UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal
DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana

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

Programa de: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo
2016

MANUELA GARCIA LAVELI DA SILVA

Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal
DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana

São Paulo

2016

Dedico, não apenas este trabalho, mas todas as minhas conquistas aos meus pais e ao meu marido que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos, que me ensinaram a nunca desistir e a ser uma pessoa humilde e a sempre lutar pelos meus sonhos. Obrigada por todos os seus ensinamentos e por todo o amor que me dedicaram. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e pelas graças alcançadas. Agradeço pelas pessoas especiais que colocastes em meu caminho.

A meu amado marido, por todo amor, carinho e dedicação. Obrigada pelo incentivo e pelo apoio em todas as horas. Tenho certeza que esta foi uma etapa concluída com sucesso e devo grande parte dele a você. Te amo!

Aos meus pais, avós e irmão, agradeço pelo carinho, amor e compreensão. Obrigada por serem tão especiais em minha vida. Amo vocês!

Ao meu orientador e amigo Professor Durvanei, com quem tenho trilhado cinco anos de muitos ensinamentos e incentivos. Agradeço de coração por todas as oportunidades concedidas e pelo apoio. Muito obrigada!

Aos meus amigos queridos do laboratório Thais, Larissa, Aline e Antenor por todo carinho e companheirismo nestes últimos anos. Obrigada pelo apoio em todas as horas e que venham mais anos de pesquisa e amizade!

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, agradeço pelo apoio e pela amizade de vocês Arthur, Daniel, Rosely, Roberto.

Amo a liberdade, por isso deixo as coisas que amo livre.

Se elas voltarem é porque as conquistei.

Se não voltarem é porque nunca as possuí.

John Lennon

(1940-1980)

Sumário

RESUMO	3
ABSTRACT	5
1- INTRODUÇÃO	7
1.1. Neoplasia.....	7
1.2. Câncer de mama	10
1.3. Células de adenocarcinoma de mama humana – MCF7	12
1.4. Fosfolípidos antineoplásicos	12
1.5. Fosfoetanolamina sintética	15
1.6. Formulação Lipossomal - DODAC.....	17
2- OBJETIVO.....	19
2.1. Objetivos específicos	19
3- MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Formulação lipossomal Pho-s / DODAC	20
3.1.1. Formulação da Pho-s	20
3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC	20
3.1.3. Preparação das dispersões sonicadas.....	20
3.1.4. Preparação das amostras de Pho-s /DODAC	21
3.1.5. Medidas de absorção óptica	21
3.2. Cultura Celular	21
3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	22
3.4. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados	22
3.5. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de fluxo	23
3.6. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase	23
3.7. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser	24
3.7.1. Marcação com fluorocromo acridine-orange	24
3.7.2. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo rodamina-123	24
3.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI.....	24
3.9. Avaliação da expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo	25
3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	26
3.11. Ensaio de proliferação celular por CFSE-DA.....	27
3.12. Análises estatísticas.....	28
4- RESULTADOS	29
4.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	29

4.1.1. Avaliação da viabilidade celular com o tratamento da Pho-s	29
4.1.2. Avaliação da viabilidade celular do tratamento com DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s	38
4.2. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados	40
4.3. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	43
4.3.1. Grupo tratado com fosfoetanolamina sintética (Pho-s)	43
4.3.2. Grupo controle positivo – Doxorrubicina e associações	48
4.3.3. Grupo tratado com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s	51
4.4. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase	54
4.5. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser	58
4.5.1. Marcação com fluorocromo acridine-orange	58
4.5.2. Marcação da mitocôndria através do fluorocromo rodamina 123	60
4.6. Análise dos marcadores/receptores de membrana e nucleares por citometria de fluxo	62
4.7. Potencial elétrico da membrana mitocondrial	72
4.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI por citometria de fluxo	73
4.9. Ensaio de proliferação CFSE-DA	76
5- DISCUSSÃO	78
6- CONCLUSÃO	93
REFERENCIAS	95

RESUMO

Silva MGL. *Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A Fosfoetanolamina sintética (Pho-s) é uma molécula análoga aos fosfolipídios de membrana celular com propriedades antitumorais, antiinflamatórias e antiproliferativas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu diversos estudos in vitro e in vivo com a Pho-s mostrando resultados satisfatórios quanto à sua eficácia antitumoral. Neste estudo foram avaliados os efeitos antitumorais in vitro da Pho-s e da formulação lipossomal DODAC/Pho-s em linhagem de adenocarcinoma de mama humana (MCF7). Os efeitos da citotoxicidade da Pho-s na linhagem tumoral MCF7 foi avaliado pela determinação da viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT e os valores obtidos da IC50% foram de 37,2; 25,8; 1,8 mM nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Com o tratamento de DODAC vazio nas células MCF7 a IC50% foi de 0,3 mM e com o tratamento de DODAC/Pho-s a IC50% de 1,8 mM, após 24 horas de tratamento. A produção de radicais livres lipoperoxidados foi avaliada pela formação do TBARS em células MCF7, tratadas por 24, 48 e 72 horas com Pho-s, não mostrando diferença significativa nos valores de lipoperoxidação. As alterações nas distribuições das populações celulares nas fases do ciclo celular avaliadas por citometria de fluxo mostraram um aumento do DNA fragmentado após 48 horas e parada na fase G2/M após 24 horas. As alterações nos arranjos celulares foram avaliadas por meio da marcação com os fluorocromos acridine-orange e rodamina 123 por microscopia confocal a laser, no qual foi observada a mudança na morfologia, fragmentação de membranas e perdas da projeção de prolongamentos citoplasmáticos. A indução de células em senescência foi avaliada pela atividade enzimática com a enzima β -galactosidase, mostrando uma diminuição das células senescentes nas maiores concentrações de tratamento com a Pho-s e com o DODAC/Pho-s. Diversos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, stress, angiogênese e receptores hormonais e o potencial mitocondrial foram

avaliados por citometria de fluxo. A atividade apoptótica das células tumorais de mama foi avaliada pela Anexina V/PI, mostrando um aumento, principalmente, da apoptose tardia e seus ensaios de proliferação celular pelo teste com o CFSE-DA resultou na diminuição significativa da capacidade de proliferação celular. O tratamento das células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 com a Pho-s mostrou ser um composto de natureza fosfolipídica com potencial promissor antitumoral.

Descritores: adenocarcinoma de mama; linhagem tumoral MCF7; fosfoetanolamina sintética; formulação lipossomal; apoptose; ciclo celular.

ABSTRACT

Silva MGL. *Antitumor evaluation of synthetic phosphoethanolamine and liposomal formulation DODAC/synthetic phosphoethanolamine in human breast tumor cells*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Synthetic Phosphoethanolamine (Pho-s) is a molecule analogous to cell membrane phospholipids with antitumor, anti-inflammatory and antiproliferative effects. Our research group has developed several *in vitro* and *in vivo* studies with Pho-s showing satisfactory results regarding its antitumor efficacy. In this project we evaluated the *in vitro* antitumor effects of Pho-s and the liposomal formulation DODAC/Pho-s in human breast adenocarcinoma line (MCF7). The effects of the Pho-s cytotoxicity on the MCF7 tumor cell line were evaluated by determining the cell viability by the MTT colorimetric test and the concentration of IC₅₀% were 37.2; 25.8; 1.8 mM in the 24, 48 and 72 hour periods, respectively. With DODAC treatment in MCF7 cells the IC₅₀% was 0.3 mM and the treatment of DODAC/Pho-s at IC₅₀% of 1.8 mM after 24 hours of treatment. The production of lipoperoxides radicals was evaluated by the formation of TBARS in MCF7 cells, treated for 24, 48 and 72 hours with Pho-s, showing no significant difference in lipoperoxidation values. Changes in the cell population distributions in the cell cycle phases evaluated by flow cytometry showed an increase of the fragmented DNA after 48 hours and stop at the G₂/M phase after 24 hours. Alterations in the cellular arrangements were evaluated by means of the labeling with the fluorochromes acridine-orange and rhodamine 123 using laser confocal microscopy, in which the change in morphology, membrane fragmentation and loss of the projection of cytoplasmic prolongations were observed. Senescent cell induction was evaluated by enzymatic activity with the β -galactosidase enzyme, showing a decrease in senescent cells at the highest concentrations of treatment with Pho-s and DODAC/Pho-s. Several control markers and cell cycle progression, stress, angiogenesis and hormone receptors and mitochondrial potential were evaluated by flow cytometry. The apoptotic activity of breast tumor cells was evaluated by Annexin V/PI, showing an increase mainly of late apoptosis and

cell proliferation assays by the CFSE-DA with the Pho-s by flow cytometry, resulting in significant decrease of cell proliferation. Treatment of MCF 7 human breast adenocarcinoma cells with Pho-s has been shown to be a phospholipid-type compound with promising antitumor potential.

Descriptors: breast adenocarcinoma; MCF7 tumor line; synthetic phosphoethanolamine; liposomal formulation; apoptosis; cell cycle.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Neoplasia

O câncer é o resultado de uma série de alterações que controlam o crescimento, maturação e diferenciação celular. Estima-se que em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões e até 2030 o câncer deverá alcançar a maior taxa de mortalidade comparada a outras doenças, até então consideradas como de maior ocorrência (WHO, 2008; JEMAL et al., 2008). A cada ano, o câncer provoca cerca de 8 milhões de mortes no mundo. Estima-se que um terço dessas mortes poderia ter sido evitado com mais prevenção, detecção precoce e acesso aos tratamentos existentes. O INCA estima cerca de 600 mil casos novos da doença para 2016, o qual deve estar relacionado ao aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização (INCA, 2016).

De todos os casos de tumores, 80 a 90% deles estão associados a fatores ambientais como, cigarro, exposição excessiva ao sol, alguns vírus. O envelhecimento traz mudanças genéticas nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna, porém o surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores (SONDAK; TAYLOR; SABEL, 2004).

Os tumores são tecidos complexos constituídos por vários tipos de células distintas que participam das interações heterotípicas umas com as outras (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

As seis *hallmarks* do câncer distintas e de capacidades complementares que permitem o crescimento do tumor metastático e a disseminação continua fornecendo uma base sólida para a compreensão à biologia do câncer (Figura 01).

Figura 01 – Esquema das alterações existentes no processo de carcinogênese. *The hallmarks of the cancer.* Adaptado de Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 2011.

Indiscutivelmente a característica mais fundamental das células tumorais envolve a sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. Os tecidos normais cuidadosamente controlam a produção e a liberação de sinais da promoção do crescimento celular que instrui a entrada na progressão por meio do crescimento e divisão do ciclo celular, assegurando assim uma homeostase do número de células e, assim, a manutenção da arquitetura e função do tecido normal. As células tumorais, por meio destes sinais de desregulação, passam a controlar seu próprio crescimento e sua divisão celular. Os sinais que permitem são transmitidos em grande parte, por fatores de crescimento que se ligam à superfície celular dos receptores, tipicamente contendo tirosina-quinase intracelular nos seus domínios. Esta possui a função de emitir sinais via intracelular ramificada às vias de sinalização que regulam a progressão por meio do ciclo celular, bem como o crescimento de células; muitas vezes esses sinais ainda influenciam outras propriedades biológicas das células, tais como a sua sobrevivência e o metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O ciclo celular é controlado por uma rede de regulação, as características gerais que são conservadas a partir de levedura para humanos (MORGAN,

2007). Ele prossegue por meio de transições regulamentadas garantindo que os eventos específicos fiquem de uma forma ordenada. A descoberta de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs), a elucidação dos mecanismos subjacentes de controle transcricional, a sinalização do ponto de verificação e a caracterização de vias reguladoras ubiquitina ligase revelaram que os princípios reguladores do ciclo celular geral são compartilhados entre eucariotas (BERTOLI et. al., 2013).

As mudanças dinâmicas na expressão gênica como uma função da progressão do ciclo celular são reguladas por atividade específica de CDKs. Estas variações em níveis de expressão gênica controlam a acumulação de várias ciclinas e, assim regula a atividade das CDKs, conduzindo assim a progressão do ciclo celular. Os genes regulados durante o ciclo celular codificam várias proteínas. A transcrição regulada pelo ciclo celular pode ser agrupada em três principais fases; G0/G1, G2/M, Síntese (FUKUOKA et. al., 2013).

O controle da divisão celular é regulado por um complexo com a interação de vários genes que controlam o ciclo celular, com ácido desoxirribonucléico (DNA) de replicação (fase S) e mitose como principais pontos de verificação (Figura 02). A progressão do ciclo é controlada principalmente por ciclinas, quinases associadas e seus inibidores. Retinoblastoma (Rb) e p53 são importantes genes supressores envolvidos no G1/S controle checkpoint.

Figura 02 – Mecanismo de regulação do ciclo celular. Os pontos de verificação no sistema de controle do ciclo celular asseguram que processos-chave no ciclo ocorram na sequência apropriada. Fonte: Alberts, B. 2011.

