SARAH FERNANDES TEIXEIRA

**Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina,
como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-
transferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

São Paulo

2016

SARAH FERNANDES TEIXEIRA

Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientador: Dr. Adilson Kleber Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Teixeira, Sarah Fernandes.

Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP: fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células / Sarah Fernandes Teixeira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Emer Suavinho Ferro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Oncologia.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor against non-small cell lung cancer..

1. Neoplasias 2. Pulmão 3. Antineoplásicos 4. Imunobiologia I. Ferro, Emer Suavinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0102/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sarah Fernandes Teixeira.

Título da Dissertação: Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP: fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células.

Orientador(a): Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolaminacidiltransferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células*", registrada sob nº 73, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 05/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) **Adilson Kleber Ferreira** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Sarah Fernandes Teixeira, Ricardo Alexandre de Azevedo*. Esta licença de uso de animais expira em 05/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor, against non-small cell lung cancer*", registered as **Number 73**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/5/2015.

Under this license, **Adilson Kleber Ferreira** (Principal Investigator) and team members *Sarah Fernandes Teixeira, Ricardo Alexandre de Azevedo* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/05/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 13 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto do Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo através do projeto financiado pela FAPESP sob o número de processo de 13/07273-2.

A aqueles que acreditaram em mim quando até mesmo eu duvidei e revigoraram minhas forças em todos os momentos: Deus, meus pais, meus amigos, meus irmãos e minha tia Dida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por nunca me abandonar, sempre me concedendo a força e a coragem necessárias para que eu não me apavorasse nem desanimasse.

Aos meus pais, Geraldo e Alveni, e aos meus irmãos, Sérgio e Saulo, por serem os meus exemplos e auxiliarem na formação do meu caráter. Obrigada por sempre me apoiarem e por perdoarem minhas ausências.

À minha tia Dida e aos meus padrinhos, Conceição e Laudelino (*in memoriam*), por nunca duvidarem do meu potencial.

Aos meus amigos (Taynã, Brunella, Felipe, Luciana, Samyra, Thaynnara, Jefferson, Aline e Rosania), pelo incentivo e a cumplicidade que fazem cada segundo valer a pena.

Ao Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, pela orientação e, principalmente, pela confiança ao apostar no meu trabalho e sempre me ajudar com muita paciência e boa vontade.

Ao Dr. Adilson Kleber Ferreira, pela orientação, ensinamentos, incentivo, confiança e por sempre me apoiar, fazendo o possível para o melhor desenvolvimento do meu trabalho e da minha carreira.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto por tão gentilmente me acolher em seu laboratório e compartilhar sua vivência científica.

Ao Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo por ter me ajudado em todos os momentos, sempre com uma calma celestial, e os muitos conselhos científicos e de vida.

Ao Dr. Salomão Dória Jorge por me ensinar as bases dos estudos *in silico*, pelos os almoços bem-humorados e os auxílios nos experimentos.

À equipe que realizou os estudos *in silico* e a síntese do CHY-1: Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Dra. Liliana Marzorati e o Dr. Marcio Henrique Zaim.

Às queridas Celinha e Claudinha, pelo cuidado, dedicação e carinho com que me ajudaram, tão prontamente, em todos os momentos.

À Dra. Débora Levy e ao Dr. Jorge Luis Maria, pelos conselhos científicos e pela gentil disponibilização dos equipamentos de seu laboratório.

Ao Dr. Carlos Rogério Figueiredo, por seu auxílio atencioso em diversos experimentos e também pelos importantes ensinamentos acadêmicos e de vida.

Aos colegas de bancada do Laboratório de Imunologia de Tumores, em especial a Ariane, a Aline, o Thiago, a Mariana, o Cícero, a Thais, a Carol, a Karen, a Maria, a Patrícia e a Cecília, por toda ajuda, paciência, ensinamentos e companheirismo.

À atenciosa correção das normas da dissertação pela equipe da secretaria do ICB.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa (processo FAPESP nº 2014/24455-0) e o financiamento (processo FAPESP nº 2013/07273-2) deste trabalho.

A todos que ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho. Obrigada!

“And in the end

The love you take is equal to

The love you make.”

(The Beatles, 1969)

RESUMO

TEIXEIRA, S. F. **Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células.** 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O câncer de pulmão é um dos mais incidentes e letais no Brasil e no mundo, por conseguinte, a busca de novos fármacos a fim de controlá-lo é necessária. Atualmente o desenvolvimento de fármacos conta com abordagens computacionais que otimizam este processo. Dado que a fosfatidiletanolamina (PE) desempenha importantes papéis fisiológicos e apresenta-se aumentada em tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC), fica claro que a PE e suas vias de produção são interessantes novos alvos. Dentre as enzimas envolvidas na síntese de PE, a CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) é frequentemente superexpressa em células neoplásicas, inclusive nas células de pulmão, e é um alvo ainda pouco explorado. Sendo assim, no presente trabalho, foi avaliado o potencial terapêutico do CHY-1, um análogo da miltefosina desenvolvido como inibidor da enzima Pcyt2, e os mecanismos inerentes à sua atividade antitumoral em modelo de CPNPC. Desde os testes iniciais, o CHY-1 apresentou citotoxicidade superior ao seu protótipo, a miltefosina, e, além disso, as células malignas apresentaram-se mais sensíveis ao CHY-1 do que as células não-tumorigênicas. Ademais, quando comparado a outro inibidor da enzima Pcyt2, a meclizina, o CHY-1 também foi superior quanto à atividade citotóxica. Nas células A549 e NCI-H460, a indução de apoptose pelo CHY-1 foi um mecanismo secundário de citotoxicidade, porém, foram evidenciadas alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático das células tratadas, bem como o estabelecimento de um ambiente com acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Nas células LL/2, por sua vez, CHY-1 induziu apoptose com alterações funcionais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático. O CHY-1 ainda é capaz de induzir o aumento da externalização de calreticulina nas células A549 e LL/2, um indicativo de que o CHY-1 gera um dos sinais que pode induzir estas células à morte imunogênica. Em conclusão, o presente trabalho evidencia o potencial do CHY-1 como um inibidor da enzima Pcyt2 e candidato a fármaco com atividade preferencial para CPNPC. Além disso, o CHY-1 é capaz de levar as células A549 e LL/2 à morte imunogênica.

Palavras-chave: Carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC). CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2). Morte imunogênica. Citotoxicidade.

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. F. **Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor against non-small cell lung cancer.** 2016. 75 p. Master thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Lung cancer is one of the most incident and lethal cancers in Brazil and all over the world, thus, the pursuit for new drugs to control this disease is necessary. Nowadays, new drugs development has computational tools that improves this process. Once that phosphatidylethanolamine (PE) plays several important physiological roles and it is overexpressed in tumor tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, it is clear that PE and its production pathways are interesting new targets. Among the enzymes of PE production pathway, CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2) is usually overexpressed in tumor cells, included in lung cancer cells, and it remains as an underexplored target. Therefore, this study aimed to evaluate antitumor effects of CHY-1, a miltefosine analogue developed as an inhibitor of Pcyt2 enzyme, and to investigate the mechanisms related to its antitumor action against NSCLC. Initially, CHY-1 had already shown to be more cytotoxicity than its prototype, miltefosine, and malignant cells were more sensitive to CHY-1 effects than non-tumorigenic cells. Furthermore, when compared with another inhibitor of Pcyt2 enzyme, meclizine, CHY-1 had also higher cytotoxic activity. In A549 and NCI-H460 cells, CHY-1 triggers apoptosis as a secondary mechanism of cytotoxicity, although, treated cells have clearly morphological and functional changes on mitochondria and on endoplasmic reticulum, as well as the establishment of an environment of reactive oxygen species accumulation. On the other hand, in LL/2 cells, CHY-1 induced apoptosis with mithocondral and endoplasmatic reticulum changes. CHY-1 also increased calreticulin externalization in A549 and LL/2 cells, an indication that this compound generates signals that may induce immunogenic cell death. In conclusion, this work presents CHY-1 as an inhibitor of Pcyt2 enzyme and new drug candidate with preferential activity on NSCLC cells. Moreover, CHY-1 triggers immunogenic cell death in A549 and LL/2 cells.

Keywords: Non-small cell lung cancer (NSCLC). CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). Immunogenic cell death. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes: a via de Kennedy. A via de Kennedy apresenta duas rotas distintas para a produção de, respectivamente, PE e a fosfatidilcolina.	22
Figura 2 - Esquema dos processos envolvidos na morte imunogênica.....	25
Figura 3 - Curvas dose-resposta do CHY-1, a meclizina (MEC) e a miltefosina (MLT) nas três principais linhagens de CNPCPs utilizadas.	38
Figura 4 - O CHY-1 induz alterações morfológicas preferencialmente nas células de CNPCPs.	41
Figura 5 - O CHY-1 inibe a proliferação celular de células de CNPCPs.....	42
Figura 6 - O CHY-1 e a miltefosina (MLT) induzem modificações na morfologia celular indicativas de morte celular nas células de linhagens de CNPCPs humanas em cultura 3D com matriz.	44
Figura 7 - O CHY-1 induz citotoxicidade em células NCI-H1299 e NCI-H460 em cultura 3D com matriz com a mesma eficiência da cultura 2D.	44
Figura 8 - Os efeitos apoptóticos do CHY-1, da miltefosina (MLT) e da meclizina (MEC) em células A549.....	47
Figura 9 - Os efeitos apoptóticos do CHY-1, da miltefosina (MLT) e da meclizina (MEC) em células NCI-H460.....	48
Figura 10 - O CHY-1 induz apoptose nas células murinas LL/2.....	49
Figura 11 - O efeito de CHY-1 sobre o $\Delta\psi_m$ das células de CNPCPs.....	51
Figura 12 - O CHY-1 aumenta a produção de ânion superóxido das células A549.	52
Figura 13 - O CHY-1 e a MEC elevam a produção de ânion superóxido das células NCI-H460.	53
Figura 14 - Nenhum dos tratamentos em estudo alterou a produção de ânion superóxido das células de LL/2.....	54
Figura 15 - O CHY-1 induz danos mitocondriais e do retículo endoplasmático nas células de CNPCPs humanos.	56
Figura 16 - O CHY-1 induz estresse do retículo endoplasmático nas células A549 e LL/2.	57

Figura 17 - O efeito precoce de CHY-1 não está relacionado à liberação de cálcio dos estoques do retículo endoplasmático em nenhuma das células avaliadas. 58

Figura 18 - O CHY-1 induz a exposição extracelular de calreticulina, um importante marcador de morte imunogênica, em células A549 e LL/2..... 59

Figura 19 - O CHY-1 induz redução da expressão de HMGB1, outro marcador de morte imunogênica, em células A549. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inibição da viabilidade celular por CHY-1 e a miltefosina nas diferentes linhagens celulares.....36

Tabela 2 - Inibição da viabilidade celular por CHY-1, miltefosina, meclizina, mitoxantrona e paclitaxel nas linhagens celulares de CPNPC principais do estudo.....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D Bidimensional

3D Tridimensional

°C Graus Celsius

µg Micrograma

µL Microlitro

µM Micromolar

Δψ_m Potencial de membrana mitocondrial

AKT Proteína quinase B

ATP Trifosfato de adenosina

BSA Albumina sérica bovina

Ca²⁺ Cálcio

CCCP Carbonilcianeto m-Clorofenil-Hidrazona

CPNPC Carcinoma de Pulmão de Não-Pequenas Células

CRT Calreticulina

CRTR Receptor de calreticulina

CTL Resposta linfocítica T citotóxica

CTP Citinina 5' trifosfato

DCs Células dendríticas

DHE Dihidroetídeo

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

ERO Espécies reativas de oxigênio

ERK Quinase regulada por sinal extracelular

g Aceleração de gravidade(9,8m/s²)

h Hora

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HCl Ácido clorídrico

HCA *Hierarchical Cluster Analysis*

HMGB1 Proteína B1 do grupo de alta mobilidade

IAPs Proteínas inibidoras de apoptose

IC₅₀ Concentração inibitória de 50% da proliferação celular

kDa Kilodaltons

M Molar

MAPK Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEC Meclizina

MET Microscopia eletrônica de transmissão

mg Miligrama

MHC Major Histocompatibility Complex

mL Mililitro

MLT Miltefosina

mM Milimolar

MTT Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MTX Mitoxantrona

NaCl Cloreto de sódio

nM Nanometros

OsO₄ Tetróxido de ósmio

P2RX7 Receptores purinérgico P2X7

PBS Tampão fosfato-salino

PCA *Principal Components Analysis*

Pcyt2 CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase

PE Fosfatidiletanolamina

pH Potencial hidrogeniônico

PI Iodeto de Propídeo

PI3K Enzima fosfatidilinositol-3-quinase

PKC Proteína quinase C

PRR Receptores tipo *pattern recognition*

PTX Paclitaxel

PVDF Fluoreto de polivinilideno

RPMI-1640 *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

SDS Dodecil sulfato de sódio

TCRs Receptores de células T

TH1 Resposta imunogênica T *helper* 1

TLR4 Receptores do tipo *Toll-like* 4

TMRE Ester etílico tetrametilrodamina

TTBS Tampão de Tris-salino com *Tween-20*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Enunciando o problema	19
1.2	O câncer de pulmão	19
1.3	Biossíntese dos fosfolípidios	20
1.4	Morte imunogênica.....	24
1.5	Desenvolvimento do CHY-1 como novo candidato a fármaco	26
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Cultivo celular.....	29
3.2	Avaliação da citotoxicidade em cultura 2D	29
3.3	Avaliação da proliferação celular	30
3.4	Avaliação da citotoxicidade em cultura 3D.....	30
3.5	Análise da apoptose através do ensaio de anexina V/PI	31
3.6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$)	31
3.7	Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio	32
3.8	Análise da expressão de calreticulina na superfície celular	33
3.9	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão	33
3.10	Western blotting	34
3.11	Avaliação do estresse do retículo endoplasmático	35
3.12	Análise da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático	35
3.13	Análise estatística dos resultados.....	35
4	RESULTADOS	36
4.1	O CHY-1 é citotóxico para células de CPNPC	36
4.2	O CHY-1 inibe a proliferação celular das células de CPNPC.....	42
4.3	O CHY-1 é igualmente ativo em modelo 3D de cultura de células.....	43
4.4	O CHY-1 induz apoptose em células de CNPCPs	45
4.5	CHY-1 altera o $\Delta\psi m$ das células NCI-H460 e LL/2.....	49
4.6	O acúmulo de EROs nas células tratadas com CHY-1	51
4.7	As alterações morfológicas das organelas induzidos por CHY-1	54
4.8	Alterações do retículo endoplasmático induzidas por CHY-1.....	57
4.9	A indução da exposição de calreticulina por CHY-1	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÕES.....	67

REFERÊNCIAS*	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enunciando o problema

O câncer de pulmão está entre os tipos de tumores malignos de maior incidência no mundo e apresenta uma alta taxa de mortalidade (FERLAY et al., 2013; SIEGEL et al., 2014). No Brasil, o câncer de pulmão foi estimado como o quarto mais incidente, acometendo 27.330 indivíduos em 2014 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2014). Dados obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde mostram que esse tipo de neoplasia maligna foi responsável por 24.490 mortes no ano de 2013 (INCA, 2013). Na verdade, nos últimos anos sua razão mortalidade/incidência tem sido superior a 0,8, mostrando claramente a letalidade desta doença (INCA, 2014). Diante desse cenário, esta doença mantém-se como um desafio à saúde pública nacional e mundial e são necessários esforços no sentido de buscar novas abordagens terapêuticas.

