



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, ANTIPROLIFERATIVOS E  
ANTIMIGRATÓRIOS DO PEPTÍDEO Hs02 E DE SUA CONJUGAÇÃO COM A  
CUMARINA DCCA EM CÉLULAS MCF-7**

**Pedro Henrique Celestino Alves**

Brasília – DF

2025

**Pedro Henrique Celestino Alves**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, ANTIPROLIFERATIVOS E  
ANTIMIGRATÓRIOS DO PEPTÍDEO Hs02 E DE SUA CONJUGAÇÃO COM A  
CUMARINA DCCA EM CÉLULAS MCF-7**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia  
da Universidade de Brasília como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges

Brasília – DF

2025

Pedro Henrique Celestino Alves

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, ANTIPROLIFERATIVOS E  
ANTIMIGRATÓRIOS DO PEPTÍDEO Hs02 E DE SUA CONJUGAÇÃO COM A  
CUMARINA DCCA EM CÉLULAS MCF-7**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia  
da Universidade de Brasília como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2025.

**Comissão Avaliadora**

---

Profa. Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges

---

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama

## Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por tudo. Agradecer a minha mãe, Sebastiana Pereira Celestino, que desde sempre esteve presente em minha vida, sempre me apoiando e me incentivando, sou eternamente grato por tudo, se eu cheguei aonde cheguei, pode ter certeza de que foi por conta de tudo o que a senhora fez por mim, obrigado mãe, a senhora é meu maior presente.

Gostaria de agradecer minha querida orientadora, Tatiana Karla, pela oportunidade que me deu, por todo o carinho ao longo desse tempo e por todos os ensinamentos que vieram juntos ao longo desses anos.

Agradeço também ao Maurício Guilherme, por todos os bons momentos no laboratório e todas as matérias que sobrevivemos juntos.

Quero agradecer ao Daniel Landim que foi meu primeiro amigo ao entrar na UnB, me diverti imensamente ao seu lado nessa jornada e obrigado por deixar ela mais leve, sendo tanto pelas anotações, como principalmente os bons momentos que passamos.

Também quero agradecer a Ana Beatriz, que me apoiou de diversas maneiras ao longo do curso, ouvindo minhas reclamações, comemorações e choros. Além de me ajudar nos experimentos sempre que conseguia, sou muito feliz por você ter entrado na minha vida.

À Mariângela meu muito obrigado por todos os ensinamentos que obtive no laboratório. Tenho certeza de que, se sem eles, eu teria passado maus bocados.

Quero agradecer também à Fabiana, Raquel, Gustavo, Karen e Daniela por todos os bons momentos, de risada ou frustrações que compartilhamos ao longo desse período.

**Sumário**

Lista de figuras e tabela.....	vi
Lista de Abreviaturas .....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução.....	11
Objetivo geral .....	25
Metodologia.....	27
Resultados.....	39
Discussão.....	51
Conclusão.....	55
Referências.....	58

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Ilustração das fases do ciclo celular.....	14
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da 7-(N,N-Diethylamino)-cumarina-3-carboxílica (DCCA)..	24
<b>Figura 3</b> – Fluxograma do delineamento experimental do estudo.....	28
<b>Figura 4</b> - Fluxo de trabalho da cultura celular.....	29
<b>Figura 5</b> – Protocolo simplificado do ensaio de MTT.....	33
<b>Figura 6</b> - Protocolo simplificado do ensaio de migração celular.....	39
<b>Figura 7</b> – Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA.....	41
<b>Figura 8</b> - Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 48 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA.....	43
<b>Figura 9</b> – Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 72 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA.....	43
<b>Figura 10</b> - Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 72 horas.....	44
<b>Figura 11</b> – Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 48 horas.....	46
<b>Figura 12</b> - Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 72 horas.....	46
<b>Figura 13</b> - Efeito antiproliferativo do peptídeo Hs02 e da conjugação Hs02-DCCA na linhagem MCF-7, avaliado pelo ensaio CFSE.....	47
<b>Figura 14</b> – Variação percentual da área da ferida ao longo de 72 horas no ensaio de migração celular ( <i>wound healing</i> ) utilizando células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações dos compostos Hs02 e Hs02-DCCA.....	49
<b>Figura 15</b> - Fechamento da ferida (%) após 72 horas no ensaio de migração celular ( <i>wound healing</i> ) com células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações dos compostos Hs02 e Hs02-DCCA.....	50
<b>Figura 16</b> - Imagens representativas do ensaio de migração celular ( <i>wound healing</i> ) realizado com células MCF-7 ao longo de 72 horas.....	51

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01</b> - Classificação dos Subtipos Moleculares do Câncer de Mama.....	17
--	----

## Lista de Abreviaturas

<b>CFDA-SE</b>	Corante Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster
<b>DCCA</b>	7-(N,N-dietilamino)-cumarina-3-carboxílica
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Hs02</b>	Peptídeo Hs02
<b>MCF-7</b>	Michigan Cancer Foundation – 7 (linhagem celular)
<b>ME-5%</b>	Meio de Ensaio 5%
<b>ME-10%</b>	Meio de Ensaio 10%
<b>MCTs</b>	transportadores de monocarboxilato
<b>MM-0%</b>	Meio de Migração 0%
<b>MM-10%</b>	Meio de Migração 10%
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>STF</b>	Solução Salina Trifosfato

## Resumo

O câncer de mama permanece como um dos maiores desafios de saúde pública mundial, impulsionando a busca por novas estratégias terapêuticas capazes de superar as limitações dos tratamentos convencionais. Entre essas alternativas, os peptídeos bioativos têm se destacado por sua seletividade e pela habilidade de modular processos celulares. O peptídeo Hs02 já havia demonstrado atividade antineoplásica em linhagens hematológicas; contudo, seus efeitos sobre tumores sólidos ainda não haviam sido investigados. Neste estudo, avaliamos pela primeira vez os impactos citotóxicos, antiproliferativos e antimigratórios de Hs02 e de sua versão conjugada à molécula fluorescente 7-(N,N-dietilamino)-cumarina-3-carboxílica (DCCA) em células de câncer de mama MCF-7. Foram conduzidos ensaios de viabilidade celular (MTT), morte celular (PI), proliferação (CFSE) e migração (*wound healing*), utilizando concentrações entre 1,0 e 7,5  $\mu\text{M}$ . Hs02 apresentou um perfil de resposta dose-dependente não monotônico, sendo a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  a mais eficaz, com redução significativa da viabilidade após 24 horas e forte inibição da migração celular. Curiosamente, concentrações mais altas resultaram em perda de efeito e recuperação da viabilidade a níveis próximos ao basal. Em contraste, a forma conjugada Hs02-DCCA mostrou menor potência em doses intermediárias, mas promoveu uma inibição progressiva do fechamento da ferida em concentrações elevadas, superando o peptídeo isolado em atividade antimigratória, sem comprometer a viabilidade metabólica. Além disso, a conjugação conferiu um perfil farmacodinâmico diferenciado, incluindo permeabilização de membrana e alterações nos processos metabólicos e de adesão celular. Em síntese, os resultados revelam que Hs02 exerce efeitos citotóxicos e citostáticos dependentes do contexto e restritos a uma faixa limitada de concentração, enquanto sua conjugação com DCCA amplia o espectro funcional e confere maior estabilidade em doses elevadas. Esses achados representam a primeira evidência do potencial de Hs02 e Hs02-DCCA como



candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais baseados em peptídeos.

## Abstract

Breast cancer remains one of the major global public health challenges, driving the search for new therapeutic strategies capable of overcoming the limitations of conventional treatments. Among emerging alternatives, bioactive peptides have gained attention due to their selectivity and ability to modulate cellular processes. The peptide Hs02 has previously demonstrated antineoplastic activity in hematological cell lines; however, its effects on solid tumors had not yet been investigated. In this study, we evaluated for the first time the cytotoxic, antiproliferative, and antimigratory effects of Hs02 and its conjugate with the fluorescent molecule 7-(N,N-diethylamino)-coumarin-3-carboxylic acid (DCCA) in MCF-7 breast cancer cells. Cell viability (MTT), cell death (PI), proliferation (CFSE), and migration (wound healing) assays were performed using concentrations ranging from 1.0 to 7.5  $\mu\text{M}$ . Hs02 exhibited a non-monotonic dose-dependent response, with 2.5  $\mu\text{M}$  being the most effective concentration, leading to a significant reduction in viability after 24 hours and strong inhibition of cell migration. Interestingly, higher concentrations resulted in loss of effect and recovery of viability to near-basal levels. In contrast, the Hs02-DCCA conjugate showed lower potency at intermediate concentrations but induced progressive inhibition of wound closure at higher doses, surpassing the isolated peptide in antimigratory activity while maintaining metabolic viability. Moreover, conjugation conferred a distinct pharmacodynamic profile, including membrane permeabilization and alterations in metabolic and adhesion processes. Overall, the findings reveal that Hs02 exerts context-dependent cytotoxic and cytostatic effects within a narrow concentration range, whereas conjugation with DCCA expands its functional spectrum and enhances stability at higher doses. These results provide the first evidence supporting Hs02 and Hs02-DCCA as promising candidates for the development of peptide-based antitumor agents.

# 1. Introdução

## 1.1 Contexto geral

O câncer corresponde a segunda maior causa de mortes prematuras por doenças não transmissíveis no mundo, sendo responsável por 30,3% das mortes prematuras globais entre 30 e 69 anos (Bray et al., 2021). Em 2020, houve cerca de 10 milhões de óbitos decorrentes dessa doença, além disso, é previsto, para o ano de 2050, que o número de novos casos suba para 35 milhões, um aumento de 75% em relação ao ano de 2022, quando houve 20 milhões de casos (World Health Organization, 2024).

Sabemos que a origem dessa doença não é recente, é descrito que Imhotep, um médico egípcio do ano de 2.625 a.C., apresentou aspectos macroscópicos de um câncer de mama, também, o patologista Arthus Aufderheide localizou esqueletos mumificados, com evidências da doença (Mukherjee, 2011). Mesmo com diversos casos, o termo que se refere a essa doença só surgiu por volta de 400 a.C., quando Hipócrates notou uma semelhança entre um caranguejo com um tumor e a formação de vasos sanguíneos ao seu redor. Em função desta observação, ele usou o termo *karkinos* do grego (caranguejo) para se referir a essa condição (Mukherjee, 2011). Hoje em dia sabemos que o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, que giram em torno de células que tem um crescimento de forma desordenada, podendo invadir tecidos e se disseminar para órgãos distantes, algo que chamamos de metástase (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Para entendermos como o câncer surge, é necessário falar sobre o ciclo celular, processo no qual ocorre a perpetuação celular, garantindo manutenção dos tecidos e renovação de células necessárias para o sistema. O ciclo celular é dividido em quatro fases principais, sendo a G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M (Figura 1). A fase G<sub>1</sub> é a fase em que ocorre o crescimento

celular e a síntese de proteínas necessárias para a replicação do DNA, em seguida, a fase S, ou Síntese de DNA, é o momento em que ocorre a duplicação do DNA; após essa fase a célula entra na fase G<sub>2</sub>, que é quando ela se prepara para a divisão celular, tendo uma síntese proteica adicional sendo também o momento em que ocorre uma verificação dos erros de replicação para garantir a integridade do DNA. Ao final, ocorre a fase M, também chamada de mitose, onde o DNA que havia sido duplicado se divide em duas células-filhas (Israels; Israels, 2000) (Figura 1).

Algumas células que estão na fase G<sub>1</sub> podem entrar na fase G<sub>0</sub>, onde elas não continuam as etapas do ciclo celular, mas permanecem desempenhando funções específicas, (Pizzorno; Murray; Joiner-Bey, 2016).

Vale ressaltar, que durante essas etapas existem reguladores do ciclo celular, tanto positivos, para a continuação do ciclo, como negativos, para a interrupção. Como reguladores positivos temos como exemplo as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs), que trabalham de forma conjunta, onde as ciclinas se ligam as CDKs, formando complexos ativos, esses complexos fosforilam proteínas-alvo que vão promover as etapas do ciclo celular. Quando são detectadas condições inadequadas, ou presença de danos ao DNA, os reguladores negativos atuam para bloquear ou retardar a progressão do ciclo celular, como exemplos temos a proteína p53 e as cinases sensoras de dano no DNA (ATM e ATR). Proteínas como a ATM e ATR são capazes de detectar danos ao DNA, com isso elas fosforilam a p53 gerando um aumento da sua presença, dessa maneira ela ativa genes que inibem CDKs, por exemplo, travando o ciclo celular (Zhang et al., 2024).

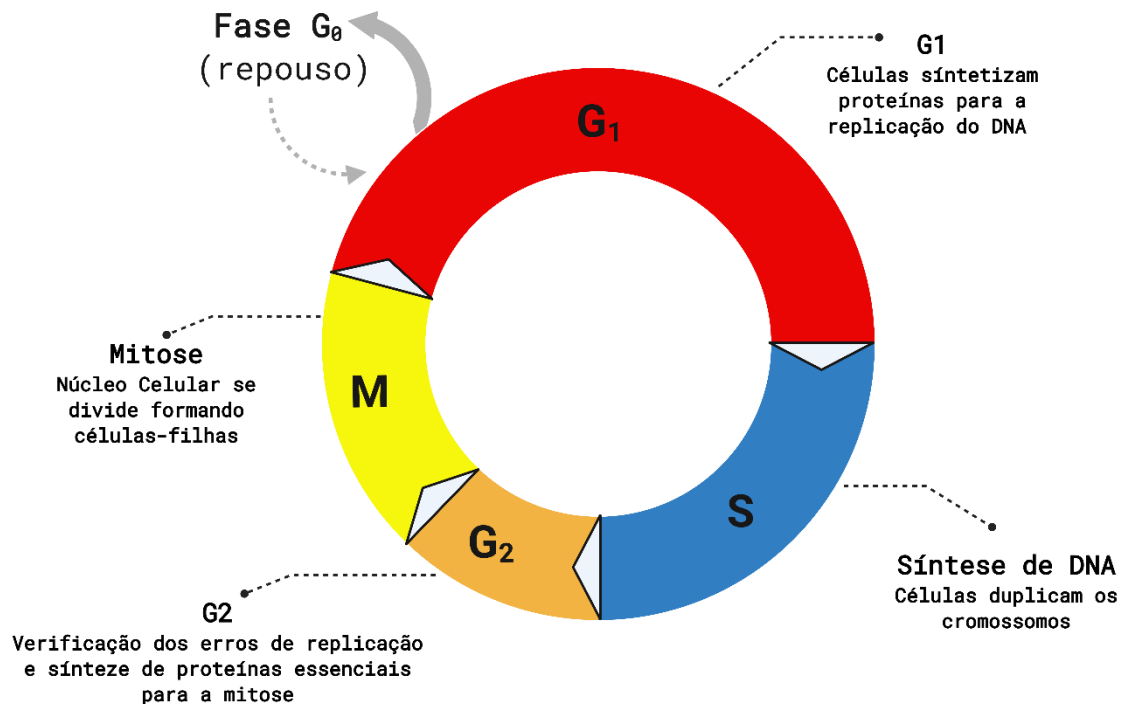


Figura 1 - Ilustração das fases do ciclo celular. Criado com BioRender.com.