1.2. Câncer de mama

O aumento das taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama está associado a diferentes fatores de risco. A interação de fatores genéticos com estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente estão envolvidos no seu desenvolvimento (JOHNSON-THOMPSON; GUTHRIE, 2000). O câncer de mama é tipo mais frequente nas mulheres em quase todas as regiões do país, nas regiões Sul e Sudeste são 71 casos a cada 100 mil mulheres, no Centro-Oeste são 51 casos a cada 100 mil e no Nordeste são 37 casos a cada 100 mil. Na região Norte o câncer de mama é o segundo mais incidente, sendo 21 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Os principais fatores de risco do câncer de mama em mulheres são a idade, infertilidade, idade da primeira gravidez, menopausa tardia, uma mutação herdada no gene BRCA1/BRCA2 e uso de hormônios (estrogênio e progesterona) em fase pós-menopausa (DONEPUDI et al., 2015).

O parênquima mamário é constituído de ácinos e um lúmen central composto por uma contínua camada de células epiteliais luminais, as quais são envoltas por uma camada de células mioepiteliais. Essa estrutura de dupla camada é encerrada na membrana basal. A matriz extracelular fornece sustentação estrutural e informação contextual. E este mesmo macroambiente orienta as células epiteliais a estabelecerem as extremidades apical e basal numa superfície intacta e polarizada que mantêm o seu estado diferenciado, sendo o contato físico adquirido por meio da combinação de diversas formas de junções (BISSEL; RADISKY, 2001).

No desenvolvimento e remodelamento mamário, assim como na origem e progressão do câncer de mama, há a participação de diversos fatores, como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, moléculas de matriz extracelular e metaloproteinases de matriz (BISSEL; RADISKY, 2001). O estudo do câncer mamário, assim como de outros tipos de cânceres, tem mostrado que esta patologia possui alta heterogeneidade nos diferentes tipos celulares e suas origens no interior dos tecidos. Além disso, essa diversidade se estende à desregulação de várias vias que governam fundamentalmente processos como morte, proliferação e diferenciação (KREEGER, 2010). Isto exige cada vez mais o desenvolvimento de diferentes frentes de pesquisas, as quais visam trazer à luz maiores informações sobre esta doença.

Os marcadores moleculares são utilizados para diagnosticar e determinar o estágio do câncer e seu possível tratamento. Em geral, eles podem ser classificados como marcadores de tecido; marcadores genéticos; soro-marcadores. Um exemplo de marcador é o gene supressor de tumor p53, que expressa a proteína p53, a qual é responsável pelo mecanismo de controle do câncer. A superexpressão da p53 é vista no câncer de mama e em outros tumores, tornando-a um prognóstico da doença. (DONEPUDI et al., 2015)

A resistência de células tumorais a quimioterapia constitui um importante obstáculo clínico para o sucesso da terapia do câncer. Um número de mecanismos pelos quais as células tumorais de mama humana se tornam resistentes a agentes quimioterapêuticos têm sido descritos, por exemplo, a ausência de caspase-3 em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 conduz à perda da capacidade de levar a célula à apoptose normal e

dispõe de um possível mecanismo para provocar quimioresistência (YANG, 2011).

1.3. Células de adenocarcinoma de mama humana – MCF7

O câncer de mama foi considerado um tumor heterogêneo por meio de observações morfológicas. Sua classificação foi baseada nos seguintes parâmetros: tipo histológico, grau do tumor, estado do linfonodo e a presença de marcadores tais como receptor de estrogênio (ER) e, mais recentemente, o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). O desenvolvimento do perfil molecular usando microarrays de DNA provou esta heterogeneidade, demonstrado através do perfil de expressão gênica e expressão imunohistoquímica do ER α , receptor de progesterona (PR) e HER2, os quais classificam o câncer de mama em cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2, basal e normal (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

A linhagem de adenocarcinoma de mama humana MCF7 é classificada como luminal A, pois possui um imunoperfil com HER2 negativo, ER α positivo e PR negativo ou positivo.

A linhagem celular MCF7 foi obtida a partir de um derrame pleural retirado de uma paciente com câncer de mama metastático. A paciente de 69 anos de idade tinha sofrido uma mastectomia da mama direita devido a um tumor benigno e uma mastectomia radical da mama esquerda por um adenocarcinoma maligno, em seguida o cultivo de células foi iniciado (LEVENSON; JORDAN, 1997).

1.4. Fosfolípidos antineoplásicos

As membranas biológicas são compostas por três componentes fundamentais: os fosfolípidios (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolípidios de membrana são estruturas formadas por cadeias hidrofóbicas no interior da bicamada lipídica e com cabeça polar situada no espaço citoplásmico aquoso (Figura 03). Os FLs de membrana podem formar ligações não-covalentes com proteínas periféricas de membrana, muitas vezes por atrações eletrostáticas, estabelecendo o modelo conhecido de mosaico fluído. Os FLs exercem várias funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma grande variedade de processos

catalíticos e atuando como doadores para a síntese de macromoléculas. Além de ativamente influenciar na comunicação entre o meio intra e extracelular pela transdução de sinal celular e a interação lipídeo/proteína (VAN MEER et al., 2008).

Figura 03 – Estrutura de um fosfolípido de membrana.

Fonte: Manuela Garcia Laveli da Silva

Munder et al. 1973 demonstraram pela primeira vez, que entre alguns análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquil-derivados, apresentavam efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais (MUNDER et al., 1973; ANDREESEN et al., 1978). Atualmente, estes éteres derivados da lisofosfatidilcolina pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade citostática. Contudo, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os alquilfosfolídeos antitumorais (AFTs) não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto celular, e sim, seus efeitos antitumorais estão relacionados com a modificação do turnover na membrana celular (JIMÉNEZ -LOPES et al., 2010).

Os lipídios antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes grupos: o primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolípidios, chamados de éter lipídios antitumorais ou análogos AFTs. Sua estrutura contém ligações éter no

glicerol dos fosfolipídios, o principal protótipo da classe é o 1-O-octadecil-2-Ometil-rac-glicero-3 fosfocolina (ET-18-OCH₃; Edelfosina). O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina, que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formada por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (BUSTO et al., 2008; MOLLINEDO et al., 2010;).

O mecanismo de ação dos AFTs é direcionado a membrana celular, em especial das células tumorais. Embora seu mecanismo não esteja totalmente compreendido, foi demonstrado que seus efeitos são dependentes da incorporação na membrana celular, devido a sua longa cadeia apolar de hidrocarbonetos que facilita sua inserção na membrana celular (NGWENYA et al., 1992). Uma das primeiras hipóteses para explicar a seletividade dos AFTs em células tumorais foi levantada com base que, as células tumorais não apresentavam a enzima alquil-mono-glicero oxidase, que é uma oxidase de função mista que hidrolisa o átomo do carbono α da cadeia de carbonos do éter gliceril, envolvida no metabolismo do éter lipídico (TAGUCHI; ARMAREGO, 1998).

Os FLs fazem parte da fração não polar de amostras biológicas e são investigados do ponto de vista dos teores de ácidos graxos em conjunto com lipídios apolares. PLs são formados por um esqueleto de glicerol com duas moléculas de éter ligado a ácidos graxos (parte hidrofóbica), o qual o grupo fosfato funcional está ligado, o que é frequentemente modificado por uma estrutura de baixo peso molecular adicional (parte hidrofílica, por exemplo, serina, etanolamina, glicerol, colina, etc) (BIERHANZL et al., 2015). A fosfatidiletanolamina é o fosfolipídio mais abundante em células eucarióticas.

A fosfatidiletanolamina (PE) possui funções importantes em processos celulares, tais como a fusão da membrana, do ciclo celular, autofagia e a apoptose. PE pode ser produzida por meio de três principais vias bioquímicas: através da via Kennedy CDP-etanolamina, fosfatidilserina mitocondrial (PS) via descarboxilação (catalisada por PS descarboxilase, PSD) e acilação de lisina (catalisada por lisina aciltransferase). O substrato etanolamina entra na via Kennedy e é convertido em fosfoetanolamina (P-Etn) via fosforilação dependente de ATP pela ação da quinase de etanolamina (EK) (Figura 04) (PAVLOVIC, 2014).

Figura 04 – Etapas da biossíntese da Fosfatidiletanolamina e Fosfoetanolamina. A fosforilação da quinase de etanolamina por etanolamina (EK) para produzir fosfoetanolamina (P-Etn) é seguida pelo CTP: fosfoetanolamina citidililtransferase (Pcyt2) produção mediada pela CDP-etanolamina. A reação final desta via é executada por CDP-etanolamina: 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase (HPT) para produzir PE. As enzimas análogas de CDP-colina da via de Kennedy incluem, colina quinase (CK), CTP: colina citidililtransferase (Pt1, CCT) e CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfotransferase de colina (CPT). No fígado fosfatidiletanolamina (PE) é transformado em fosfatidilcolina (PC) pela ação de fosfatidiletanolamina N-metiltransferase (TMEP). PE pode ser produzido na mitocôndria por descarboxilação de fosfatidilserina (PS) por PS descarboxilase (PSD). Mamíferos não sintetizam PS de novo; PS é produzido através da troca da cabeça do grupo de PE (PS sintase-2, PSS2) ou PC (PS sintase-1, PSS1). Além disso, o PE pode ser feito por ácido gordo (FA) esterificação de liso-PE com o liso-PE aciltransferase (LPEAT). Fonte: PAVLOVIC, 2014.

1.5. Fosfoetanolamina sintética

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a fosfoetanolamina sintética (Pho-s), um fosfolípídeo artificialmente fosforilado análogo aos fosfolípídeos de membrana celular capaz de modular a expressão pró-apoptótica Bad/Bax em células de melanoma murino B16F10, o que levou ao aumento da atividade da caspase-3 fosforilada, desencadeando o processo de apoptose e bloqueando

um ciclo celular na fase de síntese ou na fase G2/M, dependendo de sua concentração. O tratamento *in vivo* de camundongos portadores de melanoma B16F10 com a Pho-s resultou na inibição de crescimento tumoral, aumento da sobrevivência e redução de metástases (FERREIRA et al., 2012). Entretanto, quando testada em fibroblastos e células endoteliais humanas normais, a Pho-s não foi capaz de alterar a viabilidade ou induzir citotoxicidade (FERREIRA et al., 2011). Pho-s também resultou na inibição da formação de carcinomatose ascítica e evitou aumento dos níveis séricos de marcadores bioquímicos, pois a análise bioquímica dos camundongos BALB/c não tratados mostraram aumento na dosagem de transaminases hepáticas. Pode-se sugerir que a inibição da ascite neoplásica pela Pho-s impede insuficiência hepática (FERREIRA et al., 2012).

Pho-s é citotóxica para células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, diminuindo a viabilidade celular, acompanhada por alterações morfológicas e descolamento as células em cultura de monocamada. Além disso, células não tratadas mostraram distribuição intracelular, peri-nuclear normal da mitocôndria, enquanto que em células de adenocarcinoma de mama MCF7 tratadas com Pho-s, apresentaram profundas mudanças na morfologia mitocondrial e as mitocôndrias foram agregadas no citoplasma (FERREIRA et al., 2013).

Os fosfolipídios derivados a partir da etanolamina são componentes estruturais essenciais das membranas celulares e desempenham papéis regulatórios na divisão celular, sinalização, ativação, autofagia e fagocitose (BAKOVIC et al., 2007). A Fosfoetanolamina primária (PEA) é um substrato para diversos fosfolipídios das membranas celulares, especialmente fosfatidilcolina. (ELLISON; BEAL; MARTIN, 1987). A fosfoetanolamina foi isolada em 1963 por Outhouse, um monoéster cujo grupo R corresponde a NH₂-CH₂-CH₂ de tumores malignos bovinos, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza (OUTHOUSE, 1936). A fosfoetanolamina orgânica e a etanolamina (EA) estão presentes em grandes quantidades no cérebro normal e têm sua concentração aumentada, em até 10 vezes, em diversos tipos de tumores (PERRY et al., 1971).

1.6. Formulação Lipossomal - DODAC

Recentemente, nosso grupo tem desenvolvido diversos experimentos associando a Pho-S com as vesículas de DODAC (dioctadecildimetilamônio) e os resultados são satisfatórios quanto à eficácia da formulação lipossomal, pois apesar da eficácia já comprovada utilizando o composto Pho-s, o tratamento antitumoral poderia ser maximizado com a utilização de lipossomas e outros carreadores baseados em sistemas de entrega de drogas com o objetivo de atingir as células tumorais com maior eficiência e especificidade, além de diminuir os efeitos colaterais, uma vez que quando encapsuladas, as drogas são liberadas lentamente e o seu tempo de vida no plasma é maior, fato esse que desta forma tem apresentada melhor eficácia em modelos animais. (SHARMA et al., 1997).