1.2 O câncer de pulmão

Em relação à classificação clínica do câncer de pulmão, apesar da existência de algumas exceções e do comportamento biológico distinto entre os subtipos do mesmo grupo, este é usualmente dividido em carcinoma de pulmão de pequenas células e carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC) (DAVIDSON, GAZDAR; CLARKE, 2013; TRAVIS, BRAMBILLA; RIELY, 2013). O carcinoma de pulmão de pequenas células representa cerca de 14% dos casos de câncer de pulmão e caracteriza-se por sua agressividade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; DAVIDSON, GAZDAR; CLARKE, 2013). Já o CPNPC, representa cerca de 84% dos diagnósticos de câncer de pulmão e é um grupo heterogêneo que engloba diferentes tipos histológicos, tais como: o carcinoma de células epidermóides, os adenocarcinomas, o carcinoma de células grandes e outros mais raros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; TRAVIS et al., 2011).

Enquanto o tratamento do carcinoma de células pequenas realiza-se principalmente por quimio e/ou radioterapia, o tratamento do CPNPC (em estágios iniciais) é baseado na cirurgia, incluindo também a radio- e a quimioterapia além de, mais recentemente, as chamadas “terapias-alvo” (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; VANSTEENKISTE et al., 2013). Embora a cirurgia nos estágios iniciais possa ser curativa, 70% dos casos de CPNPC são

diagnosticados já em estádios avançados e, por conseguinte, inoperáveis (VANSTEENKISTE et al., 2013). Nestes casos, preconiza-se a quimioterapia, que é capaz de estender a sobrevida, e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

1.3 Biossíntese dos fosfolipídios

Atualmente, o desenvolvimento de novos fármacos conta com as abordagens computacionais que tornam esta busca racional e otimizam este processo, uma vez que estas abordagens consideram a identificação de alvos que estejam alterados preferencialmente nas células malignas (AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006; DAMIÃO et al., 2014; OVERINGTON; NARANG; DESAI, 2009; PALACEBERL et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2014). Neste contexto os fosfolipídios e as vias de produção destes surgem como um ponto de interesse devido as suas funções celulares e à presença de alterações relacionadas a eles e suas funções no contexto tumoral (IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007; RYSMAN et al., 2010; SCOTT et al., 2010; SWINNEN et al., 2003). Os fosfolipídios são os componentes principais das membranas plasmáticas, sendo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina (PE) os mais abundantes (LI et al., 2006). Ademais, os fosfolipídios também estão relacionados aos processos de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação e motilidade (CULLIS; DE KRIJFF, 1979; HUANG; FRETER, 2015; VANCE; TASSEVA, 2013). Juntos, todos esses processos celulares, apresentam-se alterados e são de extrema importância no desenvolvimento tumoral, desta forma, as vias de produção de fosfolipídios estão aumentadas nas células tumorais e tornam-se alvos em potencial (BRASKY et al., 2013; IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007).

Dentre os mais abundantes fosfolipídios de membrana celular temos a PE, que desempenha importantes papéis em processos fisiológicos, tanto diretamente quanto através de seus metabólitos biologicamente ativos, tais como, ácidos graxos livres e diacilglicerol, ambos importantes segundos mensageiros (VANCE, 2008). Diversas das atividades exercidas por esse fosfolipídio estão intimamente relacionada aos mecanismos de desenvolvimento tumoral como a citocinese (EMOTO et al., 1996), a apoptose (EMOTO et al., 1997) e a autofagia (LAMB, YOSHIMORI; TOOZE, 2013; ROCKENFELLER et al., 2015). Em células normais, a distribuição dos fosfolipídios de membrana é

assimétrica, sendo mantida por ATPases do tipo P, denominadas amino-fosfolipídios-translocases, que catalisam o transporte de PE e fosfatidilserina do folheto externo membranar para o folheto interno (DEVAUX, 1992; MARCONESCU; THORPE, 2008). Células tumorais possuem o perfil de distribuição de fosfolipídios alterado e expõem maiores níveis de PE e fosfatidilserina no folheto externo (EMOTO et al., 1997). É interessante notar que a exposição da PE ocorre também na superfície do endotélio tumoral, provavelmente devido ao estresse oxidativo do microambiente, o qual perturba a atividade das aminofosfolipídios translocases (STAFFORD; THORPE, 2011). Outra interessante evidência é que tecidos tumorais de amostras de pacientes com CPNPC, quando comparado ao tecido de uma região pulmonar não afetada, apresenta alterações proeminentes no perfil de fosfolipídios, em especial um aumento de PE (MARIEN et al., 2015). De posse de todos esses dados, fica claro que a PE e suas vias de produção podem ser interessantes pontos para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente em modelo de CPNPC.

Em células eucarióticas, a PE é sintetizada majoritariamente através da via da citidina 5-difosfocolina, também denominada de via de Kennedy (Figura 1), a partir da fosforilação da etanolamina pela etanolamina-quinase, seguida de conversão da fosfoetanolamina em PE pela ação da CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) e, em sequência no retículo endoplasmático, da fosfoetanolamina-transferase (GIBELLINI; SMITH, 2010; PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Por outro lado, a fosfatidilcolina pode ser sintetizada por duas vias distintas: a via de Kennedy e a via de transmetilação da PE, catalisada pela fosfatidiletanolamina n-metiltransferase (FAGONE; JACKOWSKI, 2013; GIBELLINI; SMITH, 2010). Desta forma, na via de Kennedy, a transformação de colina em fosfatidilcolina ocorre através de um processo análogo ao da etanolamina: a fosfatidilcolina é formada pela fosforilação da colina proveniente da dieta, em uma reação catalisada pela colina-quinase, seguida de duas reações sequenciais catalisadas pelas enzimas CTP:fosfocolina-citidilil-transferase e, em seguida, pela fosfocolina-transferase. A fosfatidilcolina também pode ser produzida por três metilações sequenciais da PE, através da ação da fosfatidiletanolamina n-metiltransferase (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013; VANCE; VANCE, 2009).

Figura 1 - As reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes: a via de Kennedy. A via de Kennedy apresenta duas rotas distintas para a produção de, respectivamente, PE e a fosfatidilcolina. As duas rotas são bem similares e apresentam enzimas análogas, responsáveis pela conversão dos precursores, etanolamina e a colina, em seus respectivos fosfolipídios. A via de Kennedy é iniciada pela ação de uma amino-álcool-fosfotransferase que fosforila a etanolamina ou a colina, resultando na produção da fosfoetanolamina e fosfocolina, respectivamente. A reação subsequente entre a citosina 5' trifosfato (CTP) e os produtos fosforilados é mediada pelas enzimas Pcyt2 e CTP:fosfocolina-citidilil-transferase, resultando na produção de CDP-etanolamina ou CDP-colina e pirofosfato. A última etapa da reação é pela CDP etanolamina: 1,2-diacylglicerol etanolamina fosfotransferase ou CDP colina: 1,2-diacylglicerol colina fosfotransferase, que acopla o produto da reação anterior ao diacylglicerol formado como produto final a PE ou a fosfatidilcolina, respectivamente. Neste contexto, essas enzimas surgem como possíveis alvos terapêuticos para reduzir a excessiva reciclagem de membrana das células tumorais, em especial, enzima da

etapa limitante da reação, presente no retículo endoplasmático, Pcyt2 (destacada em vermelho).

Portanto, pode-se buscar interferir no metabolismo de fosfolipídios nas células como uma estratégia terapêutica. Neste contexto, a Pcyt2 surge como um alvo potencial posto que esta enzima é frequentemente superexpressa em diversos tumores malignos, dentre os quais, pode-se destacar, o câncer de pulmão (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Ademais, ela é uma das peças-chaves da formação de membranas, uma vez que está envolvida na síntese dos seus principais componentes. Portanto, a inibição de sua atividade é capaz de interromper a divisão celular, desestruturar os *lipid rafts*, alterar a produção de segundos mensageiros e levar à apoptose (EMOTO; UMEDA, 2000; FULLERTON, HAKIMUDDIN; BAKOVIC, 2007; VANCE, 2008; SIGNORELL et al., 2009; ZHU; BAKOVIC, 2012). Concomitantemente, a inibição da Pcyt2 leva ao acúmulo de seu substrato, a fosfoetanolamina, que, quando em excesso, leva à inibição da respiração celular (GOHIL et al., 2013). Em 2013, Gohil e colaboradores também identificaram a meclizina, apesar de ser mais conhecida como um anti-histamínico usado há décadas na profilaxia de náusea e vertigem, como o primeiro fármaco inibidor da Pcyt2.

Na verdade, o uso de fosfolipídios no tratamento de alguns tipos de câncer já é conhecido (GAJATE; MOLLINEDO, 2002; VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013), tendo como exemplo dessa classe, os fosfolipídios antineoplásicos: edelfosina, miltefosina e ilmofofosina. A miltefosina é a única com uso clínico aprovado, sendo este para o tratamento tópico de metástases cutâneas do câncer de mama (KAMINSKY, 2002), enquanto a edelfosina e a ilmofofosina apresentam uso limitado por sua instabilidade metabólica (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013). Entretanto, o uso clínico da miltefosina apresenta uma severa restrição devido aos seus efeitos adversos no sistema gastrointestinal e hemolíticos (GAJATE et al., 2011). O protótipo deste estudo, a miltefosina, é um inibidor da CTP:fosfocolina-citidilil-transferase, enzima análoga a enzima alvo deste estudo, induzindo, por conseguinte, à apoptose devido a deficiência de colina e ao aumento dos níveis de ceramida (RAMOS et al., 2002; YOSIFOV et al., 2014; WNETZAK et al., 2014).

1.4 Morte imunogênica

Alguns estudos apontam um possível papel imunogênico de fosfolipídios antineoplásicos, devido às alterações nos *lipid rafts* e no estresse do retículo endoplasmático (GAJATE; MOLLINEDO, 2001; GAJATE; MOLLINEDO, 2007; MOLLINEDO et al., 1997; MOLLINEDO; GAJATE, 2006; VAN DER LUIT et al., 2007; WELLER et al., 2009). Este fato, aliado a crescente compreensão e interesse do papel da resposta imune contra os tumores e dos mecanismos capazes de favorecê-la, como a morte imunogênica, faz com que seja interessante avaliar também estes fármacos em um contexto imunológico.

A morte imunogênica pode ser definida como a morte celular mediada pela ação de células efetoras do sistema imune estimuladas por células apresentadoras de antígeno maturadas por sinais de células em processo de morte (KROEMER et al., 2013). Dentre as células apresentadoras de antígenos profissionais estão as células dendríticas (DCs), que são mediadoras da relação entre as respostas imunes inatas e adaptativas (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN, 2007).

As DCs podem processar os antígenos tumorais de células tratadas em processo de morte, os quais passam a ser expostos na superfície celular no contexto de moléculas codificadas pelo MHC (*Major Histocompatibility Complex*), ao mesmo tempo em que sinalizam efetivamente para linfócitos T *naïve*, de maneira a induzir sua ativação e resposta (Figura 2). Consequentemente, estas células tumorais em processo de morte imunogênica produzem sinais para as DCs que culminam na geração de linfócitos T efetores (auxiliares e citotóxicos) e de memória, voltados especificamente para o combate das células tumorais e, portanto, capazes de contribuir para a prevenção da recidiva da doença (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; RAMOS et al., 2013; STEINMAN, 2012). Portanto, as DCs podem ser consideradas peças-chave, que, dependendo do estado funcional, podem levar tanto à imunidade quanto à tolerância (DE JONG, SMITS; KAPSENBERG, 2005; SPONAAS et al., 2006; ZARNANI et al., 2007). O estado funcional das DCs está estreitamente correlacionado com os sinais recebidos pelo microambiente tumoral. Estes sinais incluem citocinas, mediadores inflamatórios e moléculas portadoras de padrões moleculares

capazes de ativar seus receptores tipo *pattern recognition receptors* (PRR) (DZOPALIC et al., 2012).

