Adilson Kleber Ferreira

**Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios
de membrana celular com potencial efeito
antitumoral e apoptótico em modelos de tumores
experimentais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2013

Dedicatória

Aos amigos por todas as conversas jogadas foras em horas de descontração, das nossas inquietações que resultaram em descobertas, dos tantos risos e momentos de tristezas que também compartilhamos juntos. Alguns finais de semana de preocupação e angustias devotado uns aos outros, a expectativa de boas notícias, enfim... do companheirismo vivido. Algum dia iremos nos perder no tempo, seja por uma opção pessoal ou pela escolha do destino, pois em breve cada um irá seguir seu caminho, formar sua família, assim, talvez iremos restritamente nos encontrar em algum encontro de final de semana, dizer algumas novidades e falar sobre as expectativas. Porém, um dia, momentos assim serão cada vez mais raros, as opções individuais irão se encarregar de nos afastar. Os filhos então nos perguntarão: “Papai quem são aquelas pessoas?” Neste momento o coração apertado e as lembranças irão trazer as recordações dos tantos anos de alegria junto a vocês, amigos. Desta forma, fica uma dedicatória humilde aos meus amigos, meu muito obrigado e a promessa de lembrar todos vocês que são responsáveis pela minha formação, como sempre disse, todos vocês. Não deixe que a adversidade seja causadora de desavenças fazendo seus corações sofrerem desnecessariamente. Lembre-se que cabe a nós decidir a nossa história, ninguém é uma ilha. No momento não tenho certeza do meu futuro, mais a única certeza que tenho é que grandes amigos eu fiz, assim, eu dedico este trabalho, a todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS por tudo que me proporcionou nesta caminhada, a oportunidade de estar realizando este trabalho. Agradeço o presente divino que me enviaste, a família querida que sempre me conforta e os excelentes amigos que conquistei.

Aos meus queridos pais, Maria José Ferreira e Celso Vicente Ferreira, exemplos de força, esperança, dignidade, humildade, amor e carinho, não existem palavras para descrever o que vocês são para mim. Agradeço a educação e formação que me proporcionaram em meio a tantas dificuldades. Olhando para o passado vejo que conseguimos vencer e hoje no presente, tenho a certeza que podemos aproveitar os momentos maravilhosos que DEUS tem nos proporcionado, AMO VOCÊS.

Aos meus avôs, Sebastiana Pereira e José de Castro Sobrinho (*em memória*), querida avó, conseguimos né! A Sra. não tem ideia da grandeza de sua presença na minha vida, seus ensinamentos e conhecimento sobre o mundo serão para sempre fonte de minha inspiração. Em minha opinião avô o Sr. é o homem mais inteligente que conheci, pude entender que para ser inteligente basta ser simples. Infelizmente nos deixou antes de poder te oferecer este presente. Irei seguir seus passos, melhorar os com seus acertos e me corrigir com seus defeitos, obrigado por me ajudar a chegar até aqui!

Ao meu grande amor, Vanessa Martins, você me mostrou que amar é querer compartilhar cada segundo, seja ele qual for. Sua humildade e simplicidade me encantam a cada dia, aprendi ao seu lado a amar e ser amado. Em todos os momentos desde que te conheci você esteve sempre presente. Durante todo este tempo percebi se tenho um grande diamante, este é você. Obrigado por compartilhar seus momentos juntos aos meus, TE AMO.

A tia Zuleika, pelos momentos de atenção, dedicação e paciência, seus dotes culinários são fantásticos, obrigado por toda sua generosidade.

A Edna Fernandes e ao Katsutoshi Ito, pelas conversas fascinantes durante os plantões noturnos que me motivaram a entrar na ciência, agradeço pela oportunidade de estar aqui hoje e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria, pela oportunidade, dedicação e orientação durante todas as etapas deste trabalho. Agradeço imensamente as horas de discussão científica, que tanto me proporcionaram a progressão acadêmica. Os ensinamentos que levo deste grande período em seu laboratório, não estão apenas ligados ao aprendizado intelectual mais também ao crescimento pessoal, ético e moral.

Aos grandes amigos, Ricardo Alexandre, Aline Vivian, Rafael Porto e Paulo Júnior. Aprendi com vocês o valor da verdadeira amizade, até então desconhecida por mim. Sei que foi difícil me aguentar durante todo este tempo, mais isso foi apenas o começo! Toda evolução pessoal e acadêmica necessita de uma base sólida, vocês me fornecem esta fonte, sei que posso contar com vocês sempre, este trabalho também é de vocês.

A Dra. Debóra Levy e ao Dr. Jorge Luis Mária. Momentos valiosos de discussão acadêmica proporcionada por vocês serão inesquecíveis, pessoas de enorme bondade, dignidade e humildade, obrigado pelos conselhos sempre muito valiosos e pela amizade.

Ao Dr. Fábio Luiz Navarro e ao Adriano Radin, amigos que sei que posso contar sempre, humildade, disposição e carisma são algumas qualidades que me espelho em vocês, amizades que se consolidam cada dia mais.

Ao Dr. Renato Meneguelo, sua confiança em mim e sua amizade foram determinantes neste trabalho. Discussões científicas que contribuíram em todas as etapas deste estudo. Tenho grande consideração pelo seu caráter e honestidade, obrigado por essa oportunidade de ter você como amigo.

A Dra. Vanessa Freitas, por toda sua paciência, dinamismo e colaboração, agradeço por toda generosidade e pelos conselhos em minhas inquietações científicas.

Ao Dr. Eduardo Rego Magalhães e a Dra. Barbára Santana-Lemos, pelo qual tenho grande admiração por seus trabalhos, meus agradecimentos pela colaboração e oportunidade.

Ao Dr. Antonio Carlos Fávero Caires (*em memória*). Obrigado pela sua dedicação e colaboração neste trabalho, sua admirável empolgação com a ciência me motivou

sempre. Deixo registrado meu enorme respeito pelo seu trabalho e contribuição para a ciência.

Ao Dr. Gilberto Orivaldo Chierice e ao Dr. Salvador Claro Neto, sempre levantando questões científicas fascinantes e curiosas, obrigado pelas longas tardes de discussões.

Ao Dr. Sergio Paulo Bydlowski, por todo apoio e colaboração neste trabalho, sempre me atendendo com muita atenção e paciência, além de disponibilizar seu laboratório para a realização deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular, Cleide, Dra. Luciana e a Diná pela alegria e atenção que sempre me prestaram.

A Dra. Juliana Pereira e a Graciela Aparecida Brocardo, por disponibilizar o laboratório para as análises de citometria de fluxo, além das discussões sobre as formas de aquisições, que me ajudaram a melhor entender sobre o assunto.

Ao Dr. Ivo Lebrun, obrigado pela amizade e confiança em mim depositada, agradeço por toda sua disposição e atenção.

A Dra. Vera Luiza Capelozzi, sempre muito generosa e atenciosa, por disponibilizar seu laboratório para a realização das análises imunoistoquímicas.

I would like to thanks Dr. Frank Kruyt from University of Groningen, Netherlands for the support and that he provided me over the period in his laboratory. I could grow and improve my scientific background. Also, I need to thank Saravanan Yuvaraj, PhD, who helped me with everything that I needed in the laboratory, around it and in the Netherlands.

Next, I need to thank all the people who create such a good atmosphere in the lab and encouraging me to pursue an advanced degree; Dr. Timmer-Bosscha, Dr. Meijer, J, Dr. van Vugt, MA, Kirill Pavlov, Judith Honing, Milind Pore, Ingrid Roosmalen, Elina Ovchynnikova and Justin Joseph

A Dra. Rosemary Viola Bosh, fica minha admiração pela sua determinação, descontração e alegria. Amiga de todos os momentos, a você expresse meu carinho com esse humilde, mais de coração, agradecimento.

A Dra. Kerly Cristina Pasqualoto e ao Dr. Marcio Henrique Zaim, muito obrigado pelo privilégio de poder compartilhar da amizade de vocês, dedicação, respeito e harmonia são os exemplos que tenho de vocês.

A Dra. Roseli Ricci, pela imensa ajuda com a microscopia de varredura e pelas longas conversas, obrigado pelos ensinamentos.

A Dra. Iara Kretzer e ao seu marido Fernando, pela amizade sincera e confiança em mim depositada, pois nos momentos mais difíceis vocês estavam ao meu lado, agradeço todas as tardes de alegria e descontração.

Ao Dr. Marcelo Bispo, grande amigo pelo qual tenho muita estima e consideração, obrigado pela sua imensa ajuda, principalmente nos meus primeiros dias na Holanda. Certamente, nossa amizade se estende além dos Países Baixos, certeza que sempre poderá contar com a minha amizade.

Aos amigos, Andrea Parente e Bruno Jasen, pessoas simples e de enorme coração que me ajudaram muito, tornaram os dias em Groningen mais agradáveis, nossa amizade se consolida a cada dia, obrigado amigos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Thiago, Álvoro, Miryam, Fernanda, Adrian, Kátia, Juliana, Mário, Carlos, Gustavo, obrigado pela amizade e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Genética, Dr. Alexandre Pereira e Diana Aparecida, pela amizade, colaborações e auxílios em diversos trabalhos.

Aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Patrícia, Antonia, Júlio, Márcia, Silvana, João, Beatriz, por todo apoio prestado e as horas de descontração.

A secretária da pós-graduação em Fisiopatologia Experimental, em especial a Tânia Souza e a Liduvina Barros pela atenção, dedicação e prontidão em me ajudar, muito obrigado.

Agradeço à FAPESP, pelo auxílio financeiro em todas as etapas da minha formação acadêmica, à iniciação científica, mestrado e o doutorado.

“O acaso só favorece as mentes preparadas”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características Gerais dos Fosfolipídios Antineoplásicos	1
1.2 Mecanismo de ação dos Fosfolipídios Antineoplásicos	5
1.3 Fosfoetanolamina	11
2.0 OBJETIVO GERAL	14
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Cultura celular	15
3.2 Cultura tridimensional em matrigel e análise das modificações morfológicas por microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura	15
3.3 Avaliação da citotoxicidade	17
3.4 Ensaio de proliferação celular nas células endoteliais HUVEC	17
3.5 Ensaio de migração das células endoteliais HUVEC	18
3.6 Teste da formação do tubo nas células endoteliais HUVEC	18
3.7 Análise das fases do ciclo celular	18
3.8 Quantificação e análise morfológica pela coloração com Hoechst/PI	19
3.9 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo (Anexina V/PI)	20
3.10.1 Avaliação da atividade da caspase 3 e 8 por citometria de fluxo	20
3.10.2 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)	21
3.10.3 Avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas Bad, Bax e Bcl-2 por citometria de fluxo	22
3.10.4 Expressão dos receptores de superfície DR4 e DR5 por citometria de fluxo	23
3.10.5 Western blot	23
3.10.6 Análise ultraestrutural por microscopia de transmissão	24

3.10.7 Modelo <i>in vivo</i> de estudo.....	25
3.10.7.1 Declaração de ética.....	25
3.10.7.2 Implante das células tumorais e delineamento animal.....	25
3.10.7.3 Avaliação dos efeitos antitumorais.....	26
3.10.7.4 Expansão do número de células leucêmicas de camundongos PR C/EBP α +/- utilizando transplante em camundongos NOD/Scid.....	27
3.10.7.5 Delineamento experimental.....	28
3.10.7.6 Análises hematológicas.....	30
3.10.7.7 Análises do número total de reticulócitos do sangue periférico.....	30
3.10.7.8 Imunofenotipagem e determinação da apoptose/necrose no tratamento dos animais portadores de leucemia promielocítica.....	30
3.10.7.9 Análise bioquímica dos marcadores hepáticos.....	31
3.10.7.10.1 Análise dos efeitos antitumorais da FS por PET/CT.....	31
3.10.7.10.2 Preparo das amostras para análises histopatológicas.....	32
3.10.7.10.3 Avaliação histopatológica pela coloração de Hematoxilina-eosina.....	32
3.10.7.10.4 Determinação da fragmentação nuclear das células tumorais no tecido histológico por fluorescência.....	33
3.10.7.10.5 Análise por imunoistoquímica das proteínas p38 e EK1/2.....	33
3.10.7.10.6 Análise citoquímica das fibras de colágeno pela coloração de Picrosirius e fibras elásticas por Verhoeff's.....	34
3.10.7.10.7 Análises estatísticas.....	34
4.0 RESULTADOS	36
4.1 Modelo experimental do carcinoma renal murino - RENCA.....	36
4.1.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos.....	36
4.1.2 Efeitos da FS e Sunitinib na inibição da proliferação celular em células HUVEC.....	39
4.1.3 FS reduz a expressão do receptor de superfície VEGF-A nas células endoteliais HUVEC.....	42
4.1.4 Efeito da FS na formação do tubo capilar em matrigel e na migração das células endoteliais HUVEC.....	44

4.1.5 FS e Sunitinib induzem modificações no ciclo celular nas células endoteliais HUVEC	51
4.1.6 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial nas mitocôndrias isoladas das células RENCA.....	54
4.1.7 Avaliação das alterações morfológicas das células tumorais RENCA pela coloração Hoechst /PI.....	57
4.1.8 Avaliação morfológica por MEV e microscopia confocal a laser das células RENCA em cultura 3D.....	59
4.1.9 Determinação da atividade da caspase 3 e 8 e apoptose nas células RENCA por citometria de fluxo	65
4.1.10.1 Avaliação da expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2, envolvidas da regulação da apoptose.....	70
4.1.10.2 Avaliação <i>in vivo</i> dos efeitos antitumorais da FS e Sunitinib, nos modelos experimentais do carcinoma renal murino RENCA em camundongos BALB/c.....	72
4.1.10.3 Análise hematológica e bioquímica dos portadores do carcinoma renal murino RENCA	80
4.2 Modelo experimental do melanoma humano SK-MEL-28.....	86
4.2.1 Avaliação do efeito citotóxico	86
4.2.2 FS induz morte celular por apoptose nas células SK-MEL-28 detectado pelo teste de Anexina V/PI	88
4.2.3 Avaliação do ciclo celular demonstra que a FS induz apoptose nas células SK-MEL-28	90
4.2.4 FS induz despolarização mitocondrial e ativação da caspase-3 nas células SK-MEL-28	92
4.2.5 Avaliação da expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2 envolvidas na regulação da apoptose.....	96
4.2.6 Avaliação ultraestrutural dos efeitos morfológicos induzidos pela FS nas células SK-MEL-28	98
4.2.7 Avaliação <i>in vivo</i> dos efeitos antitumorais da FS no melanoma humano SK-MEL-28	106
4.2.8 Avaliação dos efeitos antitumorais da FS por micro PET/CT [¹⁸ F] FDG	108
4.2.9 Análise histopatológica dos tumores dorsais dos animais BALB/c ^{nu/nu} tratados com FS e DITC.....	110
4.2.10.1 Avaliação do envolvimento das proteínas ERK1/2 e p38 no melanoma humano SK-MEL-28 em resposta ao tratamento com a FS	114