Embora existam diversos mecanismos de regulação do ciclo celular, é possível que ocorra uma falha durante esses processos regulatórios, o que pode ocasionar uma perda do controle proliferativo, assim, a célula pode se tornar independente dos sinais fisiológicos que determinam o início ou a interrupção da divisão celular. A perda da regulação do ciclo celular se não causar a morte, pode se tornar o início da carcinogênese. Processo que diversas alterações genéticas e epigenéticas podem se acumular no genoma de uma célula somática, lhe dando vantagens seletivas em relação a células saudáveis (Hanahan; Weinberg, 2000).

Para que ocorram essas alterações, dois grupos de genes normalmente estão envolvidos, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são responsáveis por regular o crescimento e proliferação celular, sendo responsáveis por codificar proteínas envolvidas nessas etapas, que podem estimular a produção ou ativação de ciclinas ou CDKs, por exemplo, mas quando esses genes sofrem mutações que lhe

concedam ganho de função, eles podem se transformar em oncogenes promovendo proliferação de forma exacerbada (Singh et al., 2025). Em contrapartida, existem os genes supressores de tumor, como o TP53, que codifica a p53, e o BRCA1, que atuam regulando a divisão celular. Eles codificam proteínas que controlam a proliferação celular, atuando como protetores naturais contra o crescimento celular desenfreado, mas quando ocorrem mutações que os façam perder suas funções, as células danificadas tem uma vantagem em sua sobrevivência, continuando o crescimento e multiplicação (Kontomanolis et al., 2020). Com essa combinação de mutações, com a proliferação exacerbada somada a inativação dos reguladores negativos, um ambiente totalmente favorável para a expansão celular de células danificadas é criado, sendo a base para um desenvolvimento tumoral (Hanahan, 2022).

Por fim, a transformação das células normais em células cancerígenas é o resultado de uma aquisição progressiva das características que as tornam capazes de continuar se multiplicando e sobrevivendo, ignorando os controles fisiológicos do organismo. Essas transformações são conhecidas como *Hallmarks of Cancer*, sendo que elas resultam em proliferação sustentada, evasão de mecanismos supressores de crescimento, resistência a morte celular e capacidade de invadir tecidos, formando metástases (Hanahan; Weinberg, 2011).

## **1.2 Câncer de Mama**

Dentre os diversos tipos de neoplasias humanas, o câncer de mama ganha um certo destaque, sendo uma doença multifatorial, em que alterações genéticas, epigenéticas e hormonais interagem entre si, favorecendo a proliferação descontrolada e o desenvolvimento de tipos tumorais distintos. Ela é um dos desafios mais complexos da oncologia moderna, sendo um conjunto de neoplasias que diferem, entre si, em biologia, prognóstico e resposta terapêutica (Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022b).

No Brasil, as projeções para o ano de 2025 é que tenham 73.610 novos casos de câncer de mama, sendo o mais comum após o câncer de pele. Em 2023, foram contabilizados 20.165 óbitos decorrentes da doença, reforçando sua posição como a principal causa de mortalidade oncológica feminina no país (Instituto Nacional de Câncer (Brasil), 2025).

Além dos efeitos físicos, a doença também causa impactos tanto emocionais quanto sociais. O diagnóstico causa medo e ansiedade, gerando diversas preocupações quanto a um futuro incerto, sendo pela possibilidade de um mau prognóstico ou pela chance de recidiva. As alterações físicas decorrentes do tratamento, podem reduzir a autoestima causando danos que vão além do físico, como no emocional e psicológico das pacientes (Lopes et al., 2024).

Entre os fatores que podem resultar na carcinogênese mamária, um que recebe destaque é a idade avançada; contudo, outros fatores também estão envolvidos tais como o sedentarismo, a obesidade e o consumo regular do álcool. Há ainda a possibilidade da incidência de fatores hereditários, sendo que alguns dados mostram que cerca de 10% dos casos de câncer de mama estejam associados a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, supressores de tumor (Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022a).

Atualmente, os estudos do câncer de mama priorizam a sua classificação molecular, conseguindo revelar características internas do tumor, que não podem ser identificadas pela observação microscópica do tecido. Por isso, se faz necessário analisar a expressão gênica e a avaliação de marcadores imuno-histoquímicos, como receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Por estas avaliações, os carcinomas mamários são agrupados em quatro subtipos principais, o Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e o Triplo-Negativo, tendo essa classificação como uma orientação para prognósticos e estratégias terapêuticas (Zhang; Powell; Li, 2020).

No caso do subtipo Luminal, seu nome é proveniente de sua semelhança com as células luminais da mama e por expressarem os mesmos genes, o que faz supor que este subtipo tenha origem desse tipo celular (Silva ZANETTI BMSc et al., 2011). Especificamente, o subtipo Luminal A é o mais frequentemente diagnosticado, sendo caracterizado pela positividade para RE e RP, mas tendo uma baixa expressão de genes proliferativos, tais como a proteína Ki-67 e a ciclina B1. Esse subtipo está relacionado a um melhor prognóstico, tendo como tratamento a terapia hormonal, como o uso de moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, como o tamoxifeno, ou com inibidores da aromatase, que reduzem a produção de estrogênio pelo organismo. Esses tratamentos resultam em uma menor incidência de recidiva e maior taxa de sobrevida (Orrantia-Borunda et al., 2022).

Já o subtipo Luminal B, se caracteriza pela positividade no RE, baixa expressão de HER2, sendo negativo para RP e uma alta expressão de Ki-67. Este subtipo está associado a um pior prognóstico em comparação ao Luminal A, visto que a maior taxa de Ki-67 aumenta a taxa de proliferação celular e em casos que tenham a expressão de HER2 geram uma maior agressividade, visto que esse gene de crescimento vai estar ativo. Desta forma, o Luminal B apresenta maior risco de recorrência e uma resposta terapêutica mais variável, sendo que nesse caso é utilizado a terapia hormonal em associação com a quimioterapia (Lammers et al., 2025).

Diferente dos tumores luminais, os outros subtipos moleculares do câncer de mama envolvem certos desafios clínicos. O subtipo HER2-positivo é definido pela superexpressão da proteína HER2, sendo presente em cerca de 15% dos casos (Orrantia-Borunda et al., 2022). Historicamente, esse subtipo esteve relacionado a um pior prognóstico, devido a sua rápida taxa proliferativa, sendo bem agressivo, pois com a expressão exacerbada do HER2 ocorre uma sinalização contínua das vias que estimulam proliferação celular. Como tratamento para HER2-positivo, são utilizados medicamentos direcionados contra a proteína



HER2 como trastuzumabe combinado com entansina que é um agente inibidor da divisão celular; ou o pertuzumabe e inibidores da tirosina quinase. Independente do tratamento, a extirpação cirúrgica do tumor é necessária, sendo associada ao tratamento com quimioterápicos (Wang; Xu, 2019)

Por outro lado, o subtipo Triplo-Negativo se caracteriza pela ausência de expressão de RE, RP e HER2, sendo o responsável por cerca de 20% de todos os casos de cânceres de mama. É mais frequente em mulheres afro-americanas e mulheres mais jovens, geralmente com menos de 40 anos, nas quais tem o pior prognóstico (Orrantia-Borunda et al., 2022). Sua agressividade estaria relacionada a uma elevada heterogeneidade biológica, tendo o predomínio de células com propriedades de células-tronco cancerígenas (CSCs) e a escassez de alvos terapêuticos específicos, dessa maneira a quimioterapia citotóxica permanece como principal abordagem sistêmica, mas tendo também tratamentos com inibidores da proteína poli (ADP-ribose) polimerase (PARP); embora a presença de CSCs frequentemente contribuam para a resistência medicamentosa e um maior risco de reincidência (Mandapati; Lukong, 2023).

**Tabela 1 – Classificação dos Subtipos Moleculares do Câncer de Mama**

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>RE ou RP</b>	<b>HER2</b>	<b>Características Principais</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Luminal A</b>	Sim	Não	Crescimento mais lento	Hormonal
<b>Luminal B</b>	Sim	Alguns casos	Crescimento mais rápido que Luminal A	Hormonal/Quimioterápico
<b>HER2-positivo</b>	Alguns casos	Sim	Superexpressão da proteína HER2.	Hormonal (alguns casos)/Quimioterápico
<b>Triplo-Negativo</b>	Não	Não	Não expressa RE, RP e HER2	Quimioterápico

A tabela apresenta os principais subtipos moleculares do câncer de mama — Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e Triplo-Negativo — destacando o status dos receptores hormonais (RE/RP), a expressão do receptor HER2 e as características biológicas predominantes (Lammers et al., 2025; Orrantia-Borunda et al., 2022).

A relevância desses subtipos se reflete diretamente nos indicadores epidemiológicos. Em escala global, o câncer de mama permanece como a neoplasia mais frequente entre as

mulheres, sendo que em 2022 foram registrados aproximadamente 2,3 milhões de novos casos e cerca de 670 mil óbitos decorrentes da doença, a tornando a principal causa de morte entre as mulheres (World Health Organization, 2025).

Embora os avanços em terapias oncológicas tenham ampliado as possibilidades de tratamento, o câncer continua apresentando obstáculos significativos. A diversidade genética e molecular dos tumores impede respostas homogêneas aos medicamentos, favorecendo o aparecimento de células resistentes e, com isso, a recorrência da doença. Além disso, muitos agentes quimioterápicos carecem de seletividade, atingindo também células normais e provocando efeitos adversos que limitam a dose terapêutica segura.

Mesmo abordagens modernas, como imunoterapias e terapias-alvo, não estão isentas de limitações, a resistência adquirida e a variabilidade individual entre pacientes reduzem sua eficácia. Outro ponto crítico é o custo elevado dessas estratégias, que restringem o acesso em larga escala, sobretudo em sistemas públicos de saúde.

### **1.3 Peptídeos bioativos e terapias anticâncer**

Os peptídeos bioativos são uma classe de moléculas formadas por curtas sequências de aminoácidos capazes de modular processos celulares. Eles podem ser obtidos de proteínas naturais, por processos enzimáticos ou produzidos por síntese química e engenharia molecular, apresentando estruturas lineares, cíclicas ou modificadas para aumentar atividade e estabilidade (Bauso et al., 2024). Em alguns sistemas biológicos os peptídeos podem permanecer inativos e serem ativados após clivagens específicas revelando sítios funcionais responsáveis que podem lhes conferir ação antimicrobiana, antiproliferativa ou regulatória (Ghadiri et al., 2024).

Em um contexto oncológico, existem peptídeos anticâncer que se distinguem por sua capacidade de reconhecer seletivamente células tumorais, sendo essa habilidade decorrente de algumas propriedades biofísicas como carga positiva, hidrofobicidade moderada e conformações anfipáticas, que favorecem sua interação com membranas celulares enriquecidas por fosfolipídios aniônicos, heparan sulfato e glicoproteínas alteradas (características que podem ser encontradas em células malignas) (Norouzi; Mirmohammadi; Houshdar Tehrani, 2022). Com essa seletividade estrutural muitos peptídeos podem promover perturbações diretas na membrana tumoral, levando a formação de poros, despolarização, perda de integridade e lise celular.

Além dessa ação membranolítica, muitos peptídeos exibem mecanismos intracelulares complexos. Alguns ativam vias apoptóticas intrínsecas, modulando proteínas BAX, BCL-2 e promovendo a liberação de citocromo c, enquanto outros podem induzir estresse oxidativo, desregulação mitocondrial, fragmentação de DNA ou bloqueio de topoisomerasas (Vadevoo et al., 2023). A literatura também descreve peptídeos como sendo capazes de regular vias de sinalização essenciais para a sobrevivência celular, incluindo PI3K/AKT, ERK/MAPK e TGF- $\beta$ /SMAD, resultando em inibição da proliferação, supressão de migração e redução da capacidade de invasão tumoral, especialmente em modelos de câncer de mama (Bauso et al., 2024).

Do ponto de vista imunológico, diversos peptídeos atuam como moduladores do microambiente tumoral, podendo estimular células do sistema imune inato, aumentar a produção de citocinas, favorecer a fagocitose ou reverter mecanismos de evasão imune empregados pelas células neoplásicas (Ghadiri et al., 2024). Essa ação combinada, que envolve efeitos diretos e indiretos sobre o tumor, posiciona os peptídeos como candidatos estratégicos para terapias combinadas e imunoterapias de nova geração.

A diversidade de mecanismos de ação observados nos peptídeos anticâncer está diretamente relacionada a suas diferenças estruturais, como composição de aminoácidos, carga líquida, hidrofobicidade e conformação espacial. De acordo com a literatura, esses peptídeos podem ser classificados em diferentes subclasses, incluindo peptídeos catiônicos, peptídeos derivados de organismos marinhos, peptídeos penetrantes de células e peptídeos híbridos, cada uma associada a mecanismos biológicos específicos (Norouzi; Mirmohammadi; Houshdar Tehrani, 2022). Peptídeos catiônicos, por exemplo, interagem preferencialmente com membranas tumorais devido a maior exposição de fosfolipídios aniônicos, como a fosfatidilserina, levando a desestabilização da membrana, formação de poros e consequente morte celular por necrose ou apoptose. Já os peptídeos penetrantes de células apresentam a capacidade de atravessar a membrana plasmática por mecanismos diretos ou mediados por endocitose, atuando como vetores para o transporte intracelular de fármacos e moduladores moleculares (Norouzi; Mirmohammadi; Houshdar Tehrani, 2022). Esse conjunto de propriedades estruturais e funcionais tem impulsionado o crescente interesse científico por peptídeos bioativos como agentes antitumorais, visto que em comparação com outras moléculas e anticorpos monoclonais, os peptídeos oferecem vantagens substanciais, incluindo maior seletividade, menor toxicidade sistêmica, fácil modificação estrutural, rápida biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, atributos determinantes para terapias mais seguras e direcionadas (Vadevoo et al., 2023).

Dessa forma, os peptídeos bioativos se consolidam como elementos centrais nas estratégias contemporâneas de inovação farmacológica, atuando tanto como agentes anticâncer diretos quanto como plataformas versáteis para veiculação de moléculas, conjugação com fluoróforos ou desenvolvimento ou no desenvolvimento de estruturas híbridas de maior estabilidade e potência. A compreensão dessas propriedades tem impulsionado o surgimento de novos peptídeos com potencial terapêutico significativo, cuja

avaliação em modelos celulares apropriados representa uma etapa fundamental no desenvolvimento de candidatos promissores para terapias antitumorais.

#### **1.4 O peptídeo Hs02**

Os peptídeos antimicrobianos intragênicos (PAIs) são uma classe recente de peptídeos bioativos identificados no interior de genes codificadores de proteínas humanas. Esses peptídeos, revelados por ferramentas de mineração genômica, apresentam em comum o fato de serem curtos, predominantemente catiônicos e anfipáticos, propriedades que favorecem sua interação seletiva com membranas celulares ricas em fosfolipídios aniônicos. Diversos PAIs demonstram capacidade de induzir permeabilização de membrana, modulação inflamatória e morte celular dependente de poros, além de apresentarem atividade contra microrganismos patogênicos (Brand et al., 2019). Essas características estruturais e funcionais tem despertados um crescente interesse pelo potencial desses peptídeos atuarem como moléculas terapêuticas de amplo espectro.