Figura 2 - Esquema dos processos envolvidos na morte imunogênica. Após o estresse causado pelo agente indutor de morte imunogênica, as células pré-apoptóticas expõem ou liberam sinais que facilitam sua fagocitose pelas DCs. Dentre os sinais que levam à indução deste processo estão a calreticulina (CRT), o ATP e a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1). Esses sinais podem ser reconhecidos como sinais para fagocitose pelas DCs através de sua interação com receptores de calreticulina (CRTR), purinérgico P2X7 (P2RX7) e do tipo *Toll-like 4* (TLR4), respectivamente. Em sequência, as DCs ativadas interagem com os receptores de células T (TCRs) dos linfócitos, gerando uma resposta imunogênica T *helper 1* (TH1) ou linfocítica T citotóxica (CTL) (adaptado de KROEMER et al., 2013).

Nowak e colaboradores, em 2003, demonstraram que a quimioterapia pode induzir a apoptose associada à morte imunogênica. Nesta conjuntura, dentre as moléculas expostas pelas células no início da morte imunogênica, a calreticulina se insere como uma proteína que, quando co-translocada junto à ERp57 para a superfície celular serve de sinal de fagocitose para as DCs através do CD91 (ZENG et al., 2006). Essa exposição de calreticulina é intimamente relacionada ao estresse do retículo endoplasmático, posto que esta proteína está presente no lúmen do retículo endoplasmático e sua exposição na superfície celular ocorre em decorrência de perturbações nesta organela, podendo, por consequência, ser associada a este tipo de morte celular (RAJENDRAN; SIMONS, 2005). Ademais, as células em processo de morte imunogênica liberam, dentre outros sinais, a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e ATP para o meio extracelular, que é capaz de interagir com os receptores do tipo *Toll-like 4* e os receptores purinérgicos P2X7, respectivamente, das DCs (APETOH et al., 2007; KROEMER et al., 2013).

A ativação de receptores de morte, que dependem dos *lipid rafts*, também está relacionada à exposição de calreticulina com consequente morte

imunogênica (PANARETAKIS et al., 2009). De acordo com os dados descritos anteriormente, a edelfosina mostra-se capaz de induzir apoptose em células malignas de forma dependente dos *lipid rafts* e do retículo endoplasmático (GAJATE; MOLLINEDO, 2001; GAJATE; MOLLINEDO, 2007; MOLLINEDO et al., 1997; MOLLINEDO; GAJATE, 2006). Em adição, a miltefosina também apresenta atividade modulatória dos *lipid rafts* e maior afinidade por esses microdomínios (VAN DER LUIT et al., 2007; WELLER et al., 2009). Portanto, esses dados apontam para uma possível ativação da morte imunogênica pelos fosfolípidios antineoplásicos, posto que o estresse do retículo endoplasmático e alterações nos *lipid rafts* relacionam-se à indução desse tipo de morte.

1.5 Desenvolvimento do CHY-1 como novo candidato a fármaco

Dado o foco do nosso grupo em buscar novos alvos para desenvolvimento racional de novos fármacos e o potencial da enzima Pcyt2 no contexto tumoral, foram utilizadas abordagens de planejamento de novos fármacos auxiliadas por computador para desenvolver uma quimioteca de novas entidades químicas como potenciais inibidores da enzima Pcyt2. Através de métodos de modelagem molecular e de quimiometria, dezenas de derivados de éter fosfolípides foram selecionados e submetidos a análises de métodos de agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis*) e de componentes principais (PCA, do inglês: *Principal Components Analysis*) a fim de descobrir quais eram as propriedades moleculares, dependentes da estrutura química, mais relevantes no processo de discriminação dos compostos. Ao final da análise exploratória, os compostos foram separados em dois grandes grupos e, no grupo onde estavam os fosfolípidios antineoplásicos (dentre eles a miltefosina), estava também um composto ainda não comercializado, o qual denominamos CHY-1. Por fim, foram procedidos testes de ancoragem de CHY-1 no sítio de interação da enzima Pcyt2 (código de entrada 3ELB no *Protein Data Bank*; BERMAN et al., 2000), os quais evidenciaram uma afinidade calculada favorável que incentivou a síntese e escolha deste composto para a avaliação dos seus efeitos biológicos.

A atividade inibitória *in vitro* da enzima Pcyt2 por CHY-1 foi avaliada e confirmada em um estudo prévio em colaboração a Profa. Dra. Marica Bakovic da *University of Guelph*. O estudo utilizando o isótopo radioativo [^{14}C] da fosfoetanolamina mostrou que o CHY-1 é capaz de inibir a enzima de forma não

competitiva, levando a redução da produção de PE, porém, o CHY-1 também inibe o transporte de etanolamina para a célula (dados ainda não publicados).

Consistente com esta hipótese, foram iniciadas as análises para elucidar se o CHY-1 apresenta ação antitumoral pela inibição da enzima Pcyt2 e se este é capaz de alterar o estado funcional das DCs, levando à morte das células tumorais não só devido à sua toxicidade direta, mas também pela morte imunogênica. Assim, este trabalho visa avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de CHY-1 em células de CPNPC bem como os mecanismos de ação. Ademais, pretende-se analisar a capacidade do CHY-1 induzir morte imunogênica mediada por DCs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico de CHY-1, um análogo da miltefosina desenvolvido como novo inibidor da enzima Pcyt2, e investigar os mecanismos inerentes à sua atividade antitumoral em modelo de CPNPC.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos citotóxicos da miltefosina e de CHY-1 em células de linhagem de fibroblasto pulmonar (LL-24) e de CPNPC (A549, NCI-H460 e LL/2), em cultura bidimensional (2D) e tridimensional (3D);
- Determinar *in vitro* os mecanismos de morte celular produzidos pela miltefosina e o CHY-1;
- Avaliar a presença de alterações celulares relacionadas a mecanismos de morte imunogênica causadas pela miltefosina e pelo CHY-1 *in vitro*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

As linhagens de CPNPC humanas (A549, NCI-H1299, NCI-H292 e NCI-H460) e murina (LL/2 (LLC1)) e a linhagem endotelial humana de cordão umbilical (HUVEC) foram mantidas em meio RPMI-1640 com 10% (v/v) de soro fetal bovino, enquanto que a linhagem de fibroblasto pulmonar humana, LL-24, foi cultivada em meio DMEM com 20% (v/v) de soro fetal bovino. Os meios utilizados em todas as células foram suplementados com solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 0,5% (p/v) de anfotericina B. Todas estas células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ e, ao atingirem a subconfluência, as culturas foram ampliadas e as células criopreservadas em solução de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em soro fetal bovino a -80 °C.

3.2 Avaliação da citotoxicidade em cultura 2D

Inicialmente a citotoxicidade do CHY-1 foi avaliada em células não-tumorigênicas (LL-24 e HUVEC) e tumorais (A549, NCI-H1299, NCI-H292, NCI-H460 e LL/2). As células foram plaqueadas na densidade de 10⁴ células/poço em placas de 96 poços e, após adesão, tratadas com cada fármaco (o CHY-1, a miltefosina, a meclizina, a mitoxantrona ou o paclitaxel), com concentrações de 2,5 a 150 µM, por 24 h. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma-Aldrich, MO, EUA) a 5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada por 3 h. As placas foram então centrifugadas a 240 g por 10 minutos, o meio foi removido e os cristais de formazam diluídos em 100 µL de DMSO. Neste experimento, os valores de absorbância obtidos dos poços controle, ou seja, expostas somente ao meio com o veículo, representam 100% de viabilidade celular. A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo estimado da concentração do IC₅₀, valor da concentração inibitória de 50% da proliferação celular a partir da curva dose-resposta de cada fármaco, após cálculo de viabilidade celular através das densidades ópticas obtidas utilizando o leitor de microplacas (VERSAmaxTunableMicroplate Reader, Molecular Devices, CA, EUA) em comprimento de onda de 538 nm.

3.3 Avaliação da proliferação celular

O ensaio clonogênico é comumente utilizado para monitorar a eficácia de novos compostos antitumorais a fim de avaliar a capacidade dos fármacos alterarem a atividade proliferativa das células remanescentes do tratamento. As células A549, NCI-H1299 e NCI-H460 foram plaqueadas em placas de 12 poços, na concentração de 200 células/poço e, após 4 h de incubação em estufa, as células foram tratadas por 12 h com a miltefosina (100 μ M) ou o CHY-1 (8 μ M). Após o tratamento, o sobrenadante foi removido e as células permaneceram em cultura por 10 dias com meio de cultura suplementado. Ao final deste tempo de incubação, o meio foi removido cuidadosamente por aspiração, e as placas lavadas três vezes com 1 mL de tampão salino. Em seguida as colônias foram fixadas e coradas com uma solução de glutaraldeído 6% e cristal de violeta 0,5% em água (v/v) durante 30 minutos. Para retirar o excesso de corante, as placas foram lavadas com água e deixadas em temperatura ambiente para total secagem. As colônias contendo mais que 50 células individuais foram contadas em estereomicroscópio (Nikon SM2645, Japão) e as imagens adquiridas em câmera digital (Panasonic DMC-TZ30, Japão).

3.4 Avaliação da citotoxicidade em cultura 3D

A fim de avaliar a atividade citotóxica do CHY-1, células tumorais (A549, NCI-H1299, NCI-H292 e NCI-H460) foram cultivadas em um sistema de cultura 3D. Neste modelo, as células apresentam morfologia, organização, proliferação, interações intercelulares e matriz-células, que se assemelham às condições *in vivo*, o que torna este modelo de avaliação citotóxica mais eficiente. O matrigel (BD Matrigel™ *Basement Membrane Matrix*, BD Biosciences, CA, EUA) foi previamente diluído como instrução do fabricante, aliquotado em tubos e estocados a -80 °C. O mesmo foi descongelado em banho de gelo até o momento da sua utilização. No momento de utilização foi adicionado o volume de 35 μ L Matrigel diluído 1:1 em tampão salino gelado nas placas e mantido durante 30 minutos a 37 °C para a sua solidificação. As células foram plaqueadas, na concentração de 10^4 células/poço, delicadamente sobre a superfície da matriz sólida e acrescida de meio de cultura, e incubada a 37 °C, durante 5 dias. Em seguida as células foram tratadas por 24 h com a miltefosina (100 μ M) ou o CHY-1 (8 μ M). Após os tratamentos foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) às

células e incubadas por 3 h. Após este período, o meio foi removido e acrescentado 100 μ L DMSO, para dissolver os cristais de formazam, seguido de homogeneização com auxílio de uma pipeta, a fim de liberar as células da matriz. Em seguida as placas foram centrifugadas a 240 g por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para uma nova placa de 96 poços. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (VERSAmaxTunableMicroplate Reader, Molecular Devices, CA, EUA) em comprimento de onda de 538 nm.

3.5 Análise da apoptose através do ensaio de anexina V/PI

Dentre as metodologias utilizadas para avaliar os mecanismos de ação citotóxica direta do CHY-1 sobre as células tumorais, está o uso do kit “*Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V AlexaFluor® 488 & Propidium Iodide*” (Molecular Probes®, Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido). Esse protocolo permite a avaliação da população apoptótica de uma amostra, uma vez que nesta há a exposição de fosfatidilserina, um dos marcos iniciais da apoptose, que se liga à anexina V marcada com Alexafluor488. Paralelamente, há avaliação da incorporação do iodeto de propídeo (PI) ao DNA, que indica estágios mais tardios da apoptose ou outros tipos de morte celular. As células A549, NCI-H460 e LL/2 foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e tratadas com a meclizina (100, 50 e 25 μ M), a miltefosina (100, 50 e 25 μ M) ou o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M) por 12 h. O fármaco paclitaxel 100 μ M, por 12 h de tratamento, foi utilizado como controle positivo experimental de apoptose. Após lavagem com o tampão de ligação 1 x do kit, as células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com anexina V-Alexafluor488 (diluição de 1:50). As células foram novamente lavadas com tampão de ligação 1 x e incubadas a 37 °C com 20 μ g de PI. Após 15 minutos de incubação, as células foram novamente lavadas com tampão de ligação, ressuspensas em 300 μ L deste e analisadas por citometria de fluxo usando FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) através do *software CellQuest*. Um total de 20.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa FlowJo versão 0.7 (Tree Star Inc., OR, EUA).

3.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O processo de morte celular está intimamente relacionado a alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), o qual pode ser analisado através

de uma sonda catiônica, a éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), que se acumula em mitocôndrias funcionais devido a sua carga membranar relativamente negativa. Desta forma, as células A549, NCI-H460 e LL/2 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram tratadas por 12 h com a meclizina (100, 50 e 25 μM), a miltefosina (100, 50 e 25 μM) ou o CHY-1 (8, 4 e 2 μM) para avaliar as alterações do $\Delta\psi_m$ e melhor detalhar os mecanismos de morte envolvidos. O carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) é um potente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial que foi utilizado como controle positivo de despolarização mitocondrial na concentração de 100 μM por 10 minutos. Após o tratamento, as células foram recolhidas, lavadas com PBS/BSA 0,5% azida 0,02% e incubadas por 15 minutos a 37 °C com TMRE (Molecular Probes, OR, EUA) 50 nM. As células foram lavadas novamente, ressuspensas em 300 μL da solução de PBS/BSA e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA). Foram coletados 20.000 eventos por amostra e analisados através do programa FlowJo versão 0.7 (Tree Star Inc., OR, EUA).