4.3 Modelo experimental do adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células (NSCLC).....	116
4.3.1 FS induz citotoxicidade nas células NSCLC	116
4.3.2 FS reduz o potencial elétrico da membrana mitocondrial nas células NSCLC.....	118
4.3.3 FS reduz o nível de expressão e modifica a redistribuição citoplasmática dos receptores DR4 e DR5	120
4.3.4 FS induz apoptose nas células NSCLC de forma caspase-dependente avaliado pelo teste de Anexina V/PI.....	124
4.3.5 FS induz apoptose nas células NSCLC pela ativação da via mitocondrial dependente da ativação das caspases.....	126
4.3.6 FS reduz a expressão da Bcl-2, promovendo a translocação do Bax e induzindo a clivagem do Bid.....	128
4.4 Modelo experimental de leucemia promielocítica aguda	132
4.4.1 Transplante de células leucêmicas de camundongos PR C/EBP α +/- utilizando camundongos NOD/Scid.....	132
4.4.2 Avaliação do tratamento dos animais NOD/Scid portadores de leucemia promielocítica aguda.....	135
4.4.3 Avaliação por imunofenotipagem das células obtidas dos órgãos dos animais NOD/Scid leucêmicos após os tratamentos com FS, DA e ATRA	138
4.4.4 Avaliação dos efeitos na indução de apoptose pelos tratamentos por citometria de fluxo	149
5.0 DISCUSSÃO	154
6.0 CONCLUSÕES	179
7.0 REFERÊNCIAS	180

Lista de abreviaturas

$\Delta m\Psi$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
AEF	Amino etil-éster-fosfórico
AIF	Fator indutor de apoptose
ANT	Transportador de nucleotídeos de adenina
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATRA	Ácido all-trans retinóico
AFTs	Alquilfosfolipídios Antitumorais
AFC	Alquilfosfocolina
Bad	Promotor de morte associado à Bcl-2
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bax	Proteína x associada à Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-Xl	Linfoma de células B extra grande
Bid	Agonista de morte – domínio de interação de BH3
CDKs	Ciclina dependente de quinases
Caspase	Proteases cisteíno aspartato dependente
CRH	Carcinoma renal humano
Cyp D	Ciclofilina D
CrmA	<i>Cytokine response modifier A</i>
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte
DED	Domínio efetor de morte
DHL	Desidrogenase láctica
DITC	Dacarbazina

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ErFC	Erucilfosfolcolina
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FasL	Fas ligante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fosfoetanolamina Sintética
FL	Fosfolipídios
HefC	Miltefosina
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LSs	Lisofosfolipídios
LisoFC	Lisofosfatidilcolina
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MAC	Membrana externa mitocondrial
MAPKs	Proteínas quinases ativadoras mitogênicas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NSCLC	Carcinoma de pulmão de não pequenas células
PARP-1	Poli-ADP-Ribose Polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pRB	Proteína retinoblastoma
P-TEFb	Fator de transcrição basal
RAR α	Receptor do ácido retinóico α

RE	Retículo Endoplasmático
MMP	Poros de transição mitocondrial
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
RSC	Roscovitine
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRADD	Domínio de morte relacionado ao receptor de TNF
TRAIL	Ligante de indução de apoptose relacionado ao TNF
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

Ferreira AK. Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais. [Dissertação]. São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Neste estudo foram avaliados os efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética (FS) em modelos de tumores experimentais e as vias de sinalizações envolvidas nesta atividade. *In vitro* a FS foi citotóxica para as linhagens de células tumorais de melanoma humano, SK-MEL-28, carcinoma renal murino RENCA e para as células do carcinoma de pulmão de não pequenas células NSCLC. Alterações ultraestruturais como a condensação da cromatina, formação de *blubes* de membranas e mitocôndrias eletrodensas foi acompanhada pela redução do potencial elétrico mitocondrial. Aumento da ativação da caspase 3 e 8 e da expressão da proteína Bax, além da redução da CDK9 e CDK4/6, também foram observados. A redução da migração e proliferação das células endoteliais HUVEC induzida pela FS foi associada com a modulação da expressão do VEGF-A, resultando na inibição *in vitro* da formação do tubo endotelial. *In vivo* a FS foi capaz de inibir o crescimento dos tumores sólidos do melanoma e do carcinoma renal murino de forma superior aos quimioterápicos Dacarbazina (DITC) e ao Sunitinib. No modelo de metástase pulmonar utilizando as células RENCA, a FS reduziu o número de nódulos metastáticos pulmonares e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais. Os efeitos terapêuticos da FS também foram avaliados no modelo de leucemia promielocítica aguda (LPA) transplantada em camundongos NOD/Scid. O tratamento com a FS reduziu o número de blastos periféricos e infiltrados na medula óssea e nos parênquimas, esplênico e hepático. De forma superior a Daunorrubicina (DA) e ao Ácido all-trans retinóico (ATRA), a FS induziu apoptose nos clones malignos que expressam CD34⁺, bem como nas células CD117⁺/Gr-1⁺. Este conjunto de resultados mostra que a FS é um composto promissor na terapêutica contra neoplasias.

Descritores: Fosfoetanolamina sintética, apoptose, migração, proliferação, melanoma, carcinoma renal, leucemia.

Summary

Ferreira AK. Alkyl phosphate synthetic precursor of the cell membrane phospholipids with potential antitumor and apoptotic effects in experimental tumor models. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

In this study, we evaluated the antitumor effects of synthetic phosphoethanolamine (FS) in an experimental tumor model and the signaling pathways involved in this activity. *In vitro*, FS was cytotoxic to tumor cell lines of human melanoma, SK-MEL-28, renal carcinoma murine, Renca, and for non-small cell lung cancer, NSCLC. Ultrastructural changes such as chromatin condensation, blubes formation on membranes and electrodense mitochondria were accompanied by a reduction of the mitochondrial electric potential. Increased activation of caspase-3, 8 and Bax protein expression, in addition to a reduction of CDK9 and CDK4/6 levels, was also observed. The reduction of migration and proliferation of endothelial cells, HUVEC, induced by FS was associated with the modulation of VEGF-A-expression, resulting in the *in vitro* inhibition of tubulogenesis. *In vivo*, FS was able to inhibit the growth of solid tumors of melanoma and renal carcinoma more potently than Dacarbazine (DITC) and Sunitinib. In the lung metastasis model, using RENCA cells, FS reduced the number of metastatic lung nodules and increased the survival rate of the animals. The therapeutic effects of FS were also evaluated in the model of acute promyelocytic leukemia transplanted in mice NOD/Scid. The treatment with FS reduced the number of peripheral blasts and infiltrates in the blood marrow, splenic and hepatic parenchyma. Fs was more potent than Daunorubicine (DA) and all-trans retinoic acid (ATRA) in the induction of apoptosis in the malignant clones expressing CD34⁺ as well as CD117⁺/Gr-1⁺ cells. Taken together, theses results show that FS is a promising compound for the therapy against tumors.

Descriptions: Synthetic phosphoethanolamine, apoptosis, migration, proliferation, melanoma, renal carcinoma, leukemia.

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais dos Fosfolipídios Antineoplásicos

Membranas biológicas são compostas basicamente por três componentes fundamentais: os fosfolipídios (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolipídios de membrana são estruturas formadas por cadeias hidrofóbicas no interior da bicamada lipídica e com cabeça polar situada no espaço citoplásmico aquoso. 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 diversas funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma ampla 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).

Os FLs participam de processos que influenciam as propriedades das proteínas associadas à membrana e servem como precursores de importantes segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. Há evidências de que a distribuição de diferentes FLs na bicamada membrana não é aleatória, e que as consequências físicas da sua redistribuição pode ser importantes na estrutura e na sinalização celular. Com base nesta abordagem, um grupo de pesquisadores no final da década de 1960, Eibl, Arnold, Weltzien e Westphal em busca de novas moléculas imunomoduladoras, proveniente dos FLs, identificaram o primeiro

análogo metabolicamente estável da Lisofosfatidilcolina (LisoFC). Desde então, a utilização dos lisofosfolipídios (LSs) como fonte de novos compostos bioativos tem sido baseada na conhecida atividade biológica, atuando como reguladores de diversas atividades enzimáticas celulares, tais como a ativação de macrófagos peritoneais e ao aumento da resposta imunológica (Berkovic, 1998).

Porém, como os LSs são instáveis metabolicamente e rapidamente metabolizados na membrana celular, esforços foram realizados na tentativa de aumentar a estabilidade química destes compostos, potencializando a capacidade imunomoduladora. Modificações estruturais na LisoFC, como a substituição da ligação éster por éter na região que conecta o glicerol a cadeia de hidrocarbonetos foram realizadas, tornando as estruturas análogas metabolicamente resistentes à acetiltransferases e as lisofosfolipases, responsáveis pelo metabolismo dos fosfolipídios (Eibl et al., 1967).

No decurso do desenvolvimento, Munder e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que entre alguns destes análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquil-derivados, apresentavam efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais (Munder et al., 1973; Andreessen et al., 1978). Atualmente, estes éteres derivados da LisoFC pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade citostática. Em contraste, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os AFTs não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto celular, e sim, seus efeitos tumorais estão relacionados com a modificação do *turnover* na membrana celular (Jiménez-lópez et al., 2010).

Os lipídios antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes subtipos: O primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolipídios, coletivamente chamados de éter lipídios antitumorais ou análogos alquilfosfolípeos antitumorais (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 (AFC), que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formado por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (HefC; Miltefosina) (Mollinedo et al., 2004; Busto et al., 2008).

A Edelfosina destaca-se na prática clínica como eficaz no tratamento de leucemia aguda, sendo capaz de induzir apoptose o que permitiu torna-se o protótipo para a elaboração de novos éteres-derivados. Com relação aos estudos de estrutura atividade, claramente indicam que as substituições em C2 e C3 da Edelfosina bloqueiam completamente a capacidade da molécula de induzir a apoptose. Além disso, a presença de um curto grupo, O-metil-não-hidrolizável em C2, bem como um grupo polar na cabeça da fosfocolina no C3 são críticos para suas ações apoptóticas. No entanto, a cadeia de O-octadecil em C1 pode ser substituída por outros O-alquil de cadeia longa sem afetar a habilidade do éter lipídico de induzir a apoptose (Fujiwara et al., 1997; Mollinedo et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química da Edelfosina

Investigações mais detalhadas sobre a relação entre estrutura e a atividade citotóxica revelou que, a atividade antiproliferativa é atribuída a longa cadeia alquila nas posições sn-1 ou sn-3 que consiste de pelo menos 16 átomos de carbono. Diante destas observações, no final de 1980, Eibl e Unger (Göttingen, Alemanha) identificaram o primeiro composto representante de um novo grupo de eterlisofosfolipídios chamado de Miltefosina, estruturalmente formado por uma cadeia de C-16 ligada diretamente a uma molécula de fosfocolina através da ligação éter (Berkovic, 1998).

Figura 2. Estrutura química da Miltefosina

Contrário à maioria dos AFTs, a Miltefosina é metabolizada sistemicamente por fosfolipases, gerando subprodutos atóxicos como a fosfocolina e 1,2 diacilfosfatidilcolina. A Miltefosina foi um dos primeiros AFTs desenvolvidos, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), para uso oral no tratamento de leishmaniose visceral, além de, atuar como agente antifúngico. A Miltefosina também apresenta potente atividade antitumoral *in vitro*, entretanto, tem sua utilização clínica limitada à aplicação tópica e oral, devido ao alto grau de hemólise. Atualmente, tem sido utilizada na clínica para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo, sendo também amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose tropical (Dummer, et al., 1993; Khademvatan et al., 2011).

Devido aos promissores efeitos antitumorais da Edelfosina e da Miltefosina, estes são considerados modelos estruturais na busca de novos AFTs. Como exemplo de novos análogos desta classe, destaca-se o Erucilfosfolcolina (ErFC), que se difere da Miltefosina no comprimento da cadeia alquila e a presença de uma ligação dupla. Essas diferenças estruturais são responsáveis pela alteração no comportamento farmacológico e nos aspectos físico-químicos, como o aumento da hidrofobicidade, resultando na formação de uma estrutura lamelar membranosa, eliminando a toxicidade hemolítica, podendo desta forma ser administrado por via intravenosa (Bagley et al., 2011).

1.2 Mecanismo de ação dos Fosfolipídios Antineoplásicos

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-glicerol 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 e Armarego, 1998).

Entretanto, este mecanismo proposto foi revisado, e demonstrado que a Edelfosina, não era substrato para a oxidase alquil-mono-glicerol, além de que, em

alguns tecidos como músculo, não foi identificado a presença da enzima. Ainda da tentativa de explicar como os AFTs interagem especialmente nas membranas das células tumorais, foi desenvolvido um modelo que mimetizava a fluidez lipídica de membrana das células normais e tumorais. O modelo estudado foi avaliado com o uso da membrana de Langmuir, composta pelos principais lipídios de membrana, o colesterol e a fosfatidilcolina (FC). O modelo de membrana que representava as células tumorais foi preparado pela mistura de colesterol e FC insaturada. Em contraste, a membrana celular normal foi composta por FC saturada, associado em grande parte a alta concentração de esteróis. Os resultados deste estudo mostraram que a Edelfosina não atua somente em membranas de células tumorais, mais também é capaz de modificar a organização e aumento da fluidez de membrana nas células normais. Porém, em baixas concentrações a Edelfosina afeta somente a condensação da membrana nas células tumorais (Hac-Wydro e Dynarowicz-Łatka., 2010).

Não está claro se todos os AFTs realmente compartilham os mesmos mecanismos de ação, porém, há evidências substanciais que todos atuam por algum mecanismo que envolve sua incorporação na membrana celular. Quando inseridos na membrana, os AFTs interferem com o *turnover* dos fosfolipídios, podendo alterar as propriedades físicas das membranas, além de interferir na geração de segundos mensageiros, como o ácido fosfatídico, diacilglicerol e o fosfoinositídeo. Sendo que, alterações em alguns destes sistemas metabólicos podem gerar um nível de estresse celular iniciando eventos que induzem morte celular por apoptose (Sprong et al., 2001).

A região da membrana plasmática ou o alvo molecular considerado de maior importância para a atividade antiproliferativa e apoptótica pode depender do tipo celular. Contudo, a maioria dos eventos estão diretamente associados com a inibição da biossíntese da FC que ocorre no retículo endoplasmático (RE) responsável pela síntese dos principais fosfolípidos estruturais. O alvo de inibição da biossíntese da FC é a enzima CTP:fosfocolina citidililtransferase, no qual ambos Edelfosina e Miltefosina tem como função a inibição desta enzima, que como consequência induz apoptose em células tumorais (van Blitterswijk e Verheij., 2008).

A síntese da FC é crucial para a proliferação celular e está aumentada nas células tumorais. Porém, a forma como a inibição da síntese da FC induz apoptose, ainda não está bem esclarecida. Algumas possibilidades são atribuídas ao bloqueio da síntese de FC, com a redução da síntese da esfingomielina e diacilglicerol. Esta síntese é catalisada pela enzima esfingomielina sintase (SMS) na face trans-Golgi, levando ao acúmulo do substrato da SMS, que é a ceramida, uma molécula associado a apoptose. A inibição da síntese de FC no RE, também pode ser um caminho que inicia a apoptose induzido pelo estresse celular (Wagner et al., 1993).