Os lipídios mais utilizados na formulação de lipossomas são a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina. Os lipossomas consistem em pequenas vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas, as quais isolam um ou mais compartimento aquoso interno, do meio aquoso externo. Devido sua natureza anfótera, é possível encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas de acordo com seu grau de lipofilicidade e carga. Moléculas hidrofílicas são incorporadas na cavidade aquosa interna, enquanto que as lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão (BITOUNIS et al., 2012).

Figura 05 – Características estruturais dos tipos de lipossomas. (A) Fármaco hidrofílico no interior do lipossoma; (B) Fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; (C) Catiônico; (D) De longa circulação, com polímero hidrofílico na superfície; (E) Sítios específicos; (F) Com anticorpos ligantes; (G) Com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossomas; (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossoma catiônico.

O sal cloreto dioctadecildimetilamônio (DODAC), que é utilizado na formulação lipossomal, é obtido por cromatografia de troca iônica a partir do sal brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) em resina Dowex 21K, na forma de cloreto e recristalizado para a retirada de impurezas.

O brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) tem sido utilizado na formulação de drogas hidrofóbicas (VIEIRA et al., 2006). Os anfifílicos derivados de sais de amônio quaternário, como o DODAB e o DODAC, quando dispersos em água, tendem a se associarem, formando grandes agregados que podem assumir estruturas de bicamadas fechadas (vesículas) e com sua superfície carregada positivamente. As propriedades de organização de moléculas anfifílicas em águas são determinadas por diferentes fatores do sistema (OLIVEIRA, 2008).

2- OBJETIVO

Avaliar os efeitos antitumorais da formulação lipossomal DODAC com a Fosfoetanolamina sintética (Pho-s) em linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humana, MCF7.

2.1. Objetivos específicos

Em todos os experimentos foram realizadas as seguintes condições de tratamento: Grupos Tratados – fosfoetanolamina sintética; DODAC vazio; DODAC/Pho-s; Grupo Controle – veículo/meio, sendo realizados os seguintes experimentos:

- Determinação da atividade citotóxica (IC50%) pelo ensaio colorimétrico MTT;
- Determinação da formação dos produtos da peroxidação de lipídios polissaturados;
- Análise das fases do ciclo celular das células tumorais por citometria de fluxo;
- Avaliação da indução de senescência celular pela ação enzimática da β -galactosidase;
- Avaliação por microscopia confocal a laser as alterações morfológicas de toxicidade causadas pelo composto;
- Avaliação da atividade apoptótica das células tumorais pela marcação com Anexina V/PI;
- Avaliação das vias da apoptose dependentes ou não das atividades das Caspase-3 e 8 ativas por citometria de fluxo;
- Avaliação da expressão dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, stress, angiogênese e receptores hormonais por citometria de fluxo;
- Avaliação do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo;
- Realização dos ensaios de proliferação por CFSE-DA analisados por citometria de fluxo.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Formulação lipossomal Pho-s / DODAC

3.1.1. Formulação da Pho-s

A Fosfoetanolamina sintética (Pho-s) foi preparada de acordo com Outhouse (1936), analisada por cromatografia de alta performance (HPLC). A solução estoque de 1M foi dissolvida em água e esterilizada em membrana 0,22 μ m e armazenada à temperatura ambiente. Foram realizados experimentos com amostras em diferentes concentrações molares de Pho-s: 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 mM, diluídas em meio de cultivo, como também utilizadas na preparação da formulação lipossomal.

3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC

O cloreto dioctadecildimetilamônio (DODAC) foi obtido por cromatografia de troca iônica a partir do sal brometo – DODAB (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) utilizando-se resina Dowex 21K (Sigma-Aldrich) na forma Cl⁻ (1,2 mEquivalentes/ml) em metanol. Ele foi pesado e dissolvido em 4 mL de água do tipo ultra-pura Mili-Q, a fim de obter-se uma concentração final de 2 Mm. Em seguida, a dispersão foi aquecida à 57 °C por no mínimo 20 min até a completa homogeneização. Logo após, a amostra foi agitada por 5 min e mantida à temperatura ambiente por 3 h para que o sistema estabilize-se completamente.

3.1.3. Preparação das dispersões sonicadas

Após a preparação das vesículas, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução para o início do processo de sonicação. Esse processo foi realizado em um recipiente cilíndrico de 15 mL de volume e 2,5 cm de diâmetro, utilizando-se do ultrassom Virsonic (Virtis Company Inc., Nova Iorque, Estados Unidos) 500 cm ponta de 11 mm, a 30% da potência máxima em 15 ciclos por min, com 30 seg de intervalo entre cada ciclo. Durante a sonicação, as amostras foram mantidas à aproximadamente 60 °C. Após o procedimento acima, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm em 24 °C, durante uma hora para que fossem retirados os resíduos de titânio provenientes da ponta do sonificador.

3.1.4. Preparação das amostras de Pho-s /DODAC

Foram criados filmes de Pho-s a partir de uma solução (500 µM) de Pho-s/dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich)/metanol (1:1) que foram colocados à baixa pressão por no mínimo 3 h, com intuito de retirar traços de solvente orgânico. Em seguida, foram adicionadas ao filme as dispersões de DODAC 2 mM, agitando-o por 5 min. Foram realizados experimentos com amostras em diferentes frações molares de DODAC/Pho-s: 0,38; 0,5; 0,6; 1,2; 1,8 mol%. Após o término da agitação, as amostras foram mantidas por 6 h à temperatura ambiente, como processo de incubação, antes do início dos experimentos.

3.1.5. Medidas de absorção óptica

As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro modelo 8452 A (Hewlet Packard, Arizona, Estados Unidos), com controle de temperatura Julabo F25, e com cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0cm.

3.2. Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de mama humana: MCF7 obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC), tendo o respectivo código HTB-22™, mantida e estocada no banco de células sob responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, insulina humana (Humulin 100 UI/mL, Eli Lilly and Company - EUA) 1%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células dispostas em monocamada foram submetidas à dissociação enzimática com solução de tripsina 0,2% + EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 0,02%, para que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi realizada utilizando o mesmo meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

As células tumorais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 10^5 células/mL durante 24, 48 e 72 horas e tratadas com a Pho-s, DODAC vazio e DODAC/Pho-s em diversas concentrações, como grupo controle foi utilizado o meio de cultura e o veículo para a diluição da solução estoque da Pho-s. Além disso, como controle também foi utilizado a linhagem de fibroblasto normal (FN1) tratadas com a Pho-s. A linhagem FN1 faz parte do banco de células normais do laboratório obtidas pelo Prof^o Durvanei Augusto Maria. Após os tempos de tratamento o sobrenadante foi coletado em outra placa e adiciona-se 100 μ L de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, e as células incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescentado 100 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que induz toxicidade em 50% das células (IC₅₀) foi determinada após os diferentes tempos de tratamento nas concentrações para avaliação do efeito dose-resposta. A citotoxicidade de cada tratamento foi expressa pela porcentagem de morte celular, calculada em relação aos controles negativos.

3.4. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados

A quantificação da peroxidação de lipídeos é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica que é medida espectrofotometricamente. Os sobrenadantes das culturas celulares utilizadas para a metodologia do MTT foram recolhidos antes do teste de citotoxicidade MTT e mantidos sob-refrigeração de -20°C. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em microtubo foi adicionado 50 μ L da amostra e adicionados com 250 μ L de ácido tricloroacético - TCA 20% (Sigma-Aldrich) em outro microtubo, 50 μ L da mesma amostra foi adicionada

com 250 µL de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86% (Sigma-Aldrich, Cat.: T550-0). Os microtubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 20 min, seguido de resfriamento a 0°C por 20 min, centrifugação a 8000 rpm por 4 min e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

3.5. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de fluxo

As células foram submetidas ao tratamento com Pho-s, DODAC vazio e DODAC Pho-s por período de 24 horas. As células tratadas e do grupo controle foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400 rpm por 10 min. Em seguida, o “pellet” foi ressuspenso em solução de álcool 70° e álcool RNase e armazenado no freezer -20°C por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e ressuspensas em 200 µL de tampão Fac’s, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) na intensidade de fluorescência FL2H e os histogramas adquiridos pelo programa Cell-Quest - BD e analisados no programa ModFit .

3.6. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β-galactosidase

As células foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C por 24 h e em seguida, tratados com Pho-s no tempo de 24 h. As células foram fixadas com formaldeído a 2%, 0,2% de glutaraldeído em PBS à temperatura ambiente durante 3-5 min. Após lavagem em PBS, as células foram encubadas com solução de coloração contendo 1 mg/mL de β-galactosidase (Cell Signaling Technology, Danvers-MA) durante 16 h. Após a fixação, as células foram colocadas em glicerol 70%. A contagem das células foi realizada em microscópio de luz em dez campos selecionados aleatoriamente (aproximadamente 200 cel/campo) (1 mm²) e capturados para a detecção da taxa de senescência expressa em (%).

3.7. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

3.7.1. Marcação com fluorocromo acridine-orange

As alíquotas das culturas de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos tratados com Pho-s e controles passaram por um processo de remoção do meio de cultura e lavadas com próprio meio de cultura RPMI. Em seguida, foi acrescentado 5 µL de acridine-orange (Molecular Probes, USA), durante 10 min no escuro a 37° C. Após a incubação, o excesso de acridine-orange foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview™ 300) e as imagens fotodocumentadas e analisadas.

3.7.2. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo rodamina-123

As alíquotas das culturas de adenocarcinoma de mama MCF-7 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos tratados com Pho-s e controles passaram por um processo de remoção do meio de cultura e lavadas com próprio meio de cultura RPMI. Em seguida, foi acrescentado 10 µL de rodamina-123 (Molecular Probes, USA), durante 15 min no escuro a 37° C. Após a incubação, o excesso de rodamina-123 foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview™ 300) e as imagens foto documentadas e analisadas.

3.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI

A finalidade desta análise é determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V (Kit In situ Cell Death Detection, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolípido com atividade anticoagulante vascular que é encontrada pela maior

parte na face citosólica das membranas celulares. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolípidios negativamente carregados. Após confluência na placa de 6 orifícios as células foram tratadas com Pho-s, DODAC vazio e DODAC/Pho-s, por período de 24 h e foram lavadas 2 vezes em PBS, resuspensas em 100 µL de PBS e incubadas por 30 min com 1 µg de anexina V-FITC diluído em tampão e 18 µg/mL de solução de iodeto de propídio. A leitura da quantidade da expressão de Anexina V (apoptose) e do PI (necrose) foi realizada em citômetro de fluxo – FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

3.9. Avaliação da expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo

Alíquotas de 100 µL das suspensões de células tumorais (10^6 células/mL) dos grupos tratados com Pho-s, DODAC vazio e DODAC/Pho-s e os grupos controles foram incubadas por 1 h a 4°C, com 1 µg de anticorpo específico caspase 3 ativa (Santa Cruz, Biotechnology) conjugado com ficoeritrina-PE e anticorpo específico caspase 8 ativa (Santa Cruz, Biotechnology) conjugado com ficoeritrina-PE na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH. Foram utilizados diversos marcadores envolvidos na morte celular, reguladores da progressão do ciclo celular, adesão, stress oxidativo, angiogênese e reguladores hormonais (conforme tabela abaixo). Após este período as células foram centrifugadas a 1500 rpm e lavadas com PBS gelado e 0,2% de BSA por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensão em 200 µL de Tampão Fac’s contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

Marcadores	Função	Fabricante
Caspase 3 ativa	Via intrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Caspase 8 ativa	Via extrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Citocromo-C	Indutor de apoptose	Abcam ®
Bax	Promotor da apoptose	Abcam ®
Bad	Promove a morte celular	Abcam ®
Bcl-2	Inibidor da apoptose	Abcam ®
p53	Supressor tumoral	Abcam ®
TNF-DR4	Indutor de morte celular	Abcam ®
VEGF-R2	Fator de crescimento envolvido na angiogênese	Abcam ®
VEGF-R1	Fator de crescimento envolvido na angiogênese	Abcam ®
CD90	Marcador de célula tronco e metástases tumorais	Abcam ®
CD34	Adesão celular	Abcam ®
CD44	Receptor do ácido hialurônico	Abcam ®
Ciclina D1	Progressão do ciclo celular	Abcam ®
IL-1B	Reação inflamatória	Abcam ®
IL-2	Reação inflamatória	Abcam ®
IL-6	Reação inflamatória	Abcam ®
PCNA	Marcador de proliferação celular	Abcam ®
Herb 2	Receptor hormonal	Abcam ®
Progesterona PR	Receptor hormonal	Abcam ®
Estrógeno ER	Receptor hormonal	Abcam ®

3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorecendo em verde. Alterações ao nível da integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON, 1980). As amostras das células tumorais dos grupos tratados com Pho-s, DODAC vazio e DODAC/Pho-s e os grupos controles foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 5 µl de Rh-123 (5 mg/mL⁻¹ diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% CO₂ a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos

foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 100 µL de tampão Fac's Flow. A leitura e análise da marcação da Rh-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FLH- 1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.11. Ensaio de proliferação celular por CFSE-DA

Para caracterizar a atividade proliferativa das células tumorais de mama MCF-7, tratada com Pho-s e grupo controle, foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE – Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester). O CFSE-DA (Molecular Probes – EUA), diluído em PBS 0,1% albumina humana em diferentes concentrações, foi adicionado ao meio com as células dos grupos tratados com Pho-s e controles para a marcação. O tempo de marcação foi de 10 min a 37° C, homogeneizando a cada 3 min. Durante a marcação foram adicionados cinco vezes o volume de meio RPMI 10% de SFB e incubados por 5 min em gelo e no escuro. As células foram lavadas três vezes com 20 mL de RPMI 10% de SFB e ressuspensas em 1 mL de RPMI 10% de SFB para a contagem. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE-DA no dia da marcação (dia zero) em citômetro de fluxo e analisado pelo programa FlowJo. O programa FlowJo forneceu os índices utilizados para avaliação da proliferação espontânea das células marcadas com CFSE, sendo porcentagem de células divididas e índice de divisão celular os índices utilizados neste estudo. A porcentagem de células divididas é a porcentagem de células da amostra original que dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura. O índice de divisão celular é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram.