3.7 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio

Um importante fator associado à morte celular e ao dano mitocôndrial é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a qual pode ser determinada pela reação do dihidroetídeo (DHE) com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formando o etídeo, que se liga ao DNA e amplifica a fluorescência vermelha do DHE. As células A549, NCI-H460 e LL/2 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) tratadas por 12 h com a meclizina (100, 50 e 25 μM), a miltefosina (100, 50 e 25 μM) ou o CHY-1 (8, 4 e 2 μM), foram recolhidas e lavadas com PBS/BSA 0,5% azida 0,02% e, em seguida, incubadas a 37 °C por 15 minutos com 30 μg de DHE (Sigma-Aldrich, MO, EUA). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi utilizado como controle positivo da produção de EROs. Por fim, as células lavadas, ressuspensas em 300 μL de PBS/BSA 0,5% azida 0,02% e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA). Foram coletados 20.000 eventos por amostra e analisados através do programa FlowJo versão 0.7 (Tree Star Inc., OR, EUA).

3.8 Análise da expressão de calreticulina na superfície celular

A exposição de calreticulina é um dos marcos iniciais da morte celular imunogênica e, por conseguinte, foi analisada a alteração da expressão, na superfície celular, de calreticulina pelas células de linhagem tumoral (A549, NCI-H460 e LL/2) devido a cada um dos tratamentos. As células foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) e tratadas por 12 h com a miltefosina (100 μ M) ou o CHY-1 (8 μ M). A mitoxantrona 1 μ M (Sigma-Aldrich, MO, EUA) pelo mesmo período de tratamento foi utilizada como controle positivo de indução de exposição de calreticulina. Após o período de tratamento, as células foram então coletadas em tubos, lavadas e incubadas com o anticorpo primário anti-calreticulina 1:1000 (Abcam Cambridge, MA, EUA). Em seguida, as células foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexafluor 488 1:1000 (Cell signalling, MA, EUA). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) com o auxílio do *software CellQuest*, e, a cada amostra, foram adquiridos 20000 eventos. Desta forma, foi obtida a percentagem de células que expressam a calreticulina em sua superfície.

3.9 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

As alterações morfológicas celulares induzidas pelo tratamento com o CHY-1 foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células A549 e NCI-H460 tratadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço) por 12 h com CHY-1 (8 μ M), recolhidas e ressuspensas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (PBS, pH 7,2) durante 24 h. A amostra foi então centrifugada a 1500 g por 20 minutos para formação de *pellets*. O sobrenadante foi descartado e sobre os *pellets* formados foram adicionados mais solução fixadora de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,3), permanecendo por 24 h a 4 °C. O material foi congelado em acetona seca contendo 1 % de OsO₄ por 48 h a -90 °C. As amostras foram gradualmente aquecidas a -30 °C para finalização em acetona: resina (1:2) sendo, posteriormente, embebidas em resina de epóxido. Secções ultrafinas de 60 nm foram feitas e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram adquiridas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100 CXII pertencente ao Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.10 Western blotting

A avaliação dos níveis de expressão de proteínas relacionadas à morte celular foi realizada por *Western blotting*, com objetivo de elucidar os mecanismos de morte celular envolvidos na atividade tanto da miltefosina, a meclizina quanto CHY-1. As células tumorais (A549, NCI-H460 e LL/2) foram plaqueadas (10^6 células/poço) e tratadas com 12 h com a meclizina (100, 50 e 25 μ M), a miltefosina (100, 50 e 25 μ M) ou o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M). Os grupos da mitoxantrona (1 μ M), do paclitaxel (100 μ M), e do CaCl_2 (5 mM) foram utilizados como controle positivo de morte imunogênica, morte celular e ativação de calpaína, respectivamente. Após os tratamentos, as células foram lisadas com o reagente de extração de proteínas de mamíferos (*Mammalian Protein Extraction Reagent*®, Thermo Scientific Pierce, IL, EUA) contendo inibidores de protease e de fosfatase (*Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets*®, Thermo Scientific Pierce, IL, EUA). A concentração de proteínas do lisado foi determinada, em seguida, através do ensaio de Bradford (Thermo Scientific Pierce, IL, EUA). De acordo com a concentração de proteínas obtida, os lisados celulares foram diluídos em tampão *Standard Western blotting* (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS a 2%, glicerol 10%, 5% de 2- β mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol) e desnaturados por aquecimento. Em seguida, 20 μ g dos lisados celulares foram fracionados por eletroforese (*TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions* 12%, Biorad, CA, EUA) e transferidos para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com o kit *Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kits Quick Start Guide* (Biorad, CA, EUA) e *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Biorad, CA, EUA). Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão de Tris-salino (TTBS: 100 mM Tris-HCl, 137 mM de NaCl e 0,05% de *Tween*-20, pH 7,8) e bloqueadas durante 1 hora em leite desnatado 5% diluído em TTBS. Após outra lavagem com TTBS, a membrana foi incubada *overnight* com os anticorpos primários (Cell signalling, MA, EUA) a 4 °C. A membrana foi novamente lavada com TTBS e, então, incubada por 1 h com anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (Cell signalling, MA, EUA). A detecção foi realizada com o kit de *Pierce® Western Blotting Substrate Plus* (Thermo Scientific Pierce, IL, EUA) e a densidade de pixels das bandas quantificadas através do software Image J (NIH, USA) a fim de comparar as alterações de expressão proteica.

3.11 Avaliação do estresse do retículo endoplasmático

Este ensaio foi realizado para determinar se os efeitos do CHY-1 estão relacionados a indução de estresse do retículo endoplasmático. Desta forma, as células tumorais (A549 e NCI-H460) foram plaqueadas (10^4 células/poço) e tratadas por 12 h com a miltefosina (100 μ M), o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M) e a mitoxantrona (1 μ M). Após o tratamento, as amostras serão coradas com ER-Tracker Red (Invitrogen, CA, EUA) e examinadas em *High Content Analysis* (Elx800™ Absorbance Microplate Reader, Biotek, VT, EUA), com 488 nm de comprimento de onda de excitação e emissão coletada de 494-555 nm. Desta forma, será obtida a percentagem de células em estresse do retículo endoplasmático.

3.12 Análise da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático

Um importante mecanismo de morte celular é a liberação prolongada de cálcio de reservatórios intracelulares, culminando na ativação de proteases dependentes de cálcio. Assim, foi avaliado se o CHY-1 é capaz de induzir este mecanismo utilizando o kit Fluo4 NW (Invitrogen, CA, EUA). As células tumorais (A549 e NCI-H460) foram plaqueadas (3×10^4 células/poço) e, após a completa adesão, foram realizadas duas incubações seguidas com o reagente de cor, sendo a primeira de 30 minutos a 37 °C, seguida de 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada uma leitura da fluorescência basal dos poços que foi descontada da análise final. As células foram tratadas então com CHY-1 (16 μ M) combinado com taspargina (30 μ M). Diversas leituras foram realizadas em um leitor de fluorescência de microplacas (SpectraMax m23, Molecular Devices, CA, EUA), 494 nm de excitação e 516 nm de emissão, durante 1 h e 30 minutos.

3.13 Análise estatística dos resultados

Através dos ensaios de citotoxicidade, foram determinados os IC₅₀, a partir da curva dose-resposta, dos fármacos. Já a análise dos demais experimentos foi realizada por ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software Graph-Pad Prism* versão 5.04 (LaJolla, CA, EUA), e os valores expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando-se como valores significantes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4 RESULTADOS

4.1 O CHY-1 é citotóxico para células de CPNPC

Inicialmente foram realizadas triagens da atividade citotóxica de CHY-1 em comparação à miltefosina (seu protótipo) em linhagens de CPNPC humanas (A549, NCI-H1299, NCI-H292 e NCI-H460) e na linhagem murina de CPNPC (LL/2). Ademais, o estudo também avaliou o efeito do CHY-1 nas células não-tumorigênicas (um fibroblasto pulmonar humano, LL-24, e uma célula endotelial de cordão umbilical humana, HUVEC) através do ensaio de MTT. Desta forma, as células foram tratadas com ambos os compostos nas concentrações de 2,5 a 150 μM por 24 h. A leitura da densidade óptica de cada poço foi analisada após a incubação com o MTT. A partir das densidades ópticas, foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle e as curvas dose-resposta de cada composto para cada linhagem. Por fim, a partir destas curvas, foram calculados os valores de IC_{50} (Tabela 1) e os valores foram comparados entre si através do teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 1 - Inibição da viabilidade celular por CHY-1 e a miltefosina nas diferentes linhagens celulares.

Linhagem	Valor de IC_{50} (μM) $\pm$ DP	
	MLT	CHY-1
A549	109,70	5,67
	$\pm 14,55$	$\pm 0,69$
NCI-H1299	89,04	11,55
	$\pm 13,10$	$\pm 3,26$
NCI-H292	112,25	7,25
	$\pm 19,16$	$\pm 2,72$
NCI-H460	94,15	8,01
	$\pm 8,83$	$\pm 2,92$
LL-24	93,19	48,42
	$\pm 15,92$	$\pm 14,03$
HUVEC	19,09	19,35
	$\pm 3,48$	$\pm 5,52$
LL/2	23,05	4,15
	$\pm 1,90$	$\pm 0,07$

Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 3 repetições.

MLT= miltefosina

IC_{50} = concentração responsável pela inibição de 50% da viabilidade celular em relação ao controle.

DP= Desvio padrão

Os resultados mostram que o CHY-1 e a miltefosina são citotóxicos para todas as células estudadas. O CHY-1 apresentou-se menor citotoxicidade para a célula não-tumorigênica LL-24 ($p < 0.001$). Além disso, não há diferença estatística entre os valores de IC_{50} de CHY-1 para as demais células apresentadas. Por outro lado, a miltefosina é mais citotóxica para a célula não-tumorigênica HUVEC e para a célula LL/2 ($p < 0.001$), adicionalmente, a miltefosina foi igualmente tóxica para LL-24 e as demais células de CPNPC humanas. Vale ressaltar que o CHY-1 é mais citotóxico que a miltefosina em todas as células estudadas ($p < 0.001$), exceto a HUVEC. É importante frisar que são necessárias concentrações até quinze vezes maiores da miltefosina para obter os mesmos efeitos observados pelo tratamento com CHY-1 sobre as células de CPNPC. Desta forma, o CHY-1 é mais efetivo em reduzir da viabilidade das células tumorais do que a miltefosina. No entanto, apesar do CHY-1 ser citotóxico para os fibroblastos pulmonares e para a célula endotelial, a concentração tóxica de CHY-1 para os fibroblastos é oito vezes inferior à necessária para o mesmo efeito em célula tumoral e três vezes inferior, no caso da célula endotelial.

Em seguida, o mesmo ensaio de MTT foi repetido nas linhagens centrais do estudo (A549, NCI-H460 e LL/2) para os fármacos que serão utilizados nos ensaios posteriores como controles positivos de morte celular (o paclitaxel), controle de morte imunogênica (a mitoxantrona) e inibidor da enzima Pcyt2 (a meclizina) (Tabela 2). As curvas dose-resposta dos três principais compostos deste estudo (o CHY-1, a miltefosina e a meclizina) nas células A549, NCI-H460 e LL/2 estão representadas na Figura 3.

Tabela 2 - Inibição da viabilidade celular por CHY-1, miltefosina, meclizina, mitoxantrona e paclitaxel nas linhagens celulares de CPNPC principais do estudo.

Linhagem	Valor de IC ₅₀ (μM) ± DP				
	PTX	MTX	MEC	MLT	CHY-1
A549	76,72	19,33	83,79	109,7	5,67
	±13,13	± 3,41	±7,84	±14,55	±0,69
NCI-H460	59,12	11,8	107,00	94,15	8,01
	±6,22	±0,32	±15,03	±8,83	± 2,92
LL/2	4,90	5,90	14,02	23,05	4,15
	±0,81	±0,49	±5,61	±1,90	±0,07

Os valores representam as médias ± desvio padrão de 3 repetições.

PTX= paclitaxel

MTX= mitoxantrona

MEC= meclizina

MLT= miltefosina

IC₅₀= concentração responsável pela inibição de 50% da viabilidade celular em relação ao controle.

DP= Desvio padrão

Figura 3 - Curvas dose-resposta do CHY-1, a meclizina (MEC) e a miltefosina (MLT) nas três principais linhagens de CNPCPs utilizadas. As curvas dose-resposta de CHY-1 (■), MEC (▲) e MLT (●) nas linhagens A549, NCI-H460 e LL/2 após o tratamento por 24 h com doses de 2,5 a 150 μM e determinação da viabilidade celular (média ± desvio padrão) através do ensaio de MTT. O composto CHY-1 apresenta a maior atividade

citotóxica para as linhagens humanas A549 e NCI-H460 quando comparado ao seu protótipo, a MLT, e o inibidor da enzima Pcyt2 (MEC). Enquanto que para a linhagem murina LL/2 é mais sensível e apresenta uma diferença é mais sutil entre estes compostos. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A linhagem de CNPCP murina, LL/2 mostrou-se como a mais sensível utilizada no estudo ($p < 0.001$) para os tratamentos com o paclitaxel, a miltefosina e a meclizina. Nesta célula murina, ao comparar os valores de IC_{50} dos cinco compostos, o CHY-1 foi mais citotóxico apenas que a miltefosina ($p < 0.001$). Porém, o composto CHY-1 apresenta citotoxicidade superior ao paclitaxel e a meclizina nas demais linhagens ($p < 0.001$). Já a miltefosina apresentou citotoxicidade inferior à meclizina ($p < 0.05$) e ao paclitaxel ($p < 0.001$), na linhagem A549. Enquanto nas células NCI-H460, a miltefosina foi superior ao paclitaxel ($p < 0.001$) e igual a meclizina na capacidade de inibir a viabilidade celular. Desta forma, CHY-1 pode ser considerado um análogo promissor, pois é mais citotóxico para células de CPNPC que o seu protótipo, a miltefosina e do que o fármaco antineoplásico paclitaxel para as linhagens A549 e NCI-H460.