Apesar dos diversos trabalhos relatados na literatura, permanece ainda incerto o mecanismo pelo qual os AFTs exercem atividade antitumoral. Alguns estudos direcionam a atividade apoptótica da Edelfosina à capacidade de ativação do c-Jun (JNK) e aos processos relacionados à via mitocondrial. Recentemente, foi descrito o envolvimento da ativação dos receptores Fas (CD95 ou APO-1), um membro de

um subgrupo da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNF), que contêm um domínio de morte intracelular, capaz de iniciar a sinalização da apoptose, através da formação de uma co-agregação com subdomínios de membrana ricos em colesterol e glicerofosfolipídios chamado de *raft lipds* (Hacwydro et al., 2010). O resultado da ativação do Fas na membrana induz a oligomerização do receptor, recrutando proteínas adaptadoras como a proteína de domínio de morte associada ao Fas (FADD), através da interação entre seus domínios e os domínios do “cluster” do receptor. Por sua vez, FADD recruta a pró-caspase 8 e 10 pela interação com complexo de sinalização celular indutor de morte celular (DISC). Em uma interação homotípica, o domínio de morte do FADD liga-se ao domínio de morte dos receptores do ligante indutor de apoptose relacionado à TNF (TRAIL), o qual o domínio efetor de morte (DED) do FADD, por sua vez, interage com o DED da pró-caspase-8, assim a proximidade do DISC com a pró-caspase-8 induz sua auto-clivagem proteolítica (Figura 3).

Figura 3. Esquema de sinalização da apoptose pela via extrínseca. Em resposta a ligação ao receptor Fas. A oligomerização de Fas pelo FasL induz o recrutamento de FADD localizado na porção citoplasmática do Fas pelo seu domínio de morte (DDs). A extremidade oposta da FADD contém um domínio efetor de morte (DED) que permite o recrutamento da pró-caspase que induz uma sequência de mudanças no sítio ativo da pró-caspase-8, tornando-a enzimaticamente inativa. Caspase-8 pode clivar proteínas com o domínio BH3, ou conectar a via intrínseca pela clivagem da proteína Bid, resultando no truncado (tBid), podendo inativar a proteína antiapoptótica Bcl-2 na membrana mitocondrial. Isto permite a abertura do poro de transição mitocondrial (MMP), favorecendo a liberação da endonuclease G (Endo G), que está localizada no espaço intermembranar da mitocôndria. No núcleo a Endo G cliva o DNA em fragmentos de alto peso molecular produzindo fragmentos de DNA oligonucleosomal. O citocromo *c* também liberado pela abertura do MMP, no citoplasma forma o complexo com Apaf-1 e caspase-9, na presença de dATP para ativar a caspase-9. A ativação da caspase-9 pode decompor e ativar pró-caspase-3 em sua forma ativa, levando a quebra de várias proteínas do citoesqueleto e da degradação do inibidor de *caspase-activated DNase* (ICAD). A p53 inicia a apoptose por ativação transcricional de proteínas pró-apoptóticas Bax, Noxa e Puma reprimindo a ação da proteína antiapoptótica Bcl-2.

1.3 Fosfoetanolamina

A importância bioquímica de ésteres fosfóricos em tecidos normais foi assunto do *Annual Reviews of Biochemistry*, que ocorreu em 1935. Outhouse chamou atenção em especial para a presença dos ésteres fosfóricos em tumores malignos. Ele relatou a presença de um éster fosfórico chamado de amino etil-éster-fosfórico (AEF) ou fosfoetanolamina, encontrado em abundância em tecidos malignos tumorais. Em continuidade ao seu estudo, a próxima questão levantada por ele seria se os AEF estão predominantes em tumores malignos ou também eram peculiares em tecidos normais (Outhouse, 1936).

Em 1937, Outhouse publicou o que seria a base para o início dos estudos de metabolismo de tumores ao descrever que o AEF era peculiarmente encontrado em tumores malignos, sendo inexpressiva sua presença em tecidos normais como fígado, pâncreas e placenta de embrião. Além, de mostrar que os ésteres são encontrados em grandes quantidades em tumores malignos, ele também descreveu sua rota de síntese (Outhouse, 1937).

Com base nestes estudos realizados por Outhouse, o grupo de Química Analítica da USP - São Carlos sintetizou a fosfoetanolamina sintética (FS), que corresponde a uma estrutura química simples formada por uma região de cabeça de fosfocolina polar, seguido de uma cadeia etílica e uma amina terminal. Como um fosfomonoéster, os átomos de hidrogênio são ionizáveis em solução aquosa, os ésteres existem na forma de ânion, a qual a extensão da ionização depende da acidez do meio, força iônica e outros fatores físico químicos, contrário o grupo

amina que se comporta como uma substância íon dipolar zwitteriônica (Al-asfour, 2008) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura química da fosfoetanolamina sintética

A FS endógena é sintetizada por duas rotas biológicas, a primeira corresponde à via clássica de Kennedy utilizando colina e a etanolamina quinase, que são amplamente presentes em eucariotos. Estas enzimas catalisam o passo da via Kennedy, que é a fosforilação ATP-dependente na etanolamina ou colina, formando fosfoetanolamina e ou fosfocolina. A formação da FS pode ocorrer em um processo não clássico, utilizando como substrato a esfingosina-1-fosfato (S1P) pela ação da S1P lyase, com a formação do produto final FS e o hexadecanol (Gibellin e Smith, 2010).

Os estudos com os AFTs têm mostrado que a longa cadeia alquila e a molécula de fosfocolina pode ser suficiente para os efeitos antineoplásicos. Apesar da FS, do ponto de vista químico, ser considerada uma estrutura simples comparada aos análogos LisoFC, nosso estudo demonstrou que ela é capaz de exercer atividade apoptótica em tumores malignos (Ferreira et al., 2011).

Em recente estudo foram investigados os efeitos antitumorais e citotóxicos da FS em fibroblastos, células endoteliais humanas normais e no melanoma murino

B16F10. Os resultados demonstraram que nas concentrações em que a FS induz citotoxicidade para as células tumorais, não é capaz de alterar a viabilidade das células normais. Os efeitos no ciclo celular observados neste estudo, como redução da capacidade de síntese de DNA, além de inibição da proliferação celular com redução das células em mitose G2/M, estão relacionados com os efeitos apoptóticos, que reflete no aumento do pico apoptótico Sub-G1, bem como, a ativação da caspase-3. Os estudos comparativos *in vivo* entre a FS e o agente quimioterápico Taxol no modelo experimental de melanoma B16F10, suportam a utilização da FS como um novo agente no tratamento de tumores malignos, uma vez que os efeitos terapêuticos obtidos da redução do volume tumoral e da disseminação metastática foram superiores ao Taxol (Ferreira et al., 2011).

Apesar do avanço das pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas contra o câncer, as opções de tratamentos continuam sendo ineficaz do ponto de vista terapêutico. Milhares de pessoas morrem anualmente devido a falta de opção de tratamento ou ainda pela impossibilidade da realização do tratamento, devido ao alto custo dos quimioterápicos considerado de última geração, que na maioria das vezes aumentam apenas a estimativa de vida dos pacientes. Diante deste, o presente trabalho busca validar de forma experimental a utilização da FS como um agente terapêutico, podendo oferecer a essa grande parcela de pacientes, uma nova opção de tratamento, de alta seletividade, com menores efeitos adversos e um custo acessível a todos.

OBJETIVO

2.0 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética em modelos experimentais de neoplasias, como o carcinoma renal murino (RENCA), melanoma humano (SK-MEL-28) e no modelo de animais NOD/Scid portadores de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), e as vias envolvidas na citotoxicidade e indução de apoptose.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

A linhagem celular do carcinoma renal murino (RENCA), as células de túbulos proximais renais de rato (IRPTC), gentilmente cedidas pela Profa. Maria Oliveira de Souza (ICB-USP), células endotelial da via umbilical humana (HUVEC-CRL 1730), as células do adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células (H460 WT); (H460 Bcl-2) (H460 CrmA), e do melanoma maligno humano (SK-MEL-28), foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Cultlab®) pH 7.0, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2mM de L-glutamina. Para as células RENCA o meio de cultura foi acrescido de solução de aminoácidos não essenciais 0,1mM (Gibco®) e piruvato de sódio 0,1mM (Sigma®). Os frascos de cultura de 75 cm² foram mantidos em estufa contendo atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C, após a confluência foram subcultivadas para ampliação, congeladas em solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em SFB e estocadas em nitrogênio líquido.

3.2 Cultura tridimensional em matrigel e análise das modificações morfológicas por microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura

As alterações morfológicas e a citotoxicidade celular nas células RENCA foram avaliadas após o tratamento utilizando o sistema de cultura 3D (BD Matrigel™). Após previamente diluído, o matrigel no volume de 50 µl foi adicionado às lamínulas para as análises de microscopia confocal a laser, para os experimentos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi diretamente adicionado em

placas de Petri de 9.5 cm². O matrigel foi solidificado após 30 minutos em estufa a 37°C e as células foram plaqueadas delicadamente sobre a superfície da matriz sólida, que foi acrescida de meio de cultura RPMI e incubadas a 5% de CO₂ a 37°C, durante 10 dias seguidos dos tratamentos por 12 horas.

Após os tratamentos as células utilizadas para a microscopia confocal a laser foram lavadas em PBS 1x e fixadas por 10 minutos com formaldeído 4%, pH 7.4 a 37°C. As alterações no citoesqueleto foram avaliadas pela coloração de faloidina-FITC. As células foram pré- incubadas por 1 hora com Rnase A 1mg/l a 37°C no escuro e coradas com faloidina-FITC (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR), diluída 1:100 e novamente incubadas no escuro a temperatura ambiente. Após, as lamínulas foram lavadas 3 vezes em solução de PBS a 37°C. As alterações nucleares também foram observadas pela coloração com iodeto de propídio 1,8µg/µl (PI) (Sigma®), sendo incubadas durante 1 hora. A preparação das lâminas foi realizada com auxílio de uma pinça, onde as lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro sendo fixadas com ProLong® e após, armazenadas a -20°C no escuro até o momento da leitura realizada por microscopia confocal a laser, Nikon PCM 2000 (Nikon, Japão).

Para a MEV, as células imediatamente após os tratamentos, foram fixadas em 3% de glutaraldeído por 1 hora a 4°C, no meio de cultura e pós-fixadas em OsO₄ 2% por 1 hora em temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações progressivas de etanol 10 a 100% por 10 minutos. As células foram secas com auxílio de um secador de ponto crítico, utilizando dióxido de carbono líquido e fixadas em porta

espécie, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 35 nm em *ion sputter coater* durante 2 minutos. As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura operado em 15Kv, sendo realizadas três fotomicrografias por amostras com aumento de 35 e 55 vezes.

3.3 Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio brometo]. As células foram plaqueadas em quadruplicata na densidade de 10^4 células em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação as células foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações dos compostos. Após o tratamento foram adicionados 10 µl de MTT (5mg/ml) às células e incubadas por 3 horas, após este período, o meio foi removido e acrescentado 100 µl de DMSO para dissolver os cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm para a determinação da concentração inibitória (IC₅₀).

3.4 Ensaio de proliferação celular nas células endoteliais HUVEC

As células HUVEC na densidade de 10^3 /ml foram plaqueadas em quadruplicata em placas de 96 poços e após 6 horas de incubação as células foram tratadas e mantidas em cultura por 72 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. A viabilidade celular foi obtida pelo ensaio do MTT. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação às células não tratadas.

3.5 Ensaio de migração das células endoteliais HUVEC

As células HUVEC na densidade de $10^5/\text{ml}$ foram cultivadas em placa de 12 poços em meio RPMI suplementado com 1% de SFB durante 24 horas até atingirem total confluência. Após, foi realizada a ferida na região central da cultura de células, utilizando a ponta de uma ponteira estéril de 200 μl e após foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de SFB, para facilitar a migração celular. As células foram tratadas imediatamente após a realização da ferida. Para medir o número de células endoteliais que migraram, as imagens foram fotografadas, imediatamente após 24 horas de tratamento usando o microscópio Nikon sistema TE2000E. A área de vedação da ferida foi calculada usando o programa *Wimasis image analysis*.

3.6 Teste da formação do tubo nas células endoteliais HUVEC

Neste teste foi utilizado o sistema de cultivo em Matrigel (BD Biosciences) plaqueada no volume de 100 μl em placas de 12 poços e mantido a 37°C até atingir a fase sólida. As células HUVEC ($10^4/\text{ml}$), foram diluídas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas durante 12 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Os poços foram fotografados no microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss, Axiovision). As extensões totais e os números de ramificações de plexo de tubos foram quantificados pelo programa *Wimasis image analysis*.

3.7 Análise das fases do ciclo celular

O efeito dos tratamentos foi avaliado quanto à capacidade de modificar a distribuição das células no ciclo celular. As análises foram determinadas pela

quantificação do conteúdo de DNA por citometria fluxo, com a coloração de iodeto de propídio (PI). Células HUVEC (10^6 /ml) foram plaqueadas em frascos de 75 cm² mantidas *overnight*. As células foram tratadas por 24 horas à 37°C, e após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado mantido *overnight* a 4°C. As células foram então tratadas com 40 mg/ml (PI), 10 mg/ml (RNase A), e analisados usando o citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA).

3.8 Quantificação e análise morfológica pela coloração com Hoechst/PI

As células foram plaqueadas na concentração de 10^6 /ml células e cultivadas em placas de 6 poços durante 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas as células foram tratadas com as concentrações obtidas pelo cálculo da IC₅₀ através do ensaio de citotoxicidade MTT. No dia seguinte após os tratamentos foram acrescentados as placas 1 ml de meio de cultura contendo 10 mg/ml de Hoechst 33342 (H) e 1 mg/ml de PI para coloração do núcleo, incubando durante 20 minutos a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Foram considerados os seguintes aspectos durante a contagem das células: células marcadas somente com PI+ indicam aumento na permeabilidade da membrana (necrose), células marcadas com dupla coloração PI+/H+ em rosa representam as células em apoptose tardia e quando positivo apenas para H+ consideradas em apoptose somente as células com o núcleo fragmentado. As imagens foram digitalizadas em aumento 40x e depois foi realizada a média das contagens. A análise foi realizada por microscopia de fluorescência usando Eclipse Nikon E1000 (Nikon, Kanagawa, Japão), as imagens digitais foram obtidas com uma

câmera CCD (Applied Imaging modelo ER 339, Santa Clara, CA, EUA) e o sistema de documentação utilizada foi V Cytovision 2.8 Fiscal (Applied Imaging Corp).

3.9 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo (Anexina V/PI)

As proporções de células apoptóticas foram detectadas utilizando o teste de externalização da fosfatidilserina marcada com Anexina V conjugado ao Isotiocianato de fluoresceína (FITC), (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim-Germany), detectando as populações de células com os resíduos da fosfatidilserina expostos em sua superfície. As células também foram marcadas com PI, o que permite a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas. A concentração de 10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas por 24 horas. Após, as células foram separadas com tripsina 0,2% e lavadas com PBS a 37°C e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. As células foram então incubadas com 4 µg/ml de Anexina V e 1,8 µg/µl de PI por 1 hora a 37°C, centrifugadas 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 400 µl de tampão de ligação fornecido pelo fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA) e pelo programa WinMDI 2.9 (Instituto de Scripps, La Jolla, CA, EUA).

