSP-6 é uma das mais abundantes fosfolipases A₂ presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Essa toxina foi isolada primeiramente por Rodrigues, et. al. (1998) e apresenta grande potencial terapêutico contra células de câncer de mama, como demonstrado em recentes estudos do nosso grupo de pesquisas (AZEVEDO, et. al., 2016). Em seu trabalho, Azevedo demonstrou que essa toxina é capaz de inibir a adesão de células MDA-MB-231 de forma dose dependente. Além disso, BnSP-6 mostrou-se capaz de induzir células MDA-MB-231 a apoptose e a expressão de genes relacionados

a via apoptótica confirmou esse resultado. A toxina ainda foi capaz de modular a expressão de genes relacionados a angiogênese e invasão, revelando o potencial anti-angiogênico e anti-metastático de BnSP-6.

Neste trabalho avaliamos a citotoxicidade e genotoxicidade da PLA₂ BnSP-6, em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 e de células não tumorigênicas de tecido mamário da linhagem MCF-10A. Corroborando com os resultados de Azevedo (2016), BnSP-6 mostrou-se significativamente, mais citotóxica para células de câncer de mama de uma linhagem do subtipo 4 (triplo negativo) do que para células não tumorigênicas da linhagem MCF-10A (Figura 2), demonstrando o potencial terapêutico da molécula.

A citotoxicidade de PLA₂s Lys-49 pode ser atribuída a região C-terminal dessas moléculas que apresenta uma sequência de aminoácidos (115-129) catiônicos e de cadeia hidrofóbica. Além dessa região, a citotoxicidade das PLA₂s de peçonhas de serpentes pode ser por outras regiões da molécula assim como pela interação com diferentes alvos moleculares como integrinas e receptores celulares relacionados ao crescimento e proliferação (GEBRIN, *et. al.*, 2009; ARAYA & LOMONTE, 2007; LOMONTE, *et. al.*, 2010).

Alguns trabalhos relatam a genotoxicidade de peçonhas de serpentes em diferentes linhagens celulares (ZABOILE, *et. al.*, 2014; MARCUSSI, *et. al.*, 2011). Contudo, a análise dos nossos resultados sobre a formação de micronúcleos sobre células da linhagem MCF-10A revelaram que a ação genotóxica da peçonha bruta de *B. pauloensis* precisa ser melhor explorada sobre essas células. Por outro lado, nossos resultados com a toxina isolada indicaram que BnSP-6 não é altamente tóxica para a linhagem não

tumorigênica, indicando uma possível seletividade da toxina e revelando assim o potencial terapêutico da molécula.

A atividade genotóxica de PLA₂s isoladas da peçonha de serpente já foi descrita para diferentes tipos celulares incluindo linfócitos humanos e células tumorais humanas HepG2 (MARCUSSEI, *et. al.*, 2011; DOUMANOV, *et. al.*, 2015). Crotoxina (CX), uma fosfolipase A₂ abundante na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* é um agente com alta capacidade genotóxica como demonstrado por Marcussi e colaboradores (2011). Neste trabalho os autores demonstraram que crotamina, um peptídeo dessa peçonha, e crotoxina são possivelmente as principais responsáveis pela ação genotóxica da peçonha de *C. d. terrificus* sobre linfócitos humanos.

Vipoxina, outra fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Vipera ammodytes meridionalis*, também apresentou capacidade genotóxica, induzindo a formação de micronúcleo em células tumorais humanas HepG2, uma linhagem de carcinoma hepático (DOUMANOV, *et. al.*, 2015). Interessantemente, esses resultados, juntamente com os resultados obtidos neste trabalho, parecem sugerir uma hipótese de que as fosfolipases A₂ encontradas nas peçonhas de serpentes são agentes com alta capacidade genotóxica, podendo ser um dos principais componentes presentes na peçonha responsáveis por esta atividade, porém outros trabalhos precisam ser realizados para se validar isto.

A genotoxicidade é um processo provocado por drogas comumente utilizadas em grande parte das estratégias terapêuticas antitumorais, como a mitomicina C. Esse evento é caracterizado pela capacidade de uma molécula provocar danos na molécula de DNA, por meio da deleção de cromossomos ou quebras da estrutura dupla fita do DNA, levando a formação de micronúcleos,

observados no final da replicação celular (KOLLING, *et. al.*, 2008; RITTINGHAUSEN, *et. al.*, 2013; OECD, 2004; GUERREIRO, *et al.*, 2013). Nossos resultados em células MDA-MB-231 demonstraram que a PLA₂ BnSP-6 também é capaz de induzir a formação de micronúcleos de forma dose dependente.