Após estes ensaios iniciais, foram determinadas as concentrações de CHY-1 e da miltefosina para os demais experimentos, prezando por valores que sejam suficientemente efetivos para induzir efeitos. Portanto, para o CHY-1 a concentração estipulada foi de 8 μ M, e a concentração de 100 μ M foi estabelecida para a miltefosina e a meclizina. Complementando os dados quantitativos do estudo de citotoxicidade, também foram adquiridas e analisadas, através de microscópio óptico, as alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com CHY-1, 8 μ M, e seu o protótipo, na concentração de 100 μ M, após 24 h de tratamento (Figura 4).

Estas imagens corroboram os resultados de viabilidade celular, posto que as células tumorais tratadas, apresentaram redução do volume celular, perda da refringência celular, fragmentação de membrana e redução da confluência. Todas estas alterações morfológicas são sinais clássicos de morte celular, desta forma, estas concentrações são interessantes para os estudos subsequentes. No entanto, para estabelecer qual o tipo morte celular envolvido, ainda são necessários estudos mais detalhados de mecanismo ação. Vale ressaltar ainda que estas imagens mostram poucas alterações morfológicas nos fibroblastos LL-24 tratados com o CHY-1, em comparação à miltefosina, posto que, embora estas

concentrações sejam tóxicas para as linhagens malignas, para os fibroblastos LL-24, a concentração citotóxica é superior.

Figura 4 - O CHY-1 induz alterações morfológicas preferencialmente nas células de CPNPCs. Após 24 h de tratamento é possível observar células com redução do volume celular, perda da refração celular, fragmentação de membrana, redução da confluência celular, e proporcional aumento de células no sobrenadante tanto nas células tratadas com CHY-1 (8 μ M), quanto com a miltefosina (MLT, 100 μ M). No entanto, na linhagem de fibroblasto, LL-24, estas alterações são mais sutis. As imagens são representativas de três experimentos independentes e foram obtidas através de microscópio de contraste de fase (magnificação x 100).

4.2 O CHY-1 inibe a proliferação celular das células de CPNPC

Após a avaliação do efeito citotóxico de CHY-1, o ensaio clonogênico foi realizado a fim de determinar se a miltefosina e o seu análogo, CHY-1, reduzem a capacidade proliferativa das células de CPNPC. Uma vez que os resultados deste ensaio refletem a capacidade de uma única célula tumoral remanescente do tratamento crescer e formar uma colônia. Desta forma, as células foram plaqueadas e tratadas por 12 h com a miltefosina ou o CHY-1. Em seguida o meio de tratamento foi retirado e as células foram incubadas por 10 dias em meio de cultura suplementado, a fim de permitir seu crescimento, divisão celular e a formação das colônias. Neste ensaio o CHY-1 mostrou-se novamente superior à miltefosina na redução da capacidade proliferativa das células tumorais avaliadas (Figura 5). Por conseguinte, é possível afirmar que o CHY-1 não é apenas um interessante agente citotóxico para células tumorais de pulmão, mas também é capaz de reduzir a capacidade proliferativa das células que resistem ao tratamento com este. Inclusive, em células NCI-H1299, a miltefosina não apresentou atividade na redução da capacidade proliferativa das células.

Figura 5 - O CHY-1 inibe a proliferação celular de células de CNPCPs. As linhagens tumorais A549, NCI-H1299 e NCI-H292 foram plaqueadas e tratadas por 12 h com o CHY-1 8 μ M ou a miltefosina (MLT, 100 μ M). Após o período de tratamento, o meio foi substituído por meio de cultura suplementado e as células mantidas e cultura por 10 dias. Finalmente as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Estas imagens

foram obtidas através de estereomicroscópio e as colônias (grupo com número de células igual ou superior a 50 células) foram contadas. Para as células A549 e NCI-H460, todos os tratamentos foram capazes de reduzir a proliferação celular ($***p<0.001$ vs controle), porém CHY-1 apresentou atividade superior à MLT ($***p<0.001$). Nas células NCI-H1299, apenas CHY-1 inibiu a atividade proliferativa das células tumorais ($***p<0.001$). Os gráficos representam as médias e o desvio-padrão de três experimentos independentes, ao passo que as fotos dos poços são imagens representativas destes experimentos.

4.3 O CHY-1 é igualmente ativo em modelo 3D de cultura de células

Apesar do grande número de estudos de triagem de novos fármacos que se baseiam em testes preliminares *in vitro* utilizando cultura 2D, triagens em cultura 2D são pouco preditivas. Visto que, nesses modelos, há alterações na morfologia das células, bem como na sua função, além de ocorrer uma disponibilidade diferenciada de fármaco entre as células. Para contornar estes entraves e aumentar a predição dos efeitos antitumorais de CHY-1 antes de usar modelos *in vivo*, a atividade citotóxica de CHY-1 e da miltefosina foi avaliada em cultura 3D de células. Nesse modelo 3D as células tumorais humanas (A549, NCI-H1299, NCI-H292 e NCI-H460) foram cultivadas por 5 dias em Matrigel e, em sequência, tratadas por 24 h com a concentração de 100 μM da miltefosina ou de 8 μM de CHY-1. Após o período de tratamento, foram registradas imagens da morfologia celular (Figura 6) e, então a leitura da viabilidade celular destes poços foi realizada através do ensaio de MTT (Figura 7).

Figura 6 - O CHY-1 e a miltefosina (MLT) induzem modificações na morfologia celular indicativas de morte celular nas células de linhagens de CNPCPs humanas em cultura 3D com matriz. A morfologia celular das células de CNPCPs em cultura tridimensional em Matrigel, após 24 h de tratamento com CHY-1 8 μ M ou MLT 100 μ M. Estas imagens, obtidas através de microscópio de contraste de fase (magnificação x 100), são representativas de três experimentos independentes. As células de CNPCPs, após 5 dias em cultura em Matrigel, adquiriram estruturas variadas (alveolar, traqueal ou mista), no entanto, após os tratamentos, surgem sinais de morte celular: as células perderam estas estruturas, aglomerando-se e há redução do volume celular.

Figura 7 - O CHY-1 induz citotoxicidade em células NCI-H1299 e NCI-H460 em cultura 3D com matriz com a mesma eficiência da cultura 2D. Após a cultura 3D em Matrigel das células de CNPCPs, por 5 dias, e o tratamento de 24 h com o CHY-1 8 μ M ou a

miltefosina (MLT, 100 μ M), as células foram incubadas com MTT a fim de comparar a capacidade preditiva de resposta citotóxica dos modelos de cultivo em 2D e 3D. A compatibilidade dos modelos foi dependente da linhagem celular e do fármaco. De forma que o modelo tridimensional apresenta resposta bem próxima ao bidimensional na linhagem celular NCI-H460 e para as linhagens NCI-H1299 e NCI-H292 apenas para o CHY-1. Já a MLT apresentou uma resposta mais próxima do modelo 2D nas linhagens NCI-H292 e NCI-H460. Para a linhagem A549 nenhum dos fármacos apresentou resposta próxima ao modelo bidimensional. Este gráfico representa as médias e o desvio-padrão de três experimentos independentes.

Neste modelo as células A549 assumem uma estrutura predominantemente em monocamada, em formato alveolar, enquanto que a NCI-H292 estruturou-se em várias camadas celulares com lúmens maiores. As células NCI-H1299 e NCI-H460, por sua vez, apresentam estrutura menos definida com características que lembram as duas células anteriores, porém a NCI-H460 assemelha-se mais à NCI-H292. Contudo, após os tratamentos, esta morfologia é alterada e as células desagregam-se e perdem sua refringência. Quando quantificada a viabilidade celular neste modelo, é possível observar que o CHY-1 foi igualmente eficiente em reduzir a viabilidade celular da NCI-H460 e NCI-H1299 em modelo 3D, quando comparado ao modelo 2D. Enquanto a miltefosina só apresentou o mesmo perfil de citotoxicidade da cultura 2D nas células NCI-H292 e NCI-H460. Porém, apenas na NCI-H1299 o composto CHY-1 mostrou-se superior à miltefosina em reduzir a viabilidade celular das células.

4.4 O CHY-1 induz apoptose em células de CNPCPs

Após determinar a citotoxicidade de CHY-1 tanto em modelo 2D quanto no 3D, as células A549, NCI-H460 e LL/2 foram tratadas por 12 h com o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M), a miltefosina (100, 50 e 25 μ M) ou a meclizina (100, 50 e 25 μ M), no intuito de melhor determinar os mecanismos de morte celular envolvidos nas alterações morfológicas observadas. Neste experimento, o paclitaxel foi utilizado como controle positivo de morte celular. Assim, após os tratamentos, as células foram marcadas com anexina V conjugada com Alexafluor488 e PI para determinar a população apoptótica (anexina V⁺) e de células com reduzida integridade de membrana (PI⁺).

Tanto o tratamento com CHY-1 quanto com a miltefosina e a meclizina, na maior concentração utilizada, foram capazes induzir a exposição de fosfatidilserina nas três linhagens de CNPCPs utilizadas (Figuras 8, 9 e 10). Desta forma, o efeito destes compostos, em sua maior concentração estão, ao

menos em parte, relacionados à indução de apoptose. Estes resultados corroboram aqueles da morfologia, onde observamos uma redução do volume e perda da refringência celular, fragmentação de membrana e redução da confluência celular.

Contudo, quando a apoptose é o principal mecanismo de morte engatilhado por um agente citotóxico, geralmente observa-se uma porcentagem maior de células positivas para anexina V. Desta forma, fica claro que a apoptose não é a principal via de morte celular envolvida na citotoxicidade de CHY-1 e da miltefosina nas células A549 e NCI-H460, dado que estes compostos induzem à apoptose em menos que 20% das células. Ao passo que a meclizina, induziu à apoptose nas duas células de CNPCPs humanas a partir da concentração de 50 μ M. No entanto, a meclizina desencadeia a apoptose em uma porcentagem maior de células apenas na célula NCI-H460, de forma que aponta esta como a principal via de morte induzida por este fármaco nesta célula. A célula LL/2 apresentou-se mais sensível à apoptose, todos os tratamentos em suas maiores concentrações levaram a uma taxa de apoptose superior a 25%, destacando-se com um importante mecanismo de citotoxicidade neste modelo.

A **B**

Figura 8 - Os efeitos apoptóticos do CHY-1, da miltefosina (MLT) e da meclizina (MEC) em células A549. (A) *Dotplots*, representativos de três experimentos independentes, da dupla-marcação com anexina-V conjugada com Alexafluor488 (FLH-1, no eixo “x”) e com PI (FLH-2, no eixo “y”), das células A549 tratadas por 12 horas com CHY-1, MLT ou MEC em três diferentes concentrações. (B) Análise da porcentagem de células apoptóticas (anexina-V+PI) no controle em comparação com diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, em relação ao controle (ANOVA de uma via).

A **B**

Figura 9 - Os efeitos apoptóticos do CHY-1, da miltefosina (MLT) e da meclizina (MEC) em células NCI-H460. (A) *Dotplots*, representativos de três experimentos independentes, da dupla-marcação com anexina-V conjugada com Alexafluor488 (FLH-1, no eixo “x”) e com PI (FLH-2, no eixo “y”), das células NCI-H460 tratadas por 12 h com CHY-1, MLT ou MEC em três diferentes concentrações. (B) Análise da porcentagem de células apoptóticas (anexina-V+PI-) no controle em comparação com diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, em relação ao controle (ANOVA de uma via).

A **B**

Figura 10 - O CHY-1 induz apoptose nas células murinas LL/2. (A) *Dotplots*, representativos de três experimentos independentes, da dupla-marcação com anexina-V conjugada com Alexafluor488 (FLH-1, no eixo "x") e com PI (FLH-2, no eixo "y"), das células A549 tratadas por 12 h com o CHY-1, a miltefosina (MLT) e a meclizina (MEC) em três diferentes concentrações. (B) Análise da porcentagem de células apoptóticas (anexina-V+PI-) no controle em comparação com diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, em relação ao controle (ANOVA de uma via).

4.5 CHY-1 altera o $\Delta\psi$ m das células NCI-H460 e LL/2

Posto que os resultados de marcação de anexinaV/PI indicaram que o CHY-1 pode induzir apoptose, a participação mitocondrial neste processo foi avaliada

através do uso da sonda TMRE (Figura 11). Neste experimento, ademais dos mesmos grupos experimentais utilizados anteriormente, o CCCP, um potente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, foi utilizado como controle positivo de despolarização mitocondrial.

Neste experimento, a despolarização é evidenciada pela redução da intensidade de fluorescência da população marcada quando comparado ao controle. Na célula A549 (Figura 11A), apesar da indução de apoptose por CHY-1, o tratamento com este, em nenhuma de suas concentrações, não alterou o $\Delta\psi_m$. Entretanto, os tratamentos com a miltefosina e a meclizina, ambos na concentração de 100 μM , foram capazes de reduzir o $\Delta\psi_m$. Por conseguinte, apesar dos três compostos induzirem apoptose nesta linhagem, apenas a miltefosina e a meclizina apresentam apoptose associada a alterações na membrana mitocondrial. Nas células NCI-H460 (Figura 11B), por sua vez, todos os compostos testados, em sua maior concentração, despolarizaram a membrana mitocondrial. Este resultado aponta que, nesta célula todos os compostos, inclusive CHY-1, apresentam indução de apoptose com participação mitocondrial. Para as células LL/2 (Figura 11C), as maiores concentrações de todos os três tratamentos (8 μM para CHY-1 e 100 μM para a meclizina e a miltefosina) induziram uma menor média de intensidade de fluorescência. Portanto, na linhagem murina, assim como na NCI-H460, todos os compostos apresentam indução de apoptose com participação mitocondrial.