3.10.1 Avaliação da atividade da caspase 3 e 8 por citometria de fluxo

Foram cultivadas 10^6 /ml células em placas de 6 poços por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e tratadas durante 8 horas. Após o período de tratamento o sobrenadante e as células aderentes foram coletados com o uso de tripsina 0,2%,

seguida de lavagem com PBS gelado e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. A determinação da caspase-3 foi realizada utilizando o kit NucView™ 488 da caspase-3 substrato (Biotium Inc., EUA). Este substrato permeia a membrana e sofre clivagem pela protease ativa no citoplasma de células em apoptose, liberando um corante fluorescente que cora o DNA. Para a avaliação da atividade da caspase-8 foi utilizado o kit caspase-8 Detection Kit (Calbiochem®), assim, 0,2 µl da suspensão celular foi transferida para um tubo de citometria de fluxo e incubadas com 2 µl de red-IETD-FMK caspase-8 de substrato e NucView™ 488 da caspase-3 substrato, com ou sem o inibidor Z-VAD-FMK, seguido de incubação a temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo FACScalibur utilizando o programa *cell quest* (BD), com aquisição de 10.000 eventos.

3.10.2 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

Para a avaliação do potencial elétrico das mitocôndrias, as células foram plaqueadas na concentração de 10^6 /ml células por poço na placa de 6 poços e cultivadas por 12 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. O $\Delta\psi$ foi medido pela incorporação da sonda tetrametil rhodamine metil éster (TMRE) incubadas com 10 nM. A avaliação do $\Delta\psi$ isoladas, conforme manual do fabricante (Quiagen® Qproteome Mitochondria Isolation Kit), foram medidas pela captação da sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocinina), na concentração de 10 µmol/L. Em ambos os protocolos as células foram incubadas por 20 minutos a 37°C, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, sendo a suspensão celular resultante ressuspensa em

salina tamponada. A fluorescência foi determinada em $\lambda=485\text{nm}$ para excitação e $\lambda=590\text{nm}$ para emissão por citometria de fluxo FACScalibur utilizando o programa *cell quest*, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em escala linear e FL1/FL2 em escalas logarítmicas.

3.10.3 Avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas Bad, Bax e Bcl-2 por citometria de fluxo

As células na densidade de $10^6/\text{ml}$ foram plaqueadas e cultivadas em placas de 6 poços durante 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Após os tratamentos, as células foram separadas com tripsina 0,2% e lavadas com PBS na temperatura de 37°C , centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C . As células foram ressuspensas em tampão PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% e incubadas por 1 hora em diferentes tubos com 1 μg dos anticorpos primários Bad, Bax e Bcl-2-FITC (Abcam Inc.). Após, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS gelado, os sobrenadantes foram desprezados e o botão celular ressuspenso em 200 μl de PBS contendo 0,1% de paraformaldeído. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur utilizando o programa *cell quest*, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em escala logarítmica e/ou linear e FL1/FL2, que detectam a fluorescência da reação antígeno/anticorpo conjugado a PE e/ou FITC.

3.10.4 Expressão dos receptores de superfície DR4 e DR5 por citometria de fluxo

As células na densidade de 10^5 /ml foram plaqueadas e cultivadas em placas de 6 poços durante 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. As células foram tratadas por 6 horas e depois separadas com tripsina 0,2% e lavadas com PBS na temperatura de 37°C, centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 100 µl de tampão PBS e incubadas por 1 hora em diferentes tubos com anticorpos anti-DR4/DR5 primários diluídos 1:100. Após, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS, seguida de incubação por 45 minutos, com o anticorpo secundário goat anti-mouse Ig (H+L) diluído 1:50. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e os sobrenadantes foram desprezados, sendo o botão celular ressuspenso em 300 µl de PBS contendo 0,1% de paraformaldeído. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur utilizando o programa *cell quest*, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em escala logarítmica e/ou linear para FL1, que detectam a fluorescência da reação antígeno/anticorpo conjugado ao FITC.

3.10.5 Western blot

A expressão das proteínas de interesse foi determinada por SDS-PAGE (10 a 12,5%) seguido por Western blot. Após 24 horas dos tratamentos, as células H460 WT, H460 Bcl-2 e H460 CrmA foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com o reagente Mammalian Proteína A contendo 10% de inibidor de protease e 10% de inibidor de fosfatase. A concentração de proteína foi

determinada de acordo com o ensaio de Bradford. Os lisados celulares foram diluídas em tampão de amostra Standart Western blot (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS a 2%, glicerol 10%, 5% de 2- β mercaptoethanol, 0,002% azul de bromofenol) e fervida durante 10 minutos para desnaturar as proteínas. Os lisados celulares foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE, Biorad) e transferidos para membranas de PVDF ativadas com metanol usando um sistema de tanque blot-(Biorad). Após, as membranas foram lavadas em tampão de Tris-salino (TBS: 100 mM Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,8) e bloqueadas durante 1 hora em TBS com 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 (TBST em leite). A imunodeteção foi realizada utilizando os anticorpos primários anti-humanos caspases 3, 8 e 9, Noxa, Puma, Bid, Bax, Bcl-2, Bclxl, Ciclina D1, CDK4, CDK6, CDK7, CDK9, diluídos (1:1000) em TTBS-leite incubados *overnight* a 4°C. A ligação do anticorpo foi determinada utilizando HRP-secundário conjugado ao anticorpo de coelho anti-rato e a detecção foi realizada com o kit de Lumi-luz PLUS western blot substrato. A imunocoloração de β -actina (C4, 1:1500 diluído em TTBS- leite) foi realizado como um controle de equalização da proteína.

3.10.6 Análise ultraestrutural por microscopia de transmissão

Após 12 horas de tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0.1M pH 7.2, por 2 horas à 4°C. As células foram descoladas da placa de petri com um *cellscraper* e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Após, as células foram fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (diluído em tampão fosfato) por 30 minutos. As células foram lavadas novamente, desidratadas em acetona e embebidas em Epon. As

secções foram contrastadas com acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. As grades contendo as células foram analisadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM10.

3.10.7 Modelo *in vivo* de estudo

3.10.7.1 Declaração de ética

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos em pesquisas com animais aprovado pelo Comitê de Ética Comissão para Pesquisa Animal do Instituto Butantan (processo número 566/09) e do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo número 106/10).

3.10.7.2 Implante das células tumorais e delineamento animal

Diferentes grupos de camundongos da linhagem BALB/c, BALB/c nu/nu e NOD/SCID (n=5), foram mantidos no biotério prédio da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, com aproximadamente 25 g, idade aproximada de seis a oito semanas, dieta de água e ração *ad libidum*. As suspensões celulares utilizadas para a implantação no flanco dorsal e na veia caudal dos animais foram obtidas após o tratamento das células RENCA e SK-MEL-28 em cultura com tripsina 0,2% por 5 minutos e inativação com 10% de SFB. As células desprendidas foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e lavadas 2 vezes com PBS a 37°C. A concentração celular foi ajustada por contagem em câmara de malassez, sendo a viabilidade celular superior a 97%. Foi injetado o volume final de 100 µl subcutaneamente na

concentração de 10^6 /ml e endovenoso 10^4 /ml células, diluídas em meio estéril RPMI 1640.

3.10.7.3 Avaliação dos efeitos antitumorais

A progressão dos tumores dorsais foi acompanhada após o 11º dia do implante tumoral e os animais sacrificados quando apresentaram tumores superiores a 1cm^3 . Os órgãos e tumores foram retirados e analisados alterações macroscópicas, como a presença de nódulos, metástases, áreas de necrose, aumento da área de irrigação e o leito vascular. A massa tumoral foi pesada em balança digital e separada de forma uniforme para extração de RNA. As amostras processadas para histologia foram colocadas em formol 10% em tubo cônico de 50 ml e para a extração de RNA total as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. A eficácia do tratamento nos modelos descritos foi acompanhada pelas análises macroscópicas dos tumores dorsais, números de metástases internas, taxa de sobrevivência animal, índice de caquexia e volume tumoral. O tamanho e volume tumoral foram avaliados com intervalos de dois dias com o auxílio de um paquímetro digital, duas medidas do comprimento (Longitudinal) e duas medidas da largura (Vertical) da massa tumoral dorsal foram realizadas, sendo considerados tumores não palpáveis e mensuráveis medidas em ambos os eixos menores que 0,4 cm. Os valores das medidas foram convertidos em volume levando em consideração a fórmula do cálculo do volume: Volume do tumor = $0,52 \text{ eixo (menor)}^2 \times \text{eixo maior}$.

3.10.7.4 Expansão do número de células leucêmicas de camundongos PR C/EBP α +/- utilizando transplante em camundongos NOD/Scid

Foram realizados transplantes em 40 camundongos NOD/Scid da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, utilizando células de baço de três doadores leucêmicos PR C/EBP α +/- diferentes. Cada receptor NOD/Scid (fêmeas de dez semanas) foi irradiado com uma dose de 300cGy (33cGy/minuto), 12 horas antes da injeção de 100 μ l de suspensão celular contendo 2×10^6 células leucêmicas (via retro-ocular). Os camundongos receptores foram monitorados semanalmente, por contagem e análise diferencial de lâminas de esfregaço de sangue periférico (SP), obtido a partir de sangria da cauda. Ao se detectar leucocitose, anemia, plaquetopenia e/ou a presença de blastos no SP, os camundongos foram considerados leucêmicos. A enxertia ocorreu por volta de cinco semanas após o transplante, quando os tratamentos foram iniciados com diferentes concentrações da FS.

3.10.7.5 Delineamento experimental

Tratamento dos animais BALB/c portadores do carcinoma renal murino (RENCA)

⇒ Modelo dorsal

⇒ Modelo metastático

Tratamento dos animais BALB/c^{nu/nu} portadores do melanoma humano SK-MEL-28

⇒ Modelo dorsal

Tratamento dos animais NOD/Scid portadores de leucemia promielocítica aguda (LPA)

3.10.7.6 Análises hematológicas

As amostras de sangue na presença do anticoagulante EDTA (10%) foram obtidas do plexo supramandibular. As coletas foram realizadas em condições normais e não estressantes. O número total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas foram realizados através do contador hematológico Pentra-120 (HORIBA ABX).

3.10.7.7 Análises do número total de reticulócitos do sangue periférico

Alíquotas de sangue dos animais tratados com FS e Sunitinib e grupo controle foram incubados na proporção 1:1 com a solução de azul de cresil brilhante 1%, e incubadas por 20 minutos a 37°C. Foram realizados esfregaços em lâminas, secos ao ar e avaliados em microscópio de luz. Foram observados eritrócitos considerando as formas imaturas das linhagens eritrocíticas, contendo RNA nuclear citoplasmático com dois ou mais grânulos azurófilos.

3.10.7.8 Imunofenotipagem e determinação da apoptose/necrose no tratamento dos animais portadores de leucemia promielocítica

Ao final do tratamento, os animais NOD/Scid leucêmicos foram necropsiados e a suspensão celular obtida da medula óssea, fígado e baço foram marcadas com c-kit CD117 conjugado com APC (clone 2B8, Bioscience), CD34 conjugado com FITC (RAM34, eBioscience) e Gr1 (RB6-8C5, eBioscience). As células foram imunofenotipadas e as proporções de células apoptóticas foram estimadas e detectadas utilizando o teste de Anexina V/PI marcado com a fluorêscencia (FITC) Anexina V (Boehringer- Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) e PI (iodeto de propídeo, Sigma), analisadas em citômetro do fluxo de FACSCalibur

(Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA), e analisadas pelo programa WinMDI 2.9 (instituto de Scripps, La Jolla, CA, EUA).

3.10.7.9 Análise bioquímica dos marcadores hepáticos

As amostras de sangue dos animais de diferentes grupos foram obtidas do plexo supramandibular, sem uso de anticoagulante, dos camundongos BALB/c em condições normais e não estressantes. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e após, o sobrenadante foi separado do sangue total, armazenado em eppendorf e refrigerado a 4°C até o momento da análise. As análises bioquímicas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (DHL) foram realizadas mediante a calibração dos parâmetros utilizando amostras controles obtidas de camundongos normais para estabelecer o padrão de referência. Todas as análises foram realizadas por automação com o auxílio do aparelho Cobas Integra-700 (Roche©).

3.10.7.10.1 Análise dos efeitos antitumorais da FS por PET/CT

Os efeitos na progressão do melanoma humano SK-MEL-28 tratados com FS foram avaliados por PET/CT animal em um sistema exclusivo para pequenos animais GE Medical Systems eXplore RS MicroCT System Cone-beam Scanner (GE Medical Systems). Foram injetados por via intravenosa na veia da cauda 0,37 MBq (10uCi) do complexo radioativo [^{99m}Tc] V (DMSA) 2]. Após 40 minutos, os animais foram anestesiados com isoflurano 2% em 2L/min de oxigênio e posicionado ventrolateralmente. As imagens foram adquiridas com uma resolução de 70kV (40 mA) feixe, 12 ms de exposição, e mais de 400 exibições radiais em

uma rotação de 360°. A respiração foi monitorizada durante a obtenção das imagens em um sistema de monitorização Biovet (m2m Imaging Corp) e as aquisições desencadeadas no final da fase inspiratória. As imagens de PET foram reconstruídas com a utilização do subconjunto bidimensional de ordenada e o algoritmo de expectativa de maximização com uma resolução espacial de 1,66-1,85mm.

3.10.7.10.2 Preparo das amostras para análise histopatológica

Foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 0.2cm² dos tumores, dos animais tratados e controle, pesados e fixados por 24 horas em tampão formalína, tamponado com o pH 7.4 para a realização de análises histopatológicas. Após o período de fixação de 24 horas as amostras foram acondicionadas em cápsulas histológicas e colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM 2145), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas e inclusas em parafina quente no equipamento (Leica® modelo EG 1160). Os blocos foram microtomizados no aparelho (Leica® modelo RM 2145) obtendo cortes de 5 µm dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm³, realizando dois níveis de corte para cada área de estudo.

3.10.7.10.3 Avaliação histopatológica pela coloração de Hematoxilina-eosina

As amostras de tecido dos tumores foram fixadas em 10% de formalína tamponada e processada para inclusão em parafina. Seções de 5 mm foram obtidas e coradas com Hematoxilina-eosina para avaliação de área de necrose e as

alterações do microambiente tumoral. A quantificação da área de necrose foi realizada usando o programa *Image J*, disponível no Instituto Nacional de Saúde no link: <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

3.10.7.10.4 Determinação da fragmentação nuclear das células tumorais no tecido histológico por fluorescência

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol durante 15 minutos e hidratados pela sequência de passagens no álcool 50%, 70% e 100%. As lâminas foram coradas com 1 mg/ml de iodeto de propídio por 30 minutos à 37°C e vedadas com esmalte incolor para serem preservadas como semi-permanentes. As imagens foram digitalizadas para posterior análise, o qual foi contado cinco campos homogêneos com aproximadamente 50 células em (Aumento 40x). A análise foi realizada por microscopia de fluorescência usando Eclipse Nikon E1000 (Nikon, Kanagawa, Japão), as imagens digitais foram obtidas com uma câmera CCD (Applied Imaging modelo ER 339, Santa Clara, CA, EUA) e o sistema de documentação utilizada foi V Cytovision 2.8 Fiscal (Applied Imaging Corp).