Dentro dessa categoria, se destaca o peptídeo Hs02, recentemente descrito e derivado da proteína humana miosina 1H. Composto por 16 aminoácidos (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH<sub>2</sub>), o Hs02 apresenta carga positiva e organização anfipática, característica de peptídeos com afinidade por membranas celulares com composição lipídica alterada. Em células tumorais, essas alterações incluem maior exposição de fosfolipídios aniônicos, como a fosfatidilserina, aumento da fluidez da membrana, alterações no conteúdo de colesterol e maior densidade de microvilosidades, resultando com isso em uma superfície celular mais negativamente carregada, quando comparada as células saudáveis. Embora o Hs02 seja um peptídeo de origem endógena, sua caracterização biológica é recente e os estudos disponíveis sobre suas propriedades e mecanismos de ação ainda são limitados (Brand et al., 2019).

Resultados iniciais demonstraram que o Hs02 possui atividade antimicrobiana, anti-biofilme e anti-inflamatória, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas resistentes. Seus mecanismos envolvem interação com lipopolissacarídeos (LPS), ruptura da permeabilidade de membranas bacterianas e redução de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), sem apresentar citotoxicidade significativa em células murinas (RAW) na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  (Zhao et al., 2025).

No campo oncológico, o conhecimento disponível é ainda mais restrito. Por ser um peptídeo relativamente novo, ainda não há estudos envolvendo o câncer de mama. Um único estudo publicado até o momento com células HL-60 oriundas de uma leucemia promielocítica aguda, demonstrou que o Hs02 apresenta atividade antineoplásica uma vez que reduziu a viabilidade celular e ativou vias de morte dependentes de permeabilização de membrana, tais como a piroptose. Entre os efeitos observados estão o bloqueio do ciclo celular em G1, liberação de desidrogenase láctica (DLH), formação de poros de ativação de moléculas associadas a piroptose, como *NOD like receptor P1* (NLRP1), caspase 1 (CASP-1), gasdermina (GSDME) e IL-1 $\beta$ . Neste trabalho, os autores ainda verificaram que o peptídeo apresentou baixa citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano, sugerindo um certo grau de seletividade (Mota et al., 2024).

Dessa maneira, esse peptídeo ainda está em fase de estudos, tendo seus mecanismos de ação ainda em fase inicial de investigação. Avaliar seus efeitos citotóxicos em modelos validados, como a linhagem MCF-7, representa uma etapa essencial para ampliar o entendimento sobre seu espectro biológico e explorar sua viabilidade como candidato emergente para terapias anticâncer.

### **1.5 7-(N,N-Diethylamino)-cumarina-3-carboxílica**

A molécula 7-(N,N-Diethylamino)-cumarina-3-carboxílica (DCCA), é uma carboxicumarina sendo uma molécula derivada da família das cumarinas, que são um grupo de compostos conhecidos por diversas aplicações, sendo farmacológicas, ópticas e fotofísicas, possuindo um sistema bicíclico conjugado que lhe dá a capacidade de gerar efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (Gaber et al., 2021).

A DCCA apresenta um grupo N,N-dietilamino ligado ao anel benzênico na posição 7 e um grupo ácido carboxílico na posição 3 (Figura 2). Derivados cumarínicos que contenham substituições na posição 3, como no caso da DCCA, são associados a atividades anticancerígenas, por mecanismos que geram a apoptose, modulação do ciclo celular e interferência em vias de estresse oxidativo (Gaber et al., 2021). O sistema cumarínico conjugado, formado pela fusão do anel benzênico com o anel lactônico, juntamente com o grupo doador de elétrons na posição 7 favorecem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que gera disfunção mitocondrial e ativação de caspases, como a caspase-9, que é uma proteína chave na via de morte programada apoptótica (Draoui et al., 2013). Também, certas carboxicumarinas podem interagir com alvos intracelulares que estejam envolvidos no ciclo celular, levando a parada entre G<sub>0</sub> e G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub> e M, o que favorece a redução da proliferação tumoral (Draoui et al., 2013). Foi demonstrado por Takla et al. (2023) que derivados cumarínicos podem apresentar citotoxicidade seletiva contra células de MCF-7, reforçando a evidência de que a DCCA pode atuar de forma seletiva nesse tipo celular.

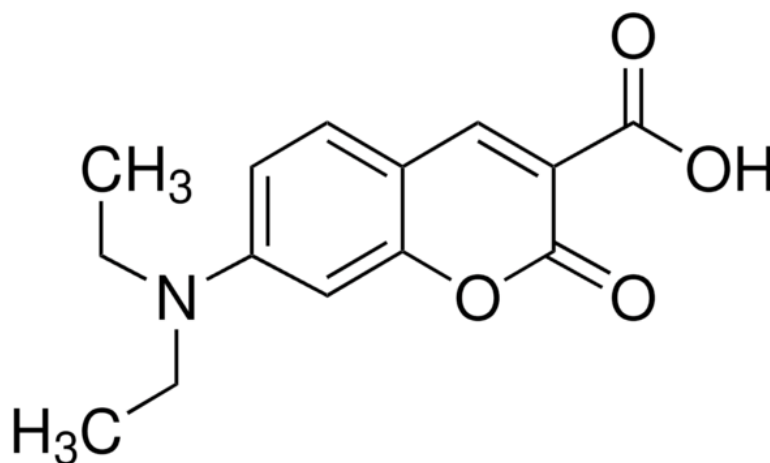


Figura 2 – Estrutura química da 7-(N,N-Diethylamino)-cumarina-3-carboxílica (DCCA). Imagem obtida em Santa Cruz Biotechnology (SCBT). Disponível em: [<https://www.scbt.com/p/7-diethylamino-coumarin-3-carboxylic-acid-50995-74-9>.] Acesso em: 05 dez. 2025

A DCCA também é descrita como um cromóforo versátil, podendo ser utilizada como marcador fluorescente, sendo empregada em estudos de permeabilidade e metabolismo celular. Com sua alta estabilidade eletrônica, associada a planaridade do sistema cumarínico, resultante da conjugação entre o anel benzênico e o anel lactônico, a DCCA gera uma estabilidade orbital do composto que contribui para sua capacidade de absorção e emissão de comprimentos de onda mais longos (Zhang et al., 2008). Também foi demonstrado que essa classe de moléculas apresenta uma boa solubilidade em solventes orgânicos, uma estabilidade térmica e uma facilidade de funcionalização (Draoui et al., 2013), o que favorece sua aplicação em modificações conjugadas, com o intuito de promover um efeito sinérgico.

### 1.6 Justificativa do estudo

Diante da elevada incidência do câncer de mama e da ampla diversidade de seus subtipos moleculares, essa doença permanece como um importante desafio em saúde pública. Além das implicações clínicas, o diagnóstico está associado a impactos sociais e



psicológicos significativos, comprometendo a autoestima e a qualidade de vida das pacientes. Apesar dos avanços terapêuticos, como quimioterapia, hormonioterapia e terapias-alvo, ainda existem desafios importantes no tratamento, incluindo a heterogeneidade tumoral, resistência adquirida e efeitos colaterais severos. Nesse contexto, modelos *in vitro* desempenham papel essencial na triagem de compostos bioativos, entre eles, se destaca a linhagem celular MCF-7, amplamente utilizada em estudos de câncer de mama.

A investigação do peptídeo Hs02 em modelos de câncer de mama é necessária diante do seu caráter inovador e da falta de estudos que avaliem seu potencial antitumoral. Embora evidências iniciais indiquem que o Hs02 apresente propriedades antimicrobianas e efeitos citotóxicos seletivos em linhagem hematológicas, ainda não existem dados disponíveis sobre seu impacto em tumores sólidos, especialmente em células de câncer de mama. Dessa maneira, sua avaliação em um modelo amplamente utilizado na pesquisa oncológica é essencial para ampliar o entendimento sobre seu espectro biológico e seu potencial como agente terapêutico.

A conjugação do Hs02 com DCCA representa uma estratégia promissora, uma vez que a cumarina apresenta propriedades estruturais e funcionais associadas a efeitos anticancerígenas, como indução de apoptose, modulação do ciclo celular e interferência em vias de estresse oxidativo. Além disso, possui grupos funcionais que favorecem seletividade tumoral, já demonstrada em células MCF-7 e características em sua estrutura que podem potencializar a atividade do peptídeo Hs02 e ampliar suas aplicações experimentais.

Dessa forma, é possível que a associação dos dois compostos produza efeitos distintos, tais como aumento de citotoxicidade com seletividade para as células tumorais ou mesmo introduzir novos mecanismos de ação não observados no peptídeo isolado. Por isso,

a avaliação comparativa entre o Hs02 isolado e o Hs02-DCCA é fundamental para identificar sinergias, compreender mecanismos intracelulares, relevantes e avaliar eventuais efeitos tóxicos ou funcionais da adição dessa cumarina. Uma vez confirmada a ação sobre células de câncer de mama, este estudo pode estabelecer as primeiras evidências desses compostos como candidatos a protótipos terapêuticos. O trabalho contribui não apenas ao caracterizar um peptídeo pouco explorado em tumores sólidos, mas também ao demonstrar que sua conjugação química pode ampliar seu espectro biológico, oferecendo novas possibilidades para o desenvolvimento de moléculas mais seletivas, funcionais e promissoras no contexto da terapia antitumoral.

### 1.7 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos citotóxicos, antiproliferativos e antimigratórios do peptídeo Hs02 e de sua conjugação com o DCCA em células da linhagem MCF-7, com o objetivo de determinar se a modificação estrutural promovida pela conjugação é capaz de potencializar, modificar ou reduzir as respostas celulares desencadeadas pelo peptídeo isolado.

### 1.8 Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade celular das células MCF-7 por meio do ensaio colorimétrico de MTT;
- Avaliar a ocorrência de morte celular, utilizando marcação com iodeto de propídio;
- Medir a taxa de proliferação celular após os tratamentos, utilizando marcação com CFSE;
- Analisar a capacidade de migração celular por meio do ensaio de cicatrização (*Wound Healing*), investigando se os tratamentos interferem na motilidade das células MCF-7;

- Comparar as respostas biológicas obtidas entre o Hs02 isolado e sua forma conjugada com a DCCA, avaliando possíveis diferenças de citotoxicidade, proliferação e migração em diferentes concentrações molares.

## 2. Metodologia

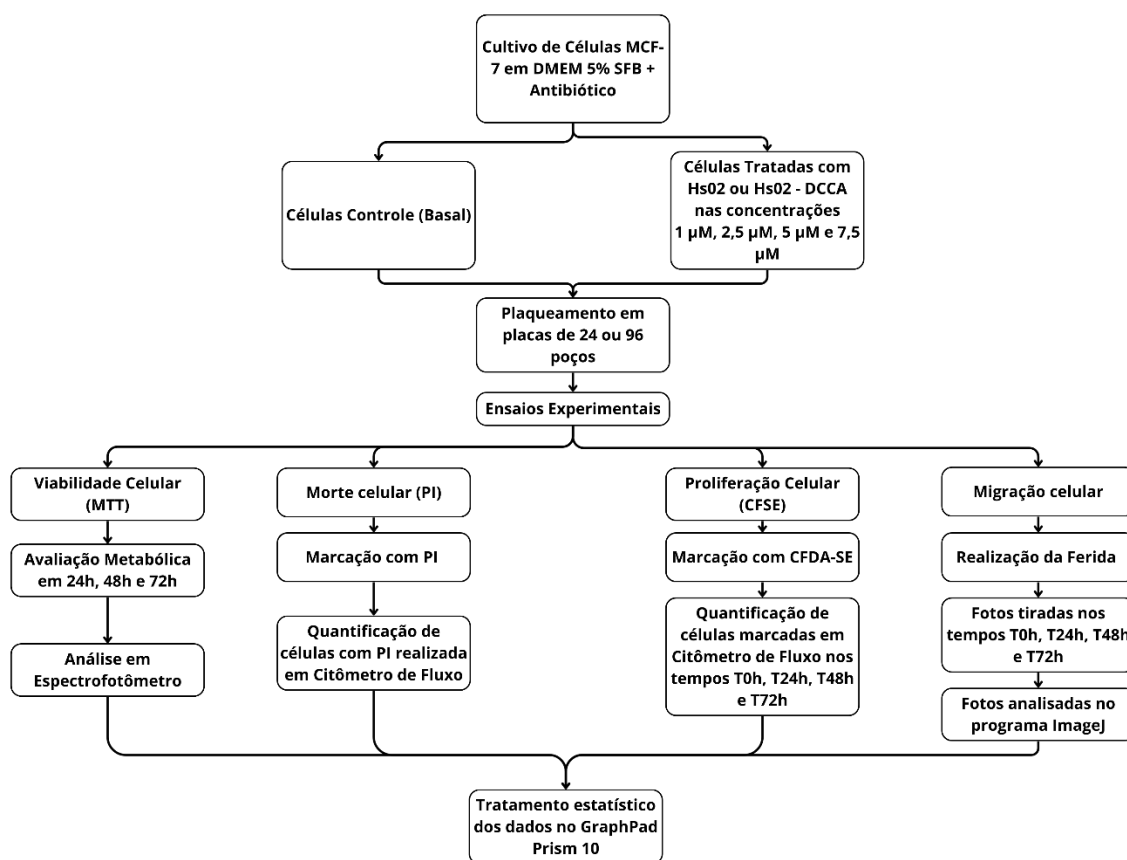


Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental do estudo

### 2.1 Linhagem celular e condições de cultura

A cultura celular foi realizada utilizando células de linhagem MCF-7 (ATCC), doadas pelo professor Dr. Fabio Pittella Silva, do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer – Universidade de Brasília. As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose (DMEM, 12800-017, Gibco, Estados Unidos), enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (estreptomicina-penicilina), pH 7,2. Os frascos foram mantidos em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As subculturas foram preparadas quando a cultura celular atingia 80% de confluência celular (Figura 4, A).

Para preparação das subculturas, o meio DMEM era retirado das garrafas e substituído por 3 de uma solução estéril de salina trifosfato (STF) pH 7,2, para lavagem. Em seguida, as células eram tripsinizadas por 5 minutos com 2 mL de tripsina-EDTA. Logo após, o conteúdo dos frascos era transferido para um tubo falcon e os frascos de cultura foram lavados novamente com STF para coletar todas as células remanescentes. O tubo era vedado e centrifugado à 200g por 8 minutos. Ao final, o sobrenadante era descartado e o *pellet* ressuspensão em meio de cultura novo (Figura 4 B).