O mecanismo da genotoxicidade das PLA₂s, assim como de outros componentes de peçonhas ofídicas não é totalmente claro, mas sabe-se que as PLA₂s e outros componentes das peçonhas são capazes de produzir danos celulares que desencadeiam a produção de radicais livres provocando estresse oxidativo (IWANAGA & SUZUKI, 1979; KANG *et. al.*, 2011) e esse pode ser um dos mecanismos de genotoxicidade das PLA₂s, uma vez que o estresse oxidativo pode levar células a apoptose e a ativação de mecanismos mutagênicos como a formação de micronúcleos, efeito também observado por algumas drogas utilizada na terapia tumoral (ZUNEC, *et. al.*, 2016; MARCUSSI, *et. al.*, 2013).

Os danos que levam a formação dos micronúcleos são mais comuns em processos celulares que requerem alta ativação ou replicação da molécula de DNA, como o ciclo celular, que ao longo de suas fases requer alta expressão de proteínas e a replicação de todo o material genético celular (IARMARCOVAI, *et. al.*, 2008; HELLEDAY, *et. al.*, 2008). Nas células normais o ciclo celular apresenta diversos mecanismos que avaliam danos no DNA e os corrigem, porém quando esses danos são comprometedores para a célula, vias de morte celular são ativadas (RITTINGHAUSEN, *et. al.*, 2013; OECD, 2004).

Células cancerígenas são frequentemente resistentes a mecanismos que induzem morte celular devido ao aumento da expressão de proteínas

pertencentes a vias que inibem sistemas responsáveis por reparos do DNA e a indução da morte celular. Essas alterações previnem que durante o ciclo celular, essas células com alterações, em sua maioria genéticas, sejam conduzidas a morte, geralmente por apoptose, favorecendo que células com distúrbios continuem a se propagar. Em geral, essas alterações encontradas em proteínas e fatores de transcrição relacionados ao ciclo celular, como as ciclinas, uma classe de proteínas responsáveis pelo controle e promoção do ciclo celular (GÉRARD & GOLDBETER, 2015; HELLEDAY, *et. al.*, 2008; GUERREIRO, *et. al.*, 2013; ASHARANI, *et al.*, 2009).

Com base nesses dados, a análise da ação genotóxica de BnSP-6 sobre células MDA-MB-231 (Figura 3 A), sugere que essa toxina é capaz de interferir nos mecanismos de síntese e/ou reparo de danos na molécula de DNA, provocando a deleção cromossômica e/ou a quebra da estrutura dupla fita do DNA nessas células.

Para elucidar melhor o mecanismo da ação genotóxica de BnSP-6, foi realizado a análise do ciclo celular das duas linhagens de células de mama por citometria de fluxo. A interferência da fosfolipase A₂ no ciclo celular foi avaliada após a sincronização das células na fase G₀/G₁ induzida pela privação de SFB no meio de cultura. A privação do SFB em cultura celulares leva a inibição do ciclo celular, pois indicam para as células em cultura que as condições externas não são favoráveis para a divisão celular, bloqueando o ciclo em G₀/G₁ (ROSNER, *et. al.*, 2011; 2013).

A expressão de ciclina D1 está aumentada em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (ZHOU, *et. al.*, 2001). Ciclinas tipo D, em associação com a ciclinas cinases CDK4 e CDK6, promovem a transição G₁

para a fase S por fosforilar a proteína do retinoblastoma (pRb), liberando assim o fator de transcrição E2F1, o qual é necessário para a ativação de genes da fase S. A transcrição da ciclina D1 pode ser estimulada pelo fator de transcrição NF- κ B (LI, *et. al.*, 2011; ZHOU, *et. al.*, 2001).

Os resultados da análise do ciclo celular demonstraram que a toxina é capaz de inibir a proliferação e diminuição do ciclo celular de células MDA-MB-231. Corroborando com esses resultados, BnSP-6 também induziu uma diminuição da expressão gênica de NF- κ B e E2F1, fatores de transcrição que promovem a expressão de proteínas do ciclo celular. NF- κ B promove ainda transição da fase G1 para S em alguns tipos de células de câncer (HINZ, *et. al.*, 1999; ZHOU, *et. al.*, 2001) e assim sua inibição promove a inibição da transição de fase G1 para S.