3.10.7.10.5 Análise por imunistoquímica das proteínas p38 e EK1/2

As reações de imunocoloração das proteínas p38 e EK1/2 foram realizadas nas amostras dos tumores do melanoma dorsal. Quatro secções foram anexados em lâminas silanizadas, re-hidratadas em etanol graduado e coberto com 10 mM de tampão citrato pH 6.0. As amostras foram incubadas durante 30 minutos com anticorpo monoclonal primário contra as proteínas p38 e EK1/2 diluído 1:100, seguido de incubação com anticorpo secundário biotina. O complexo

estreptavidina-peroxidase foi revelado utilizando di-aminobenzidina como substrato cromogênico.

3.10.7.10.6 Análise citoquímica das fibras de colágeno pela coloração de Picrosirius e fibras elásticas por Verhoeff's

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante 1 hora em uma solução 0,1% de Sirius Red e dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram lavados durante cinco minutos em água corrente e contra-corados com hematoxilina fresca durante dois minutos. Para a avaliação das fibras elásticas, as amostras foram coradas com a solução de Verhoeff's durante 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes em água deionizada. A diferenciação da coloração foi realizada pela adição de 2% de cloreto de ferro por 2 minutos. O ponto de diferenciação para a visualização das fibras elásticas foi acompanhada em microscópio de luz, seguida de lavagens em água deionizada.

3.10.7.10.7 Análises estatísticas

As taxas de sobrevivência dos camundongos foram submetidas ao teste estatístico de *Kaplan-Meyer* seguido do teste de *log-rank*. Os outros dados foram analisados pela distribuição (Gaussiana ou Normal), seguido do teste *t student* para a comparação entre os dois grupos. Para a comparação entre três ou mais grupos os dados foram analisados pelo método de variância ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de *Tukey-Kramer* utilizando o Software Graph Prism. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos

independentes, considerando-se como valores significantes $*p<0,05$; $** p<0,01$;
 $***p<0,001$.

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 Modelo experimental do carcinoma renal murino - RENCA

4.1.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos

A citotoxicidade da FS e Sunitinib foi avaliada nas células RENCA, células renais normais IRPTC e nas células endoteliais HUVEC. A citotoxicidade realizada pelo método colorimétrico do MTT foi o primeiro experimento realizado para obtenção dos valores de IC₅₀, possibilitando a utilização desses valores para os estudos dos efeitos antitumorais *in vitro*. Os resultados obtidos após 24 horas de tratamento mostraram que a FS é citotóxica para as células RENCA com o IC₅₀ de 90 mM, para as células HUVEC, 73 mM e para as células IRPTC, 134 mM. O tratamento com Sunitinib foi citotóxico para as linhagens das células RENCA, HUVEC e IRPTC com respectivos valores de IC₅₀ de 5; 0,7 e 0,02 µM (Figura 5-6).

Figura 5. Determinação da citotoxicidade da FS pelo método colorimétrico MTT. As células RENCA, HUVEC e IRPTC foram tratadas com diferentes concentrações da FS pelo período de 24 horas. A curva mostra a correlação do efeito expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Figura 6. Determinação da citotoxicidade do Sunitinib pelo método colorimétrico MTT. As células RENCA, HUVEC e IRPTC foram tratadas com diferentes concentrações do Sunitinib pelo período de 24 horas. A curva mostra a correlação do efeito expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.1.2 Efeitos da FS e Sunitinib na inibição da proliferação celular em células HUVEC

Os efeitos sobre a proliferação foram avaliados utilizando concentrações abaixo da IC₅₀ obtidos no teste de citotoxicidade. Os efeitos antiproliferativos observados no tratamento com a FS e Sunitinib são apresentados em porcentagem de viabilidade em relação ao controle. Os tratamentos com FS nas concentrações de 10 a 50 mM inibiram a proliferação celular em média 43% (Figura 7A). A capacidade inibitória do Sunitinib nas células HUVEC foi avaliada com o mesmo critério, utilizando as concentrações de 0,01 μ M a 1 μ M. A ação inibitória do Sunitinib foi confirmada, e os tratamentos com as concentrações de 0,1 μ M a 1 μ M apresentam efeitos inibitórios na proliferação celular em média de 32%, enquanto as concentrações de 0,01 a 0,06 μ M não apresentaram efeito inibitório. (Figura 7B). Após identificar que a FS e o Sunitinib exibem efeitos antiproliferativos em concentrações subtóxicas, os estudos dos efeitos inibitórios foram realizados utilizando as concentrações de FS 10 mM e Sunitinib 1 μ M.

Os efeitos da FS e do Sunitinib sobre a proliferação das células HUVEC também foram avaliados pela incorporação da sonda fluorescente CFDA SE. A porcentagem de células em proliferação após o tratamento com FS e Sunitinib foi reduzida significativamente (**p<0,001), entretanto, a FS foi mais efetiva na redução da proliferação celular reduzindo, para 4,4% o número de populações de células comparado ao Sunitinib 7,1%, após 72 horas de tratamento (Figura 8).

Figura 7. Efeitos antiproliferativos em células endoteliais HUVEC. FS e Sunitinib foram testados quanto à capacidade antiproliferativa em células HUVEC. A viabilidade das células foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT. (A) A FS nas concentrações de 10 a 50 mM inibiu a proliferação celular em média 43%. (B) Os efeitos antiproliferativos do Sunitinib foram observados no tratamento com as concentrações de 0,1 μ M a 1 μ M com média de atividade antiproliferativa de 32%.

Figura 8. Ensaio de proliferação celular pela incorporação do CFDA SE. A proliferação celular foi avaliada por citometria de fluxo após 72 horas de tratamento com FS 10 mM e Sunitinib 1 μ M. Os histogramas representativos mostram a distribuição do número de células que proliferaram e diferem na intensidade de fluorescência, o qual demonstra o efeito inibitório da FS e do Sunitinib na proliferação das células HUVEC.

4.1.3 FS reduz a expressão do receptor de superfície VEGF-A nas células endoteliais HUVEC

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente indutor mitogênico de tumores, além de um fator altamente específico da angiogênese, que atua através de ligação a dois específicos receptores do tipo tirosino quinase. A avaliação da expressão dos receptores de superfície demonstra que a FS 10 mM reduz de forma significativa ($p < 0,01$), quando comparado ao Sunitinib à expressão do VEGF-A nas células HUVEC, podendo indicar a primeira observação do potencial efeito antiangiogênico apresentado pela FS neste trabalho (Figura 9).

Figura 9. Modulação do receptor VEGF-A pela FS. As células HUVEC foram tratadas durante 12 horas com FS na concentração de 10 mM e a expressão do receptor avaliada por citometria de fluxo. O nível de expressão de superfície do VEGF-A foi reduzido em resposta ao tratamento com a FS. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.4 Efeito da FS na formação do tubo capilar em matrigel e na migração das células endoteliais HUVEC

Para examinar o efeito da FS sobre a migração celular das células endoteliais, empregamos a técnica de cicatrização de feridas que consiste na migração lateral das células. Após a realização da ferida central, a área de migração celular foi monitorada durante um período de 24 horas. Os efeitos da FS na inibição da capacidade migratória das células foram comparados ao Sunitinib 1 μ M, VEGF 10 ng/ml, BAY 11-7082 (BAY) 10 μ M e o Roscovitine (RSC) 10 μ M. A área coberta de células do controle que corresponde à migração celular, alcançou o percentual de 62%. Como esperado, o VEGF causou um aumento da migração das células HUVEC, no percentual de 69%. Os efeitos inibitórios da migração celular também foram observados com a utilização do inibidor seletivo e irreversível do NF- κ B, o BAY, com redução na porcentagem de ocupação de células para 43%. O inibidor das ciclinas CDK1, CDK2, CDK5 e CDK7, o RSC, inibiu a migração celular como representado pela porcentagem de área ocupada correspondente a 46%. O inibidor de múltiplos receptores do tipo tirosino quinase, Sunitinib, reduziu para 48% a porcentagem de células que migraram para a região central da ferida demonstrando assim, seus efeitos inibitórios sobre as células HUVEC. O tratamento com a FS foi capaz de inibir com a mesma eficácia comparada aos demais agentes, a migração das células endoteliais atenuando a migração lateral das células para a área da ferida, com redução para 50% da região ocupada pelas células (Figura 10A-10B).

Os efeitos da FS 10 mM e Sunitinib 1 μ M sobre a angiogênese foram avaliados *in vitro* através da formação do tubo em matrigel, que mimetiza a formação da rede capilar. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços pré-revestidas com matrigel. Os tratamentos foram realizados simultaneamente ao plaqueamento das células HUVEC, que foram mantidas em cultura durante 48 horas (Figura 11A). A organização da rede tubular e as alterações morfológicas foram analisadas pela MEV nas células crescidas em matrigel. As células endoteliais do grupo controle estão justapostas formando estruturas circulares em forma de um *loop* vascular, com uma organização bem definida de membrana que se estendem em ramificações. Nas células tratadas com FS, a formação das ramificações estão desorganizadas sem a presença de estruturas tubulares. Ainda é importante enfatizar que não houve presença de alterações morfológicas de membrana que indique qualquer forma de toxicidade induzida pela FS. O tratamento com o Sunitinib foi capaz de desestruturar a organização do endotélio, as ramificações foram descontinuadas, podendo ainda observar regiões na membrana com alterações morfológicas, que podem indicar toxicidade (Figura 11B).

As análises quantitativas mostram que a FS inibiu a extensão do tubo capilar 4837 ± 1189 (* $p < 0,05$), comparado ao Controle 17820 ± 743 e ao Sunitinib 10720 ± 773 . A habilidade das células HUVEC em formar as redes tubulares foi analisada pelos números de pontos de ramificações. A redução do número de ramificações nas células tratadas com FS de $(20 \pm 4,2\%)$ foi significativa (** $p < 0,01$), em relação ao controle $(160 \pm 15\%)$. Apesar de não alterar a extensão tubular, o

Sunitinib reduziu o número de pontos de ramificações ($94 \pm 7,7\%$) um índice de (* $p < 0,05$), demonstrando sua capacidade de desestruturar a formação de novas redes tubulares (Figura 12A-12B).

A

B

Figura 10. FS reduz a migração de células endoteliais. (A) Fotomicrografia representativas adquirida após a realização da ferida, e após 24 horas dos tratamentos (aumento de 20x). (B) As células estimuladas com VEGF 10 ng/ml apresentaram aumento da capacidade de migração, que corresponde a uma área de ocupação de 69%. O tratamento com FS 10 mM apresenta uma área coberta de células de 48%, demonstrando sua capacidade inibitória sobre a migração das células endoteliais. Os tratamentos com RSC 10 μ M, BAY 10 μ M e Sunitinib 1 μ M, apresentaram respectivamente (46, 43 e 48%), de área coberta de células. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, sendo que o percentual de migração foi determinado pela área coberta pelas células.

Figura 11. Efeitos da FS e Sunitinib sobre o modelo de formação do tubo em matrigel analisados pelo MEV. As células HUVEC foram plaqueadas em placas de 12 poços pré-revestidas com Matrigel e simultaneamente tratadas com FS e Sunitinib durante 12 horas. A formação dos tubos foi analisada pelo programa *Wimasis image analysis* (A) e as análises morfológicas pelo MEV (B).

Figura 12. FS inibe a formação dos tubos na cultura tridimensional. Os dados quantitativos da extensão total dos tubos (A) e dos pontos de ramificações (B) foram obtidos pelo programa *Wimasis image analysis*. Os dados quantitativos são apresentados em média $\pm$ DP em duplicata de dois experimentos independentes.

4.1.5 FS e Sunitinib induzem modificações no ciclo celular nas células endoteliais HUVEC

Os efeitos antiproliferativos dos tratamentos foram avaliados quanto à capacidade de inibir a progressão das células no ciclo celular. Os testes foram realizados na presença ou ausência de inibidores específicos do ciclo celular, como o RSC 10 μ M e o BAY 10 μ M. Os tratamentos das células HUVEC com (FS 10 mM + RSC 10 μ M) e (FS 10 mM + BAY 10 μ M), resultaram em um acúmulo das células na fase G0/G1, respectivamente de 66% e 71% (* p <0,05), além da diminuição concomitante das células na fase S. O tratamento com a FS 10 mM aumentou a população de células na fase G2/M em 20% (* p <0,05) (Figura 13). A porcentagem de 61% de células acumuladas em G0/G1 comparado ao controle, também foi observada no tratamento com Sunitinib 1 μ M. Este efeito também foi observado no tratamento com (Sunitinib 1 μ M + RSC 10 μ M) e (Sunitinib 1 μ M + BAY 10 μ M), apresentando respectivos valores de 74% e 62% (* p <0,05) (Figura 14).

Figura 13. Análise do ciclo celular das células endoteliais HUVEC tratadas com FS. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados de dois experimentos independentes. Valores de (* $p < 0,05$) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*.

Figura 14. Análise do ciclo celular das células endoteliais HUVEC tratadas com Sunitinib. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados de dois experimentos independentes. Valores de (* $p < 0,05$) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*.

4.1.6 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial nas mitocôndrias isoladas das células RENCA

Após o tratamento foi possível observar e quantificar as alterações morfológicas das mitocôndrias por citometria de fluxo, usando com base os parâmetros FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*). Após a aquisição dos eventos (número de mitocôndrias) foi definido os *gates* correspondentes as regiões (R1, R2 e R3) nos *dot plots* representativos. O tratamento das células com FS 90 mM induziu modificações no tamanho e no volume mitocondrial como observado em R2 ($0,5 \pm 0,07\%$) e R3 ($0,6 \pm 0,02$), quando comparado às células não tratadas (Figura 15A-15B). Esta modificação estrutura da mitocôndria foi relacionada com a dinâmica funcional mitocondrial pela incorporação da sonda JC-1. As mitocôndrias isoladas das células não tratadas apresentam elevado padrão de incorporação da sonda medido pelo $\Delta\psi$ (97%), que representam um padrão bioquímico estável e funcional. A presença do aumento da fluorescência verde FL1, como indicado no *dot plot* mostram que as mitocôndrias das células tratadas com FS apresentam importantes modificações funcionais com redução do $\Delta\psi$ (50% *low*), comparado ao controle (3% *low*) (Figura 16).

Figura 15. Alterações morfométricas das mitocôndrias isoladas das células RENCA por citometria de fluxo. (A) O tratamento com FS 90 mM após 24 horas modificou a distribuição morfológica mitocondrial em (FSC e SSC), como indicado no *gate* (R1 e R3). (B) Os resultados em porcentagem do *gate* R1, R2 e R3 estão apresentados nos gráficos de barra em média $\pm$ DP.

Figura 16. Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela coloração de JC-1 e analisado por citometria de fluxo. O tratamento com FS comparado ao controle reduziu o $\Delta m\Psi$, como indicado no *dot plot* representativo, com aumento da formação de monômeros, fluorescência verde (FL1). A população de mitocôndrias em (FL2) como indicado no *dot plot* representa uma população com elevada formação de agregados, resultante da incorporação da sonda JC-1 que está relacionado com aumento do $\Delta m\Psi$. Os resultados estão apresentados em porcentagem da duplicata de dois experimentos independentes.