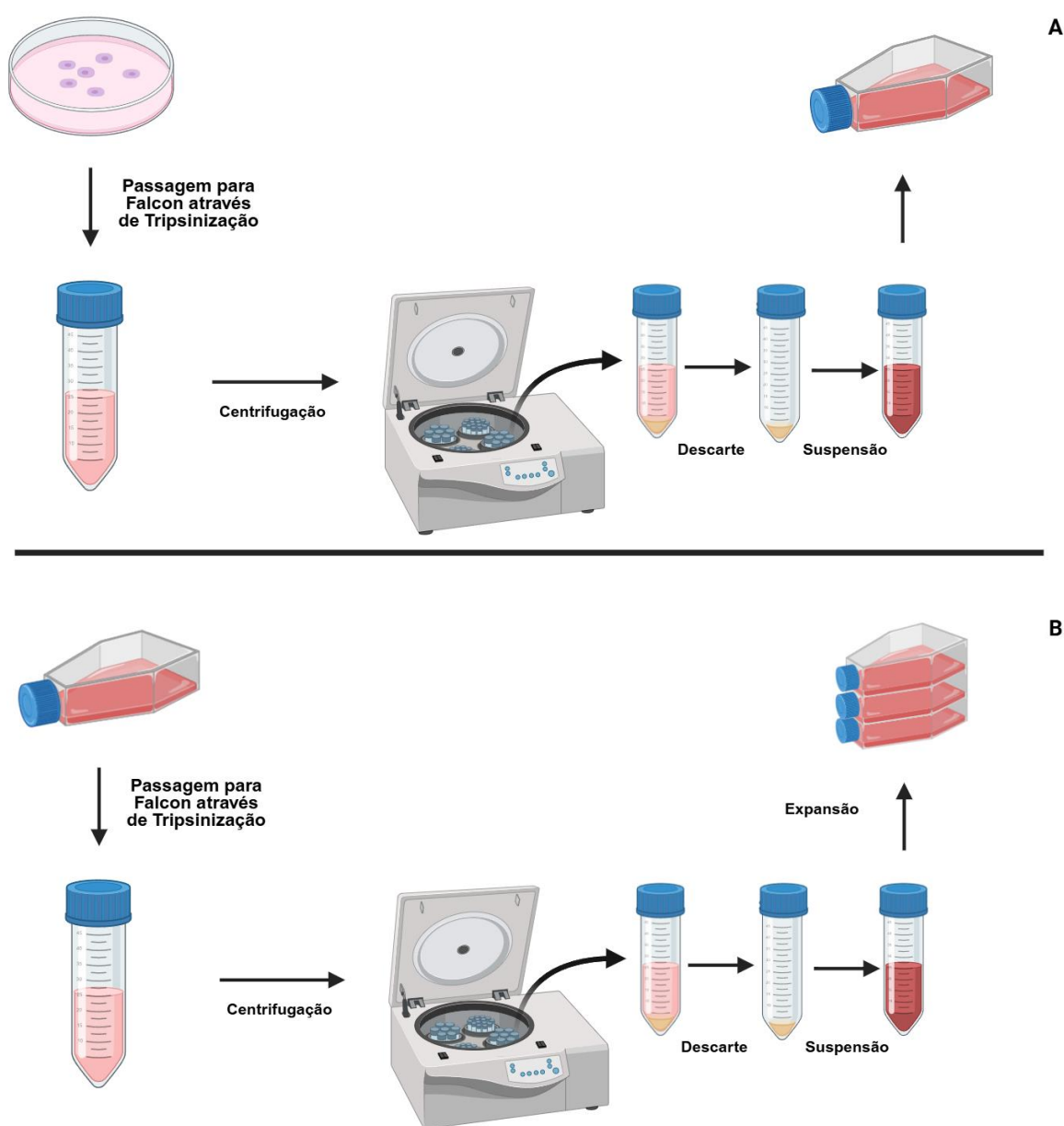


Figura 4: Fluxo de trabalho da cultura celular. Criado com BioRender.com.

## **2.2 Preparação dos Meios de Tratamento e Soluções-Estoque**

Para os testes, foi utilizado o peptídeo Hs02 e sua conjugação com a DCCA (Hs02-DCCA), sendo ambos gentilmente fornecidos pelo Dr. Guilherme Dotto Brand do Laboratório de síntese e análise de biomoléculas, Instituto de Química, Universidade de Brasília.

### **2.2.1 Meios Base Experimentais**

Para os diferentes ensaios, foram preparados quatro meios base distintos a partir de DMEM. O primeiro, denominado Meio de Ensaio 5% (ME-5%), foi composto por DMEM suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico, sendo este meio utilizado como veículo para os tratamentos com peptídeos nos ensaios de MTT, PI e CFSE. O segundo, Meio de Ensaio 10% (ME-10%), foi composto por DMEM com 10% SFB e 1% antibiótico. O terceiro, Meio Migração 10% (MM-10%), continha DMEM com 10% SFB, porém sem antibiótico, foi utilizado para os controles positivos no ensaio de migração. Por fim, o Meio Migração 0% (MM-0%), composto por DMEM sem SFB e sem antibiótico, sendo utilizado para os tratamentos e como controle negativo no ensaio de migração.

### **2.2.2 Compostos de Teste**

Os compostos de teste, Hs02 e Hs02-DCCA, objetos principais deste estudo, foram fornecidos como soluções-estoque nas concentrações de 906  $\mu\text{M}$  e 706  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

A partir destes estoques, foram preparadas as concentrações finais de 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 7,5  $\mu\text{M}$ , sendo que as diluições foram realizadas diretamente nos meios utilizados para cada ensaio. Para os ensaios de viabilidade celular (MTT), morte celular (PI) e

proliferação (CFSE), as soluções dos peptídeos foram preparadas em ME-5%, já para o ensaio de migração celular, foi realizado em MM-0%.

### **2.2.3 Controles Estradiol e Tamoxifeno**

As soluções de controle para os ensaios foram preparadas a partir de suas fontes primárias para criar soluções-estoque. O controle positivo foi preparado a partir de uma solução contendo 1,53 mg de estradiol (Lenzetto – Gedeon Richter, Hungria) sendo diluída com STF para obtenção de uma solução-estoque de 11,234 mM.

Para o controle negativo de proliferação, foram utilizados comprimidos de Citrato de Tamoxifeno 20 mg (Blau, Brasil), sendo macerados e solubilizados em 2 mL de DMSO. A solução foi filtrada 2 vezes em membrana de 0,22 µm, Kasvi, resultando em uma solução-estoque de 17,75 mM.

A partir destas soluções-estoque, as concentrações finais de trabalho foram obtidas por diluição direta nos meios experimentais. As soluções de 10 µM de tamoxifeno e 10 nM de estradiol foram preparadas pela diluição dos seus respectivos estoques no ME-10% para uso no ensaio de CFSE. A solução de 10 nM de estradiol também foi preparada, como controle positivo para migração, em MM-10% para o ensaio de migração. Adicionalmente, o controle positivo de morte celular, para MTT e PI, foi preparado a partir de ME-5%, criando uma solução de 30% de DMSO. Os meios ME-10%, ME-5% e MM-10% puros serviram como controles basais, e o MM-0% como controle negativo de migração.

### **2.3 Preparo das Células para Ensaio de Viabilidade (MTT) e Morte Celular (PI)**

Para os ensaios de viabilidade e morte celular, foram utilizadas placas de 96 poços, sendo plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células por poço em 100 µL de ME-5%. As placas foram mantidas

em incubação a 37°C em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir a adesão celular.

Passado o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 200g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 100 µL dos respectivos tratamentos e controles, preparados conforme descrito no item 2.2, foram adicionados em cada poço. Os grupos experimentais consistiram em Controle Basal (ME-5%), Controle Positivo de Morte (30% DMSO em ME-5%) e os compostos Hs02 e Hs02-DCCA nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 7,5 µM (diluídos em ME-5%).

Então, as placas foram incubadas e avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo os procedimentos de finalização de cada ensaio descritos separadamente nos itens 2.4 (MTT) e 2.5 (PI).

## **2.4 MTT**

A viabilidade celular foi analisada por meio de um ensaio colorimétrico, utilizando o 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo (MTT). Esse método se fundamenta na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, em clivar o anel tetrazólio do MTT (tendo coloração amarela), o reduzindo a cristais de formazan, tendo coloração púrpura, insolúveis em água. Com isso, a quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Inicialmente foi preparada a solução-estoque de MTT (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) na concentração de 5 mg/mL, solubilizada em STF. Esta solução foi filtrada (filtro de seringa PES 0,22 µm, Kasvi) sendo armazenada em frasco âmbar mantido em geladeira a 2°C.

Para este ensaio, após os respectivos períodos de tratamento das placas (24, 48 e 72h), descritos no item 2.3, 10 µL da solução de MTT estéril (5 mg/mL diluído em STF) foi



adicionado em cada poço. As placas foram protegidas da luz com papel alumínio e incubadas em estufa a 37°C por 4 horas.

Ao final deste período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de DMSO em cada poço para a completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram mantidas protegidas da luz por mais 30 minutos em temperatura ambiente (T.A.). Ao final, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 570nm. (Figura 5). Os testes foram realizados em quintuplicata em quatro experimentos independentes e os dados foram apresentados como quantidade percentual de células que reduziram o MTT.

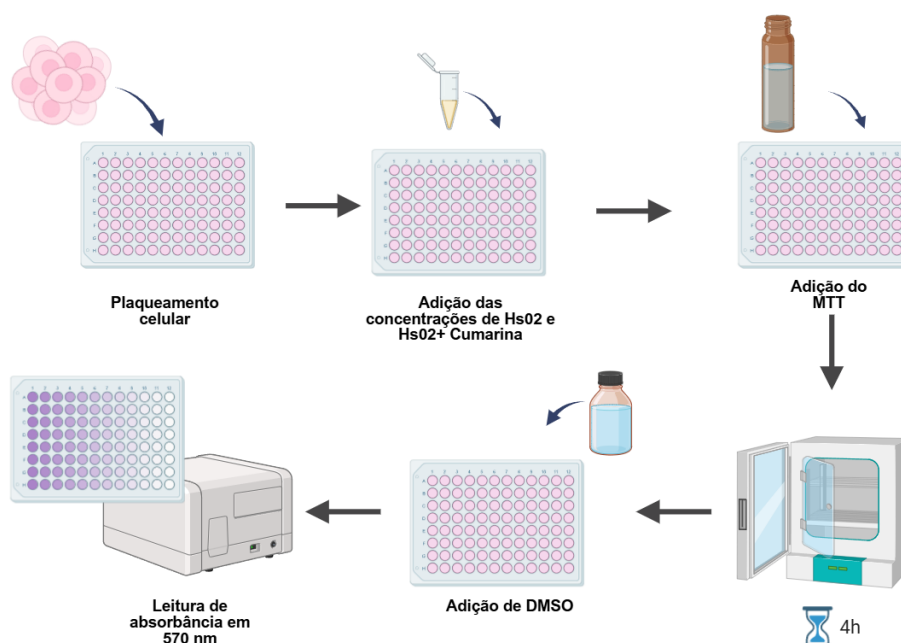


Figura 5: Protocolo simplificado do ensaio de MTT. Criado com BioRender.com.

## 2.5 PI (iodeto de propídio)

Para a avaliação da morte celular foi utilizada a citometria de fluxo com a marcação com Iodeto de Propídio (PI). O PI é um agente intercalante de ácidos nucleicos fluorescente que não permeia membranas celulares intactas, desta forma, ele cora apenas células que

tenham perdido a integridade da membrana plasmática, característica de necrose ou estágios tardios de apoptose, permitindo a distinção entre as células vivas e mortas.

As células foram plaqueadas e tratadas conforme item 2.3. Após os períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas, as placas passaram por centrifugação, em 200g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas duas vezes com STF, pH 7,2, sendo cada lavagem seguida por uma centrifugação a 200g por 5 minutos. Após a última lavagem, o sobrenadante foi retirado e as células de cada poço foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de STF com 0,5  $\mu$ L de PI (Solução-estoque de 1mg/mL, 556463, BD Biosciences, Estados Unidos).

Em seguida, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas em T.A. por 30 minutos. Após isso, 150  $\mu$ L de STF foi adicionado em cada poço e as células foram transferidas para tubos de citometria para a leitura. A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas e os dados foram apresentados como porcentagem (%) de células que incorporaram o PI, denominadas como células mortas.

## **2.6 Ensaio de Proliferação Celular**

A capacidade proliferativa foi monitorada utilizando a sonda CFDA-SE, uma molécula apolar capaz de atravessar livremente a membrana plasmática. No citoplasma, esterases intracelulares clivam seus grupos acetato, convertendo-o em CFSE, um composto altamente fluorescente que se liga covalentemente a aminas de proteínas intracelulares. A cada ciclo de divisão celular a fluorescência é distribuída equitativamente entre as células-filhas, permitindo a quantificação das gerações celulares pela redução da intensidade de fluorescência.

O corante Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster (CFDA-SE, V12883, Invitrogen, Estados Unidos) foi diluído para obtenção de uma solução estoque de 10 mM, utilizando DMSO, que foi armazenada a -20°C. A partir desta, foi preparada uma Solução de Trabalho de CFSE 10 µM, diluindo-se a solução estoque em STF.

### **2.6.1 Marcação com CFDA-SE e Definição do T0**

Para garantir uma marcação homogênea, o procedimento foi realizado em suspensão antes do plaqueamento. As células MCF-7 foram tripsinizadas, contadas e centrifugadas. O *pellet* celular foi ressuspense em solução de CFDA-SE na concentração final de 10 µM, obtendo-se uma suspensão de  $1 \times 10^6$  células/mL. A marcação ocorreu por incubação a 37°C por 30 minutos, protegida da luz, sendo agitada a cada 5 minutos.

Passado o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de meio de cultura completo (ME-10%) sobre a suspensão, seguida de incubação por 30 minutos a 37°C para hidrólise dos ésteres do corante. Após esse período, as células foram centrifugadas em 200g por 5 minutos e lavadas duas vezes com STF, pH 7,2, para remoção do excesso da sonda.

Após a marcação e lavagem, uma alíquota da suspensão celular foi separada e analisada por citometria de fluxo para estabelecer a intensidade de fluorescência máxima inicial da população parental não dividida. Este grupo foi definido como Tempo Zero (t0)

Por fim, as células restantes foram ressuspensas em meio completo e plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço. As placas foram incubadas por 24 horas em 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão e recuperação celular antes dos tratamentos.

### **2.6.2 Aplicação dos Tratamentos**

Após o período de adesão, o meio de cultura foi removido e substituído pelos meios contendo os respectivos tratamentos, marcando o início do tempo experimental. As placas destinadas aos tempos de 24, 48 e 72h receberam os Compostos de Teste (item 2.2.2), o Controle Basal (ME-10%, item 2.2.1), o Controle Positivo (Estradiol, 2.2.3) e o Controle Negativo (Tamoxifeno, item 2.2.3). Então, as placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> pelos períodos determinados. Ao final de cada período de incubação, as placas foram centrifugadas, 200 g por 5 minutos, e os sobrenadantes foram descartados. As células foram lavadas uma vez com STF, pH 7,2 e centrifugadas novamente, tendo o sobrenadante descartado. Após isso, as células foram ressuspensas em 200 uL com Tampão de Citometria (STF pH 7,2 com 2% de Albumina Sérica Bovina e 0,5 mM de EDTA), para manter o pH estável e proteger as células estáveis durante a citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os dados foram adquiridos por citometria de fluxo e os resultados foram apresentados como porcentagem (%) de células que proliferaram.

### **2.6.3 Coleta e Análise por Citometria de Fluxo**

Nos experimentos de PI e proliferação, as amostras foram transferidas para tubos de citometria e a aquisição de dados foi realizada no citômetro de fluxo Fortessa LSR II (BD Biosciences, EUA), utilizando o programa DIVA versão (BD Biosciences, EUA). No citômetro inicialmente foram analisados 10.000 eventos dentro do gate do gráfico “dot plot” de FSC/SSC setado em log.. Os ajustes dos canais FSC, SSC e das sondas fluorescentes (PI ou CSFE) foram realizados com amostras de células sem marcação e utilizando um *threshold* de 1.000 no canal de FSC.