O gene NF-KB codifica a proteína NF- κ B, conhecida por estimular a sobrevivência e proliferação celular e se encontra super expressa em diversos tipos de cânceres. Diversos estudos têm indicado que essa proteína é um importante alvo para agentes terapêuticos antitumorais utilizados como adjuvantes na quimioterapia de diversos tumores (LI, *et. al.*, 2011; WANG, *et. al.*, 2006; AGGARWAL, *et. al.*, 2005).

A inibição da expressão gênica de NF- κ B induzida pela BnSP-6 pode um dos motivos pela inibição do ciclo celular das células MDA-MB-231 na fase G1, assim como a redução das ciclinas D1 e E1 induzida pela PLA₂ em células MDA-MB-231. Além disso, a inibição da expressão gênica de Cdc25A, corrobora com esses resultados, uma vez que Cdc25A é responsável por ativar CCNE1 o qual promove a transição de G1 para S (WEINBERG, 2014; HE, *et. al.*, 2014; CONTOUR-GALCERA, *et. al.*, 2007).

CHEK 2 é, assim como p53, um gene de supressão tumoral. A proteína codificada por esse gene é ativada quando há danos no DNA identificados durante a fase G1. Quando ativada, CHEK2 interage com a proteína p53 e a estabiliza, levando a ativação da proteína, fazendo com que p53 promova parada do ciclo celular na fase G1. No entanto, depois que o dano é reparado as células seguem o ciclo, porém, se o dano no DNA não puder ser reparado, a célula entra em apoptose (WEINBERG, 2014; ALLINEN, *et. al.*, 2001). Esse é um dos mecanismos que as células utilizam para evitar que danos no DNA sejam passados para as próximas gerações celulares. Mutações nesse gene são conhecidas por favorecer uma predisposição a sarcomas, cânceres de mama e tumores cerebrais (BELL, *et. al.*, 1999; GASCO, *et. al.*, 2002; ALLINEN, *et. al.*, 2001; HIRAO, *et. al.*, 2000; AK & LEVINE, 2010).

O gene CHEK2 codifica uma proteína cinase conhecida como CHEK2 quinase. Essa enzima tem como alguns de seus substratos, proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, tais como o Cdc25A e fosfatases cdc25C, PLK3 quinase e o fator de transcrição E2F1. Todas essas proteínas são conhecidas por promover o ciclo celular. Nossos resultados mostraram que a expressão de alguns desses substratos (Cdc25A e E2F1) foi diminuída pelo tratamento realizado, sugerindo um dos motivos da diminuição da expressão desse gene. Além disso, um dos principais ativadores da transcrição de CHEK2 é a quebra da estrutura dupla fita de DNA (NEVANLINNA & BARTEK, 2006).

Outro importante dado, obtido recentemente por nosso grupo, é a capacidade de BnSP-6 induzir o aumento da expressão de BRCA2 (AZEVEDO, *et. al.*, 2016), uma proteína relacionada a vias de reparação de danos no DNA de lesões cromossômicas (FRIEDENSON, 2007). Provavelmente, a indução da

formação de micronúcleos provocada por BnSP-6 é induzida pela deleção de cromossomos e/ou outros mecanismos que ativam vias de reparação do DNA relacionadas ao reparo de lesões cromossômicas, como BRCA2, promovendo a inibição ou inativação de vias de reparo de DNA de lesões na estrutura dupla fita, como CHEK2. Esses dados ajudam a elucidar os mecanismos de genotoxicidade, assim como, os mecanismos de ação de BnSP-6 sobre as células MDA-MB-231.

O gene *Cdh1* é conhecido como um gene de supressão tumoral e que também está relacionado a processos de invasão. *Cdh1* é uma proteína extremamente importante para controle do ciclo celular e é, geralmente, pouco expressa em diferentes tipos de cânceres de mama (BERX, *et. al.*, 1995). A diminuição da expressão de *Cdh1* observada nesses tumores é resultante do estresse proliferativo visto nessas células devido a desregulação do ciclo celular (EGUREN, *et. al.*, 2013; CHEN, *et. al.*, 2015). Nas células normais, *Cdh1* age evitando a progressão desordenada do ciclo celular por conduzir a degradação proteínas que promovem a propagação do ciclo celular nas células regulando o mesmo (GAO, *et. al.*, 2009; FUKUSHIMA, *et. al.*, 2013; EGUREN, *et. al.*, 2013; CHEN, *et. al.*, 2016).