4.1.7 Avaliação das alterações morfológicas das células tumorais RENCA pela coloração Hoechst /PI

Os efeitos citotóxicos e as alterações morfológicas das células RENCA foram avaliados pelas modificações da integridade da membrana celular utilizando a dupla coloração Hoechst/PI. O tratamento das células RENCA com FS 90 mM induziu perda da morfologia do tipo fibroblástica, com agrupamento e descolamento das células da matriz celular e a presença dos corpos apoptóticos corados em rosa, com a cromatina periférica coradas em azul. O tratamento das células RENCA com Sunitinib 5 μ M apresentou alterações no volume citoplasmáticas com perda da forma fusiforme e presença de acentuadas células coradas em vermelho indicando necrose (Figura 17).

Figura 17. Fotomicrografias representativas das análises morfológicas das células RENCA coradas com Hoechst/PI. Nas células do controle observa-se o núcleo preservado com intensa coloração azul brilhante H^+ . A FS 90 mM induziu apoptose com presença de corpos apoptóticos e fragmentação nuclear H^+/PI^+ (rosa) e células descoladas da matriz (círculo). Nas células tratadas com Sunitinib 5 μM observam-se raras células em apoptose H^+/PI^+ (rosa) e acentuada figuras de necrose (setas), com fragmentação nuclear PI^+ (vermelho) (Aumento 40x).

4.1.8 Avaliação morfológica por MEV e microscopia confocal a laser das células RENCA em cultura 3D

Foi avaliada por microscopia confocal a laser a reorganização citoplasmática da actina, corada com (faloidina-FITC) e a integridade nuclear, corada com PI. As células RENCA foram crescidas em matriz 3D e tratadas com FS 90 mM por 12 horas. As células do grupo controle apresentavam intensa coloração verde para os filamentos de actina com projeções no citoplasma organizadas de forma regular, com núcleos mono e binucleados, permitindo observar a organização das células em uma espécie de nicho tumoral. O tratamento com FS afetou drasticamente a morfologia das células RENCA, induzindo retração e vacuolização citoplasmática, tornando as células com uma morfologia esférica, com redução do sinal de fluorescência e fragmentação dos filamentos de actina, seguido de modificação do citoesqueleto celular. É possível notar regiões na membrana celular com invaginações citoplasmáticas e condensação da actina periférica. As alterações nucleares revelam inúmeras figuras apoptóticas com marginalização, retração, fragmentação nuclear e formação de *bubbles* na membrana, todos característicos da apoptose. Em alguns casos, as células apresentaram perda total do material nuclear, porém, com o material fragmentado auto-contido em vesículas membranares (Figura 18).

As imagens estruturais das células RENCA cultivadas na matriz 3D e analisadas pela técnica de MEV, demonstraram que as células estavam agrupadas e aderidas na matriz. Foi possível observar a formação de estruturas complexas semelhantes à organização tubular dos néfrons com extensos túbulos conectados por uma

estrutura central cercada de conexões tubulares proximais, que se interconectam para regiões periféricas e distais (19-20). As alterações morfológicas das células RENCA tratadas com FS são distintas comparadas ao controle, com modificações que correspondem a apoptose, como os *bubbles* de membrana, desaparecimento das microvilosidades, com consequente perda de adesão a matriz e a formação esférica do corpo celular (Figura 21).

Figura 18. Avaliação morfológica das células RENCA pela microscopia confocal a laser. (A) As células não tratadas (controle) apresentaram longos filamentos de actina distribuídos em toda a extensão citoplasmática celular (*). A coloração nuclear com PI demonstrou predomínio de células mononucleadas coradas em vermelho com extensa integridade nuclear (setas). (B) Nas células tratadas com FS notam-se regiões com condensação, fragmentação e contornos irregulares da actina com formação de *bubbles* na membrana (*). Alterações morfológicas típicas de apoptose também foram visualizadas, como a fragmentação e marginalização nuclear (setas) acompanhado de retração citoplasmática (Aumento 40x).

Figura 19. Fotomicrografia representativa das células RENCA cultivadas na matriz tridimensional (3D) por microscopia eletrônica de varredura. As células RENCA do grupo controle cresceram na matriz 3D agrupadas em diferentes níveis. Observam-se células com características pleomórficas com progressões citoplasmáticas (setas) e sem alterações na superfície da membrana celular. Nota-se estruturas celulares centrais agrupadas (*), que estão conectadas nas extremidades por ramificações tubulares periféricas (+).

Figura 20. Fotomicrografia representativa das células RENCA cultivadas na matriz tridimensional (3D) por MEV. Após 10 dias de cultivo, nota-se a formação de uma estrutura celular central condensada (*), que expandida em longas estruturas tubulares interconectadas (+) em ramificações, apresentam diferentes espessuras quando comparados entre os túbulos proximais e os distais que estão nas extremidades periféricas (&).

Figura 21. Fotomicrografia representativa das células RENCA cultivadas na matriz tridimensional (3D) por MEV. Após 12 horas de tratamento com FS 90 mM por 12 horas, é possível observar mudanças morfológicas marcantes correspondentes a apoptose (setas), com formação de corpos apoptóticos, redução das microvilosidades, perda de adesão a matriz (*) e formação de *bubbles* na membrana (setas).

4.1.9 Determinação da atividade da caspase 3 e 8 e apoptose nas células RENCA por citometria de fluxo

Após 12 horas de tratamento das células RENCA com FS 90 mM, foi observado aumento da atividade da caspase-3 ($17 \pm 1,4\%$), quando comparado ao Sunitinib 5 μM ($2 \pm 0,45\%$). Entretanto, o tratamento com Sunitinib induziu aumento na atividade da caspase-8 ($25 \pm 1,4\%$), quando comparado ao tratamento com FS ($13 \pm 2,3\%$) (Figura 22A-22B). Os efeitos resultantes do aumento da atividade das caspases 3 e 8 foi analisado pelo teste de AnexinaV/PI. O tratamento das células RENCA com FS e Sunitinib apresentou aumento significativo ($***p < 0,001$), na proporção de células mortas por apoptose comparado às células não tratadas (controle). Entre os tratamentos realizados não foi observado diferenças entre os grupos, Sunitinib ($62 \pm 3,0\%$) e FS ($57 \pm 2,6\%$) (Figura 23A-23B).

As células RENCA foram pré-tratadas por 2 horas na presença de 5 μM do inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) CsA, associado a 1 mM do pan inibidor das caspases Z-VAD-FMK. Após 12 horas de tratamento com FS 90 mM foi possível observar que a morte celular por apoptose induzida pelos compostos são dependentes da atividade das caspases e da alteração da permeabilidade mitocondrial. Os resultados mostraram que mesmo nestas condições, como o bloqueio irreversível das caspases pelo Z-VAD-FMK, o tratamento com FS induziu morte celular nas células RENCA por necrose com ($61,2 \pm 7,9\%$). Mesmo com a utilização da Ciclosporina A (CsA), inibidor do Poro de Transição de Permeabilidade resultando na interrupção da liberação de

proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria, a FS induziu morte celular por necrose ($39 \pm 3,8\%$) (Figura 24A-24B).

Figura 22. Avaliação da atividade das caspases 3 e 8 por citometria fluxo nas células RENCA. (A) A atividade da caspase-3 mostrou que entre os tratamentos realizados, a FS 90 mM aumentou significativamente a atividade da caspase-3 (** $P < 0.05$). (B) Entretanto, o tratamento com Sunitinib 5 μ M foi efetivo na ativação da caspase-8 quando comparado ao tratamento com FS 90 mM (* $P < 0.05$). As barras representam à média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

A

B

Figura 23. Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI. As células foram tratadas durante 12 horas com FS 90 mM e Sunitinib 5 μ M, e os efeitos avaliados por citometria de fluxo. (A) Gráficos representativos tipo *dot plot* apresentando as diferentes populações de células em apoptose marcadas com Anexina V ou em necrose marcadas com PI. (B) As barras representam à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (***) $p < 0,001$.

A

B

Figura 24. Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI. As células RENCA foram pré-incubadas por 2 horas com ZVAD-fmk e ou CsA e tratadas durante 12 horas com FS 90 mM, e os efeitos avaliados por citometria de fluxo. (A) Gráficos representativos tipo *dot plot* demonstrando que a FS induz apoptose de maneira caspase-dependente. (B) As barras representam à média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.1.10.1 Avaliação da expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2, envolvidas da regulação da apoptose

A detecção quantitativa da expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2, envolvidas na apoptose foram avaliadas nas células RENCA tratadas com FS 90 mM e Sunitinib 5 μ M por citometria de fluxo, expresso pela intensidade de fluorescência. Os tratamentos das células RENCA com FS e Sunitinib não modificaram a expressão da Bcl-2, que representa um importante mecanismo de resistência à morte celular, induzida por estímulos diversos, como por exemplo, aos agentes quimioterápicos. (Figura 25A). A expressão da proteína Bad foi investigada devido ao papel regulatório desta proteína pela Bcl-2 e Bcl-xl na regulação da apoptose. O tratamento com Sunitinib ($63,2 \pm 4,9\%$) e FS ($65,2 \pm 2,1$) significativamente (* $p < 0,05$), modificou a expressão da Bad comparado ao controle ($90,7 \pm 1,3\%$) (Figura 25B). A regulação da proteína Bax que participa na regulação da formação do poro na membrana externa da mitocôndria, também foi investigada. Os tratamentos com Sunitinib ($79,5 \pm 2,2\%$) e FS ($40 \pm 2,8\%$) reduziram os níveis da proteína pró-apoptótica (** $p < 0,01$), comparado ao controle ($158 \pm 9,1\%$) (Figura 25C).

Figura 25. Avaliação da expressão das proteínas envolvidas na apoptose Bcl-2, Bad e Bax nas células RENCA. Os tratamentos com FS e Sunitinib não modificaram os níveis de expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (A). Em contraste, houve uma redução significativa ($***p<0.001$) da expressão das proteínas apoptóticas Bad (B) e Bax (C). Os resultados são expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.1.10.2 Avaliação *in vivo* dos efeitos antitumorais da FS e Sunitinib, nos modelos experimentais do carcinoma renal murino RENCA em camundongos BALB/c

Os efeitos antitumorais do tratamento com FS foram avaliados nos animais BALB/c após a inoculação subcutânea e intravenosa das células tumorais RENCA e comparado à utilização do inibidor de múltiplas quinases Sunitinib. Os animais portadores dos tumores dorsais que receberam os implantes foram tratados após o 10º dia do implante, enquanto que, os animais que receberam as células pela via endovenosa foram tratados após o 4º do implante. Todos os esquemas experimentais foram realizados de forma monoterápica, onde todos os animais foram tratados pela via intraperitoneal, diariamente para o grupo de animais tratados com FS 40 e 80 mg/Kg, e com intervalo de dois dias para o grupo que recebeu o Sunitinib 10 mg/Kg.

O tratamento realizado com a FS em ambas as concentrações, assim como o Sunitinib resultaram na inibição significativa do crescimento tumoral (**p<0,001), comparado aos animais do grupo não tratado (controle). Durante o estudo não foi observada a perda de peso nos grupos de tratamento, por outro lado foi observado acentuada caquexia no grupo controle. Os efeitos terapêuticos dos tratamentos da FS 40 mg/Kg e 80 mg/Kg avaliados durante 15 dias demonstram que a FS nesta condição experimental foi superior ao Sunitinib 10 mg/Kg, reduzindo o crescimento tumoral, com respectivas taxas de redução de 83% e 75%, comparado com 43% de redução no percentual no grupo de animais tratados com Sunitinib (Figura 26A).

Após o término dos tratamentos os animais foram eutanasiados e os tumores removidos cirurgicamente. Nas análises macroscópicas não foi possível observar a presença de metástases. Em relação ao aspecto macroscópico dos tumores dorsais, o grupo controle apresentava numerosas áreas altamente vascularizadas em toda extensão da massa tumoral com regiões centrais de ulcerações. Em contraste, os aspectos macroscópicos dos tumores sólidos, em todas as condições de tratamento com FS e Sunitinib apresentaram massas nodulares tumorais amorfas, localizado no tecido subcutâneo, com aspecto não hemorrágico e com ausência de ulcerações (Figura 26B).

O efeito terapêutico dos tratamentos em ambos os modelos experimentais foram monitorados pela análise da taxa de sobrevida e o índice de caquexia do animais. A taxa de sobrevida foi realizada com base na estimativa global dos animais após o término dos tratamentos, sendo que todos os animais que atingiram o volume tumoral maior que 1 mm foram sacrificados. Neste estudo, foi possível estabelecer a relação da inibição do crescimento com o aumento da taxa de sobrevida. Após o término do tratamento com o Sunitinib 10 mg/Kg, a estimativa de sobrevida dos animais reduziu drasticamente, e cerca de 40% dos animais foram eutanasiados no 24º dia. Os animais portadores do tumor sólido e os que receberam a inoculação intravenosa das células tumorais, tratados com FS apresentaram estimativa superior a 60% na taxa de sobrevida, valor que foi estimado até o final do período experimental, que foi até 40º dia de monitoramento (Figura 27 e 28).

Durante o período experimental os animais foram pesados para a avaliação da perda de peso corpóreo e a determinação do índice de caquexia induzidos pelos tumores sólidos. A perda de peso foi calculada com base na mensuração do volume tumoral. Em nenhum dos grupos tratados com FS e Sunitinib houve perda de peso significativo ao longo do tratamento, enquanto, os animais do grupo controle apresentaram redução de 20% do peso corpóreo (Figura 29).

Os animais implantados com as células tumorais pela via endovenosa foram tratados após o 4º dia implante durante 15 dias. Após, os animais foram eutanasiados e os órgãos e metástases processadas para a análise histológica. Todos os animais do grupo controle apresentaram múltiplos nódulos metastáticos no pulmão com aparência opaca e não hemorrágica. Os tratamentos com FS e Sunitinib foram eficazes na redução da colonização das células tumorais RENCA nos pulmões dos animais (** $p < 0,001$). Ainda, o tratamento com FS em relação ao Sunitinib foi mais efetivo (* $p < 0,05$) na inibição da formação das metástases pulmonares, sugerindo que este regime pode ter benefícios terapêuticos em diferentes tipos de tumores metastáticos e primários (Figura 30).

Figura 26. Aspecto macroscópico e análise do crescimento dos tumorais do carcinoma renal murino RENCA implantado nos animais BALB/c. (A) Os tratamentos com FS em ambas as concentrações foi efetiva em reduzir o crescimento tumoral comparado ao Sunitinib (** $p < 0,001$). (B) Nota-se, o aspecto macroscópico dos tumores dorsais do grupo controle, regiões de extensa vascularização com volumosa massa tumoral. Em contraste, os tratamentos foram capazes de reduzir as áreas hemorrágicas e necróticas. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (** $p < 0,001$).