3.12. Análises estatísticas

Todos os valores obtidos das diferentes linhagens celulares (MCF7 e FN1) foram expressos em média $\pm$ desvio médio e após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle e os resultados tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 4.0 e InStatPad Prism Version 4.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER considerando como nível crítico para significância valores de $p < 0.05$.

4- RESULTADOS

4.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

4.1.1. Avaliação da viabilidade celular com o tratamento da Pho-s

Após 24 horas de adesão, em placa de 96 orifícios, as células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram incubadas com a Pho-s nas concentrações de 10 a 100 mM nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Após o tratamento de 24 horas, nas células MCF7, foram observados aspectos morfológicos de lise e a formação de debri celular no sobrenadante, a partir da concentração de 20 mM, com a obtenção da IC50% no valor de 37,2 mM, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,9460$ (Figura 06).

Figura 06 - Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de adenocarcinoma de mama humana MCF7 após 24 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

As demais concentrações de tratamento com a Pho-s mostraram efeitos citotóxicos significativos, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão e projeção dos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 07).

Figura 07 - Fotomicrografia dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Pho-s após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. As setas indicam os corpos apoptóticos, nota-se que a partir da concentração de 20 mM há uma redução expressiva na densidade celular.

Com o tratamento com a Pho-s após 48 horas, as células de adenocarcinoma de mama humana - MCF7 mostraram aspectos morfológicos de lise e formação de debri celular, a partir da concentração de 10 mM Pho-s, com valor de IC50% de 25,8 mM (Figura 08), bem como redução significativa da densidade celular, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,6432$.

Figura 08 - Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular após 48 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados n=3, em octuplicada.

Após o tratamento de 72 horas, nas células tumorais MCF7, foi observada uma diminuição drástica da densidade celular, com células em aspecto de lise e a formação de debri celular, em todas as concentrações com a obtenção da IC50% de 1,8 mM, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,9678$ (Figura 09). Além disso, foram observados efeitos citotóxicos, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão dos prolongamentos citoplasmáticos.

Figura 09 - Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular após 72 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados n=3, em octuplicada.

Como grupo controle e para especificidade da ação da droga, foi realizado o experimento em células de fibroblastos humanos normais (FN1). Após 24 horas de adesão, em placa de 96 orifícios, as células FN1 foram incubadas com a Pho-s nas concentrações de 10 a 100 mM nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Com tratamento de 24 horas nas células normais FN1, foi observado diminuição da densidade celular, a partir da concentração de 50 mM (Figura 11), com a obtenção da IC50% no valor de 81,8 mM, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,9478$ (Figura 10).

Figura 10 - Gráficos de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular após 24 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados n=3, em octuplicada.

Figura 11 - Fotomicrografia dos aspectos celulares dos fibroblastos humanos normais FN1 dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Pho-s após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Nota-se que a partir da concentração de 50 mM há uma pequena redução na densidade celular.

Após o tratamento com a Pho-s de 48 horas, as células de normais FN1, apresentaram pouco aspecto morfológico de lise e formação de debri celular, a partir da concentração de 40 mM Pho-s, com valor de IC50% de 61,6 mM, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,9852$ (Figura 12).

Figura 12 - Gráficos de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular em fibroblastos humanos normais após 48 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

Após o tratamento de 72 horas, nas células normais FN1, foram observadas poucas células com aspecto de lise, a partir da concentração de 40 mM, com a obtenção da IC50% de 44,05 mM, com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0,9914$ (Figura 13).

Figura 13 - Gráficos de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular em fibroblastos humanos normais após 72 horas de tratamento com a Pho-s obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

Como controle positivo da ação citotóxica foi utilizado o tratamento com o quimioterápico convencional Doxorrubicina (Dox) obtendo-se o valor da média da IC50% de 20 μ M com correlação positiva de $R_2 = 0.9871$ (Figura 14).

Figura 14 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular após 24 horas de tratamento com a Pho-s e Dox obtido pelo programa GraphPad Prism 5. Experimentos realizados n=3, em octuplicada.

4.1.2. Avaliação da viabilidade celular do tratamento com DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s

Após 24 horas de adesão, em placa de 96 orifícios, as células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram incubadas com o DODAC vazio e DODAC/Pho-s nas concentrações de 0,032 a 2,0 mM no tempo de 24 horas de tratamento.

Após o período de tratamento com o DODAC vazio e o DODAC/Pho-s, nas células tumorais MCF7 foi observada formação de debri celular, lise da membrana e formação de precipitado no sobrenadante. O tratamento com o carreador DODAC vazio nas células tumorais a IC50% foi de 0,3 mM com o coeficiente de correlação $R_2 = 0.9212$ (Figura 15 A). Contudo, com o tratamento de DODAC/Pho-s a IC50% foi obtida em 1,8 mM com o coeficiente de correlação de $R_2 = 0.827$ (Figura 15 B).

Figura 15 - Gráficos de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade celular das células MCF7 após 24 horas de tratamento com a DODAC vazia (A) e DOAC/Pho-s (B). Experimentos realizados n=3, em octuplicada.

4.2. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados

A peroxidação lipídica nas membranas celulares e a formação de radicais livres foram quantificadas pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da lipoperoxidação formado pela decomposição primária ou secundária de produtos intermediários, e reage com o ácido tiobarbitúrico, sendo amplamente utilizado na determinação do estresse oxidativo.

O tratamento com a Pho-s não resultou em uma diferença significativa na formação de radicais peroxidados lipídicos da linhagem tumoral de mama MCF7, não apresentando danos oxidativos significativos em nenhuma concentração.

Com o tratamento após 24 horas não houve aumento significativo da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MCF7 tratadas com a Pho-s nas concentrações de 10 a 100 mM (Figura 16).

Figura 16 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com a Pho-s. Valores obtidos pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados n=3, em octuplicada (ns = não significativo).

Com o tratamento de 48 horas não houve aumento significativo da produção de radicais peroxidados lipídicos (Figura 17).

Figura 17 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 48 horas de tratamento com a Pho-s. Valores obtidos pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada (ns = não significativo).

Após o tratamento de 72 horas não houve diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos quando comparado ao grupo controle (Figura 18).

Figura 18 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 72 horas de tratamento com a Pho-s. Valores obtidos pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada (ns = não significativo).

4.3. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

4.3.1. Grupo tratado com fosfoetanolamina sintética (Pho-s)

A Pho-s foi testada para avaliar a sua capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram tratadas com a Pho-s nas concentrações de 20 a 50 mM no tempo de 24 horas e também foram avaliadas as concentrações de 20 a 50 mM de Pho-s, após 48 horas. Estas concentrações foram escolhidas a partir do cálculo da IC50% obtida nos diferentes tempos. As porcentagens de células MCF7 nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas após os tratamentos.

Com o tratamento de 24 horas com a Pho-s, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações quando comparado ao grupo controle (Figuras 19 e 20). A população de células na fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto há uma parada na fase G2/M, quando comparada ao grupo controle.

Figura 19 – Gráficos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de adenocarcinoma de mama MCF7 dos grupos controle e tratados com a Phos (A) G0/G1, (B) Fase S, (C) G2/M e (D) DNA fragmentado, após 24 horas de tratamento. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

Figura 20 – Histogramas representativos das fases do ciclo celular da célula de adenocarcinoma de mama MCF7 dos grupos controle e tratados com a Pho-s, após 24 horas de tratamento. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

No tratamento de 48 horas com a Pho-s, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações quando comparado ao grupo controle (Figuras 21 e 22). Na concentração de 20 mM, o DNA fragmentado e a fase G0/G1 sofreram um aumento significativo, enquanto as fases S e G2/M, diminuiram significativamente.

Figura 21 – Gráficos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula tumoral de mama humana MCF7 dos grupos controle e tratados com a Pho-s (A) G0/G1, (B) Fase S, (C) G2/M e (D) DNA fragmentado, após 48 horas de tratamento. Valores de significância co.m $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA regulado pelo teste Turkey. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

Figura 22 – Histogramas representativos das fases do ciclo celular da célula de adenocarcinoma de mama MCF7 dos grupos controle e tratados com a Pho-s, após 48 horas de tratamento. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

4.3.2. Grupo controle positivo – Doxorrubicina e associações

As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram tratadas com o quimioterápico convencional Doxorrubicina (Dox) na sua IC50%, 20 μ M, valor obtido na literatura e também obtido neste trabalho (Figura 14). As células também foram tratadas com a IC50% da Pho-s e tratadas com a associação farmacológica. O tratamento associado com a Dox e a Pho-s diminuiu a viabilidade celular em média de 29%, demonstrando o seu potencial sinérgico. Esses valores foram significativos ($p = 0.01$), quando comparado aos grupos tratados isolados Dox e Pho-s (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da viabilidade da célula tumoral de mama humana MCF7 do grupo controle e tratadas com Dox, Pho-s e associações. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA regulado pelo teste Turkey. $n=3$. (# = significância do grupo tratado associado comparado com os tratados isolados).

Ambos os tratamentos levaram a uma diminuição significativa da fase G0/G1. Na fase G2/M, houve diminuição com os tratamentos Dox e Dox+Pho-s, contudo, com o tratamento da Pho-s na IC50% houve aumento significativo, estes dados corroboram com experimentos realizados anteriormente. Na fase S, apenas o tratamento da Pho-s mostrou diminuição significativa, entretanto, todos os tratamentos levaram a um aumento do DNA fragmentado (Figuras 24 e 25).

Figura 24 – Gráficos de barras das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula tumoral de mama humana MCF7 dos grupos controle e tratadas com Doxorubicina e Pho-s, (A) G0/G1; (B) G2/M; (C) Fase S; (D) DNA fragmentado. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA regulado pelo teste Turkey. $n=3$.

Figura 25 – Histogramas representativos das fases do ciclo celular da célula de adenocarcinoma de mama MCF7 dos grupos controle e tratados com a Dox, Pho-s e Dox + Pho-s após 24 horas de tratamento. n=3, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

4.3.3. Grupo tratado com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s

As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 foram tratadas com o DODAC vazio e DODAC/Pho-s. Ambos os tratamentos levaram a diminuição significativa das células na fase G0/G1. Na fase G2/M, houve diminuição com os tratamentos do DODAC vazio, contudo, com o tratamento DODAC/Pho-s houve aumento significativo. Na fase S, foi observado aumento com o tratamento DODAC vazio e diminuição com o DODAC/Pho-s. Entretanto, todos os tratamentos levaram a um aumento do DNA fragmentado (Figuras 26 e 27). Destacando o efeito tóxico do carreador vazio DODAC em comparação a formulação lipossomal DODAC/Pho-s.

Figura 26 – Gráficos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula tumoral de mama humana MCF7 dos grupos controle e tratadas com DODAC vazio e DODAC/Pho-s, (A) G0/G1; (B) G2/M; (C) Fase S; (D) DNA fragmentado. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA regulado pelo teste Turkey. $n=3$.

Figura 27 – Histogramas representativos das fases do ciclo celular da célula de adenocarcinoma de mama MCF7 dos grupos controle e tratados com DODAC vazio e DODAC/Pho-s após 24 horas de tratamento. n=3, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado.

4.4. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase

Após 24 horas de adesão, as células tumorais de mama MCF7 foram incubadas com a Pho-s nas concentrações de 10 a 50 mM no tempo de 24 horas de tratamento. Após o tratamento, as células tumorais MCF7 foram submetidas à ação enzimática da β -galactosidase. As células foram observadas e as fotos foram capturadas em microscópio de luz (Figura 28) e analisadas quanto ao número de células (10 campos), sendo contadas 100 células/campo.

Figura 28 – Fotomicrografia dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com a Pho-s e submetidas a atividades enzimática da β -galactosidase. As setas indicam os corpos apoptóticos, após 24 horas de tratamento com a Pho-s em células tumorais MCF7.