A excitação das sondas fluorescentes (PI ou CSFE) foi realizada com o laser azul de 488 nm. A configuração e calibragem do citômetro para o PI utilizou um espelho de

passagem longa de 600 nm e um espelho de passagem de banda de 610/20 nm. Já para o CFSE foi utilizado 505 e 530/30, respectivamente. Para cada fluorocromo foi produzido um histograma para ajuste da fluorescência.

Os arquivos do programa Diva foram tratados no programa FlowJo™ versão 10 (BD Biosciences, EUA). Os resultados de PI e CFSE foram apresentados em porcentagens de células que apresentaram a inclusão das sondas.

## **2.7 Avaliação da atividade migratória por meio do teste *scratch assay***

Para avaliar os efeitos do Hs02 e sua conjugação com a DCCA (item 2.2.2) sobre a migração das células MCF-7, foi realizado o método de “ensaio de ferida” (*scratch assay*). As células foram semeadas em placas de 24 poços, em uma confluência de  $2 \times 10^5$  células/poço, sendo utilizado o meio ME-5% (item 2.2.1) no plaqueamento, então as placas foram incubadas em estufa a 37° com 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 90% de confluência celular.

Após obtenção da confluência necessária foi utilizada uma única ponteira estéril de 200 µL para realizar um risco em linha reta na região central de cada poço. Imediatamente, após a realização da ferida, o sobrenadante foi desprezado e os poços foram lavados com STF, pH 7,2, para remoção das células soltas. Em seguida, o STF foi removido e os meios de tratamento foram adicionados. Sendo que os seguintes grupos foram incluídos neste estudo: Controle Negativo (MM-0%, item 2.2.1), Controle Basal (MM-10%, item 2.2.1), Controle Positivo (Estradiol 10 nM em MM-10%, item 2.2.3) e os Compostos de Teste, Hs02 e Hs02-DCCA, diluídos em MM-0%.

A migração foi monitorada por microscopia, sendo que as imagens foram capturadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas (Figura 6). A aquisição foi realizada em um microscópio invertido Eclipse Ti2 (Nikon, Japão), utilizando o programa de aquisição NIS-Elements (Nikon, Japão).

A quantificação da migração foi realizada no programa ImageJ (Wayne Rasband, Estados Unidos). Para a avaliação da área da ferida, foi utilizado o aumento óptico de 5 vezes e a área da ferida foi mensurada utilizando o *plugin Wound Healing Tool* (Arnedo, GitHub, Espanha). Este procedimento foi utilizado em todos os poços. O fechamento das áreas foi analisado tomando como base a área inicial (T0). Os dados foram expressos como porcentagem da área aberta remanescente, permitindo avaliar tanto o fechamento quanto um eventual aumento da área da ferida ao longo dos dias.

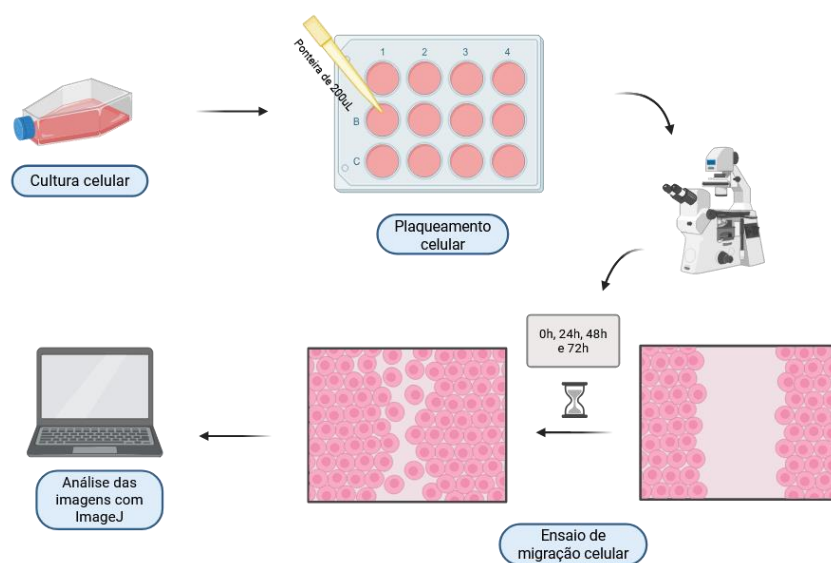


Figura 6: Protocolo simplificado do ensaio de migração celular. Criado com BioRender.com.

## 2.8 Análise estatística

Os dados resultantes foram inicialmente avaliados em relação a sua normalidade de distribuição utilizando o teste Kolmogorov e Shapiro-Wilk. Para avaliar a homogeneidade de variâncias foram utilizados os testes Brown-Forsythe test Bartlett's test. A análise estatística utilizou, para 3 ou mais grupos com dados não pareados e com distribuição normal, o teste de ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe de múltiplas comparações

para dados com variância diferente ou o teste de Fisher LSD para a variância homogênea. Já o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para 3 ou mais grupos de dados não pareados e distribuição não gaussiana, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Foi considerado com estatístico quando o valor de “p” era igual ou menor que 0,05. Os dados foram apresentados nos gráficos como mediana, quartis e valores superior e inferior quando os ensaios tinham mais de três replicatas e em média e desvio padrão corrigido nos gráficos com 3 replicatas. O programa Graphpad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA; 2005) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

### 3. Resultados

#### 3.1 Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT

Em 24 horas, a exposição das células ao Hs02 isolado, na concentração de 2,5  $\mu$ M (mediana = 68,24) ocasionou em uma queda significativa na viabilidade se comparando ao basal (mediana = 90,24) (Kruskal–Wallis;  $p < 0,0001$ ), entretanto o mesmo efeito não ocorreu nas concentrações de 1, 5 e 7,5  $\mu$ M (medianas = 75,37, 79,04 e 82,10, respectivamente) (Figura 7). Em relação ao Hs02-DCCA, em comparação com o basal, houve uma significativa queda de 25,51% na viabilidade na concentração de 1  $\mu$ M (mediana = 67,22) ( $p < 0,0001$ ), e de 15,80% na concentração de 2,5  $\mu$ M (mediana = 75,98) (Kruskal–Wallis;  $p < 0,01$ ). Entretanto não houve diferenças significativas nas concentrações superiores. Também, houve diferença entre a concentração conjugada em 7,5  $\mu$ M (mediana = 114,1) com as concentrações de 1  $\mu$ M (mediana = 75,37) e 2,5  $\mu$ M (mediana = 68,24) do Hs02 isolado, que apresentou um aumento na viabilidade de 51,38 e 67,20 % (Kruskal–Wallis;  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). (Figura 7)



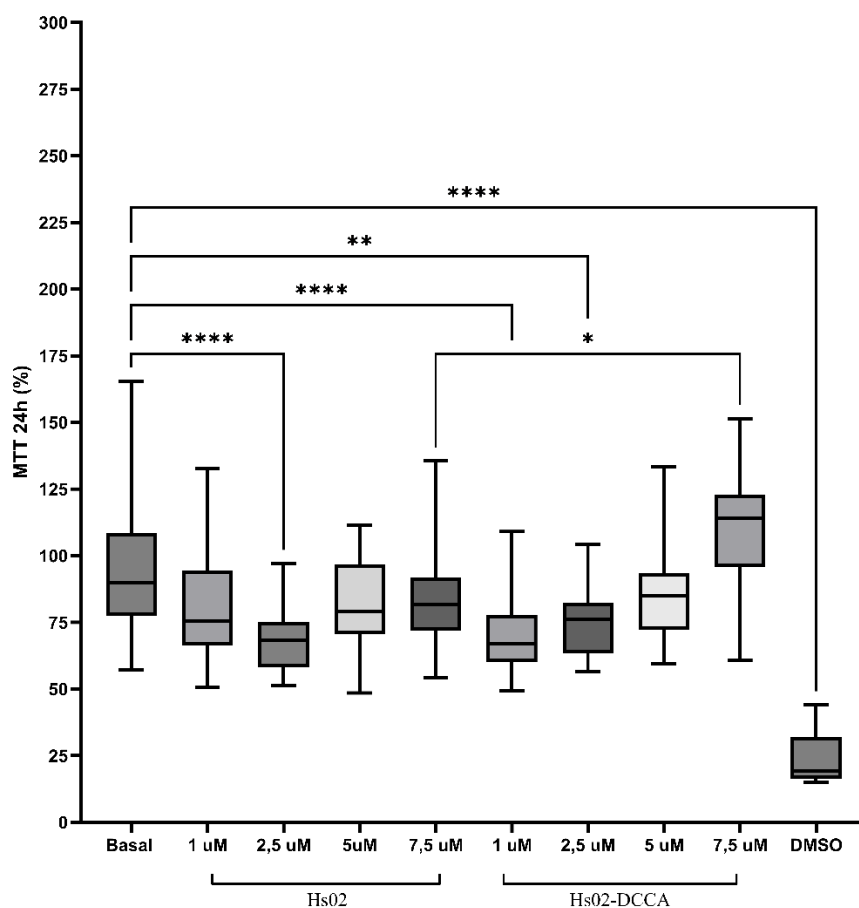


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA. Análise da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de MTT após 24 horas de incubação. (Kruskal–Wallis;  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).

Nas 48 horas foi possível ver um aumento de 48% na viabilidade na concentração de 7,5  $\mu$ M do Hs02-DCCA (mediana = 138,4), em comparação ao Basal (mediana = 93,49) (Kruskal–Wallis;  $p < 0,0001$ ). Entretanto todas as outras concentrações, tanto isoladas quanto conjugadas não tiveram diferenças significativas ao basal (Figura 8).

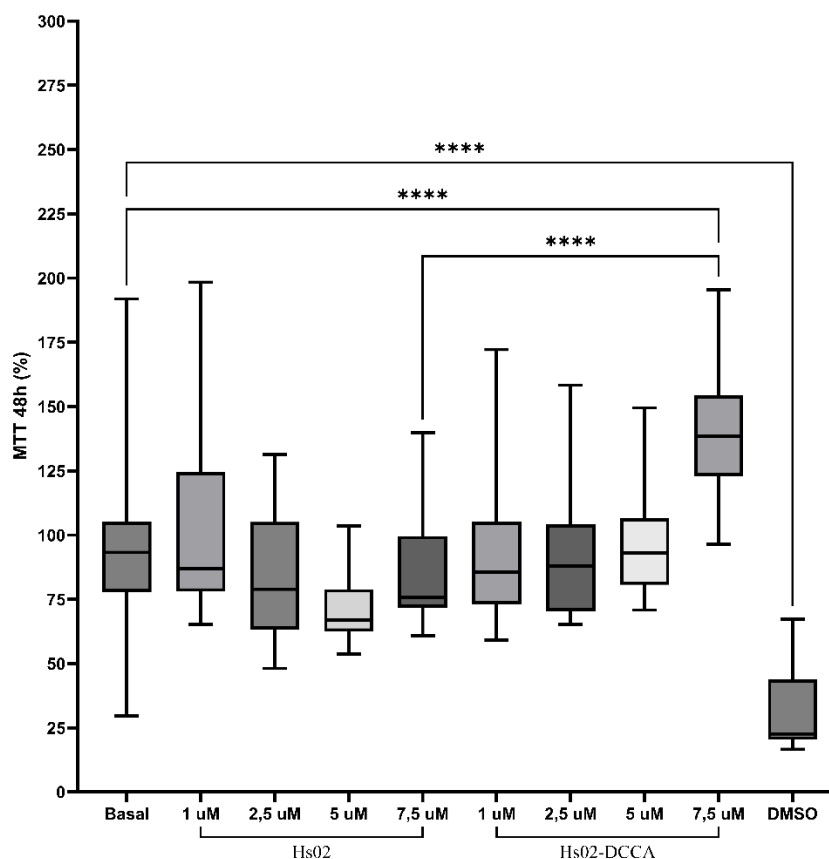


Figura 8. Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 48 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA. Análise da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação. (Kruskal–Wallis; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Em 72 horas, houve uma diferença significativa entre o basal (mediana = 98,14) e o Hs02-DCCA 7,5  $\mu\text{M}$  (mediana = 138,4), de tal forma que o último aumentou em 41,02% a viabilidade (Kruskal–Wallis;  $p < 0,001$ ). Por outro lado, foi possível ver uma diferença significativa entre o Hs02 isolado na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  (mediana = 86,68) em comparação com o Hs02-DCCA nas concentrações de 5 (mediana = 135,9) e 7,5  $\mu\text{M}$  (mediana 138,9) (Figura 9).

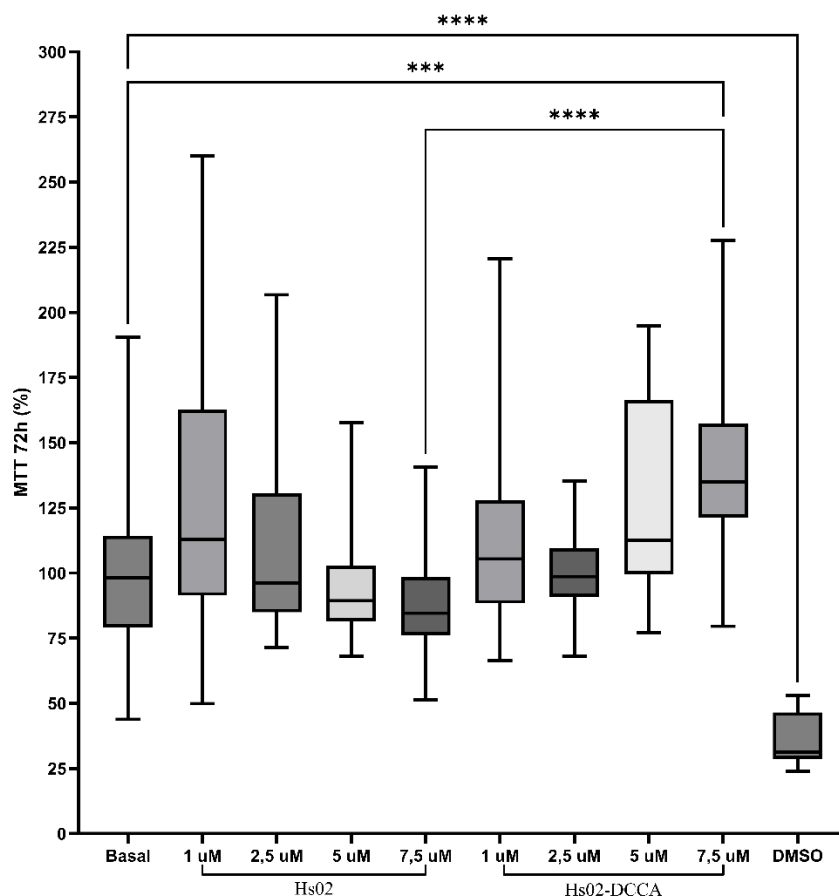


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 72 horas de tratamento com Hs02 e Hs02-DCCA. Análise da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de MTT após 72 horas de incubação. (Kruskal–Wallis; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.2 Análise da morte celular com Iodeto de Propídeo

Ao avaliar se os peptídeos são capazes de promover a morte celular, observou-se que em 24 horas houve um aumento de 36,95 e 197,8% na quantidade de células mortas na presença do Hs02-DCCA em 1 (mediana = 1,26) e 2,5  $\mu\text{M}$  (mediana = 2,74), respectivamente, se comparado ao basal (mediana = 0,92), entretanto não houveram diferenças significativas em todas as outras situações (Kruskal–Wallis  $p < 0,05$ ) (Figura 10). Em 48 horas, não foi notado diferenças significativas em nenhuma das situações. Já após 72 horas, houve uma diferença significativa entre o Hs02 1  $\mu\text{M}$  e o Hs02-DCCA na

concentração 7,5  $\mu\text{M}$  (medianas = 6,46 e 2,69, respectivamente), sendo possível ver que o conjugado reduziu 2,4 vezes a quantidade de células mortas ou em vias de morte avançada (Kruskal–Wallis;  $p < 0,05$ ) (Figura 12).