Figura 27. Análise da taxa de sobrevivência global dos animais BALB/c com implante tumoral dorsal do carcinoma renal murino RENCA. Os animais foram tratados após 10º dia de implante tumoral pela via (i.p) com FS ou Sunitinib durante 15 dias e monitorados durante 40 dias. A curva de sobrevivência mostra que após a última dose terapêutica com o Sunitinib há uma redução na taxa de sobrevivência, enquanto que o grupo que recebeu FS apresentou um expressivo aumento na estimativa global de sobrevivência. Foi realizada a análise estatística pelo *Kaplan-Meier* (** $p < 0,001$).

Figura 28. Análise da taxa de sobrevivência global dos animais BALB/c com implante tumoral endovenoso do carcinoma renal murino RENCA. Os animais foram tratados após 4º dia de implante tumoral pela via (i.p) com FS ou Sunitinib durante 15 dias e monitorados por 40 dias. A curva mostra que após a última dose terapêutica dos animais tratados com o Sunitinib, a redução na taxa de sobrevivência é precoce comparado a FS, que em ambas as concentrações aumentaram a taxa de sobrevivência nos animais quando comparados ao controle e ao Sunitinib. Foi realizada a análise estatística pelo *Kaplan-Meier* seguida do teste *Log rank* (***) $p < 0,001$).

Figura 29. Índice de caquexia dos animais BALB/c portadores dos tumores de carcinoma renal murino RENCA. Os animais foram tratados após 10º dia de implante tumoral pela via (i.p) com Sunitinib em intervalos de dois dias entre as doses e diariamente com FS durante 15 dias, sendo monitorados por 40 dias. A curva mostra que os animais do grupo controle apresentaram progressiva perda de massa corpórea durante o período experimental, redução superior a 20% do peso. Em todos os regimes de tratamento os animais não apresentaram redução do peso corpóreo. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey- Kramer* (***) $p < 0,001$.

Figura 30. Distribuição do número de metástase pulmonares dos animais BALB/c. Os animais foram tratados após 4º dia de implante tumoral pela via (i.p) com FS e Sunitinib durante 15 dias e monitorados por 40 dias. Os tratamentos induziram redução significativa (** $p < 0,01$) no número de metástases pulmonares, comparado aos animais não tratados (controle). Sendo que o tratamento com FS 40 e 80 mg/Kg foram mais eficazes na redução do número de metástases pulmonares em relação aos animais tratados com Sunitinib. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey- Kramer* (** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$).

4.1.10.3 Análise hematológica e bioquímica dos portadores do carcinoma renal murino RENCA

A análise hematológica e bioquímica foram realizadas nos animais BALB/c antes da inoculação das células do carcinoma renal murino RENCA e no último dia de tratamento com FS 40 e 80 mg/ml, Sunitinib 10 mg/ml e o grupo controle. As análises quantitativas dos leucócitos no último dia de tratamento não apresentaram modificações no número de células circulantes, que possam indicar atividade mielossupressora induzida pelos tratamentos. Também não foram observados efeitos sobre o sistema imune em resposta ao implante das células tumorais ou ainda uma possível reatividade aos tratamentos, em especial os animais que receberam FS (Figura 31A). O número de eritrócitos no grupo controle apresentou redução significativa e aumento do número de plaquetas (* $p < 0,05$), em comparação aos grupos de tratamento e aos valores de referência (Figura 31B). A reatividade medular hematopoiética da linhagem eritróide também foi acompanhada pelas análises citológicas dos reticulócitos periféricos, onde foi possível identificar que os animais do grupo controle apresentam redução do número de reticulócitos juntamente com os eritrócitos (Figura 32A-32B). Estes resultados estão associados a possíveis quadros anêmicos e distúrbios coagulativos resultante da caquexia tumoral apresentada por esses animais ao longo do período experimental.

A determinação sérica das transaminases hepáticas foi utilizada a fim de detectar alterações metabólicas induzidas pelos tratamentos ou alterações funcionais frequentes em síndromes paraneoplásicas. Os animais do grupo controle

apresentaram aumento significativo (* $p < 0,05$) no nível sérico das transaminases hepáticas AST (305 ± 21 U/L) e ALT (122 ± 16 U/L), comparado à quantificação basal (animais saudáveis), AST ($40 \pm 7,7$ U/L) e ALT (150 ± 17 U/L). O tratamento com todos os protocolos utilizados apresentaram modificações quantitativas nos valores séricos da AST para FS 40 mg/Kg (200 ± 14 U/L), FS 80 mg/Kg (243 ± 18 U/L), e Sunitinib 10 mg/Kg (222 ± 17 U/L), comparado aos valores basais. Os valores da dosagem de AST foram determinantes para a exclusão de toxicidade hepática induzida pelos tratamentos, sendo os valores para FS 40 mg/Kg ($69 \pm 5,6$ U/L), FS 40 mg/Kg ($67 \pm 3,3$ U/L) e o Sunitinib 10 mg/Kg ($78 \pm 2,8$ U/L). A concentração da ALT, dos animais do grupo controle, quando comparado aos grupos de tratamento, demonstrou que o estágio tumoral é capaz de induzir alterações hepáticas durante a progressão (Figura 33A-33B).

O nível sérico da DHL foi quantificado a fim de relacionar a proliferação e o estágio tumoral. O grupo controle apresentou aumento significativo (* $p < 0,05$) no nível sérico da DHL ($4340 \pm 98,2$ U/L), correlacionando com o pior prognóstico apresentado para este grupo de animais. Os animais tratados com FS não apresentaram alterações na dosagem sérica da DHL, FS 40 mg/Kg (870 ± 120 U/L) e FS 80 mg/Kg (822 ± 78 U/L). Os animais tratados com Sunitinib 10 mg/Kg mostraram aumento significativo (** $p < 0,001$), na concentração da DHL (3049 ± 666 U/L), comparado ao controle basal (Figura 34).

Figura 31. Avaliação hematológica (leucócitos e eritrócitos) dos animais portadores do tumor dorsal do carcinoma renal murino RENCA. (A) A análise quantitativa do número total de leucócitos mostrou que os tratamentos e o grau de estágio tumoral alteraram o número de leucócitos totais. (B) O número de eritrócitos foi reduzido nos animais do grupo controle comparado aos tratamentos com FS e Sunitinib. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* (* $p < 0,01$).

Figura 32. Avaliação hematológica (plaquetas e reticulócitos) dos animais portadores do tumor dorsal do carcinoma renal murino RENCA. (A) Os animais tratados com Sunitinib e grupo controle apresentavam plaquetose. Em contraste, os animais tratados com FS 40 e 80 mg/Kg apresentavam valores significativamente menores, comparado ao Sunitinib e ao grupo controle. **(B)** A reticulocitose foi encontrada nos animais do grupo controle e sem alterações nos animais tratados com FS e Sunitinib. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA (***) $p < 0,001$.

Figura 33. Avaliação bioquímica dos níveis séricos das transaminases dos animais portadores do tumor dorsal do carcinoma renal murino RENCA. (A) Os animais tratados com FS, Sunitinib e do grupo controle apresentavam aumento da ALT. (B) As análises da AST não mostram hepatotoxicidade induzida pelos tratamentos. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA (*** $P < 0,001$).

Figura 34. Determinação bioquímica do nível sérico da DHL dos animais portadores do tumor dorsal de carcinoma renal murino RENCA. A quantificação bioquímica nos animais do grupo controle e tratado Sunitinib 10 mg/Kg apresentaram aumento dos níveis séricos da DHL. Por outro lado, os tratamentos dos animais com FS 40 e 80 mg/Kg não apresentaram modificações quantitativas da DHL, comparada aos valores basais. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* (***) $p < 0,001$.

4.2 Modelo experimental do melanoma humano SK-MEL-28

4.2.1 Avaliação do efeito citotóxico

A citotoxicidade da FS foi avaliada em diferentes concentrações nas linhagens de melanoma humano (SK-MEL-28) e nos melanócitos murino (Melan-A). A citotoxicidade avaliada pelo método colorimétrico MTT possibilitou a determinação da concentração de tratamento que reduz em 50% a viabilidade celular. Os resultados obtidos após 24 horas de tratamento mostraram que a FS é citotóxica para as células SK-MEL-28 com IC₅₀ de 72 mM. A atividade citotóxica da FS também foi observada no tratamento dos melanócitos normais (Melan-A), com respectivo valor de 110 mM. Estes resultados ainda preliminares sugerem que a FS apresenta seletividade citotóxica para as células tumorais quando comparado ao IC₅₀ obtido para as células Melan-A (Figura 35).

Figura 35. Avaliação da citotoxicidade da FS pelo método colorimétrico MTT. As células foram plaqueadas na densidade de 10^4 /ml em placas de 96 poços e cultivadas durante 24 horas. Após, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas. A curva representa a viabilidade das células SK-MEL-28 e Melan-A, obtido em resposta ao tratamento com a FS. A correlação positiva do efeito é expressa em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.2.2 FS induz morte celular por apoptose nas células SK-MEL-28 detectado pelo teste de Anexina V/PI

O efeito citotóxico da FS foi avaliado quanto a sua capacidade de induzir alterações celulares características da apoptose. As células SK-MEL-28 foram tratadas por 12 horas com FS 72 mM, e seus efeitos comparados a DITC 1,5 mM. O tratamento das células SK-MEL-28 com FS e DITC foram efetivos em induzir morte celular por apoptose em comparação às células não tratadas. Entretanto, a FS foi mais potente ($***p<0.001$) que a DITC ($**p<0.01$), na indução da apoptose inicial nas células de melanoma (Figura 36A-36B).

A

B

Figura 36. Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI por citometria de fluxo. As células SK-MEL-28 foram tratadas com FS e DITC por 12 horas e analisadas pela dupla marcação de Anexina V/ PI, como apresentado pelo *dot plot* representativo (A). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP em gráficos de barra de três experimentos independentes (B). Valores de (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) indicam as diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos.

4.2.3 Avaliação do ciclo celular demonstra que a FS induz apoptose nas células SK-MEL-28

As modificações das fases do ciclo celular foram avaliadas após 24 horas de tratamento com FS 72 mM e DITC 1,5 mM. Os tratamentos das células SK-MEL-28 com FS e DITC não modificaram a proporção de células nas diferentes fases, quando comparado às células não tratadas. Contudo, a morte celular por apoptose foi um efeito obtido em ambos os tratamentos com FS (19%) e DITC (8%), reconhecido como o pico sub-G1, apresentado em azul nos histogramas (Figura 37A). Quando comparado com os valores obtidos no teste de AnexinaV/PI, estes resultados claramente demonstram que a FS pode exercer efeito antitumoral pela indução de apoptose nas células SK-MEL-28 (Figura 37B).

Figura 37. Análise das fases do ciclo celular nas células SK-MEL-28 tratadas com FS e DITC. (A) Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. (B) Os resultados são apresentados em gráficos de barra de três experimentos independentes. Valores de (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) indicam as diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos.

4.2.4 FS induz despolarização mitocondrial e ativação da caspase-3 nas células SK-MEL-28

A avaliação das alterações da bioenergética mitocondrial foi determinada com o uso da sonda fluorescente *tetramethylrhodamine methyl ester* (TMRE), permitindo com maior precisão a determinação das alterações do potencial elétrico de membrana mitocondrial, por não interferir no metabolismo mitocondrial. Após 12 horas de tratamento das células SK-MEL-28 com a FS 72 mM e DITC 1,5 mM, as células foram marcadas com TMRE e analisadas por citometria de fluxo. Como apresentado na Figura 38A, as populações de células foram divididas nas regiões R1 e R2, que correspondem respectivamente ao estado de maior ou menor atividade metabólica das mitocôndrias. Após a separação das duas populações R1 e R2, a intensidade de fluorescência foi o parâmetro utilizado para avaliar a capacidade de incorporação da sonda TMRE. A redução da população de células SK-MEL-28 tratadas com a FS localizada na região R1 foi acompanhada pela redução significativa do potencial mitocondrial (Figura 38B). O aumento da atividade da caspase-3 nas células SK-MEL-28 induzido pela FS corrobora com a redução do potencial elétrico de membrana, demonstrando que a indução da despolarização mitocondrial resultou na ativação da caspase-3 (Figura 38C). A caspase-3 é a principal proteína envolvida na morte celular mediada pela via intrínseca, responsável pela clivagem de muitos substratos, culminando em modificações típicas da apoptose, como a formação de *blebs* de membrana. A bioenergética mitocondrial também foi avaliada pela quantificação total das espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), inferindo o nível de atividade metabólica das células após o tratamento. Foi

observado que a FS induziu significativamente modificações no balanço redox nas células SK-MEL-28 (Figura 39). Estes dados, somados aos resultados apresentados anteriormente, mostram que a FS modifica o metabolismo mitocondrial, promovendo a despolarização da mitocôndria, promovendo morte celular por apoptose.

Figura 38. Modificação no potencial de membrana mitocondrial em resposta a FS avaliada pela sonda TMRE por citometria de fluxo. Como apresentado no *dot plot* representativo (A), as células foram separadas em duas regiões R1 e R2, que respectivamente representam as células com auto ou baixo metabolismo mitocondrial. O tratamento com FS reduziu o potencial elétrico (B) nas células SK-MEL-28 e induziu aumento da ativação da caspase-3 (C), como indicado pela intensidade de fluorescência. Os resultados apresentados são de três experimentos independentes. Valores de (* $p < 0.05$), foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA*.

Figura 39. Detecção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio nas células SK-MEL-28 por citometria fluxo. As células SK-MEL-28 tratadas com FS por 12 horas apresentaram redução da produção de ROS e RNS, indicando alteração do metabolismo mitocondrial pela modificação do *status redox*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP em gráfico de três experimentos independentes. Valores de (* $p < 0.05$), foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA*.

4.2.5 Avaliação da expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2 envolvidas na regulação da apoptose

Os resultados demonstram que a FS 72 mM apresenta um potente efeito citotóxico nas células SK-MEL-28 pela indução de apoptose. A avaliação da expressão das proteínas Bad e Bax envolvidas na morte celular induzida pela FS, indicam que a via intrínseca é requerida durante a indução de apoptose. A FS modificou significativamente a expressão da proteína Bad, que atua na regulação da interação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl. Em contraste, o tratamento com DITC 1,5 mM não modificou a expressão da proteína nas células SK-MEL-28 em comparação ao controle. Em ambos os tratamentos, com FS e DITC, não foram observados modificações na expressão da proteína Bax que regula a formação do poro na membrana externa da mitocôndria e da proteína antiapoptótica Bcl-2, que representa um importante mecanismo de resistência por diversos agentes quimioterápicos (Figura 40).

Figura 40. Expressão das proteínas Bad, Bax e Bcl-2 nas células SK-MEL-28.

As células foram tratadas durante 12 horas com FS 72 mM e DITC 1,5 mM. A expressão das proteínas pró e anti-apoptóticas foram analisadas por citometria de fluxo. O tratamento com FS aumentou o nível da expressão da proteína pró-apoptótica Bad durante a apoptose. Valores de (** $p < 0.01$) foram obtidos pelo teste de *t student* seguido do teste de *Mann-Whitney*.