Figura 11 - O efeito de CHY-1 sobre o $\Delta\psi_m$ das células de CNPCPs. Os gráficos da análise da intensidade de fluorescência média relativa ao controle da marcação com TMRE das células tratadas por 12 h com CHY-1 (8, 4 e 2 μM), MLT (100, 50 e 25 μM) ou MEC (100, 50 e 25 μM) das células A549 (A), NCI-H460 (B) e LL/2 (C). Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

4.6 O acúmulo de EROs nas células tratadas com CHY-1

A produção de EROs está intimamente relacionada à apoptose e ao colapso mitocondrial, deste modo, a produção do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi avaliada através da sonda DHE. Além dos mesmos grupos experimentais utilizados anteriormente, um do grupo foi tratado com H_2O_2 , controle positivo para o

aumento de superóxidos. O CHY-1 aumentou a produção de ânion superóxido nas células A549 (Figura 12) e NCI-H460 (Figura 13) de forma independente da alteração do $\Delta\psi_m$. Quanto aos demais compostos, apenas a meclizina também levou o aumento da produção de EROs na NCI-H460. É pertinente apontar que, nas células LL/2 (Figura 14), apesar das alterações mitocondriais observadas no ensaio anterior, não há alteração da produção de EROs com nenhum dos tratamentos.

Figura 12 - O CHY-1 aumenta a produção de ânion superóxido das células A549. (A) Os histogramas são representativos de três experimentos independentes, da marcação com DHE (FLH-2) das células A549 tratadas por 12 h com o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul), a miltefosina (MLT, 100, 50 e 25 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul) ou a meclizina (MEC; 100, 50 e 25 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul). (B) O gráfico da intensidade de fluorescência média relativa ao controle após os diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

Figura 13 - O CHY-1 e a MEC elevam a produção de ânion superóxido das células NCI-H460. (A) Os histogramas são representativos de três experimentos independentes, da marcação com DHE (FLH-2) das células NCI-H460 tratadas por 12 h com o CHY-1 (8, 4 e 2 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul), a miltefosina (MLT, 100, 50 e 25 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul) ou a meclizina (MEC, 100, 50 e 25 μ M, representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul). (B) O gráfico da intensidade de fluorescência média relativa ao controle após os diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

Figura 14 - Nenhum dos tratamentos em estudo alterou a produção de ânion superóxido das células de LL/2. (A) Os histogramas são representativos de três experimentos independentes, da marcação com DHE (FLH-2) das células LL/2 tratadas por 12 h com o CHY-1 (8, 4 e 2 μM , representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul), a miltefosina (MLT, 100, 50 e 25 μM , representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul) ou a meclizina (MEC, 100, 50 e 25 μM , representados respectivamente em vermelho, amarelo e azul). (B) O gráfico da intensidade de fluorescência média relativa ao controle após os diferentes tratamentos. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde * $p < 0.05$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

4.7 As alterações morfológicas das organelas induzidos por CHY-1

Uma das ferramentas utilizadas para melhor entender os mecanismos de CHY-1 nas células A549 e NCI-H460 foi a avaliação morfológica em MET. Através da MET é possível visualizar de alterações intracelulares. Neste experimento, as células A549 e NCI-H460 foram tratadas por 12 h com CHY-1 (8 μM) e, após processamento, foram analisadas as alterações de: integridade celular e nuclear, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Posto que apenas a linhagem A549 é produtora de surfactante, nestas células também foram avaliadas a presença de corpos lamelares. Conforme a Figura 15, o tratamento com CHY-1 é capaz de induzir danos mitocondriais e alteração na

eletrondensidade do retículo endoplasmático nas células A549 e NCI-H460. É evidente também a redução do volume do núcleo na célula NCI-H460 tratada com CHY-1. As alterações mitocôndrias nas células NCI-H460 corroboram os dados da redução de potencial mitocondrial anteriores. É interessante destacar que há uma redução na produção de surfactante, com redução do número de corpos lamelares na célula A549 após o tratamento com CHY-1.

Figura 15 - O CHY-1 induz danos mitocondriais e do retículo endoplasmático nas células de CNPCPs humanos. (A) As elétron-micrografias representativas da morfologia geral das células A549 e NCI-H460 tratadas por 12 h com CHY-1 (8 μ M) (aumento 4000 x). As setas vermelhas indicam os corpos lamelares. Em destaque, aumento de 30000 x, temos a presença das alterações morfológicas das mitocôndrias (setas azuis) e do retículo endoplasmático (setas verdes).

4.8 Alterações do retículo endoplasmático induzidas por CHY-1

As imagens de MET das células A549 e NCI-H460 tratadas com CHY-1 mostraram elétron condensação no retículo endoplasmático, conforme o mostrado na Figura 15. Em adição, a redução da integridade do retículo endoplasmático foi confirmada pelo uso da sonda fluorescente *ER-tracker*, após as células A549, NCI-H460 e LL/2 serem tratadas por 12 h com o CHY-1 (2, 4 e 8 μ M), a miltefosina (100 μ M) ou a mitoxantrona 1 μ M (Figura 16). Porém, neste ensaio, a mitoxantrona foi capaz de induzir estresse de retículo em todas as células, ao passo que, CHY-1 foi capaz de induzi-lo apenas nas células A549 e LL/2. Entretanto, ao avaliar a liberação de cálcio do retículo endoplasmático através do ensaio com o *kit Fluo4 NW*, não foi possível observar a participação da liberação de cálcio do retículo endoplasmático no tempo analisado por nenhuma das células estudadas no período observado (Figura 17).

Figura 16 - O CHY-1 induz estresse do retículo endoplasmático nas células A549 e LL/2. O estresse do retículo endoplasmático foi avaliado com o auxílio de uma sonda fluorescente *ER-Tracker*^{TM}, que se liga de maneira seletiva aos canais de potássio sensíveis ao ATP, de forma a indicar, com o excesso de ligação da sonda, uma redução do estado funcional desta organela. As linhagens A549, NCI-H460 e LL/2 foram avaliadas após o tratamento por 12 h com o CHY-1 (8, 4, ou 2 μ M) ou a miltefosina

(MLT, 100 μ M). A mitoxantrona (MTX) foi utilizada como controle positivo experimental. Os valores estão expressos em intensidade de fluorescência média das células positivas para a marcação. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, onde $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

Figura 17 - O efeito precoce de CHY-1 não está relacionado à liberação de cálcio dos estoques do retículo endoplasmático em nenhuma das células avaliadas. A liberação específica de cálcio do retículo endoplasmático foi avaliada através do uso da sonda fluorescente Fluo4 NW nas células A549 e NCI-H460, utilizando a combinação com a tapsigargina 30 μ M para aumentar o sinal de cálcio do retículo endoplasmático, facilitando a análise. Os gráficos das densidades ópticas ao longo do tempo mostram que não há diferença no sinal de cálcio com o tratamento com CHY-1 16 μ M durante o período de 1 hora e 30 minutos que foi avaliado. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos.

4.9 A indução da exposição de calreticulina por CHY-1

Em seguida, também foi avaliado se o CHY-1 possui atividade indutora de morte imunogênica. Assim, a exposição extracelular de calreticulina pelas células malignas, um dos principais marcos da morte imunogênica, foi avaliada (Figura 18). As células A549, NCI-H460 e LL/2 foram tratadas por 12 h com o CHY-1 (8 μ M) ou a miltefosina (100 μ M), usando também o tratamento com a mitoxantrona (1 μ M) como controle positivo. A mitoxantrona foi capaz de induzir a exposição de calreticulina em todos os modelos celulares. Porém, para as células NCI-H460, os tratamentos como o CHY-1 e a miltefosina não foram capazes de alterar a exposição de calreticulina, sugerindo que ambos compostos não são indutores de morte imunogênica em células NCI-H460. Por outro lado, na célula A549, tanto CHY-1 quanto a miltefosina foram capazes de induzir a exposição extracelular de calreticulina, sugerindo que ambos têm potencial para induzir morte imunogênica neste modelo. Em relação às células LL/2, apenas CHY-1 levou à externalização de calreticulina.

Figura 18 - O CHY-1 induz a exposição extracelular de calreticulina, um importante marcador de morte imunogênica, em células A549 e LL/2. A exposição extracelular de calreticulina por citometria de fluxo após tratamentos com o CHY-1 (8 μ M) ou a miltefosina (MLT, 100 μ M) por 12 h. A mitoxantrona (MTX) foi utilizada como controle positivo experimental. Os gráficos da porcentagem de células positivas para a exposição de calreticulina em cada uma das linhagens. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de

três experimentos, onde * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA de uma via).

Em seguida, foram também analisadas a expressão de proteínas relacionadas a morte imunogênica, calreticulina e HMGB1, dos lisados das células A549 tratadas com CHY-1 (8, 4 ou 2 μM), miltefosina (100 μM) e mitoxantrona (1 μM) por 12 h (Figura 19). Apesar da externalização da calreticulina, não houve alteração da expressão desta proteína em nenhum dos tratamentos. Porém, em consonância com o sinal de externalização de calreticulina observado por citometria de fluxo, há uma redução na expressão de HMGB1 com o tratamento de CHY-1 8 μM , miltefosina e o controle positivo, a mitoxantrona. Esta redução pode ser relacionada à liberação de HMGB1 que ocorre durante a morte imunogênica. Todavia, ainda são necessários ensaios adicionais a fim de avaliar parâmetros adicionais relacionados a este mecanismo de morte celular de indução de morte imunogênica para CHY-1.

Figura 19 - O CHY-1 induz redução da expressão de HMGB1, outro marcador de morte imunogênica, em células A549. As imagens das membranas são representativas de três experimentos independentes de *Western blotting* após o tratamento de 12 h com o CHY-1 (8, 4 ou 2 μM), a miltefosina (MLT, 100 μM) e a mitoxantrona (MTX, 1 μM).

5 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo, em grande parte porque as terapias mantêm-se sem uma resposta satisfatória a despeito dos avanços tecnológicos (LEMJABBAR-ALAOUI et al., 2015). Este trabalho tem o foco em um alvo inovador, pois, apesar da associação de alterações na via de Kennedy e de sua modulação para o tratamento de câncer já serem bem estudadas, o enfoque é majoritariamente na rota da colina (ACKERSTAFF et al., 2003; GLUNDE et al., 2004, 2006; IORIO et al., 2005). Neste contexto, nosso grupo direcionou seus estudos na rota da etanolamina, que ainda é pouco explorada. Desta forma, um novo composto denominado CHY-1, análogo da miltefosina, foi sintetizado para ser avaliado como um potencial novo candidato a fármaco contra células de CPNPC. Vale salientar também que, pouco tempo após o início do projeto regular ao qual este trabalho está vinculado, a meclizina foi descrita como um inibidor da Pcyt2, porém ainda sem associá-la ao uso como agente antitumoral. Por conseguinte, esta será comparada também ao CHY-1.

Inicialmente, no teste inicial de citotoxicidade, em cultura 2D, nas linhagens de CPNPC, CHY-1 foi capaz de induzir morte celular em todas as células de CPNPC em concentrações inferiores às da miltefosina. Ademais, apesar do composto ter apresentado toxicidade para o fibroblasto e para as células endoteliais, os efeitos tóxicos de CHY-1 em células não-tumorigênicas ocorrem apenas em concentrações superiores às utilizadas para as células malignas. Uma vez que as células tumorais apresentam metabolismo alterado: uma grande demanda de produção de membranas para proliferação e expõe maiores níveis de PE no folheto externo da membrana plasmática (EMOTO et al., 1997). Provavelmente, esse efeito preferencial se deve ao diferenciado *turnover* de membrana de células malignas e células normais, dado que CHY-1 foi desenvolvido para atuar em um novo alvo terapêutico da via de síntese de fosfolípidios: a Pcyt2. Quanto à atividade antiproliferativa pós-tratamento, o CHY-1 também foi superior à miltefosina, reduzindo a capacidade das células que sobreviveram ao tratamento de continuar se multiplicando. Dado que, em sua maior parte, os tratamentos quimioterápicos são administrados em ciclos, este efeito é interessante por garantir que entre um ciclo e outro de tratamento haverá uma redução do crescimento do tumor, sendo este mais facilmente eliminado nos

próximos ciclos. Ainda quando comparado à meclizina, fármaco que apresenta o mesmo alvo, o CHY-1 é capaz de induzir citotoxicidade em doses ainda menores. Portanto, o CHY-1 é superior ao seu protótipo (a miltefosina) e um outro membro da mesma classe (a meclizina). Uma possível explicação para a superioridade da CHY-1 sobre a meclizina é que, este novo composto não inibe apenas a enzima Pcyt2, mas também o transporte de etanolamina para o meio intracelular, reduzindo ainda mais drasticamente a produção de PE (dados do nosso grupo ainda não publicados).