O papel de *Cdh1* no ciclo celular é preciso, e por isso, durante todo o ciclo os níveis de *Cdh1* são flutuantes. Uma vez que altos níveis de *Cdh1* impedem as células de prossigam pela G1 e cheguem a S, as células promovem a degradação dessa proteína durante a primeira etapa do ciclo por meio do sistema ubiquitina-proteassoma, e por consequência, níveis baixos de *Cdh1* são encontrados durante a fase S. Durante G2 *Cdh1* começa a ser transcrita e na fase M é encontrado altos níveis dessa proteína no citoplasma

da célula (BERX, *et. al.*, 1995; GÉRARD & GOLDBETER, 2015; HSU, *et. al.*, 2002). A qPCR revelou que BnSP-6 foi capaz de aumentar a expressão de Cdh1, o que sugere justificar o resultado observado na análise do ciclo pela citometria de fluxo (Figura 4).

O aumento da expressão de Cdh1, assim como a diminuição de fatores de transcrição como o NF- κ B e E2F1, provocados por BnSP-6 sugere o potencial terapêutico de BnSP-6, que mostrou-se capaz de modular células de uma linhagem triplo negativa de câncer de mama a parada do ciclo celular em G0-G1, porém outras análises precisam ser realizadas para identificar precisamente qual o alvo de BnSP-6 em células MDA-MB-231.

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a capacidade da PLA₂ BnSP-6 de interferir no ciclo celular de células de câncer de mama, sugerindo o potencial terapêutico dessa toxina. A PLA₂ BnSP-6 foi genotóxica para células de linhagem de câncer de mama triplo negativo, levando a redução da expressão de genes que promovem o avanço do ciclo celular e sinais proliferativos, além disso, aumento a expressão de Cdh1, resultados que sugerem alteração no ciclo celular e diminuição da capacidade proliferativa das células de câncer de mama. Além disso, a toxina BnSP-6 ainda foi pouco citotóxica e genotóxica para uma linhagem não tumorigênica de mama, sugerindo que é capaz de interagir com essas linhagens por mecanismos diferentes, demonstrando o potencial farmacológico da molécula, podendo servir como um modelo para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. Porém novos estudos precisam ser realizados para confirmar

essa possível especificidade, assim como o mecanismo de ação dessa toxina nos tipos celulares estudados.

6. Referências Bibliográficas

Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Takada, Y.; Banerjee, S.; Newman, R. A.; Bueso-Ramos, C. E. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2005. v. 11, p. 7490-7498. 2005. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1192>

Ak, P. & Levini, A. J. p53 and NF- κ B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J.* v. 10, p. 3643-3652. 2010. <https://doi.org/10.1096/fj.10-160549>

Allinen, M.; Huusko, P.; Mäntyniemi, S.; Launonen, V.; Winqvist, R. Mutation analysis of the CHK2 gene in families with hereditary breast cancer. *British Journal of Cancer.* v. 85 (2), p. 209-212. 2001. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1858>

Araya, C.; Lomonte, B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. *Cell Biol Int.* v. 31 (3), p. 263-268. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.11.007>

Asghar, U.; Witkiewicz, A.K.; Turner, N. C.; Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery.* v. 14, p. 130-146. 2015.

<https://doi.org/10.1038/nrd4504>

AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. ACS Nano. v. 3 (2), p. 279-290. 2009. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>

Azevedo, F. V.; Lopes, D. S.; Cirilo-Gimenes, S. N.; Achê, D. C.; Vecchi, L.; Alves, P. T.; Guimarães, D. de O.; Rodrigues, R. S.; Goulart, L. R.; Rodrigues, V. M.; Yoneyama, K. A. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from Bothrops pauloensis venom. Int J Biol Macromol. v. 86, p. 671-677. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080>

Badr, G.; Al-Sadoon, M. K.; Rabah, D. M. Therapeutic efficacy and molecular mechanisms of snake (*Walterinnesia aegyptia*) venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer- and prostate cancer-bearing experimental mouse models. Free Radic Biol Med. v. 65, p.175-189. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.018>

Bazaa, A.; Pasquier, E.; Defilles, C.; Limam, I.; Kessentini-Zouari, R.; Kallech-Ziri, O.; El Battari, A.; Braguer, D.; El Ayeb, M.; Marrakchi, N.; Luis, J. MVL-PLA₂, a snake venom phospholipase A₂, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. PLoSONE. v. 5 (4), p. 01-10. 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010124>