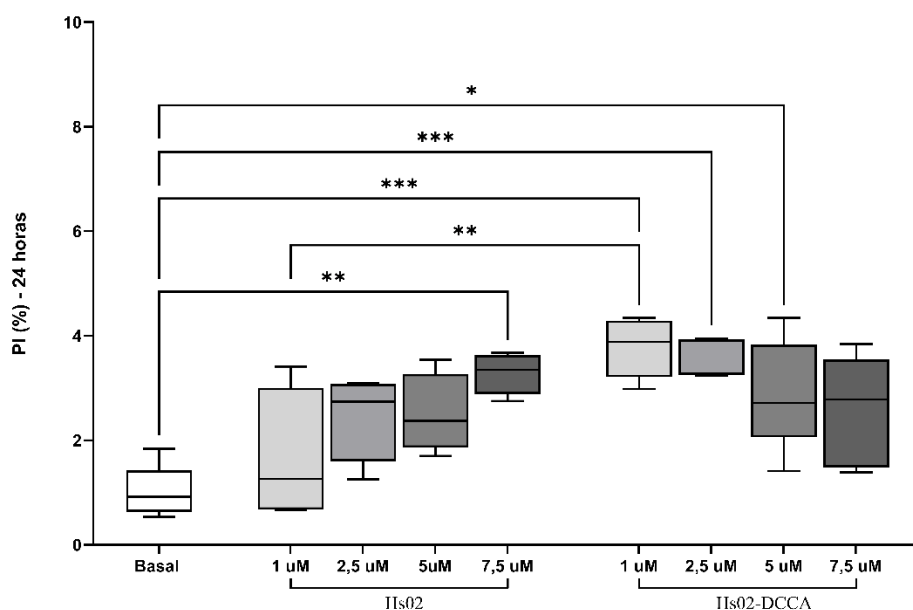


Figura 10. Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 24 horas. Porcentagem de células positivas para PI analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de exposição. (Kruskal–Wallis; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

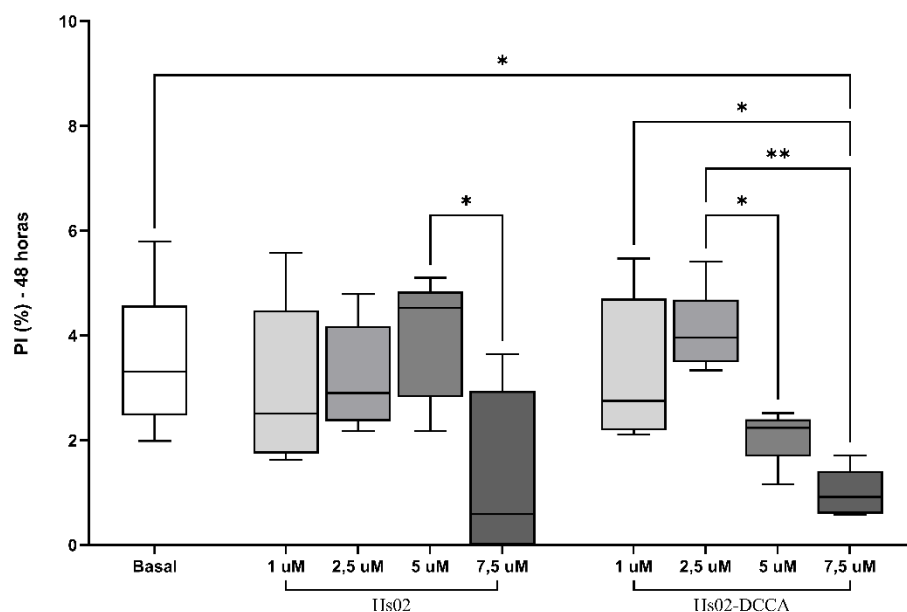


Figura 11. Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 48 horas. Porcentagem de células positivas para PI analisadas por citometria de fluxo após 48 horas de exposição. (Kruskal–Wallis; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

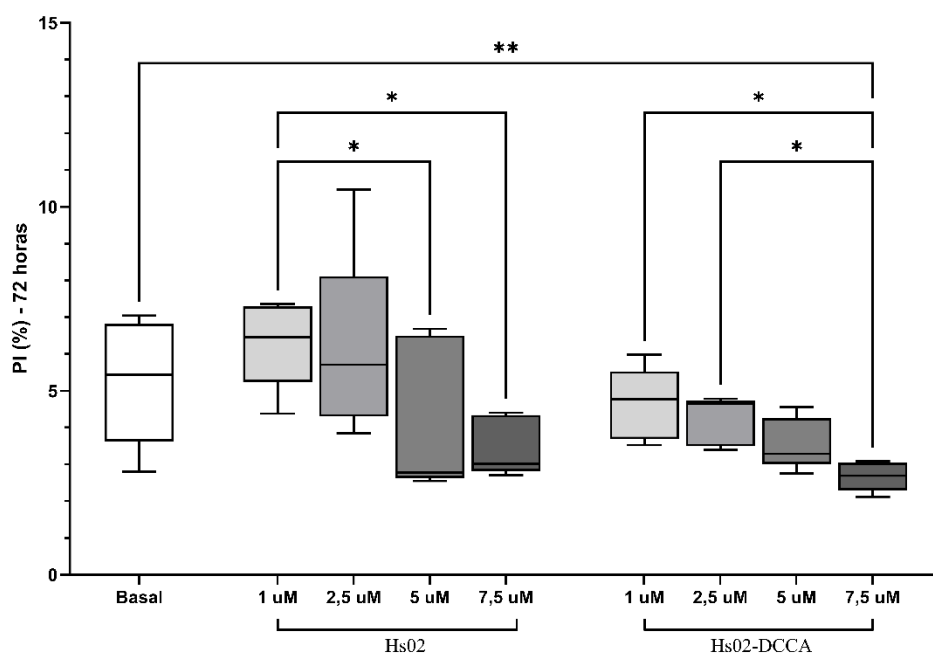


Figura 12. Avaliação da morte celular em células MCF-7 tratadas com Hs02 e HS02-DCCA em 72 horas. Porcentagem de células positivas para PI analisadas por citometria de fluxo após 72 horas de exposição. (Kruskal–Wallis; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.3 A inibição na quantidade de células proliferativas pelos peptídeos ocorre após 48 horas em uma concentração de tratamento mais baixa.

Os resultados da proliferação celular indicaram que somente a concentração 2,5  $\mu\text{M}$  do Hs02 (mediana = 56) e do seu derivado conjugado à cumarina (mediana = 71) reduziu a quantidade de células proliferativas em relação a quantidade basal de proliferação (mediana = 92,2). Essa redução de 39,26% promovida pela Hs02 e de 22,99% pela Hs02-DCCA foi observada somente após 48 horas (ANOVA;  $p < 0,05$ ) Não houve diferenças significativas em nenhuma das outras situações, embora se observe valores menores na quantidade de células em proliferação após os tratamentos de 48 horas (Figura 13, B)

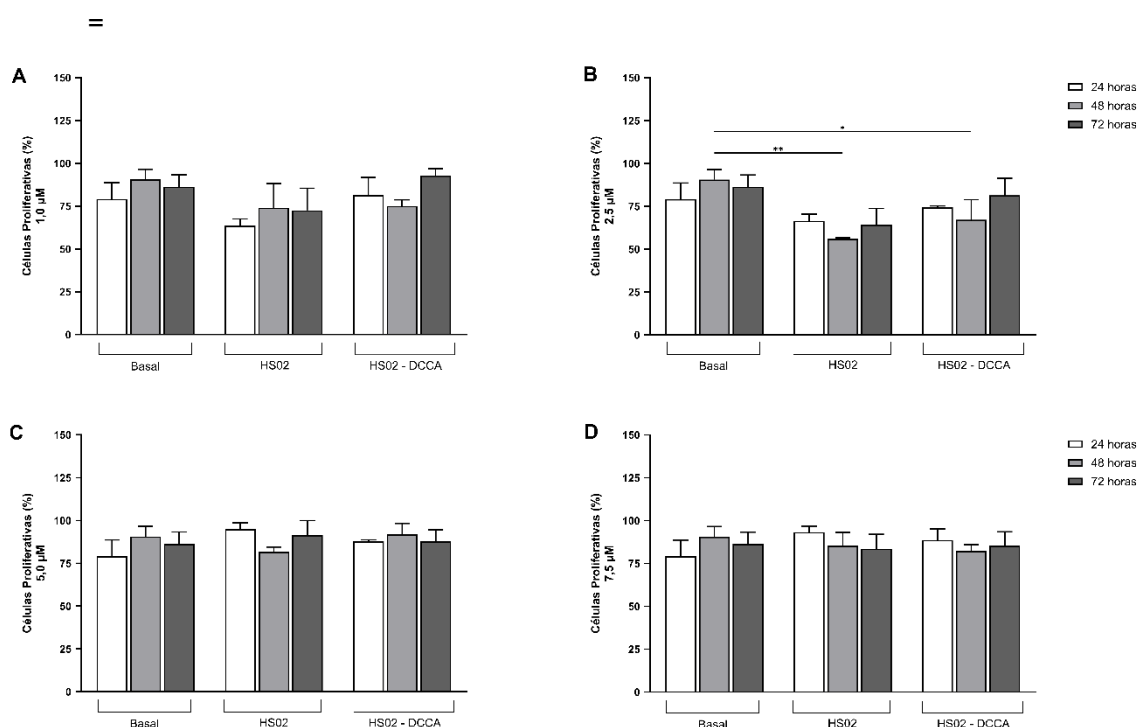


Figura 13. Efeito antiproliferativo do peptídeo Hs02 e da conjugação Hs02-DCCA na linhagem MCF-7, avaliado pelo ensaio CFSE. Porcentagem de células proliferativas quantificadas por citometria de fluxo após marcação com CFSE. Os painéis representam as diferentes concentrações testadas: (A) 1  $\mu\text{M}$ , (B) 2,5  $\mu\text{M}$ , (C) 5  $\mu\text{M}$  e (D) 7,5  $\mu\text{M}$ . As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. (ANOVA; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

### **3.4 As maiores concentrações de Hs02 e DCCA inibem a migração celular de MCF-7, promovendo abertura da ferida e reduzindo o fechamento ao longo do tempo**

Em 72h, o Hs02 2,5  $\mu$ M (mediana = -19,70) apresentou a maior porcentagem de abertura da ferida entre todos os tratamentos, atingindo aproximadamente 20% de abertura em 24h e progredindo para 25% em 72h (Figura 15), tendo diferença de 166,19% e 167,9% em relação ao CP (mediana = 29,76) e basal (mediana = 29,01) (ANOVA; \*\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). O tratamento com Hs02-DCCA 2,5  $\mu$ M (mediana = -20,23) também promoveu abertura da ferida, porém em menor quantidade, tendo 1,5% de aumento em 24h e progredindo para 10% com 72h, sendo significativamente diferente do Hs02 2,5  $\mu$ M (ANOVA; \* $p < 0,05$ ) (Figura 15).

Na concentração de 5  $\mu$ M, o Hs02 (mediana = 1,352) isolado resultou em abertura de 1,5 % em 24h e 2% em 72h (Figura 14), com diferenças significativas em relação a CP (mediana = 29,76), basal (mediana = 29,01) e Hs02 2,5  $\mu$ M (mediana = -19,7) (Figura 15). Já o Hs02-DCCA 5  $\mu$ M (mediana = - 11,19) apresentou abertura de aproximadamente 6% em 24h e 14% em 72h (Figura 14), sendo significativamente diferente do CP (mediana = 29,76), basal (mediana = 13,43), CN (mediana = 10,65) e Hs02 1  $\mu$ M (mediana = 13,43) (Figura 15).

Para 7,5  $\mu$ M, o Hs02 (mediana = -4,229) promoveu abertura de 3% em 24h aumentando para 8% em 72h, com diferenças significativas em relação ao CP (mediana = 29,76), basal (mediana = 29,01) e ao Hs02 1  $\mu$ M (mediana = 13,43) (Figura 15). O Hs02-DCCA 7,5  $\mu$ M apresentou abertura de 2% em 24h progredindo para 15% em 72h, mostrando diferenças significativas em relação ao CP (mediana = 29,76), basal (29,01), CN (mediana = 10,65) e Hs02 1  $\mu$ M (mediana = 13,43). Também, não houve diferença significativa entre Hs02 7,5  $\mu$ M e Hs02-DCCA 7,5  $\mu$ M ( $p > 0,05$ ) (Figura 15).

A análise das imagens representativas mostra que, independentemente do composto, o aumento progressivo nas concentrações reduziu a área celular ocupada nas bordas da ferida, especialmente na presença do Hs02-DCCA (Figura 16). Além disso, se observou desprendimento celular e formação de aglomerados nas maiores concentrações.