Já a miltefosina apresenta outros diversos mecanismos de ação simultâneos além da inibição de uma das enzimas da via de Kennedy, o que torna sua ação pouco seletiva. Dentre estes mecanismos está a indução da apoptose dependente de mitocôndria com ativação de caspase-9,-3 e 8 com liberação de citocromo c, ativação e realocação de Bax e Bid (PARIS, BERTOGLIO; BRÉARD, 2007). Além de ter sua citotoxicidade e atividade anticâncer relacionada à inibição da proteína quinase C (PKC), que apresenta um papel primordial no crescimento celular (COURAGE, BUDWORTH; GESCHER, 1995), a miltefosina também altera a fosforilação de Akt (proteína quinase B), uma proteína quinase serina/treonina específica que contribui para a sobrevivência, proliferação e crescimento celular (ALAM et al., 2013). A inibição das vias de proliferação proteíno-quinases ativadas por mitógenos/ quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK), via inativação de PKC (proteína quinase C), e de sobrevivência de PI3K/Akt (enzima fosfatidilinositol-3-quinase/Akt), decorrem do acúmulo da miltefosina na membrana, interferindo no metabolismo de lipídeos e na sinalização celular dependente destes (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2008). Em consonância com a literatura, nossos dados sugerem que a miltefosina foi citotóxica para as células de CPNPC, dirigindo-as para à apoptose com colapso mitocondrial. Além de sua atividade antiproliferativa que corrobora os dados da literatura que indicam este fármaco como um inibidor de PKC e da fosforilação de Akt. Entretanto, a miltefosina apresentou-se igualmente citotóxico para as linhagens de CPNPCs e não-tumorigênicas, assim, esta ausência de atividade preferencial pode ser explicada pela grande quantidade de alvos desta molécula. Estes dados apontam que a miltefosina possui baixa seletividade corroborando com os estudos apresentados por outros grupos e dados clínicos, que sinalizam

para uma limitação no uso terapêutico, prescrito somente em casos sem opções terapêuticas ou uso dérmico (PLANTING et al., 1993; VERWEIJ et al., 1992). Quanto à meclizina, em todas as células estudadas, este composto apresentou a indução de apoptose com alteração do $\Delta\psi_m$ como principal mecanismo de morte celular. Estes dados corroboram a literatura que descreve a meclizina como um potente inibidor da respiração celular que leva às células à apoptose pelo acúmulo de fosfoetanolamina (GOHIL et al., 2013).

Com a crescente busca por novos fármacos, diversas metodologias têm sido empregadas para avaliar a citotoxicidade, gerando dados mais confiáveis que os dos testes *in vitro* e, portanto, aumentando a predição de um real potencial *in vivo* e clínico dos compostos testados (CHANDRASEKARAN et al., 2014). Neste contexto, os modelos 3D devem ser ressaltados, pois os ensaios de citotoxicidade nestes geram dados mais fidedignos, devido a semelhança destes ensaios com os modelos *in vivo* (JØRGENSEN et al., 2014). Deste modo, foi utilizado um modelo de cultura 3D com Matrigel, em que as células crescem livremente dentro da matriz e apresentam algumas condições do microambiente tumoral como hipóxia, quimio-resistência, interações célula-célula e célula-matriz e difusão de fármacos (JØRGENSEN et al., 2014). Neste modelo, cada uma das células assumiu uma morfologia diferente que se correlaciona com o seu tipo histológico: a A549 cresceu em forma alveolar predominantemente em monocamada conforme o esperado para uma célula de adenocarcinoma com características de pneumócito do tipo II; a NCI-H292, por ser uma linhagem de progenitores de células basais traqueais, apresentou-se em várias camadas e com lúmen maior; e as células NCI-H1299 e NCI-H460 apresentaram morfologia pouco definida posto que são amostras de carcinoma de pulmão de células grandes, um grupo heterogêneo classificado junto por exclusão de característica típicas dos demais CPNPCs. Coerentemente, os testes de citotoxicidade em cultura 3D e 2D apresentaram resultados semelhantes. Esses dados, apesar de serem ainda *in vitro*, são promissores, posto que é possível esperar que, em modelos *in vivo*, CHY-1 mantenha-se igualmente potente, caso tenha farmacocinética adequada. A efetividade no modelo 3D indica que CHY-1 é capaz de difundir-se adequadamente na estrutura para exercer seu efeito, pelo menos nos modelos de carcinoma de pulmão de células grandes (NCI-H1299 e

NCI-H460). No entanto, apenas no modelo de cultura 3D com as células NCI-H1299, o CHY-1 superior à miltefosina. No entanto, esse modelo não avalia a cinética, sendo, pois, ainda necessário os estudos *in vivo* para confirmar o seu potencial.

Em sequência, após determinar o potencial de CHY-1, foram iniciados os estudos de mecanismo de ação deste composto em comparação a seu protótipo. Para tanto, o ensaio de dupla-marcação anexinaV/PI foi realizado no intuito de determinar se a citotoxicidade observada no modelo anterior deve-se à apoptose. Neste ensaio já foi possível observar que, apesar de se tratar de um análogo, o CHY-1 possui mecanismo de ação diferente da miltefosina, podendo esta diferença estar relacionada à maior citotoxicidade deste composto, além do seu efeito preferencial em células tumorais. O CHY-1 induz apoptose nas três linhagens de CPNPCs utilizadas, porém, ao menos para as linhagens humanas este não é o mecanismo principal de citotoxicidade do CHY-1, uma vez que, apenas para a LL/2, este foi capaz de induzir taxas de apoptose superiores a 25%.

As alterações morfológicas nas mitocôndrias dos grupos tratados com CHY-1, observadas nas imagens de MET, também apontam para a ação deste composto sobre a produção de PE. Este fosfolípido, que é produto final do braço da etanolamina da via de Kennedy, exerce papel central na biogênese das proteínas da membrana externa mitocondrial (OSMAN; VOELKER; LANGER, 2011). O silenciamento agudo da via secundária de produção de PE, a via da descaboxilação da fosfatidilserina, pode não alterar o $\Delta\psi_m$, como ocorreu com as células A549, e não alterar os níveis de proteínas de fissão mitocondrial, porém, levam a fragmentação mitocondrial e formação de ultra-estruturas aberrantes (BECKER et al., 2013; TASSEVA et al., 2004). Desta forma, a participação da PE na biogênese de proteínas da membrana externa mitocondrial é essencial para a função mitocondrial e, alterações na sua produção, conforme o esperado pelo tratamento com o CHY-1 levam ao colapso da estrutura mitocondrial. Outro mecanismo possivelmente envolvido é o acúmulo de um substrato que inibe a respiração celular, a fosfoetanolamina, decorrente da inibição da enzima (GOHIL et al., 2013). Esta inibição da respiração celular pelo

acúmulo de fosfoetanolamina pode gerar apoptose com redução do $\Delta\psi_m$ e aumento da atividade de caspase 3 (FERREIRA et al., 2012, 2013).

Apesar das imagens da MET mostrarem diversas alterações morfológicas nas mitocôndrias de ambas as células humanas tratadas com CHY-1, o dano mitocondrial parece não estar relacionado ao mecanismo iniciador da morte celular observada, mas sim ser decorrente desta. É possível inferir que o dano mitocondrial é secundário ao processo de morte celular pois apenas na maior concentração de CHY-1 há alteração do $\Delta\psi_m$, ou seja, este é resultado das alterações morfológicas mitocondriais e do desbalanço de EROs. Por sua vez, no modelo murino, o mecanismo de ação parece distinto, as células ainda não apresentam um aumento de EROs mas apresentam uma redução do $\Delta\psi_m$ que precede a indução de apoptose.

É interessante observar que a demanda de produção de fosfolipídios das células A549 é maior, posto que esta linhagem apresenta síntese aumentada de produção de surfactante utilizando a via de Kennedy (LIEBER et al., 1976). A fosfatidilcolina é o principal componente do surfactante pulmonar e este é primordialmente sintetizado pela via de Kennedy nas células alveolares do tipo II, como por exemplo, a célula A549 (RIDSDALE et al., 2010; WEINHOL et al., 1989; ZIMMERMANN et al., 1993). Desta forma, este dado pode ser um indicativo de que o CHY-1 está de fato agindo sobre a via de produção de fosfolipídios e, por as células A549 apresentaram uma redução na produção de seu surfactante, conforme o observado nas imagens da MET.

Ainda nas imagens da MET, o CHY-1 mostrou indícios de alterações do retículo endoplasmático em ambas as linhagens humanas de CPNPCs. Porém, ao avalia-la através de um ensaio com uma sonda, o CHY-1 foi capaz de induzir estresse do retículo endoplasmático apenas nas células A549 e LL/2 e não foi possível observar a participação da liberação de cálcio do retículo endoplasmático em tempos de tratamento inferiores à 1 h e 30 minutos. Assim, é possível apontar que os mecanismos de toxicidade do retículo endoplasmático pelo CHY-1 também sejam secundários aos mecanismos de morte celular independente de caspases.

Nos últimos anos, a imunoterapia vem surgindo como uma interessante e nova estratégia terapêutica contra o câncer pois leva à modulação do sistema imune do paciente contra as células malignas, originando uma resposta sistêmica, seletiva e duradoura (GUBIN et al., 2014). No tratamento do CPNPC já se estudam vacinas para antígenos específicos, imunomodulação através de anticorpos monoclonais e a combinação sinérgica entre a quimioradioterapia e as vacinas (DECLERCK; VANSTEENKISTE, 2014; WANG et al., 2015). A indução da morte imunogênica através do uso de agentes citotóxicos pode ser uma opção para superar estes obstáculos, posto que esta leva a modificações na membrana celular ou liberação de mediadores pelas células em processo de morte com consequente estimulação da resposta imune por estes sinais (KROEMER et al., 2013). Curiosamente, apenas para as células A549 e LL/2, o CHY-1 apresentou um potencial de indução de morte imunogênica, dado que somente nestes modelos houve aumento da externalização de calreticulina e redução da expressão de HMGB1. A redução da expressão de HMGB1 pode ser relacionada a sua liberação, outro importante sinal da morte imunogênica (ADKINS et al., 2015; BEZU, et al., 2015). Uma vez que o estresse de retículo endoplasmático está relacionado à liberação destes sinais, especial a calreticulina, que em condições normais encontra-se confinada nesta organela, o que explica fato de somente nas células A549 e LL/2 induzirem estes sinais quando tratada com CHY-1 (PANARETAKIS et al., 2009). Este dado é consistente com o mecanismo de ação diferente de CHY-1 em ambas as células estudadas e é promissor, visto que a A549 é uma linhagem com diversos mecanismos de resistência (expressão aumentada de transportadores relacionados à resistência a fármacos, alta metabolização de xenobióticos e alterações na via de morte celular) e representante do tipo histológico mais comum e com o número de novos casos em crescimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; BRECHBUHL et al., 2010; COURCOT et al., 2012; LEE; LIM, 2006; TRAVIS et al., 2011; VOORTMAN et al., 2007). Assim, a indução da morte imunogênica neste modelo apresenta um importante potencial terapêutico.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- O CHY-1 é um novo protótipo de inibidor da enzima Pcyt2 e candidato a fármaco para o tratamento de CPNPC;
- O CHY-1 mais potente na indução de morte celular de células de CPNPC que seu protótipo, a miltefosina, e que outro inibidor da enzima Pcyt2 (a meclizina);
- O CHY-1 tem atividade preferencial em células malignas, quando comparado à miltefosina;
- O CHY-1 nas linhagens humanas A549 e NCI-H460 apresenta a apoptose como um mecanismo secundário de citotoxicidade, sendo a morte independente de caspases possivelmente a principal via de morte celular;
- Nas células humanas, o tratamento com CHY-1 resultou em alterações morfológicas e funcionais das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, bem como o estabelecimento de um ambiente com acúmulo de EROs;
- O CHY-1 altera a produção de surfactante da célula A549;
- Na linhagem murina, LL/2, a apoptose induzida pela via mitocondrial apresenta maior importância;
- O aumento da externalização de calreticulina nas células A549 e LL/2 é um indicativo de que o CHY-1 gera um dos sinais que pode induzir estas células à morte imunogênica;

REFERÊNCIAS*

ACKERSTAFF, E.; GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z.M. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? **J Cell Biochem.**, v. 1590, n. 3, p. 525-533, 2003.

ADKINS, I.; FUCIKOVA, J.; GARG, A.D.; AGOSTINIS, P. et al. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 12, p.e968434, 2015.

ALAM, M.M.; JOH, E.H.; PARK, H.; KIM, B. et al. Synthesis, characterization and Akt phosphorylation inhibitory activity of cyclopentanecarboxylate-substituted alkylphosphocholines. **Bioorg Med Chem.**, v. 21, n. 7, p. 2018-2024, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015. **Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures 2015-2016.** Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-045101.pdf>. Acesso em: 31, ago, 2015.

APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F. TESNIERE, A. OBEID, M. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat Med.**, v. 13, n. 9, p. 1050-1059, 2007.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BAKOVIC, M.; FULLERTON, M.D.; MICHEL, V. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Biochem Cell Biol.**, v. 85, n. 3, p. 283-300, 2007.

BECKER, T.; HORVATH, S.E.; BÖTTINGER, L.; GEBERT, N. et al. Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 6, p. 4158-4173, 2013.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BEZU, L.; GOMES-DE-SILVA, L.C.; DEWITTE, H.; BRECKPOT, K. et al. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. **Front Immunol.**, v. 6, n.187, p. 1-11, 2015.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASKY, T.M.; DARKE, A.K.; SONG, X. et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. **J Natl Cancer Inst.**, v. 105, n. 15, p. 1132-1141, 2013.

BRECHBUHL, H.M.; GOULD, N.; KACHADOURIAN, R.; RIEKHOF, W.R. et al. Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-binding Cassette Protein ABCG2. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 22, p. 16582-16587, 2010.