Foi observada diminuição significativa com uma correlação positiva entre o número de células senescentes e o aumento da concentração da Pho-s (Figura 29).

Figura 29 - Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem de células senescentes após 24 h de tratamento com a Pho-s em células de adenocarcinoma de mama MCF7. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

As células tumorais MCF7 foram tratadas com o carreador vazio DODAC e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s por 24 horas. Após o tratamento, as células tumorais MCF7 foram submetidas à ação enzimática da β -galactosidase. As células tumorais foram observadas e as imagens foram capturadas em microscópio de luz (Figura 30) e analisadas quanto ao número de células (10 campos), sendo contadas 100 células/campo.

Figura 30 – Fotomicrografia dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com o DODAC vazio e o DODAC/Pho-s e submetidas a atividades enzimática da β -galactosidase. As setas vermelhas indicam o precipitado do composto e as setas pretas indicam retração celular e diminuição da densidade celular.

Com o tratamento do carreador vazio DODAC na menor concentração foi observado um aumento significativo das células senescentes, entretanto, na maior concentração não houve diferença significativa. Contudo, no tratamento com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, foi observada diminuição significativa do número de células senescentes (Figura 31).

Figura 31 - Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem de células senescentes após 24 h de tratamento com o DODAC e DODAC/Pho-s em células de adenocarcinoma de mama MCF7. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

4.5. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

4.5.1. Marcação com fluorocromo acridine-orange

Acridine-orange é um corante de fluorescência utilizado para corar vacúolos ácidos (lisossomas, endossomas e autofagossomas), RNA e DNA em células vivas.

Quando ligado à ácidos nucleicos de células emitem fluorescência verde quando ligado ao dsDNA (dupla fita) e fluorescência vermelha quando ligado ao ssDNA (fita simples), RNA ou vacúolos.

Após o tratamento com a Pho-s, a partir da concentração de 20 mM, observa-se a formação de vacúolos lisossomais distribuídos no citoplasma com alterações morfológicas, também foi observada a marcação e determinação da heterocromatina. Além disso, há alterações na estrutura celular, diminuição da densidade das células, como já foi referida nos resultados anteriores apresentados neste trabalho (Figura 32).

Figura 32 – Fotomicrografia dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Pho-s após 24 horas e marcadas com acridine-orange, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas indicam o padrão de marcação da heterocromatina nuclear e os vacúolos lisossomais citoplasmáticos.

4.5.2. Marcação da mitocôndria através do fluorocromo rodamina 123

A rodamina 123 é conhecida por inibir a função do potencial elétrico das mitocôndrias. Rodamina 123 liga-se às membranas da mitocôndria e inibir processos de transporte, especialmente o transporte de elétrons, retardando a respiração celular interna.

Após 24 horas de tratamento com a Pho-s, as células MCF7 foram fotomicrografadas em microscópio confocal a laser, observa-se na fotomicrografia do grupo controle a marcação das mitocôndrias bem delimitadas e estruturadas ao redor do núcleo. Contudo, nos grupos tratados com as diferentes concentrações da Pho-s, as mitocôndrias não estão íntegras e modificam a sua distribuição, passando preferencialmente do núcleo para o citoplasma (Figura 33). Destaca-se que nas concentrações superiores de 30 mM da Pho-s há uma redução significativa na densidade celular.

Figura 33 – Fotomicrografia dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Pho-s em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 após 24 horas e marcadas com a sonda rodamina 123, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas indicam a marcação das mitocôndrias.

4.6. Análise dos marcadores/receptores de membrana e nucleares por citometria de fluxo

Após os tratamentos com Pho-s, DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s as células tumorais MCF7 foram analisadas as expressões dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, stress, angiogênese e hormonais por citometria de fluxo. Foram comparadas as porcentagens da expressão dos marcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle, a partir dos dados e dos plots adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo programa WinMDI versão 2.9, e apresentados em gráfico de barras das médias $\pm$ desvio padrão. Foram definidos os padrões de expressão a partir da definição dos quadrantes (Gates) dos gráficos adquiridos pelo programa (dot plot), e da positividade das células marcadas no quadrante superior em função da intensidade de fluorescência (FL1-H para os marcadores fluorescentes marcados com FITC (verde) e FL2-H para os marcadores fluorescentes marcados com PE (vermelho)).

A expressão do receptor IL-1 β mostra-se diminuída no grupo controle e aumentada a partir da concentração de Pho-s 30 mM. Contudo, quando comparados ao grupo tratado com o carreador vazio DODAC não houve diferença significativa, porém no grupo tratado com a formulação lipossomal houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio. A expressão do receptor IL-2 aumenta significativamente a partir da concentração de Pho-s 30 mM. Já no grupo tratado com o carreador vazio DODAC, não houve diferença significativa, porém no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio. A expressão do receptor IL-6 mostrou-se aumentada em todas as concentrações de Pho-s, quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado apenas com o carreador vazio DODAC não teve diferença significativa, entretanto, o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s teve um aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio (Figura 34).

Figura 34 - Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão das interleucinas (A) IL-1B, (B) IL-2 e (C) IL-6. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

A expressão dos receptores hormonais ER e PR foram positivos e a expressão do receptor HER2 foi negativo nos grupos controles. Contudo, nos grupos tratados com Pho-s houve um aumento significativo dos receptores ER e PR. O grupo tratado com o carreador vazio DODAC não mostrou diferença. Entretanto, nos grupos tratados com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio (Figura 35).

Figura 35 - Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores hormonais (A) Receptor de estrógeno (ER), (B) Receptor de progesterona (PR) e (C) Her 2. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

Comparado ao grupo controle, o grupo tratado com Pho-s apresentou diminuição significativa dos receptores para os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF-R1 e VEGF-R2). Entretanto, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença entre si (ns) e o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s obteve uma diminuição significativa comparado ao grupo DODAC vazio (Figura 36).

Figura 36 - Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na angiogênese (A) VEGF-R1 e (B) VEGF-R2. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

O marcador CD44 teve sua expressão diminuída significativamente no grupo tratado com a Pho-s. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença e o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve aumento significativo quando comparado ao grupo carreador DODAC vazio. Nos experimentos realizados para a avaliação do marcador CD34, não houve diferença significativa entre os grupos tratados quando comparados ao controle não tratado. Para o marcador, CD90 houve diminuição significativa no grupo tratado com a Pho-s. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não ocorreu diferença e o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s obteve-se o aumento significativo quando comparado ao grupo DODAC vazio (Figura 37).

Figura 37 - Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores de células tronco (A) CD44, (B) CD34 e (C) CD90. Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

A expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 diminuiu drasticamente no grupo tratado com Pho-s, quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com o carreador DODAC vazio não sofreu diferença significativa, porém o grupo tratado com o DODAC/Pho-s aumentou quando comparado ao grupo tratado com DODAC. Entretanto, o membro da família das proteínas pró-apoptóticas Bax e o Bad aumentaram significativamente no grupo tratado com Pho-s. No grupo tratado com o carreador vazio DODAC, não houve diferença significativa, já no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo DODAC, há um aumento significativo (Figura 38).

Figura 38 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose (A) Bcl-2, (B) Bax, (C) Bad, (D) Caspase 3, (E) Caspase 8 e (F) TNF-DR4. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

As capases 3 e 8 fosforiladas apresentaram aumento no grupo tratado com a Pho-s. Contudo, no grupo tratado com o carreador vazio DODAC, não houve diferença significativa, já no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo DODAC, há um aumento significativo. O marcador TNF-DR4 sofreu um aumento no grupo tratado com a Pho-s. No grupo tratado com o DODAC vazio, não mostrou diferença significativa, enquanto que no grupo DODAC/Pho-s, houve um aumento, quando comparado ao grupo tratado com carreador DODAC vazio (Figura 39).

Figura 39 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose (A) Bcl-2, (B) Bax, (C) Bad, (D) Caspase 3, (E) Caspase 8 e (F) TNF-DR4. Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo)

Os marcadores envolvidos no controle da progressão e checagem do ciclo celular, ciclina D1, citocromo C e p53 obtiveram aumento significativo no grupo tratado com a Pho-s, comparado ao grupo controle. No grupo tratado com o carreador vazio DODAC, não houve diferença significativa. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador DODAC.

O marcador nuclear de proliferação celular PCNA no grupo tratado com a Pho-s diminuiu drasticamente, quando comparado ao grupo controle. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença significativa entre si, porém o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, diminuiu significativamente quando comparado ao grupo DODAC vazio (Figura 40).

Figura 40 - Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose (A) Cyclina D1, (B) Citocromo C, (C) p53 e (D) PCNA. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata. (ns = não significativo).

4.7. Potencial elétrico da membrana mitocondrial

O Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é fundamental para manter a função fisiológica da cadeia respiratória para gerar energia (ATP). A perda significativa do $\Delta\Psi_m$ diminui a produção de energia, com posterior morte celular. As análises realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123 mostraram que o tratamento com a Pho-s diminuiu significativamente o potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 41).

Figura 41 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MCF7 tratadas com Pho-s. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

A avaliação do potencial elétrico mitocondrial em células tumorais MCF7 tratadas com o carreador vazio DODAC e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s diminuiu quando comparada ao grupo controle (Figura 42).

Figura 42 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MCF7 tratadas com DODAC vazio e DODAC/Pho-s. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

4.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI por citometria de fluxo

A finalidade desta análise foi determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolípido com atividade anticoagulante vascular que é encontrada pela maior parte na face citosólica das membranas celulares. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolípidos negativamente carregados. As células de adenocarcinoma de

mama humana MCF7 foram tratadas com Pho-s por 24 horas nas concentrações de 20, 30 e 40 mM. Nas maiores concentrações, foi observado um aumento significativo da porcentagem de células mortas por apoptose tardia e necrose. Enquanto, na menor concentração, foi observado aumento significativo da apoptose tardia e inicial, esses dados confirmam os dados obtidos com a expressão da Caspase-3 fosforilada obtido nas análises por citometria de fluxo (Figura 43).

Figura 43 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da população celular tratada com Pho-s nas concentrações de 20, 30 e 40 mM. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

As células MCF7 foram tratadas com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s por 24 horas nas concentrações de 0,15 e 0,3 mM (DODAC) e nas concentrações 1,6 e 1,8 mM (DODAC/Pho-s). A porcentagem das células viáveis diminuiu significativamente em todas as concentrações. Além disso, também foi observado aumento significativo da apoptose tardia e inicial. Entretanto, apenas nas maiores concentrações de cada tratamento foi observado aumento da necrose (Figura 44).

Figura 44 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da população celular tratada com DODAC vazio e DODAC/Pho-s. Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

4.9. Ensaio de proliferação CFSE-DA

Para caracterizar a atividade proliferativa das células de adenocarcinoma de mama MCF7, tratadas com Pho-s e controles, foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE-DA). As células tumorais MCF7 foram tratadas com Pho-s nas concentrações de 20, 30 e 40 mM, em períodos de 24, 48 e 72 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 45 e 46).

Figura 45 - Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo do índice proliferativo das células tumorais de mama humana MCF7, obtido pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. Experimentos realizados n=3, em triplicata.

Figura 46 - Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células de mama MCF7 tratadas com Pho-s nas concentrações de 20, 30 e 40 mM. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em octuplicada.

5- DISCUSSÃO

Fosfolipídios análogos aos existentes na membrana celular são novos compostos potenciais no controle da proliferação de células tumorais. Desde a descoberta das propriedades citotóxicas e antitumorais de análogos de lisofosfatidilcolina, foi desenvolvido um número de análogos de alquilfosfocolina (APC) e alquil-lisofosfolípido (ALP) para uso clínico. A edelfosina é uma molécula que pertence à família alquil-lisofosfolípidos sintéticos, que incluem também fármacos clinicamente relevantes tais como miltefosina e perifosina e que podem ser administrados oralmente, entretanto apresentam diversos efeitos colaterais, como a hemólise e o consumo de fatores da coagulação sanguínea (MENDOZA et al., 2009). Neste trabalho foi utilizado um fosfolípido artificialmente fosforilado análogo aos fosfolípidos de membrana, a fosfoetanolamina sintética (Pho-s), que difere dos atuais fosfolipídios utilizados na clínica médica, por não causar efeitos colaterais, como a hemólise, distúrbios da coagulação ou mesmo hemorragias.

Neste trabalho foi avaliado o potencial de citotoxicidade e *target* da fosfoetanolamina sintética (Pho-s) no modelo *in vitro* de células de adenocarcinoma de mama humana MCF7. Diversos estudos têm sido publicados mostrando que, contrário aos agentes quimioterapêuticos convencionais, os fosfolipídios antineoplásicos agem em membranas celulares tumorais, interferindo no *turnover* dos fosfolipídios e na ativação de processo de morte celular do tipo apoptose. Devido às suas ligações éter estáveis que não são metabolizadas e podem interferir em lipídios de sinalização, causando apoptose em células de tumores malignos (VAN BLITTERSWIJK, 2008).