Bell, D. W.; Varley, J. M.; Szydlo, T. E.; Kang, D. H.; Wahrer, D. C. R.; Shannon, K. E.; Lubratovich, M.; Verselis, S. J.; Isselbacher, K. J.; Fraumeni, J. F.; Birch, J. M.; Li, F. P.; Garber, J. E.; Haber, D. A. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*. v. 286, p. 2528-2531. 1999. <https://doi.org/10.1126/science.286.5449.2528>

Bertucci, F.; Birnbaum, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. *Journal of Biology*. v. 7 (6), p. 6.1-6.4. 2008. <https://doi.org/10.1186/jbiol67>

Berx, G.; Cleton-Jansen, A. M.; Nollet, F.; Leeuw, W. J.; de Vijver, M Van.; Cornelisse, C.; van Roy F.E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*. v. 14 (24), p. 6107-6115. 1995. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00301.x>

Brannon-Peppas L.; Blanchette, O. J. Nanoparticles and systems, target for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 64, p. 206-212. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.033>

Calderon, L. A.; Sobrinho, J. C.; Zaqueo, K. D.; de Moura, A. A.; Grabner, A. N.; Mazzi, M. V.; Marcussi, S.; Nomizo, A.; Fernandes, C. F.; Zuliani, J. P.; Carvalho, B. M.; da Silva, S. L.; Stábeli, R. G.; Soares, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in câncer therapy. *BioMed*

Reserach International. v. 2014, p. 01-19. 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/203639>

Chen, C. F.; Dou, X. W.; Liang, Y. K.; Lin, H. Y.; Bai, J. W.; Zhang, X. X.; Wei, X. L.; Li, Y. C.; Zhang, G. J. Notch3 overexpression causes arrest of cell cycle progression by inducing Cdh1 expression in human breast cancer cells. *Cell Cycle*. v. 3, p. 432-440. 2016.

<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1127474>

Contour-Galcera, M. O.; Sidhu, A.; Prévost, G.; Bigg, D.; Ducommun, B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 115, p. 01-12. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.009>

Crissman, H. A. & Steinkamp, J. A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.* v. 59, p. 766-771. 1973.

<https://doi.org/10.1083/jcb.59.3.766>

De Carvalho D. D.; Schmitmeier, S.; Novello, J. C.; Markland, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon*. v. 39, p. 1471-1476. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00106-4)

Doumanov, J.; Mladenova, K.; Topouzova-Hristova, T.; Stoitsova, S.; Petrova, S. Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells. *Toxicon*. v. 94, p. 36-44. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.009>

Eguren, M.; Porlan, E.; Manchado, E.; García-Higuera, I.; Cañamero, M.; Fariñas, I.; Malumbres, M. The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nat. Commun.* v. 4, p. 2880-2896. 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3880>

Friedenson, B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* v. 7, p. 152-162. 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-152>

Fukushima, H.; Ogura, K.; Wan, L.; Lu, Y.; Li, V.; Gao, D.; Liu, P.; Lau, A. W.; Wu, T.; Kirschner, M. W.; Inuzuka, H.; Wei, W. SCF-Mediated Cdh1 Degradation Defines a Negative Feedback System that Coordinates Cell-Cycle Progression. *Cell Rep.* v. 4 (4), p. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.031>

Gao, D.; Inuzuka, H.; Tseng, A.; Wei W. Akt finds its new path to regulate cell cycle through modulating Skp2 activity and its destruction by APC/Cdh1. *Cell Div.* v. 4 (11), p. 1747-1028. 2009. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-11>

Gasco, M.; Shami, S.; Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Reserch.* v. 4, p. 70-76. 2002. <https://doi.org/10.1186/bcr426>

Gebrim, L. C.; Marcussi, S.; Menaldo, D. L.; de Menezes, C. S.; Nomizo, A.; Hamaguchi, A.; Silveira-Lacerda, E. P.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Sampaio, S. V.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals.* v. 37 (4), p. 222-229. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010>

Gérard, C.; Goldbeter, A. Dynamics of the Mammalian Cell Cycle in Physiological and Pathological Conditions. *WIREs System Biological and Medicine.* v. 8, p. 140-156. 2016. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1325>