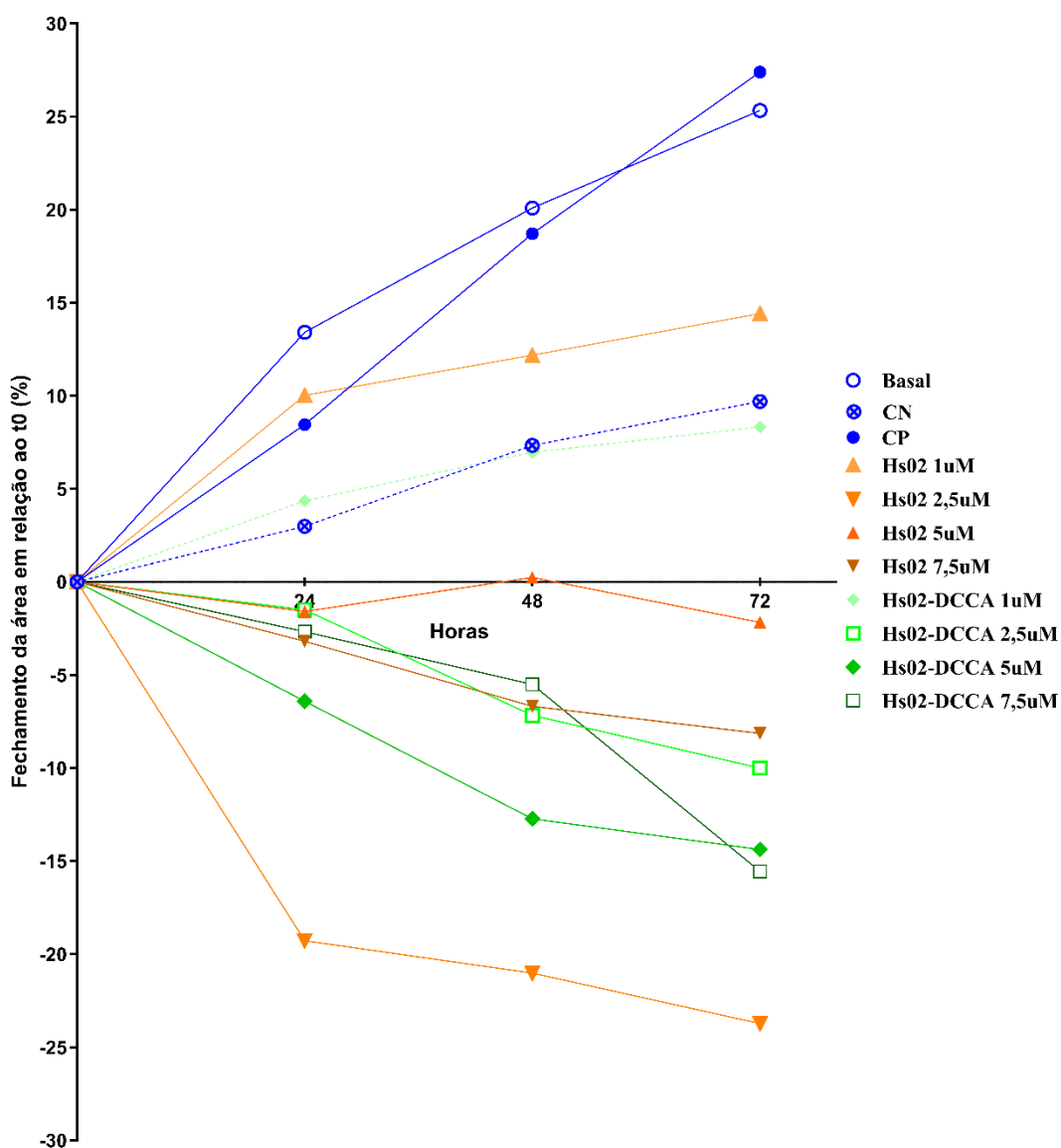


Figura 14. Variação percentual da área da ferida ao longo de 72 horas no ensaio de migração celular (*wound healing*) utilizando células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações dos compostos Hs02 e Hs02-DCCA. Os valores representam a variação da área relativa ao tempo 0h, medida nas etapas de 24h, 48h e 72h.



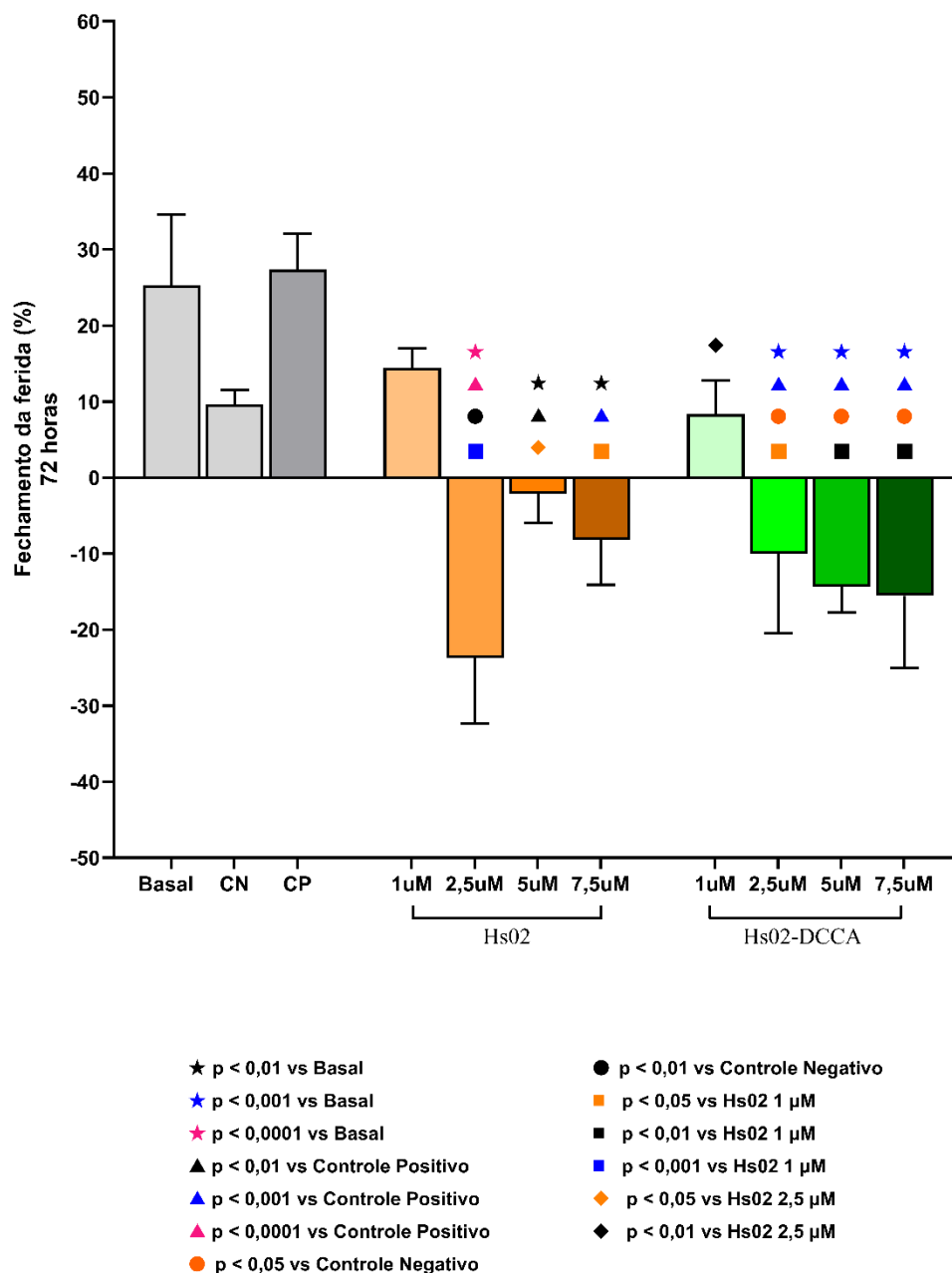


Figura 15: Fechamento da ferida (%) após 72 horas no ensaio de migração celular (wound healing) com células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações dos compostos Hs02 e Hs02-DCCA. Os valores representam a porcentagem de redução da área da ferida em relação ao tempo inicial (0h). Os símbolos indicam comparações estatisticamente significativas obtidas por ANOVA de uma via seguida de teste pós-hoc de Tukey.

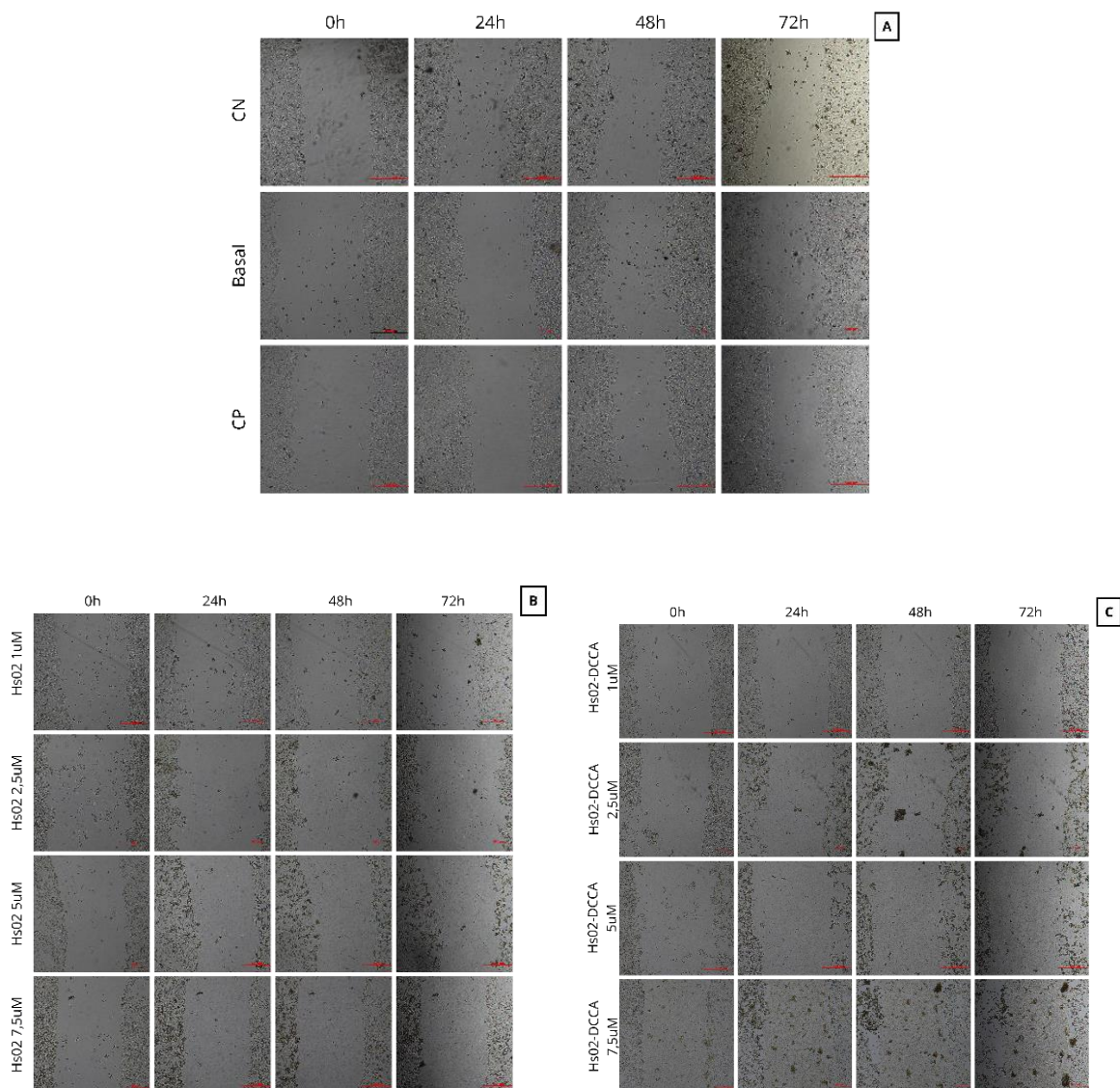


Figura 16: **Imagens representativas do ensaio de migração celular (*wound healing*) realizado com células MCF-7 ao longo de 72 horas.** (A) Controles utilizados no experimento: controle negativo (CN), basal e controle positivo (CP), registrados nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. (B) Tratamento com o composto Hs02 nas concentrações de 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 7,5  $\mu$ M. (C) Tratamento com o Hs02-DCCA nas concentrações de 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 7,5  $\mu$ M. As imagens ilustram a progressão do fechamento da ferida ao longo do tempo, permitindo observar o comportamento migratório das células sob cada condição experimental.

## 4. Discussão

Este trabalho foi o primeiro estudo que avaliou os efeitos do peptídeo Hs02 e de sua conjugação com a cumarina DCCA em células de câncer de mama MCF-7. Pelos resultados, pode-se observar que o Hs02 na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  teve a maior eficácia na inibição da migração e viabilidade, indicando uma curva dose-resposta não monotônica. É curioso que estes dados se mostraram diferentes do estudo de Mota et al. (2024), que descreveram o potencial antineoplásico do Hs02 em linhagens de leucemia. No estudo de Mota, o Hs02 demonstrou toxicidade em diversas linhagens leucêmicas (HL-60, K562, NB4, MEC1 e Jurkat), mas com um perfil de resposta dose-dependente, com valores de concentração inibitória média (IC50) entre 5,16  $\mu\text{M}$  e 13,94  $\mu\text{M}$ , concentrações superiores as que indicamos como ideal para MCF-7 (2,5  $\mu\text{M}$ ), o que indica que essa célula possa ter uma expressão maior do alvo molecular do Hs02 ou também estar ligado a estrutura da célula, visto que os leucócitos são diferentes das células de mama.

É interessante que as MCF-7, no período de 24 horas, com o Hs02 2,5  $\mu\text{M}$  tiveram uma perda significativa da viabilidade, algo que não ocorreu nas concentrações de 1, 5 e 7,5  $\mu\text{M}$ . Entretanto, essa perda da viabilidade não ocorreu em 48 e 72 horas, indicando uma possível perda da atividade do peptídeo nesse período. Realizando um paralelo com Mota et al. (2024), os autores relataram que na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , o Hs02 chegou a aumentar a viabilidade nas linhagens MEC-1 e HL-60 e conforme a dose aumentava a viabilidade diminuía progressivamente. Esse dado se diferencia do presente estudo, pois, as células MCF-7 durante o tratamento com Hs02 seguiram um comportamento não monotônico. Outro ponto que chama atenção para a relevância dos efeitos do Hs02 na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , é que comparativamente ao estudo de Costa et al. (2024), onde eles avaliaram a atividade de outros PAIs, como Hs15 e Hs20, no caso das células MCF-7, os peptídeos mais

potentes, apresentaram um IC<sub>50</sub> de aproximadamente 21  $\mu$ M, números muito maiores que os apresentados com a Hs02. O que indica que os mecanismos dos outros PAIs não são os mesmos da Hs02, com ela tendo uma maior seletividade a estrutura da MCF-7.

Em relação ao impacto dos peptídeos na mortalidade das células MCF-7, observou-se um comportamento distinto do esperado na análise com PI. Apenas o Hs02, na concentração de 7,5  $\mu$ M, promoveu um aumento significativo no número de células positivas para incorporação do PI após 24 horas, indicando que o efeito do peptídeo, associado à ruptura da membrana, ocorre em doses mais elevadas para essas células. Esse achado está de acordo com o mecanismo lítico de formação de poros proposto por Mota et al. (2024), que observaram morte celular em linhagens HL-60 a partir de 5,16  $\mu$ M, sugerindo que, embora o mecanismo seja semelhante, as células MCF-7 requerem concentrações maiores para indução desse efeito.

Por outro lado, na concentração de 2,5  $\mu$ M, onde houve perda de viabilidade das MCF7, não foi constatada ruptura de membrana significativa, mas houve uma redução na proliferação celular em 48 horas. Estes dados sugerem uma mudança do mecanismo de ação, sendo dose-dependente, em que em 7,5  $\mu$ M o peptídeo induz morte celular, enquanto em 2,5  $\mu$ M, o efeito parece ser predominantemente citostático. Mota et al. (2024) sugerem que o Hs02 foi capaz de causar parada do ciclo celular na fase G1 ao inibir a transcrição de cinases dependentes de ciclina 2 (CDK2) em células HL-60, sendo possível sugerir que um mecanismo semelhante possa ter ocorrido nas células MCF-7 na dose 2,5  $\mu$ M.

Embora os testes anteriores sugiram uma reação bifásica ou uma perda na atividade do Hs02 com o passar dos dias, o teste de migração celular mostrou resultados interessantes. Na dose de 1  $\mu$ M, o Hs02 não mostrou interferência na quimiotaxia celular; por outro lado, durante o tratamento com o Hs02 2,5  $\mu$ M ocorreu um aumento progressivo da área da ferida

ao longo do tempo, sendo maior que o efeito nas doses maiores. Esse comportamento, no qual concentrações intermediárias demonstram maior eficácia que doses mais elevadas, é característico de uma curva de dose-resposta não monotônica. Foi descrito por Zapadka et al. (2017) que em peptídeos sintéticos bioativos, esse padrão não monotônico, costuma estar associado à formação de agregados supramoleculares, onde a medida que a concentração aumenta, as moléculas tendem a se organizar em estruturas como dímeros ou oligômeros, o que reduz a quantidade de peptídeo livre disponível para interagir com receptores de membrana ou alvos intracelulares, comprometendo sua atividade funcional.