A fosfoetanolamina é uma amina primária que está presente em elevadas concentrações intracelulares em diversos tecidos e que tem sido implicada em várias funções celulares, como osmorregulação, neuromodulação e estabilização de membrana (TURNER et al., 1994). Neste estudo a fosfoetanolamina utilizada é uma molécula com alta solubilidade e fosforilada o que potencializa os efeitos biológicos.

Com o frequente avanço da nanotecnologia, vários sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*) têm sido desenvolvidos para contornar limitações relacionadas à solubilidade nos fluidos biológicos, estabilidade físico-química,

biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade para células normais. Dentre estes sistemas, os lipossomos consistem um dos tipos de nanocarreadores mais investigados com relação ao câncer. Diversos estudos demonstram que esse tipo de formulação pode maximizar a farmacocinética e a eficácia antitumoral de vários compostos (DRBOHLAVOVA et al., 2013).

Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostram que as moléculas do carreador DODAC interagem com a Pho-s em solução aquosa após ser submetida à ultrassom e posterior sonicação, originando uma formulação lipossomal DODAC/Pho-s. As moléculas nanoestruturadas com a Pho-s são estáveis e apresentam características biológicas após a sua formulação. As suspensões lipossomais obtidas de DODAC/Pho-s foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e determinação do teor (%) de fosfato das partículas anteriormente por nosso grupo para sua caracterização físico-química. Os lipossomas com concentração de 2,0 mM de Pho-s demonstraram ser estáveis em relação ao tempo de estocagem à temperatura ambiente (LUNA et al., 2016). Como a estabilidade físico-química é um parâmetro importante para biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade seletiva para células tumorais, as concentrações escolhidas para o tratamento com o DODAC vazio e DODAC/Pho-s foram de 0,032 a 2,0 mM.

Os tamanhos dos lipossomas DODAC/Pho-s, obtidos por meio da microscopia eletrônica de varredura, são entre 60-100 nm de diâmetro, sendo considerados ideais para o tratamento antitumoral, pois o endotélio vascular de tecidos saudáveis é formado por fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, enquanto que os neovasos dos tumores apresentam fenestrações bem maiores (100 a 780 nm) (FANG et al., 2011; TAURIN et al., 2012). Dessa forma, as nanopartículas com tamanho médio de 100-200 nm conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos vasos tumorais, mas não penetram nas fenestrações estreitas do endotélio dos tecidos saudáveis.

Corroborando os dados, a Pho-s foi citotóxica para todas as linhagens tumorais estudadas por nosso grupo de pesquisa, EAT (tumor ascítico de Ehrlich); células B16F10 (melanoma murino); células MCF-7 (câncer de mama humano); células H292 (câncer de pulmão); células Skmel-28 e Mewo (melanoma humano). Entretanto, o tratamento com a Pho-s não foi citotóxico para células normais, tais como fibroblastos e células endoteliais

(MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2013). Os resultados dos ensaios de citotoxicidade indicam que a Pho-s promove seus efeitos antitumorais por meio de um mecanismo que parece ser comum a todas as linhagens, sem promover efeitos citotóxicos significativos em células normais HUVEC (LUNA et al., 2016).

O tratamento com a Pho-s nas células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 mostrou-se eficaz na capacidade de inibir a proliferação celular dos diferentes tempos. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a Pho-s, levando a uma redução da viabilidade celular tempo-concentração dependente. Após 24 horas as células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 apresentaram aspectos de lise e formação de debri celular, a partir da concentração de 20 mM. Dados que corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo, no qual o tratamento com Pho-s mostrou-se citotóxico em células tumorais MCF7 (FERREIRA et al., 2013). Entretanto, após 48 e 72 horas as células tumorais MCF7 apresentaram efeitos citotóxicos significativos, a partir da concentração de Pho-s 10 mM, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão dos prolongamentos citoplasmáticos.

Contudo, o tratamento com a Pho-s nas células de fibroblastos humanos normais FN1 não apresentou o mesmo efeito citotóxico observado nas células de adenocarcinoma de mama MCF7. A viabilidade celular foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas. No tratamento no período de 24 horas, foi observado efeito significativo a partir da concentração de 70 mM. Entretanto, nos períodos de 48 e 72 horas de tratamento, o efeito citotóxico significativo foi observado a partir da concentração de 40 mM. O quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo no tratamento das células tumorais de mama MCF7, corroborando com os dados existentes na literatura, a IC50% obtida foi de 20 μ M.

O tratamento com o carreador DODAC vazio e DODAC/Pho-s nas células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 mostrou formação de debri celular, lise da membrana e formação de precipitado no sobrenadante. A

IC50% foi obtida em 0,3 mM com o tratamento de DODAC vazio nas células. Contudo, com o tratamento de DODAC/Pho-s a IC50% foi obtida de 1,8 mM.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são constantemente produzidas nas células como subprodutos do metabolismo celular, realizando importantes funções como mediadores de mecanismos de proteção, tais como reações apoptose, fagocitose e desintoxicação (LI et al., 2001). O aumento excessivo da formação de ROS induz danos ao DNA, promovendo modificações mutagênicas em nucleotídeos, oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, desempenhando um importante papel na tumorigênese. A peroxidação lipídica, induzida pelos radicais livres, é o processo mais amplamente investigado, sendo a membrana celular um dos componentes mais atingidos pela alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados suscetíveis à peroxidação (SODERGREN, 2005). Os oxidantes em geral produzem modificações em proteínas levando à perda da função e aumentando a taxa de degradação das proteínas oxidadas, promovendo alterações na sua estrutura e na permeabilidade, o que leva à inibição do crescimento e morte celular. A peroxidação lipídica pode desencadear o processo de apoptose, ativando a via intrínseca da apoptose presente em todas as células, dependente ou não da fosforilação da via das caspases (DEY, 2004).

As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 tratadas com a Pho-s não promoveu a formação de radicais peroxidados lipídicos, possivelmente não apresentando danos oxidativos significativos em nenhuma concentração nos diferentes tempos de tratamento. Isto ocorre, provavelmente, pela significativa diminuição da viabilidade celular após o tratamento com a Pho-s, sendo que ROS são subprodutos do metabolismo celular e no método colorimétrico MTT foi observado células tumorais MCF7 com aspectos de lise, formação de debris celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição na densidade celular.

A análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo revelou que as células de adenocarcinoma de mama MCF7 tratadas com as diferentes concentrações da Pho-s após 24 horas, mostrou que a proporção de células paradas na fase G2/M aumentou com o tratamento, sugerindo que Pho-s tem efeito de parada do ciclo celular na fase de mitose, estes dados corroboram com Ferreira et al., que obtiveram um conjunto de efeitos da Pho-s em células

de adenocarcinoma de mama humana MCF7 que também foi observado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s (FERREIRA et al., 2013).

No tratamento com a Pho-s no tempo de 48 horas, foi observado um aumento significativo da porcentagem de células que apresentaram DNA fragmentado. Fato que corrobora com as alterações morfológicas observadas após o tratamento; a Pho-s foi capaz de formar agregados celulares, perda de adesão e debris celulares.

Com o tratamento com o quimioterápico convencional Doxorrubicina (Dox) na sua IC50% e a associação farmacológica Pho-s com a Dox o tratamento diminuiu a viabilidade celular em média de 29%, demonstrando o seu potencial sinérgico independente do alvo molecular do quimioterápico. Ambos os tratamentos levaram a uma diminuição significativa da fase G0/G1. Na fase G2/M, houve diminuição com os tratamentos Dox e Dox+Pho-s, contudo, com o tratamento da Pho-s na IC50% houve aumento significativo, estes dados corroboram com experimentos realizados anteriormente. Na fase S, apenas o tratamento da Pho-s mostrou diminuição significativa, entretanto, todos os tratamentos levaram a um aumento do DNA fragmentado.

Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais usados são conhecidos como agentes alquilantes que, comprovadamente, interagem quimicamente com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular. De fato, na quimioterapia são descritos muitos alvos que podem ser estudados com o intuito de se estabelecer novos fármacos antitumorais, sendo que o DNA apresenta-se como um dos alvos mais estudados, dentre eles encontramos a doxorrubicina. A doxorrubicina é um dos agentes antitumorais mais importantes, se intercala entre as bases do DNA afetando diversas funções, como inibir a síntese do DNA e RNA. Além de separar as fitas simples e/ou duplas do DNA, através de mudanças nas mediadas reações da topoisomerase II, que mantêm a estrutura terciária do DNA. Portanto, leva a redução destes compostos no interior da célula, que induz a formação de radicais livres. A doxorrubicina também interage diretamente com as membranas das células e altera as suas funções, que podem ser importantes em efeitos antitumorais e na toxicidade cardíaca desta droga. A administração ocorre por via intravenosa, ela é metabolizada no fígado. A doxorrubicina é utilizada em muitas combinações para tratar tumores sólidos, em particular o câncer da mama,

carcinoma de ovário e de pulmão. Enquanto a toxicidade hematológica, como a mielossupressão, especialmente a leucopenia, é frequentemente observada entre os ciclos de quimioterapia. Doxorrubicina tem uma característica de toxicidade limitante da dose total administrada. Ela ocorre em forma aguda e crônica (BEAR et al., 2003).

O principal efeito farmacológico dos agentes de alquilação, por exemplo, a doxorrubicina, que foi utilizada neste trabalho como controle positivo, é comprometer os mecanismos fundamentais envolvidos em todo o ciclo celular, especialmente nas fases G1 e S, tal fato corrobora com os resultados apresentados neste estudo, como a associação da Dox e da Pho-s que amplifica seus efeitos citotóxicos.

A senescência é a parada do crescimento permanente que ocorre em resposta a qualquer envelhecimento, chamado de senescência da replicação tardia, ou ao stress induzido que é denominado de senescência prematura. A senescência celular está diretamente associada aos controles que acontecem na célula durante o ciclo celular. Na fase G1 do ciclo, a célula passa por monitoramentos interno e externo que visam garantir as condições apropriadas à divisão. Para garantir que tais condições intra e extracelulares estejam adequadas à correta duplicação do material genético na fase S, existem dois pontos de checagem em G1, chamados ponto de restrição e ponto de controle (XIAOFEI et. al., 2014). As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 tratadas com a Pho-s e controle foram analisadas quanto à atividade enzimática da β -galactosidase. Foi observada uma diminuição significativa do número de células senescentes quando comparada ao grupo controle, isto ocorre porque o tratamento com a Pho-s diminui significativamente a viabilidade e o número celular, dados que corroboram com o teste colorimétrico do MTT.

As células tumorais MCF7 do grupo controle e tratadas com a Pho-s foram marcadas com a sonda rodamina 123 para visualização da mitocôndria e a sua funcionabilidade por microscopia confocal a laser. As células tumorais do grupo controle apresentaram distribuição intracelular, peri-nuclear normal da mitocôndria, enquanto que em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 tratadas com as concentrações da Pho-s, mostraram profundas

mudanças na morfologia mitocondrial e as mitocôndrias apresentaram-se dispersas no citoplasma, não na região ao redor do núcleo.

Acridine-orange é um corante de ligação de ácido nucleico de células vivas que emite fluorescência verde quando ligado ao dsDNA e fluorescência vermelha, quando ligado a ssDNA ou RNA. Esta característica única o torna útil para estudos de ciclo celular. Acridine-orange também tem sido utilizado como um corante lisossomal, marcando a autofagia celular (SARKISSIAN et. al., 2014).

As células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 tratadas com a Pho-s e controle foram submetidas à marcação com acridine-orange e observadas em microscópio confocal a laser. O grupo controle na concentração de 5 mM da Pho-s apresentou uma marcação do núcleo e dos nucléolos bem delimitados. Porém, nas demais concentrações de tratamento foram observadas a marcação e determinação da heterocromatina. A partir da concentração de 30 mM da Pho-s, as células sofreram mudança na morfologia, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da projeção dos prolongamentos citoplasmáticos. Na maior concentração, as células perdem significativamente a aderência celular.