Guerreiro, O. S.; Fernandes, A. S.; Costa, J. G.; Castro, M.; Miranda, J. P.; Oliveira, N. G. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mutat Res.* v. 757 (2), p. 140-147. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.003>

Gutierrez, C. 25 Years of Cell Cycle Research: What's Ahead? *Trends Plant Sci.* [Epub ahead of print]. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.007>

He, R. J.; Yu, Z. H.; Zhang, R. Y.; Zhang, Z. Y. Protein tyrosine

phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin.* v. 35 (10), p. 1227-1246. 2014. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.80>

Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R. A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* v. 8, p. 193-204. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>

Hinz, M.; Krappmann, D.; Eichten, A.; Heder, A.; Scheidereit, C.; Strauss, M. NF-kappa β function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol.* v. 4, p. 2690-2698. 1999. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2690>

Hirao, A.; Kong, Y. Y.; Matsuoka, S.; Wakeham, A.; Ruland, J.; Yoshida, H.; Liu, D.; Elledge, S. J.; Mak, T. W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science.* v. 287 (5459), p. 1824-1827. 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1824>

Hsu, J. Y.; Reimann, J. D.; Sorensen, C. S.; Lukas, J.; Jackson, P. K. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol.* v. 4 (5), p. 358-366. 2002. <https://doi.org/10.1038/ncb785>

Iarmarcovai, G.; Bonassi, S.; Botta, A.; Baan, R. A.; Orsière, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat*

Res. v. 658 (3), p. 215-233. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>

Jiang, N.; Wang, X.; Yang, Y.; Dai, W. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment," Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. v. 6 (8), p. 885-895, 2006. <https://doi.org/10.2174/138955706777934955>

Kamath, S.; Buolamwini, J. K. Targeting EGFR and HER-2 receptor tyrosine kinases for cancer drug discovery and development. Medicinal Research Reviews. v. 26 (5). p. 569-594. 2006. <https://doi.org/10.1002/med.20070>

Kao, J.; Salari, K.; Bocanegra, M.; Choi, Y. L.; Girard, L.; Gandhi, J.; Kwei, K. A.; Hernandez-Boussard, T.; Wang, P.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Pollack, J. R. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. PLoS ONE. v. 4(7), p. 01-16. 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006146>

Kolling, D. J.; Kratz, J. M.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M. O. Padronização in vitro da técnica do micronúcleo em células VERO para detecção de genotoxicidade. In: 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2006, Florianópolis - SC. REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58, 2006.

Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium

iodide staining. *J. Cell Biol.* v. 66, p. 188-193. 1975.

<https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, p. 680-685. 1970.

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lewis, R. J.; Garcia, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery,* v. 2 (10), p. 790-802. 2003.

<https://doi.org/10.1038/nrd1197>

Li, J.; Cheng, Y.; Qu, W.; Sun, Y.; Wang, Z.; Wang, H.; Tian, B. Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* v. 108 (2), p. 84-93. 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00613.x>

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.* v. 25 (4), p. 402-408. 2001.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lomonte, B.; Angulo, Y.; Moreno, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae

snake venoms: biomimetic activities and potential applications. *Curr Pharm Des.* v. 16 (28), p. 3224-3230. 2010.
<https://doi.org/10.2174/138161210793292456>

Malumbres, M.; Barbacid, M. To Cycle or not to Cycle: A Critical Decision in Cancer. *Nature reviews Cancer.* v. 1, p. 222-231. 2001.
<https://doi.org/10.1038/35106065>

Marcussi, S.; Santos, P. R.; Menaldo, D. L.; Silveira, L. B.; Santos-Filho, N. A.; Mazzi, M. V.; da Silva, S. L.; Stábeli, R. G.; Antunes, L. M.; Soares, A. M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutat Res.* v. 724 (1-2), p. 59-63. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.06.004>

Marcussi, S.; Stábeli, R. G.; Santos-Filho, N. A.; Menaldo, D. L.; Silva Pereira, L. L.; Zuliani, J. P.; Calderon, L. A.; da Silva, S. L.; Antunes, L. M.; Soares, A. M. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. *Toxicon.* v. 65, p. 9-14. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.020>

Nevanlinna, H.; Bartek, J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene.* v. 25, p. 5912-5919. 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209877>

Novak-Zobiolo, N.; Caon, T.; Wildgrube-Bertol, J.; Pereira, C. A.; Okubo, B. M.; Moreno, S. E.; Cardozo, F. T. In vitro and in vivo genotoxic evaluation of Bothrops moojeni snake venom. *Pharm Biol.* v. 53 (6), p. 930-934. 2015.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.950385>

O'Leary, B.; Finn, R. S.; Turner, N. C. Treating Cancer with selectives CDK-4/6 inhibitors. *Nature Reviews | Clinical Oncology.* v. 26, p. 01-14. 2016.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26>

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline 487: In Vitro Micronucleus Test. Draft guideline.1st version. 2004.