CHANDRASEKARAN, S.; MARSHALL, J.R.; MESSING, J.A.; HSU, J.W. et al. TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells cultured as 3D spheroids. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111487, 2014.

COURAGE, C.; BUDWORTH, J.; GESCHER, A. Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. **Br J Cancer**, v. 4, p. 697-704, 1995.

COURCOT, E.; LECLERC, J.; LAFITTE, J.J.; MENSIER, E. et al. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. **Drug Metab Dispos.**, v. 40, n. 10, p. 1953-1965, 2012.

CULLIS, P.R.; DE KRUIJFF, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 559, p. 399-420, 1979.

DAMIÃO, M.C.F.C.B.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, A.K.; TEIXEIRA, S.F. et al. Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Approach. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 347, n.12, p. 885-895, 2014.

DAVIDSON, M.R.; GAZDAR, A.F.; CLARKE, B.E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **J Thorac Dis.**, v. 5, suppl. 5, p. S463-S478, 2013.

DECLERCK, S.; VANSTEENKISTE, J. Immunotherapy for lung cancer: ongoing clinical trials. **Future Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 91-105, 2014.

DE JONG, E.C.; SMITS, H.H.; KAPSENBERG, M.L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. **Springer Semin Immunopathol.**, v. 26, n. 3, p.289-307, 2015.

DEVAUX, P.F. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v. 21, p. 417-439, 1992.

DZOPALIC, T.; RAJKOVIC, I.; DRAGICEVIC, A.; COLIC, M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. **Immunol Res.**, v. 52, n. 1-2, p. 20-33, 2012.

EMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; YAMAJI, A. et al. Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, n. 23, p. 12867-12872, 1996.

EMOTO, K.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; KARASUYAMA, H.; INOUE, K. et al. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. **Exp Cell Res.**, v. 232, n. 2, p. 430-434, 1997.

EMOTO, K.; UMEDA, M. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. **J Cell Biol.**, v. 149, n. 6, p. 1215-1224, 2000.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1831, n. 3, p. 523-532, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.** Disponível em: www.globocan.iarc.fr. Acesso em: 31, ago, 2015.

FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; MENDONÇA FILHO, O. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 1, p. 95-104, 2012.

FERREIRA, A.K.; FREITAS, V.M.; LEVY, D.; RUIZ, J.L. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **PLoS One**, v. 8, n. 3 p. e57937, 2013.

FULLERTON, M.D.; HAKIMUDDIN, F.; BAKOVIC, M. Developmental and metabolic effects of disruption of the mouse CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase gene (Pcyt2). **Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 27, p. 3327-3336, 2007.

FULLERTON, M.D.; HAKIMUDDIN, F.; BONEN, A.; BAKOVIC, M. The development of a metabolic disease phenotype in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice. **Biol Chem.**, v. 284, n. 38, p. 25704-2513, 2009.

GAJATE, C.; MATOS-DA-SILVA, M.; DAKIR, EL-H.; FONTERIZ, R.I., et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. **Oncogene**, v. 31, n. 21, p. 2627-2639, 2011.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3860-3863, 2001.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Curr Drug Metab.**, v. 3, n. 5, p. 491-525, 2002.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 711-719, 2007.

GIBELLINI, F.; SMITH, T.K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 414-428, 2010.

GLUNDE, K.; JIE, C.; BHUJWALLA, Z.M. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. **Cancer Res.**, v. 64, n. 12, p. 4270-4276, 2004.

GLUNDE, K.; ACKERSTAFF, E.; MORI, N.; JACOBS, M.A. et al. Choline phospholipid metabolism in cancer: consequences for molecular pharmaceutical interventions. **Mol Pharm.**, v. 3, n. 5, p. 496-506, 2006.

GOHIL, V.M.; ZHU, L.; BAKER, C.D.; CRACAN, V. et al. Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 49, p. 35387-35395, 2013.

GUBIN, M.M.; ZHANG, X.; SCHUSTER, H.; CARON, E. et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 577-581, 2014.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. **Int J Mol Sci.**, v. 16, n.1, p. 924-949, 2015.

IGAL, R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1509-1515, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2014. **Ministério da Saúde, Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>. Acesso em: 31, ago, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2013. **Atlas On-line de Mortalidade.** Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 31, ago, 2015.

IORIO, E.; MEZZANZANICA, D.; ALBERTI, P.; SPADARO, F. et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. **Cancer Res.**, v. 65, n. 20, p. 9369-9376, 2005.

JØRGENSEN, A.; YOUNG, J.; NIELSEN, J.E.; JOENSEN, U.N. et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche. **Br J Cancer**, v.110, n. 10, p. 2604-2614, 2014.

KAMINSKY, R. Miltefosine Zentaris. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 3, n. 4, p. 550-554, 2002.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; ZITVOGEL, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annu Rev Immunol.**, v. 31, p. 51-72, 2013.

LAMB, C.A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 12, p. 759-774, 2013.

LEE, E.; LIM, S.J. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. **Arch Pharm Res.**, v. 29, n. 11, p. 1018-1023, 2006.

LEMJABBAR-ALAOUI, H.; HASSAN, O.; YANG, Y.W.; BUCHANAN, P. Lung cancer: Biology and treatment options. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1856, n. 2, p. 189-210, 2015.

LIEBER, M; SMITH, B; SZAKAL, A et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **Int. J. Cancer**, v. 17, p. 62-70, 1976.

LI, Z.; AGELLON, L.B.; ALLEN, T.M.; UMEDA, M. et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. **Cell Metab.**, v. 3, n. 5, p. 321-31, 2006.

MARIEN, E.; MEISTER, M.; MULEY, T. et al. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. **Int J Cancer.**, v. 137, n. 7, p. 1539-1548, 2015.

MARCONESCU, A.; THORPE, P.E. Coincident exposure of phosphatidylethanolamine and anionic phospholipids on the surface of irradiated cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1778, n.10, p. 2217-2224, 2008.

MENENDEZ, J.A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, p. 763-777, 2007.

MOLLINEDO, F.; FERNÁNDEZ-LUNA, J.L.; GAJATE, C.; MARTÍN-MARTÍN, B. et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Cancer Res.**, v. 57, n. 7, p. 1320-1328, 1997.

MOLLINEDO, F.; GAJATE, C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. **Drug Resist Updat.**, v. 9, n. 1-2, p. 51-73, 2006.

NARANG, A.S.; DESAI, D.S. Anticancer drug development. In *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. **Springer**: Berlin, Germany, p. 49–92, 2009.

NOWAK, A.K.; ROBINSON, B.W.; LAKE, R.A. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 15, p. 4490-4496, 2003.

OSMAN, C.; VOELKER, D.R.; LANGER, T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. **J Cell Biol.**, v. 192, n. 1, p. 7-16, 2011.

OVERINGTON, J.P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, L.A. How many drug targets are there? **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, n. 12, p. 993-996, 2006.

PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K.F.M.; JORGE, S.D.; ZINGALES, B. et al. Designing and exploring active N--[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three Trypanosoma cruzi strains more prevalent in Chagas disease patients. **Eur J Med Chem.**, v. 96, p. 330-339, 2015.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265-277, 2012.

PANARETAKIS, T.; KEPP, O.; BROCKMEIER, U.; TESNIERE, A. et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. **EMBO J.**, v. 28, n. 5, p. 578-590, 2009.

PAVLOVIC, Z.; BAKOVIC, M. Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis: The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2). **Int J Mol Sci.**, v. 14, n. 2, p. 2529-2550, 2013.

PARIS, C.; BERTOGLIO, J.; BRÉARD, J. Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells. **Apoptosis**, n. 12, v. 7, p. 1257-1267, 2007.

PLANTING, A.S.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. **Eur J Cancer**, v. 29, p. 518-519, 1993.

RAGHAVAN, S.; WARD, M.R.; ROWLEY, K.R.; WOLD, R.M. et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecol Oncol.**, v. 138, n. 1, p. 181-189, 2014.

RAJENDRAN, L.; SIMONS, K. Lipid rafts and membrane dynamics. **J Cell Sci.**, v. 118, n. Pt 6, p. 1099-1102, 2005.

RAMOS, B.; EL MOUEDDEN, M.; CLARO, E.; JACKOWSKI, S. Inhibition of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by C(2)-ceramide and its relationship to apoptosis. **Mol Pharmacol.**, v. 62, n. 5, p. 1068-1075, 2002.

RAMOS, R.N.; DE MORAES, C.J.; ZELANTE, B. et al. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? **Clin Dev Immunol.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

RIDSDALE, R.; TSEU, I.; WANG, J.; POST, M. Functions of membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in alveolar type II cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 43, n. 1, p. 74-87, 2010.

ROCKENFELLER, P.; KOSKA, M.; PIETROCOLA, F. et al. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. **Cell Death Differ.**, v. 22, n. 3, p. 499-508, 2015.

RYSMAN, E.; BRUSSELMANS, K.; SCHEYS, K. et al. *De novo* lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res.**, v. 70, p. 8117-8126, 2010.

SCOTT, K.F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J. et al. Emerging roles for phospholipase a2 enzymes in cancer. **Biochimie**, v. 92, p. 601-610, 2010.

SIGNORELL, A.; GLUENZ, E.; RETTIG, J.; SCHNEIDER, A. et al. Perturbation of phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial morphology and cell-cycle progression in procyclic-form *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol.**, v. 72, p. 1068-1079, 2009.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin.**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SPONAAS, A-M.; CADMAN, E.T.; VOISINE, C.; HARRISON, V. et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 6, p. 1427-1433, 2006.

SWINNEN, J.V.; VAN VELDHOFEN, PP; TIMMERMANS, L. et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 302, p. 898-903, 2003.

STAFFORD, J.H.; THORPE, P.E. Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium. **Neoplasia**, v. 13, n. 4, p. 299-308, 2011.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, v. 37, supplement 1, p. S53–S60, 2007.

STEINMAN, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol.**, v. 30, p. 1-22, 2012.

TASSEVA, G.; BAI, H.D.; DAVIDESCU, M.; HAROMY, A. et al. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 3, p.273-277, 2004.

TRAVIS, W.D. Pathology of lung cancer. **Clin Chest Med.**, v. 32, n. 4, p. 669-692, 2011.

TRAVIS, W.D.; BRAMBILLA, E.; RIELY, G.J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. **J Clin Oncol.** v. 31, n. 8, p. 992-1001, 2013.

TEIXEIRA, S.F.; DE AZEVEDO, R.A.; SALOMON, M.A.C.; JORGE, S.D. et al. Synergistic anti-tumor effects of the combination of a benzofuroxan derivate and sorafenib on NCI-H460 human large cell lung carcinoma cells. **Biomed Pharm.** v. 68, p. 1-8, 2014.

VAN BLITTERSWIJK W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. **Curr Pharm Des.** v. 14, n. 21, p. 2061-74, 2008.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, n. 3, p. 663-74, 2013.

VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res.** v. 49, n. 7, p.1377-87, 2008.

VANCE, D.E.; VANCE, J.E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. **J Lipid Res.** v. 50, Suppl:S132-7, 2009.

VANCE, J.E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, n. 3, p. 543-54, 2013.

VAN DER LUIT, A.H.; VINK, S.R.; KLARENBECK, J.B.; PERRISSAUD, D. et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Mol Cancer Ther.** v. 6, n. 8, p. 2337-45, 2007.

VANSTEENKISTE, J.; DE RUYSSCHER, D.; EBERHARDT, W.E.; LIM, E. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.** v. 24, Suppl 6, p. vi89-98, 2013.

VERWEIJ, J.; PLANTING, A.; VAN DER BURG, M. et al. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 118, n. 606-608, 1992.

VOORTMAN, J.; RESENDE, T.P.; ABOU, E.L.; HASSAN, M.A. et al. TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. **Mol Cancer Ther.**, v. 6, n. 7, p. 2103-2112, 2007.

WANG, M.; CAO, J.X.; LIU, Y.S.; XU, B.L. et al. Evaluation of tumour vaccine immunotherapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic meta-analysis. **BMJ Open**, v. 5, n. 4, p. e006321, 2015.

WEINHOLD, P.A.; ROUNSIFER, M.E.; CHARLES, L.; FELDMAN, D.A. Characterization of cytosolic forms of CTP: choline-phosphate cytidylyltransferase in lung, isolated alveolar type II cells, A549 cell and Hep G2 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1006, p. 299-310, 1989.

WELLER, K.; ARTUC, M.; JENNINGS G.; FRIEDRICHSON, T. et al. Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. **J Invest Dermatol.**, v. 129, n. 2, p.496-498, 2009.

YOSIFOV, D.Y.; KALOYANOV, K.A.; GUENOVA, M.L.; PRISADASHKA, K. et al. Alkylphosphocholines and curcumin induce programmed cell death in cutaneous T-cell lymphoma cell lines. **Leuk Res.**, v. 38, v. 1, p. 49-56, 2014.

ZARNANI, A.H.; MOAZZENI, S.M.; SHOKRI, F.; SALEHNIA, M. et al. Kinetics of murine decidual dendritic cells. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 275-283, 2007.

ZENG, G.; ALDRIDGE, M.E.; TIAN, X.; SEILER, D. Dendritic cell surface calreticulin is a receptor for NY-ESO-1: direct interactions between tumor-associated antigen and the innate immune system. **J Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3582-9, 2006.

ZIMMERMANN, L.J.; HOGAN, M.; CARLSON, K.S. et al. Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. **Am J Physiol.**, v. 264, p. L575-L580, 1993.

ZHU, L.; BAKOVIC, M. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidylyltransferase-Pcyt2 activity. **Biochem Cell Biol.**, v. 90, n. 2, p.188-199, 2012.