As citocinas inflamatórias estão associadas com o mau prognóstico e a redução da sobrevida em pacientes com câncer de mama. As citocinas no câncer de mama, em particular funcionam como promotores ou inibidores do crescimento e invasões, dependendo das suas concentrações relativas e a presença de outros fatores moduladores. Diferentes citocinas desempenham um papel importante no controle do sistema imunitário. Interleucinas (IL) são citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos, macrófagos e células epiteliais. A interleucina-1 (IL-1) é constituída família das citocinas IL-1 α , IL-1 β , e um antagonista do receptor específico (IL1ra). Em particular, a IL-1 β é altamente expressa em vários tipos de câncer, incluindo o melanoma, pancreático, e câncer de cólon. Os níveis de expressão de IL-1 β são regulados por vários fatores de transcrição, incluindo o receptor do ácido retinóico (RAR), AP-1, NF-kB . Uma sobre-regulação de IL-1 β , eventualmente, desencadeia a biologia tumor agressivo associado com a invasão de células, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e metástase em vários tumores, incluindo o câncer de cólon e pancreático (JEON et al., 2016). Neste trabalho, a IL-1 β está

diminuída no grupo controle e tem aumento significativo a partir da concentração de 30 mM. Contudo, no grupo tratado com o carreador vazio DODAC não houve diferença significativa entre eles, porém no grupo tratado com a formulação lipossomal houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio. Além disso, a IL-2 sofreu um aumento significativo a partir da concentração de 30 mM de Pho-s. Contudo, no grupo tratado com o carreador vazio DODAC não houve diferença significativa entre eles, porém no grupo tratado com a formulação lipossomal houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica com promoção de tumores e efeitos de inibição (KNUPFER, 2007). No câncer de mama luminal, como por exemplo, as células tumorais MCF7, há a inibição da expressão de IL-6 (LI et al., 2016). Nos resultados apresentados, a IL-6 está diminuída no grupo controle e tem aumento significativo em todas as concentrações de Pho-s. O grupo tratado apenas com o carreador vazio DODAC não teve diferença significativa (ns), entretanto, o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s teve um aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio.

Uma das contribuições mais importantes da linhagem celular MCF7 para a pesquisa do câncer de mama, tem sido a sua utilização no estudo do receptor de estrógeno (ER) alfa, uma vez que esta linhagem celular é uma das poucas que expressam níveis substanciais de ER imitando a maioria dos cânceres de mama humanos invasivos que expressam este receptor (LEE et al., 2015). O receptor de estrógeno, o receptor de progesterona e o receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) são marcadores tumorais clínicos para a terapia adequada para pacientes com câncer de mama. A ausência de ER e PR e a sobre expressão de HER2 tem sido consistentemente associada a um pior prognóstico da doença (SU et al., 2016).

A linhagem de adenocarcinoma de mama humana MCF7 é classificada como luminal A, pois possui um imunoperfil com HER2 negativo, receptor de estrógeno (ER) positivo e receptor de progesterona (PR) negativo ou positivo (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Este dado corrobora com os achados nos experimentos apresentados anteriormente, o qual os receptores ER e PR foram positivos e o HER2 foi negativo nos grupos controles. Contudo, nos grupos

tratados com Pho-s houve um aumento significativo dos receptores ER e PR. O grupo tratado com o carreador vazio DODAC não mostrou diferença entre eles. Entretanto, nos grupos tratados com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve aumento significativo, quando comparado ao grupo DODAC vazio nos receptores ER e PR.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio. Ele produz uma rápida e completa resposta angiogênica e um aumento da permeabilidade capilar. Produzido e secretado por uma série de células normais, ele tem expressão marcada em células tumorais, incluindo o câncer de mama, dado mostrado pelo grupo controle no experimento com o marcador VEGF-R1 e VEGF-R2. O VEGF pertence a uma família das glicoproteínas, que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário. O principal mediador da angiogênese tumoral é o VEGF-A, usualmente referido como VEGF. Vários fatores contribuem para o aumento da expressão do VEGF no câncer de mama. A baixa concentração de oxigênio intracelular bloqueia a degradação do fator indutor da hipóxia (HIF-1a), o que eleva os níveis e determina a hipóxia intracelular, que, por sua vez, determina o aumento da atividade angiogênica pela ativação da transcrição do gene VEGF (BOUDREAU, 2003).

Estudos sugerem que o VEGF está relacionado com o prognóstico em câncer de mama e que pacientes com altos níveis deste fator tem uma doença biologicamente mais agressiva, com metástases mais precoces. A expressão do fator VEGF em tumores, como no de câncer de mama, facilita a migração e a proliferação das células endoteliais, resultando em angiogênese (BOUDREAU, 2003). Neste trabalho o VEGF-R1 e VEGF-R2 foram avaliados nas células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 com os tratamentos Pho-s, DODAC vazio e DODAC/Pho-s. Comparado ao grupo controle, o grupo tratado com Pho-s obteve uma diminuição significativa na expressão dos receptores para os fatores de crescimento vascular endotelial. Entretanto, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença, embora o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s há uma diminuição significativa comparado ao grupo com o carreador DODAC vazio.

A heterogeneidade dos tumores de mama advém da presença de células tronco tumorais com a capacidade de se diferenciar ao longo de vias

divergentes e a presença destas células tronco tumorais podem ser evidenciadas pela análise fenotípica do marcador CD44. CD44, uma glicoproteína transmembrana multi-estrutural e multi-funcional, participa na regulação de muitos processos celulares incluindo a divisão celular, adesão e migração através da ligação com o ácido hialurônico (HA). Demonstra-se que CD44 também desempenha papéis essenciais na tumorigênese, invasão e metástases (XU et al., 2016). Comparado ao grupo controle, o CD44 diminuiu significativamente no grupo tratado com a Pho-s. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença entre os diferentes grupos, porém o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s há um aumento significativo comparado ao grupo DODAC vazio.

O CD34 é uma proteína da superfície celular frequentemente usada como um marcador para a seleção positiva de células estaminais e progenitoras hematopoiéticas humanas, tanto na pesquisa quanto em transplantes clínicos. O marcador tumoral CD34 é muito comum no câncer de próstata. Nos experimentos deste trabalho, não houve diferença significativa entre os grupos tratados comparados ao controle.

As células tronco cancerígenas (CSCs) são originadas de células tronco normais. Portanto, elas possuem características biológicas semelhantes e funções potenciais para quimioresistência, metástase e recidiva tumoral. O antígeno das células do timo 1 (Thy1, CD90) foi identificado como padrões de células tronco mesenquimais (MSCs) pela Associação Internacional de Terapia Celular. CD90 é expresso em algumas linhagens celulares de câncer de mama e pode estar relacionado com o seu grau de malignidade. Comparado ao grupo controle, o CD90 diminuiu significativamente no grupo tratado com a Pho-s. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC quando comparados aos demais grupos não obteve diferença e o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s obteve aumento significativo.

Vários membros da família Bcl-2 humana de proteínas reguladoras da apoptose foram identificadas, incluindo seis anti-apoptóticas, três proteínas pró-apoptóticas estruturalmente similares e diversas proteínas que interagem como agonistas ou antagonistas. Estas proteínas, por sua vez, são reguladas através de modificações e interações pós-traducionais com outras proteínas. As proteínas da família Bcl-2 regulam todos os principais tipos de morte celular,

incluindo apoptose, necrose e autofagia, operando assim como pontos nodais na convergência de múltiplas vias com grande relevância para oncologia. BCL-2 e Bax são duas proteínas envolvidas no controle mitocondrial do complexo mecanismo de apoptose. Elas têm ações muito distintas, com efeitos opostos. BCL-2 apresenta um efeito anti-apoptótico e BAX funciona como um adversário, com a capacidade de induzindo a morte célula, sendo pró-apoptótico (VIVIAN et al., 2010). Os marcadores Bcl-2 e Bax foram analisados anteriormente, os dados encontrados corroboram com achados na literatura. O Bcl-2 diminuiu drasticamente no grupo tratado com Pho-s, quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com o DODAC vazio não sofreu diferença significativa, porém o grupo tratado com o DODAC/Pho-s aumentou quando comparado ao grupo tratado com o carreador DODAC.

As caspases são uma família de cisteína-proteases importantes para a manutenção da homeostase através de regulação da morte celular e inflamação. As caspases são endoproteases que clivam ligações peptídicas numa reação que depende de resíduos de cisteína catalítica no sítio ativo da caspase. Embora o processamento das caspases mediada por inativação pode resultar no substrato, pode também gerar moléculas de sinalização ativas que participam de processos, tais como apoptose e inflamação. Assim, as caspases têm sido amplamente classificados pelas suas funções conhecidas na apoptose. As caspases envolvidas na apoptose foram subclassificados pelo seu mecanismo de ação: caspases iniciadoras (caspase-8 e -9) ou caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) (MCLLWAIN et al., 2013). Neste trabalho foram avaliadas as caspases 3 e 8.

A caspase-3 tem sido um dos marcadores tumorais mais estudados na pesquisa dos mecanismos apoptóticos pela sua localização na cascata das proteases, representando tanto a via intrínseca como a via extrínseca. Quando comparado ao grupo controle, as células tratadas com Pho-s tiveram um aumento significativo da caspase 3. As células tratadas com o carreador vazio DODAC não tiveram diferenças, entretanto, o grupo tratado com DODAC/Pho-s teve um aumento significativo quando comparado ao grupo DODAC.

A caspase 8 normalmente existe como monómero procaspase inativa que é ativada por dimerização e não por clivagem. Este processo é generalizado como um "modelo de proximidade induzida", em que o montante

de eventos de sinalização induz a dimerização e a ativação da caspase. A dimerização também facilita a clivagem autocatalítica da caspase em uma grande e outra pequena subunidade, o que resulta na estabilização do dímero. Quando comparado ao grupo controle, as células tratadas com Pho-s tiveram um aumento significativo da caspase 8. As células tratadas com o carreador vazio DODAC não tiveram diferença significativa entre si, entretanto, o grupo tratado com DODAC/Pho-s teve um aumento significativo quando comparado ao grupo DODAC vazio.

PCNA é uma proteína encontrada em todas as células das espécies eucarióticas com funções associadas não só com a replicação do DNA, mas também com outros processos celulares vitais, tais como a remodelação da cromatina, o reparo do DNA, a coesão de cromátide irmã e o controle do ciclo celular. PCNA foi originalmente descrito como um antígeno para a doença auto-imune em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, detectada apenas nas populações de células em proliferação. Posteriormente, mostrou-se que os níveis de expressão de PCNA durante o ciclo celular são um diferencial associado com a proliferação. Nos anos seguintes, muito tem sido feito para descobrir o papel de PCNA na replicação do DNA, e uma das primeiras funções atribuídas era sua associação a DNA polimerase. O envolvimento crucial do PCNA na proliferação celular e sua associação com a transformação do câncer resultou no uso frequente do PCNA como um marcador do ciclo celular (STOIMENOV, et al., 2009). O grupo tratado com a Pho-s diminuiu drasticamente, quando comparado ao grupo controle. Contudo, o grupo tratado com o carreador vazio DODAC não obteve diferença significativa entre si, porém o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, diminuiu significativamente quando comparado ao grupo DODAC vazio.

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que desempenham um papel central no processo apoptótico. A redução funcional do potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é conhecida como um gatilho para a morte celular por apoptose e este mecanismo pode ser associada com a via de sinalização apoptótica intrínseca (GALLUZZI et al., 2011). O desenvolvimento de novas moléculas alvo específicas à mitocôndria, como por exemplo, a rotenona (inibidor da cadeia respiratória) e o atractilósideo (inibidor da permutação ADP/ATP). Estes

compostos são capazes de modular a fosforilação oxidativa via glicolítica (GULLOTTI; YEO, 2009).

Num estudo do nosso grupo de pesquisa, com células de tumor de Ehrlich, a análise do $\Delta\Psi_m$ mostrou que os efeitos anticancerígenos de Pho-s são atribuídos à sua capacidade de induzir apoptose através de uma redução do $\Delta\Psi_m$ (FERREIRA et al., 2012). Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, a Pho-S induz o mesmo mecanismo em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, o que indica que a redução do $\Delta\Psi_m$ pode ser o evento chave para desencadear uma cascata da sinalização da apoptose.

No intuito de direcionar o alvo mitocondrial, as nanopartículas ou lipossomas têm se desenvolvido utilizando as seguintes estratégias, redução do tamanho da partícula (< 200 nm) o que facilita a permeação no interior do tumor e o acoplamento molecular para reconhecimento tumoral (BIASUTTO, 2010). Neste sentido a formulação lipossomal DODAC/Pho-s é uma partícula que possui menor tamanho (em torno de 60 nm) o que facilita o seu direcionamento para o interior do tumor e, além disso, foi capaz de alterar o potencial mitocondrial significativamente o que o torna um composto mitocondriotópico.

Tendo determinado que a Pho-s induz redução do $\Delta\Psi_m$, a hipótese de que os aspectos morfológicos da mitocôndria também poderiam ser afetados, é comprovado por meio da microscopia confocal a laser, marcada com rodamina 123, no qual a mitocondrial sofre despolarização da membrana e é seguido pela fragmentação mitocondrial induzida pela Pho-s. Este aspecto é característico da célula que sofre morte por apoptose. Portanto, esta descoberta nos leva a estender que a Pho-S induz apoptose através da via intrínseca, em células tumorais MCF7. A partir destes dados, foi realizada uma marcação com a anexina V/PI nas células de adenocarcinoma de mama tratadas com Pho-s para determinação da porcentagem de células em apoptose inicial, tardia e necrose. Os dados mostraram que a Pho-s induz morte por apoptose, pois houve aumento significativo da morte celular por apoptose tardia em todas as concentrações. Contudo, na maior concentração, 40 mM, houve aumento na morte celular por necrose. Estes achados colaboram com dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa com o tratamento

da Pho-s em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7 (FERREIRA et al., 2013).