É preciso ressaltar que houve uma diferença metodológica entre os ensaios deste estudo, o que pode explicar a manutenção da atividade do Hs02 ao longo das 72 horas no ensaio de migração, em contraste com a perda de atividade observada no ensaio de viabilidade. O ensaio de migração celular foi realizado com a ausência de SFB nos meios que continham Hs02 e Hs02-DCCA, para evitar uma possível interferência da proliferação celular. No estudo de Tang et al. (2021), foi demonstrado que a albumina presente no SFB é capaz de formar um complexo covalente com a  $\alpha 1$ -antitripsina sendo capaz de inibir a atividade de peptídeos antimicrobianos anfipáticos (AMPs). Segundo Tang et al. (2021), essa inibição ocorre com o complexo albumina/ $\alpha 1$ -antitripsina sendo capaz de sequestrar o peptídeo, impedindo sua ação em membranas alvo. Esse sequestro seria decorrente de que peptídeos anfipáticos. Considerando que o Hs02 tem uma região hidrofóbica em sua estrutura, é possível que a albumina, que tem bolsões hidrofóbicos em sua estrutura, se ligue ao peptídeo realizando esse sequestro. Portanto, a ausência de SFB no ensaio de migração, permitiu que o Hs02 exercesse sua atividade biológica de forma contínua, diferentemente dos ensaios de viabilidade onde o peptídeo foi provavelmente neutralizado ao longo do tempo.

Por outro lado, a conjugação Hs02-DCCA resultou em um perfil farmacodinâmico distinto e complexo, tendo uma relação inversa entre dose e toxicidade em concentrações elevadas.

Diferente do Hs02, o Hs02-DCCA foi capaz de induzir morte celular nas concentrações de 1, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , indicando que a presença da cumarina tem efeito aditivo ao Hs02 no que diz respeito à morte celular. No entanto, esse dano a membrana não resultou em redução da viabilidade metabólica, sugerindo que a permeabilização da membrana nessas doses é subletal ou que as mitocôndrias permaneceram funcionais mesmo após o comprometimento da integridade da membrana plasmática, fenômeno de dissociação metabólica frequentemente observado em estágios iniciais de morte celular não-apoptótica (Glover et al., 2024).

Por outro lado, na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$ , o Hs02-DCCA teve um comportamento único, e diferente do que observado nas outras concentrações, além de não promover a morte celular, o tratamento ainda aumentou a viabilidade. Conforme elucidado por Draoui et al. (2013), a porção DCCA do conjugado atua como inibidora dos transportadores de monocarboxilato (MCT). Estes transportadores são responsáveis pelo fluxo transmembranar de lactato acoplado a prótons, essenciais para a regulação do pH e homeostase energética e sua inibição em condições de cultura com alta disponibilidade de glicose, pode forçar as células a redirecionarem o metabolismo para a fosforilação oxidativa mitocondrial como mecanismo de compensação. Essa hiperativação mitocondrial resulta em uma taxa de conversão do sal MTT superior a das células controle, gerando o sinal elevado de viabilidade observado. Sendo essa a sugestão para o que aconteceu na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  do Hs02-DCCA, que teve um grande aumento na viabilidade.

O ensaio de migração celular mostrou um comportamento claramente dose-dependente com Hs02-DCCA, onde a abertura da ferida se intensificou progressivamente nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{M}$ . Realizando um destaque para a dose de 7,5  $\mu\text{M}$ , que mesmo promovendo um aumento na viabilidade e nenhuma alteração significativa na morte celular, foi capaz de aumentar a ferida, levando as células a desaderirem. Comprovando que, nesta concentração, o conjugado atua especificamente na adesão celular. Mecanicamente, este efeito pode ser inicialmente atribuído à inibição dos transportadores de monocarboxilato (MCTs). Conforme caracterizado por Draoui et al. (2013), o bloqueio destes transportadores pela porção DCCA impede o efluxo de lactato e prótons, gerando uma acidose intracelular que compromete a estabilidade das junções celulares.

A possível justificativa para a desaderência, é informada por Chen et al. (2022) que demonstraram que cumarinas bioativas podem inibir a migração de células de câncer de mama ao suprimir a sinalização mediada por integrinas (subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ ) e pela quinase de adesão focal (FAK). As integrinas são essenciais para o estabelecimento da adesão célula–matriz, enquanto a FAK é crucial para a estabilização e sinalização dessas adesões. A inibição desse eixo compromete a formação e a manutenção dos complexos de adesão, reduzindo a capacidade de fixação celular e levando a desaderência celular observada neste estudo.

Em conjunto, os resultados demonstraram que o Hs02 e o Hs02-DCCA possuem comportamentos farmacológicos distintos, onde o Hs02 exibiu um perfil CDRNM sensível ao SFB, enquanto o Hs02-DCCA demonstrou efeitos mais complexos envolvendo tanto permeabilização de membrana quanto alteração metabólica e de adesão celular. Esses achados reforçam que pequenas modificações químicas podem alterar drasticamente o mecanismo de ação e o destino celular de peptídeos bioativos.

## 5. Conclusão

O presente estudo investigou, pela primeira vez, a atividade biológica do peptídeo Hs02 e de sua conjugação com a cumarina DCCA em células de câncer de mama MCF-7, permitindo compreender como pequenas modificações estruturais podem alterar profundamente o comportamento farmacológico de peptídeos bioativos. Em conjunto, os resultados demonstraram que o Hs02 apresentou um perfil de resposta não monotônica, com maior eficácia na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , onde promoveu redução aguda da viabilidade e inibição robusta da migração celular. A comparação com estudos prévios, especialmente Mota et al. (2024), evidenciou que a atividade do Hs02 é altamente dependente do tipo celular e do microambiente experimental, uma vez que concentrações eficazes em MCF-7 foram substancialmente menores do que aquelas reportadas em linhagens leucêmicas. Além disso, a perda da eficiência observada ao longo de 48 e 72 horas, reforça que peptídeos anfipáticos, com o Hs02, são suscetíveis ao sequestro por proteínas séricas, como a albumina, comprometendo sua estabilidade e ação prolongada.

Por outro lado, o ensaio de migração, realizado na ausência de SFB, revelou que o Hs02 manteve sua atividade quando não esteve sujeito a neutralização por proteínas séricas, confirmando a relevância do microambiente para sua performance biológica. Esse achado destaca que a ação do Hs02 envolveu tanto mecanismos citotóxicos quanto citostáticos, modulados pela concentração e pela disponibilidade do peptídeo no meio.

Por outro lado, a conjugação Hs02-DCCA, gerou um composto com comportamento farmacodinâmico diferenciado. Em concentrações intermediárias, promoveu permeabilização de membrana sem reduzir a viabilidade metabólica, sugerindo dissociação entre dano de membrana e função mitocondrial. Na dose de 7,5  $\mu\text{M}$ , observou-se aumento da viabilidade acompanhado de perda de aderência celular, um padrão compatível com a



inibição dos MCTs pela DCCA, levando a redirecionamento metabólico e hiperatividade mitocondrial. O efeito antimigratório e pró-desaderência nessa condição demonstra que a conjugação não apenas modificou o mecanismo de ação, mas também redefiniu o destino funcional do peptídeo

Assim, os resultados revelaram que o Hs02 e o Hs02-DCCA apresentam mecanismos distintos e não intercambiáveis. Enquanto o Hs02 demonstra atividade dependente do equilíbrio entre citotoxicidade e citostase, modulada pela interação com proteínas séricas, o Hs02-DCCA exibe propriedades relacionadas a modulação metabólica e da adesão celular, características atribuídas a cumarina. Esses achados reforçam a importância de considerar o microambiente e as propriedades físico-químicas na modulação da atividade de peptídeos terapêuticos.

Em conclusão, este estudo contribui para o entendimento dos efeitos de peptídeos anfipáticos e de como modificações químicas podem alterar seus mecanismos de ação no contexto do câncer de mama. Os resultados indicam que o Hs02 é um candidato promissor a agente antitumoral em concentrações específicas, especialmente pela sua capacidade de reduzir a viabilidade celular e inibir a migração das células MCF-7. Já a conjugação Hs02-DCCA expandiu o espectro funcional do peptídeo, conferindo efeitos adicionais relacionados a modulação da adesão celular e ao redirecionamento metabólico, além de alterar de forma significativa a sua farmacodinâmica.

Para avançar no desenvolvimento desses compostos, futuros estudos devem investigar detalhadamente as vias moleculares moduladas por cada forma do peptídeo, incluindo mecanismos de citostase, permeabilização de membrana, reorganização do citoesqueleto e inibição dos transportadores de lactato. Além disso, será fundamental avaliar

a estabilidade estrutural do peptídeo e do conjugado em diferentes microambientes, sua biodisponibilidade, toxicidade e eficácia em modelos 3D.

Outro ponto essencial para estudos futuros é a realização de ensaios funcionais na ausência de SFB. Neste trabalho, os testes de MTT, PI e CFSE foram executados na presença de SFB, o que pode ter levado ao sequestro e neutralização parcial do Hs02 pelas proteínas séricas, reduzindo a sua atividade ao longo do tempo. Assim, comparar diretamente ensaios com e sem SFB permitirá determinar com mais precisão o real potencial citotóxico, citostático e antimigratório tanto do Hs02 quanto do Hs02-DCCA. Podendo esclarecer o mecanismo de ação destes compostos e seguir o seu avanço como potenciais agentes terapêuticos.

## Referências

BAUSO, Luana Vittoria *et al.* Biological Activity of Natural and Synthetic Peptides as Anticancer Agents. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 13, 1 jul. 2024.

BRAND, Guilherme D. *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220656, 1 ago. 2019.

BRAY, Freddie *et al.* The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029–3030, 15 ago. 2021.

CHEN, Yue qiang *et al.* Osthole inhibits the migration and invasion of highly metastatic breast cancer cells by suppressing ITG $\alpha$ 3/ITG $\beta$ 5 signaling. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 6, p. 1544–1555, 1 jun. 2022.

COSTA, Igor S. D. *et al.* Occurrence and evolutionary conservation analysis of  $\alpha$ -helical cationic amphiphilic segments in the human proteome. **FEBS Journal**, v. 291, n. 3, p. 547–565, 1 fev. 2024.

DRAOUI, Nihed *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7107–7117, 15 nov. 2013.

GABER, Ahmed *et al.* Synthesis and characterization of some new coumarin derivatives as probable breast anticancer mcf-7 drugs. **Crystals**, v. 11, n. 5, p. 565, 1 maio 2021.

GHADIRI, Nooshin *et al.* Bioactive peptides: an alternative therapeutic approach for cancer management. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1310443, 24 jan. 2024.

GLOVER, Hannah L. *et al.* Mitochondria and cell death. **Nature Cell Biology** 2024 **26:9**, v. 26, n. 9, p. 1434–1446, 20 jun. 2024.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?** Disponível em:  
<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 6 nov. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Câncer de mama: vamos falar sobre isso?** 10ª edição ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Câncer de mama: versão para profissionais de saúde.** Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer/tipos/mama/versao-para-profissionais-de-saude>>. Acesso em: 16 nov. 2025a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Conceito e Magnitude — Instituto Nacional de Câncer - INCA.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>>. Acesso em: 16 nov. 2025b.

ISRAELS, E. D.; ISRAELS, L. G. The Cell Cycle. **The Oncologist**, v. 5, n. 6, p. 510–513, 1 dez. 2000.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. *et al.* Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 1 nov. 2020.

LAMMERS, S. W. M. *et al.* The prognostic and predictive value of the luminal-like subtype in hormone receptor-positive breast cancer: an analysis of the DATA trial. **ESMO Open**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2025.

LOPES, Cristiano Borges *et al.* IMPACTO PSICOLÓGICO E SOCIAL DO CÂNCER DE MAMA: ALÉM DA DIMENSÃO FÍSICA. **ATUALIZAÇÕES EM PROMOÇÃO DA SAÚDE**, p. 206–213, 2024.

MANDAPATI, Aditya; LUKONG, Kiven Erique. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 7, p. 3701–3719, 1 jul. 2023.

MOTA, Isabella de Souza *et al.* Intragenic antimicrobial peptide Hs02 toxicity against leukemia cell lines is associated with increased expression of select pyroptotic components. **Toxicology in Vitro**, v. 101, 1 dez. 2024.

MUKHERJEE, Siddhartha. **The emperor of all maladies : a biography of cancer**. [S.l.]: Scribner, 2011.

NOROUZI, Peiman; MIRMOHAMMADI, Maryam; HOUSHDAR TEHRANI, Mohammad Hassan. Anticancer peptides mechanisms, simple and complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, 1 dez. 2022.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo *et al.* Subtypes of Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 31–42, 6 ago. 2022.

PIZZORNO, Joseph E.; MURRAY, Michael T.; JOINER-BEY, Herb. Cancer: Integrated naturopathic support. **The Clinician's Handbook of Natural Medicine**, p. 158–179, 2016.

SILVA ZANETTI BMSC, Juliana *et al.* CÂNCER DE MAMA: DE PERFIS MOLECULARES A CÉLULAS TRONCO doi: <http://dx.doi.org/10.5892/RUVRV.91.277292>. **Revista Vale**, v. 9, n. 1, p. 277–292, 2011.

SINGH, Sajal Raj *et al.* Exploring the Genetic Orchestra of Cancer: The Interplay Between Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. **Cancers 2025, Vol. 17, Page 1082**, v. 17, n. 7, p. 1082, 24 mar. 2025.

TAKLA, Fiby N. *et al.* Developing multitarget coumarin based anti-breast cancer agents: synthesis and molecular modeling study. **Scientific Reports 2023 13:1**, v. 13, n. 1, p. 13370-, 17 ago. 2023.

TANG, Wen Hung; WANG, Chiu Feng; LIAO, You Di. Fetal bovine serum albumin inhibits antimicrobial peptide activity and binds drug only in complex with  $\alpha$ 1-antitrypsin. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

VADEVOO, Sri Murugan Poongkavithai *et al.* Peptides as multifunctional players in cancer therapy. **Experimental & Molecular Medicine** 2023 **55:6**, v. 55, n. 6, p. 1099–1109, 1 jun. 2023.

WANG, Jiani; XU, Binghe. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2019 **4:1**, v. 4, n. 1, p. 34-, 13 set. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>>. Acesso em: 5 nov. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em: 9 nov. 2025.

ZAPADKA, Karolina L. *et al.* Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. **Interface Focus**, v. 7, n. 6, p. 20170030, 6 dez. 2017.



ZHANG, Han *et al.* Unraveling the Guardian: p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12928, 1 dez. 2024.

ZHANG, Hui *et al.* Crystal structure and photoluminescence of 7-(N,N'-diethylamino)-coumarin-3-carboxylic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 4, p. 1136–1139, 1 abr. 2008.

ZHANG, Xiaoli; POWELL, Kimerly; LI, Lang. Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond. **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3765, 1 dez. 2020.

ZHAO, Deyi *et al.* Antimicrobial peptide Hs02 with rapid bactericidal, anti-biofilm, and anti-inflammatory activity against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 13, n. 1, 7 jan. 2025.