Prinholato da Silva, C.; Costa, T. R.; Paiva, R. M.; Cintra, A. C.; Menaldo, D. L.; Antunes, L. M.; Sampaio, S. V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from Bothrops jararacussu snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* v. 21 (44), p. 01-08. 2015.
<https://doi.org/10.1186/s40409-015-0044-5>

Raj, S.; Franco, V. I.; Lipshultz, S. E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine.* v. 16 (6), p. 315-325. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s11936-014-0315-4>

Rittinghausen, S.; Bellmann, B.; Creutzenberg, O.; Ernst, H.; Kolling, A.; Mangelsdorf, I.; Kellner, R.; Beneke, S.; Ziemann, C. Evaluation of immunohistochemical markers to detect the genotoxic mode of action of fine and ultrafine dusts in rat lungs. *Toxicology*. v. 303 p.177-186. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.007>

Rodrigues, R.S. Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*). Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

Rodrigues, V. M.; Lopes, D. S.; Castanheira, L. E.; Gimenes, S. N. C.; Naves-de-Souza D. L.; Ache, D. C.; Borges, I.P.; Yoneyama, K. A. G.; Rodrigues R. S. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v. 15, n. 7, p. 670 - 684, 2015. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150217120347>

Rodrigues, V. M.; Soares, A. M.; Mancin, A. C.; Fontes, M. R.; Homsibrandeburgo, M. I.; Giglio, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr. Physiol*. v. 121 (3) p. 215-222 1998. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10136-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10136-8)

Rosner, M. & Hengstschläger, M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. *Oncogene*. v. 30 (44), p. 4509-4522. 2011. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.165>

Rosner, M.; Schipany, K.; Hengstschläger, M. Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle. *Nat Protoc*. v. 8 (3), p. 602-626. 2013. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.011>

Schnitt, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern pathology*. v. 23, p. S60-S64. 2010. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.33>

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J CLIN*. v. 66, p. 7-30. 2016. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>

Tergaonkar, V.; Pando, M.; Vafa, O.; Wahl, G.; Verma, I. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*. v. 5, p. 493-503. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00068-5)

Vyas, V. K.; Brahmabhatt, K.; Bhatt, H.; Parmar, U. Therapeutic potential of

snake venom in cancer therapy: current perspectives. Asian Pac J Trop Biomed. v. 3 (2), p. 156-162. 2013. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60042-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60042-8)

Wang, X.; Ju, W.; Renouard, J.; Aden, J.; Belinsky, S. A.; Lin, Y. 17-allyl-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor-kappaB pathway. Cancer Res. v. 66, p.1089-1095. 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2698>

Weinberg, R. A. The Biology of Cancer. 2th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York, 2014.

Zafonte, B. T.; Hult, J.; Amanatullah, D. F.; Albanese, C.; Wang, C.; Rosen, E.; Reutens, A.; Sparano, J. A.; Lisanti, M, P.; Pestell, R. G. Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. Frontiers in Bioscience. v. 5, p. 938-961. 2000. <https://doi.org/10.2741/A562>

Zhao, X.; Andreas Rodland, E. A.; Tibshirani, R.; Plevritis, S. Molecular subtyping for clinically defined breast cancer subgroups. Breast Cancer Research. 2015, p. 01-09. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0520-4>

Zhou, Q.; Hopp, T.; Fuqua, S. A.; Steeg, P. S. Cyclin D1 in breast

pre malignancy and early breast cancer: implications for prevention and treatment. *Cancer Lett.* v. 162 (1), p.3-17. 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00657-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00657-1)

Žunec, S.; Kašuba, V.; Pavičić, I.; Marjanović, A. M.; Tariba, B.; Milić, M.; Kopjar, N.; Pizent, A.; Vrdoljak, A. L.; Rozgaj, R.; Želježić, D. Assessment of oxidative stress responses and the cytotoxic and genotoxic potential of the herbicide tembotrione in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.* v. 94, p. 64-74.

2016. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.05.019>