CFSE-DA é um corante de membrana permeável que pode marcar células por ligação covalente a moléculas intracelulares. O CFSE-DA foi originalmente desenvolvido como um corante de monitoramento de longo prazo para os estudos de migração de linfócitos. Sendo assim, CFSE-DA é um reagente extremamente valioso para estudos imunológicos e de proliferação celular (*in vitro* ou *in vivo*) e o seu comportamento de migração e posicionamento *in vivo* (WOLFENSON et al., 2009).

A taxa de proliferação das células com CFSE-DA tem vantagem sobre a incorporação de ^3H timidina convencional em ensaios de proliferação celular. O método de marcação das células com CFSE-DA é um simples processo que elimina o uso de materiais radioativos e resulta num sinal fluorescente brilhante, que é facilmente detectado pelo citômetro de fluxo. As células marcadas que morrem durante o período de cultura permanecem detectáveis até desintegrarem. Estas células em apoptose e fragmentos celulares podem causar aumento geral e sinais de CFSE-DA menos definidos que podem afetar artificialmente os resultados (TOLEDO-PIZA et al., 2013).

As células tumorais de mama MCF7 foram tratadas com Pho-s nas concentrações de 20, 30 e 40 mM, em períodos de 24, 48 e 72 horas. Em todos os tratamentos ocorreu diminuição significativa da proliferação celular. Estes dados corroboram com os experimentos realizados anteriormente, a Pho-s é capaz de induzir mecanismos distintos de morte celular por apoptose e inibe a capacidade de proliferação celular, aumentando a proporção de células em senescência.

Nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados significativos com o tratamento da Pho-s em diversas linhagens tumorais e normais. Assim como, neste trabalho foi obtida a somatória dos valores da IC50% nos diferentes tempos de tratamento com a Pho-s, e as formulações DODAC e DODAC/Pho-s, as alterações morfológicas após o tratamento e visualizadas na microscopia de luz e Confocal, as alterações nas fases do ciclo celular, além dos resultados com os marcadores celulares e ensaio de proliferação celular sugerem o uso da Pho-s como um agente antitumoral capaz de induzir morte celular de

maneira seletiva e com mecanismos de sinalização celular característicos dos fosfolípidos antitumorais.

6- CONCLUSÃO

- A fosfoetanolamina sintética apresentou atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7. As concentrações inibitórias IC50% obtidas mostraram que os tratamentos com a Pho-s apresentaram citotoxicidade significativa na linhagem de adenocarcinoma de mama humana MCF7 nos tempos de 24, 48 e 72h;
- Os tratamentos com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s também apresentaram citotoxicidade significativa em diferentes proporções molares nas células tumorais de mama MCF7;
- A população celular das fases do ciclo celular tratadas com a Pho-s induziu parada na fase G2/M após 24 h de tratamento; e o aumento do DNA fragmentado após 48 h de tratamento com a Pho-s;
- O tratamento com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s aumentou a porcentagem de células com DNA fragmentado e diminuição da fase G0/G1 do ciclo celular;
- Os tratamentos com a Pho-s, o DODAC vazio e o DODAC/Pho-s mostraram atividade antiproliferativa, diminuição da viabilidade e perda da aderência celular;
- O tratamento com a Pho-s levou a mudanças na morfologia celular das células tumorais de mama, principalmente a morfologia mitocondrial, que perdem sua integridade e saem da região peri-nuclear. A porcentagem de células com mitocôndrias inativas aumenta significativamente com os tratamentos da Pho-s e DODAC/Pho-s.
- A Pho-s induziu aumento da apoptose tardia em células tumorais MCF7, enquanto o DODAC/Pho-s aumentou a apoptose tardia e inicial;

- Os valores obtidos com a taxa de proliferação mostraram diminuição da resposta proliferativa de células tumorais MCF7 quando tratadas com Pho-s corroboram os resultados obtidos pelo ensaio MTT. Estes dados reforçam o potencial uso da Pho-s e especificamente de sua formulação lipossomal DODAC/Pho-s como um fármaco ou carreador com propriedades antineoplásicas.

REFERENCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular. 3ª edição. **Artmed**. 2011.
- ANAIT, S.; LEVENSON, V. Perspectives in Cancer Research MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. **Cancer Research**. 57: 3071-3078, 1997.
- ANDREESSEN, R.; MODOLELL, M.; WELTZIEN, H. U.; EIBL, H.; COMMON, H. H.; LOHR, G. W.; MUNDER, P. G. Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids. **Cancer Res**. 38: 3894-9, 1978.
- 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**, 85: 283-200, 2007.
- BEAR, H. D.; ANDERSON, S.; BROWN, A. et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. **Journal of Clinical Oncology**, 21: 4165-4174, 2003.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature reviews**. 2013.
- BIASUTTO, L.; DONG, L.; ZORATTI, M.; NEUZIL, J. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. **Mitochondrion**, 10: 670-681, 2010.
- BIERHANZL, V. M.; ABALA, R. C.; STON, M.; KUBINEC, R.; SZABO, A. H.; PODOLEC, P. Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate. **J. Sep. Sci**. 2015, 38, 67–72.
- BONDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res**. 5(3):140-6, 2003.
- BUSTO, J. V.; DEL CANTO-JAÑEZ, E.; GOÑI, F. M.; MOLLINEDO, F.; ALONSO, A. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. **J Chem Biol**. 1: 89-94, 2008.
- DEY, P. Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. **J Clin Pathol**. 2004.
- DONEPUDI, M. S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S. J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. 2015.
- DRBOHLAVOVA, J.; CHOMOUCKA, J.; ADAM, V.; RYVOLOVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. **Current Drug Metabolism**. 14: 547-564., 2013.
- ELLISON, D. W.; BEAL, M. F.; MARTIN, J. B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. **Brain Res**. 417: 389–92, 1987.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Deliv. Rev.** 63: 136-151, 2011.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; NETO, S. C.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. **J. Cancer Sci Ther.** 3: 53-59, 2011.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F. L.; RADIN, A. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomed Pharmacother.** 66: 541-8, 2012.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; FILHO, O. M. R.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Anticancer effects of synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Research.** 32: 95-104, 2012.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; MENDONÇA, O. R. F.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 67: 481-487, 2013.

FERREIRA, A.K.; FREITAS, V.M.; LEVY, D.; RUIZ, J.L.; BYDŁOWSKI, S.P.; RICÍ, R.E.; FILHO, O.M.; CHIERICE, G.O.; MARIA, D.A. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. *PLoS One*, v.8, n.3, p.e57937, 2013.

FUKUOKA, M. et al. Identification of preferentially reactivated genes during early G1 phase using nascent mRNA as an index of transcriptional activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 430: 1005-1010, 2013.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROMER, G. Mitochondrial dynamics: a strategy for avoiding autophagy. **Curr Biol.** 21:478-80, 2011.

GIBELLINI, F.; SMITH, T. K. The Kennedy Pathway—De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. **Life.** 62: 414-428, 2010.

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

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research.** 13: 215, 2011.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JEON, M.; HAN, J.; NAM, S. J.; LEE, J. E.; KIM, S. Elevated IL-1 β expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. **Chemico-Biological Interactions.** 258:126-133, 2016.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids Health Dis.** 9(33), 2010.

KNUPFER, H.; PREIB, R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). **Breast Cancer Research and Treatment**. 102: 129-135, 2007.

KUMAR, R.; KUMAR, A. N.; SRIVASTAVA, A. Breast cancer tumor markers. **J Solid Tumors**. 2: 43-6, 2012.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **JNCI J Natl Cancer Inst**. 2015.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res**. 57: 3071-3078, 1997.

LI, Q.; SATO, E. F.; KIRA, Y.; NISHIKAWA, M.; UTSUMI, K.; INOUE, M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2001.

LI, W.; ITOU, J.; TANAKA, S.; NISHIMURA, T.; SATO, F.; TOI, M. A homeobox protein, NKX6.1, up-regulates interleukin-6 expression for cell growth in basal-like breast cancer cells. **Experimental Cell Research**. 343: 177-189, 2016.

LUNA, A. C. L.; SARAIVA, G. K. V.; MENDONÇA-FILHO, O.; CHIERICE, G. O.; NETO, S. C.; CUCCOVIA, I. M.; MARIA, D. A. *Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes*. **International Journal of Nanomedicine**. 2016.

MENDOZA, A. E. H.; CAMPANERO, M. A.; IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Antitumor Alkyl Ether Lipid Edelfosine: Tissue Distribution and Pharmacokinetic Behavior in Healthy and Tumor-Bearing Immunosuppressed Mice. **Clin Cancer Res**. 2009.

MENEGUELO, R. Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10, 2007. 133f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.

MOLLINEDO, F.; DE LA IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; ESTELLA-HERMOSO, A.; VILLA-PULGARIN, J. A.; DE FRIAS, M.; ROUÉ, G.; GIL, J.; COLOMER, D.; CAMPANERO, M. A.; BLANCO-PRIETO, M. J. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. **Clin Cancer Res**. 16(7):2046-2054, 2010.

MORGAN, D. O. In the cell cycle: principles of control. (ed. Lawrence, E.) 157–173 **New Science Press**, 2007.

MUNDER, P. G.; MODOLELL, M. Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. **Int Arch Allergy Appl Immunol**. 45: 133-5, 1973.

NGWENYA, B. Z.; FIAVEY, N. P.; MOGASHOA, M. M. Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids. **Eur J Cancer**. 28: 1637-42, 1992.

OLIVEIRA, T. R. **Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica**. 2008. 147f. Dissertação de Mestrado (Instituto de Física-Departamento de Física Geral), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OUTHOUSE, E. L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J.** 30: 197-201, 1936.

PAVLOVIC, Z. Distinctive Roles and Molecular Regulation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase Alpha and Gamma Splice Variants. **Thesis presented to The University of Guelph.** 2014.

PERRY, T. L.; BERRY, K.; HANSEN, S.; DIAMOND, S.; MONK, C. Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. **J Neurochem.** 18: 513-519, 1971.

SARKISSIAN, T.; TIMMONS, A.; ARYA, R.; ABDELWAHID, E.; WHITE, K. Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. **Methods**, 68:89-96. 2014.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, 154: 123-140, 1997.

SODERGREN, E. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement. 2000. 78 f. Ph. D. thesis (Medical Science in Geriatrics) - Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, Uppsala University, Scandinavia, 2005.

STOIMENOV, I.; HELLEDAY, T. PCNA on the crossroad of cancer. **Biochemical Society Transactions.** 37, 2009.

SU, C. H.; LIN, H.; TZENG, T. Y.; HSIEH, W. T.; HSU, M. T. Regulation of IL-20 Expression by Estradiol through KMT2B-Mediated Epigenetic Modification. **Plos one.** 2016.

TAUGUCHI, H.; ARMAREGO, W. L. Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. **Med Res Rev.** 18: 43-89, 1998.

TAURIN, S.; NEHOFF, H.; GREISH, K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? **Journal Control Release.** 28: 265 - 275, 2012.

TOLEDO-PIZA, A. R.; NAKANO, E.; RICCI, E. E. G.; MARIA, D. A. Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. **Cell Prolif.** v. 46, p. 97-108, 2013.

TURNER, O.; PHOENIX, J.; WRAY, S. Developmental and gestational changes of phosphoethanolamine and taurine in rat brain, striated and smooth muscle. **Expcriamcnial Physioiology.** 79:681-689, 1994.

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

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 9: 112-24, 2008.

VIEIRA, D. B.; PACHECO, L. F.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Assembly of a model hydrophobic drug into cationic bilayer fragments. **Journal of Colloid and Interface Science**, 293: 240-247, 2006.

VIVIAN, F.; WAITZBERG, A. F. L.; MADEIRA, M.; OSÓRIO, C. A. B. T.; SOARES, F. A.; GEBRIM, L. H. Expression of BCL-2 and BAX proteins in breast cancer after in vivo tamoxifen administration. **Rev Bras Mastologia**. 21(1):3-8, 2011.

XIAOFELI, X.; ZHENXIAO, L.; WENAN, Q.; BEIHUA, K.; JULIE, K.; JIAN-JUN, W. Inactivation of AKT induces cellular senescence in uterine leiomyoma. **Endocrinology**. 2014.

XU, H.; WU, K.; TIAN, Y.; LIU, Q.; YUAN, X.; ZHANG, L.; WU, G. S.; WU, K. CD44 correlates with clinicopathological characteristics and is upregulated by EGFR in breast cancer. **International Journal of Oncology**. 49, 2016.

WOLFENSON, H.; HEINS, Y. I.; GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. D. The heel and toe of the cell's foot: a multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions. **Cell Motil. Cytoskeleton** 66, 1017–1029, 2009.

YANG, X. R.; CHANG-CLAUDE, J.; GOODE, E. L.; COUCH, F. J.; NEVANLINNA, H.; MILNE, R. L.; GAUDET, M.; et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst.** 3:250-63, 2011.