4.2.6 Avaliação ultraestrutural dos efeitos morfológicos induzidos pela FS nas células SK-MEL-28

As análises ultraestruturais das células SK-MEL-28 tratadas com FS 72 mM foram realizadas para avaliar se os efeitos moleculares correspondem às alterações morfológicas. Nas células não tratadas a membrana citoplasmática apresenta microvilosidades regulares e polimorfismo celular. A heterocromatina perinucleolar foi diferenciada da eucromatina, e o nucléolo é claramente visível na maioria das secções. Numerosas mitocôndrias foram observadas distribuídas ao longo do citoplasma (Figura 41). É possível visualizar a separação bipolar das cromátides durante diferentes etapas da mitose, sem evidências de alterações nucleares (Figura 42). O Complexo de Golgi está composto em lamelas dispendo morfológicamente de cisternas preservadas, localizado na porção *cis* em relação ao núcleo e adjacente com o retículo endoplasmático (RE). O RE apresenta estruturas variadas, formadas em longos filamentos, com cisternas planas e portando numerosos ribossomos, adjacente ao microtúbulo. As mitocôndrias apresentam-se de forma pleomórfica com cristas septadas, separadas pela bem definida membrana interna e externa (Figura 43).

Nas células SK-MEL-28 tratadas com FS 72 mM foi possível identificar alterações ultraestruturais características da apoptose, como: condensação da cromatina, dilatação da membrana nuclear e formação de *blebbing* de membrana celular com deslocamento do envelope nuclear, além de, redução do volume celular com a presença acentuada de vacuolização (Figura 44). Foi observado aumento da porosidade do envoltório nuclear, que supostamente ocorre em

resposta à liberação de endonucleases que permeiam os poros do envelope nuclear, induzindo clivagem de substratos nucleares (Figura 45). As análises ultraestruturais das mitocondriais das células SK-MEL-28 tratadas com FS demonstram que as modificações da bioenergética mitocondrial estão relacionadas com as alterações ultraestruturais observadas. As mitocôndrias exibem vários graus de condensação com deformidades nas cristas e invaginações citoplasmáticas apresentando descontinuidade entre a membrana externa. É possível observar algumas características associadas à redução do potencial elétrico mitocondrial como: mitocôndrias eletrodensas, redução de volume e ruptura da membrana externa (Figura 46).

Figura 41. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28. Nas células não tratadas observam-se microvilosidades salientes na superfície celular (*), com o núcleo suavemente contornado com a heterocromatina (setas pretas), com figuras de separação das cromátides de forma bipolar (setas vermelhas). Observa-se a presença de numerosas mitocôndrias (setas brancas) distribuídas ao longo do citoplasma.

Figura 42. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28. Observa-se a etapa inicial da mitose com formação do fuso bipolar das cromátides (setas brancas). As organelas das células não tratadas como, retículo endoplasmático (RE), complexo de golgi (G), lisossomos (L), microtúbulos (T) apresentam morfologia bem definida.

Figura 43. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28. A população de mitocôndria (M) nas células não tratadas apresentam-se em formas pleomórficas sem modificações estruturais. Nota-se que as cristas mitocondriais estão bem delimitadas, sem alterações na ultraestrutura da membrana externa ou interna.

Figura 44. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28 tratadas com FS. A eletromicrografia das células tratadas com FS apresentam características morfológicas típicas da apoptose precoce: retração celular, perda de integridade de membrana e formação de *blebs* (*). Nota-se o acúmulo de cromatina marginalizada com degradação nucleolar (setas).

Figura 45. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28 tratadas com FS. A análise ultraestrutural do envelope nuclear demonstra espaçamento (setas) e ruptura do contorno de membrana (*), preditivo de degradação da lamina nuclear.

Figura 46. Fotomicrografia eletrônica das células SK-MEL-28 tratadas com FS. A eletromicrografia das mitocôndrias nas células tratadas com FS apresentaram aumento de eletrodensidade correspondente à redução do potencial elétrico mitocondrial. A redução do volume mitocondrial e espaçamento da membrana externa observadas (setas), são modificações características da apoptose.

4.2.7 Avaliação *in vivo* dos efeitos antitumorais da FS no melanoma humano SK-MEL-28

Os efeitos antitumorais *in vivo* foram avaliados nos animais BALB/c^{nu/nu} que receberam inoculação das células SK-MEL-28 pela via subcutânea no flanco direito. A utilização deste modelo experimental permitiu avaliar a eficácia terapêutica da FS como um novo agente antitumoral. O potencial efeito da FS sobre a inibição do crescimento tumoral foi comparado ao DITC, atualmente o principal agente no uso clínico em melanoma. Durante o período de tratamento, os tumores foram medidos para a determinação do volume tumoral estabelecendo a relação dos efeitos antitumorais. Os tratamentos com a FS em ambas as concentrações de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, assim, como o tratamento com DITC 20 mg/Kg resultaram na redução significativa do volume tumoral (**p<0.001). Os efeitos antitumorais avaliados entre os diferentes tratamentos demonstraram que a FS em ambas as concentrações, apresentam eficácia antitumoral superior ao tratamento com DITC (**p<0.001). Os tratamentos com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg da FS, respectivamente reduziram o volume tumoral em 65% e 59%, enquanto que o tratamento com 20 mg/Kg de DITC reduziu o volume em 42% (Figura 47A). A avaliação do tempo em que o tumor duplica seu tamanho demonstra que, a FS em ambas as concentrações e o DITC induzem efeitos citostáticos retardando o crescimento tumoral (Figura 47B). Após o término do tratamento, os animais foram necropsiados e os tumores dorsais retirados e pesados. O peso dos tumores dos animais tratados com FS e DITC foi reduzido significativamente, porém, entre os tratamentos experimentais, a redução no peso dos tumores dos animais tratados com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg da FS foram altamente significativos (**p<0.001) (Figura 47C).

Figura 47. Efeitos antitumorais da FS no melanoma humano SK-MEL-28. Efeitos antitumorais dos tratamentos nos animais BALB/c nu/nu portadores do melanoma dorsal tratados após o 10º dia de implante. Os animais foram tratados por 20 dias com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg de FS e 20 mg/Kg de DITC, administrados pela via (i.p). Os tratamentos com a FS em ambas as concentrações foram efetivos significativamente em reduzir o volume tumoral (A), o tempo de duplicação do tumor (B) e o peso dos tumores (C), quando comparado ao tratamento com DITC. Os gráficos representam a média $\pm$ DP de 5 animais. As análises estatísticas foram obtidas pelo teste *Two way* ANOVA seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.2.8 Avaliação dos efeitos antitumorais da FS por micro PET/CT com [^{18}F] FDG

Os efeitos antitumorais também foram avaliados pelo uso do micro PET/CT, metodologia empregada com muito sucesso no diagnóstico e avaliação da progressão tumoral. Previamente os animais foram injetados com [^{18}F] FDG, captado pelos tumores que apresentam um alto metabolismo glicolítico. As imagens do [^{18}F] FDG micro PET/CT foram adquiridas na mesma sessão e fundidas como mostrado na Figura 48A. As imagens de PET/CT dos animais tratados com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, demonstraram que a FS é efetiva na redução do crescimento tumoral. As imagens do PET/CT mostraram que os animais tratados com FS apresentam regiões de baixa captação de [^{18}F] FDG, associados com a redução da massa tumoral, presença de regiões de necrose e de baixa atividade metabólica (Figura 48B).

Figura 48. Imagens representativas em corte sagital e transversal do micro PET/CT animal com a utilização do $[^{18}\text{F}]$ FDG. A região indicada por setas brancas corresponde à inoculação das células tumorais com a intensa captação do $[^{18}\text{F}]$ FDG (A). Os tratamentos com 20 mg/Kg DITC (B), 50 mg/Kg de FS (C), e 100 mg/Kg de FS (D), reduziram a captação do $[^{18}\text{F}]$ FDG pelas células tumorais reduzindo o sinal de emissão de pósitrons.

4.2.9 Análise histopatológica dos tumores dorsais dos animais BALB/c^{nu/nu} tratados com FS e DITC

Após a aquisição das imagens os animais foram eutanasiados e os tumores foram processados para a análise histológica e imunoistoquímica. A avaliação histopatológica pela coloração de H&E apresentou os efeitos dos diferentes tratamentos do microambiente tumoral. Nas secções dos tumores dos animais não tratados observaram-se numerosas células tumorais pleomórficas, com raras regiões de necrose e a presença de figuras de mitoses. Em contraste, os tratamentos com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg da FS e 20 mg/Kg DITC apresentaram aumento extensivo das áreas de necroses (Figura 49A), com redução da densidade celular, além de numerosas células com modificação citoplasmática e núcleo fragmentado. (Figura 49B). As análises quantitativas das regiões de necrose realizada pelo programa *image J* demonstraram que FS em ambas as concentrações promove o aumento da formação da área de fibrose. (**p<0.001) (Figura 50A). A coloração dos cortes histológicos com iodeto de propídio foi empregada para avaliar de forma quantitativa a fragmentação nuclear, demonstrando que os tumores tratados com FS em ambas as concentrações apresentam significativo aumento de células com núcleo fragmentado comparado ao tratamento com DITC (Figura 50B). A coloração citoquímica com a utilização do Picrosírius e Verhoeff permitiu a avaliação das modificações estruturais no microambiente tumoral após os tratamentos. A extensa área de necrose observada nos tratamentos com FS e DITC foi substituída por uma área de fibrose rica em fibras colágenas. A presença de fibras elásticas coradas por Verhoeff observadas nos tumores não tratados demonstram a presença de numerosos vasos sanguíneos infiltrados no tumor. A redução das fibras elásticas nos tumores tratados com FS e DITC pode estar associada à redução do aporte vascular dos tumores e redução do crescimento (Figura 51A-51B).

Figura 49. Fotomicrografia representativa dos cortes dos tumores dorsais de melanoma corados por hematoxilina-eosina (H&E) e PI.

(A) O grupo controle apresentou numerosas células tumorais com raras regiões de necrose (N). Os tumores tratados com FS e DITC apresentaram extensas áreas de necrose com presença de células com núcleo fragmentado (setas pretas). (B) Na microscopia de fluorescência é possível observar numerosas células com núcleo picnótico (setas brancas) nos tumores tratados com FS (Aumento 40x).

Figura 50. Avaliação da distribuição da área de necrose e fragmentação nuclear nos tumores. (A) A FS em ambas as concentrações de tratamento, reduziu a densidade celular e aumentou a área de necrose. (B) Os tratamentos em ambas as concentrações, 50 mg/Kg e 100 mg/Kg da FS induziram o aumento significativo do número de células com núcleo fragmentado, característico na morte celular por apoptose.

Figura 51. Fotomicrografia representativa da análise citoquímica dos cortes dos tumores dorsais. (A) Os tumores do grupo controle corados por Verhoeff apresentam numerosos vasos (setas) infiltrados. Em contraste, os tratamentos com FS e DITC reduziram a densidade de vasos e sua distribuição. (B) A coloração de picrosírius demonstrou que a presença da extensa área de necrose nos tratamentos com a FS, é acompanhada pela presença de fibras de colágeno (Aumento 40x).

4.2.10.1 Avaliação do envolvimento das proteínas ERK1/2 e p38 no melanoma humano SK-MEL-28 em resposta ao tratamento com a FS

A análise imunoistoquímica mostrou que os tumores não tratados apresentaram aumento da expressão da proteína ERK1/2, membro da família das proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPKs), constitutivamente expressos em melanomas malignos. Em comparação ao controle, o tratamento com 20 mg/Kg DITC, não foi capaz de modificar a expressão da proteína ERK1/2. Em contraste, a FS em ambas as concentrações de tratamento reduziu a expressão da ERK1/2, que é ativada em resposta a inúmeros fatores de crescimentos, como citocinas e hormônios (Figura 52A). A expressão da proteína p38 relacionada com a resistência e a progressão dos melanomas, também foi evidenciada nos tumores não tratados. Os tratamentos com 20 mg/Kg DITC e 50 mg/Kg e 100 mg/Kg de FS, suprimiram a expressão da proteína p38, resultando no aumento da sensibilidade das células de melanoma à morte celular por apoptose (Figura 52B).

Figura 52. Fotomicrografia representativa da análise imunoistoquímica das proteínas ERK1/2 e p38. (A) Os tumores do grupo controle e tratados com DITC apresentaram aumento da expressão da proteína da ERK1/2. Em contraste, o tratamento com a FS em ambas as concentrações suprimiram a ativação da proteína ERK1/2. (B) A ativação da proteína p38 foi reduzida pelos tratamentos com a FS e DITC, em comparação ao grupo controle.

4.3 Modelo experimental do adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células (NSCLC)

4.3.1 FS induz citotoxicidade nas células NSCLC

A fim de avaliar os efeitos antitumorais da FS em células de NSCLC, nosso primeiro passo foi verificar os efeitos citotóxicos dos tratamentos nas linhagens H460-WT, H460-CrmA e H460-Bcl-2 tratadas com FS em diferentes concentrações. Os resultados sobre a viabilidade celular mostraram que a FS é citotóxica em todas as linhagens de células do NSCLC, independente do fenótipo de resistência à morte celular. Os respectivos valores de IC50 são apresentados na tabela 1 obtidos de três experimentos independentes.

Tabela 1. Avaliação dos efeitos citotóxicos da FS nas linhagens de células do NSCLC.

H460 WT	Pulmão	Humana	92
H460 Bcl-2	Pulmão	Humana	90
H460 CrmA	Pulmão	Humana	88

IC₅₀= Concentração inibitória mínima.

4.3.2 FS reduz o potencial elétrico da membrana mitocondrial nas células NSCLC

Para estudar o potencial efeito da FS no recrutamento da via mitocondrial na apoptose, as alterações do potencial elétrico mitocondrial foram avaliados com a utilização da sonda TMRE nas células NSCLC. A detecção da perturbação no $\Delta\psi$ foi observada após 6 horas de tratamento com a FS nas concentrações obtidas pelo IC50. As mudanças do $\Delta\psi$ mesmo com a utilização do pan-inibidor das caspases z-VAD-fmk, não foram capazes de prevenir o colapso mitocondrial (Figura 53). Desta forma, estes resultados indicam que a FS foi capaz de induzir morte celular de uma forma dependente da mitocôndria.

Figura 53. Redução do potencial de membrana mitocondrial nas células H460 induzida pela FS. As células H460 WT, H460 Bcl-2 e H460 CrmA foram tratadas com FS na concentração de 90 mM. Após 6 horas do tratamento o $\Delta\psi$ foi avaliado pela incorporação da sonda TMRE. A modificação da intensidade de fluorescência é observada pelo deslocamento das células da região R1 do *gate* para a região R2.

4.3.3 FS reduz o nível de expressão e modifica a redistribuição citoplasmática dos receptores DR4 e DR5

Receptores da família TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), estão frequentemente associados à morte por apoptose pela participação dos receptores DR4 e DR5. A avaliação da expressão dos receptores de superfície DR4 e DR5 forneceram importantes informações sobre os recrutamentos dos receptores na indução de apoptose pela FS. O nível de expressão dos receptores de superfície foi reduzido demonstrando que a FS pode modificar a densidade do DR4 e DR5, com o aumento do tráfego intracelular destes receptores (Figura 54). Esta hipótese foi confirmada pela técnica de microscopia confocal, onde é possível observar os receptores distribuídos em compartimentos intracelulares, com redistribuição difusa próxima ao núcleo (Figura 55).

Figura 54. Modulação dos receptores DR4 e DR5 induzido pela FS. As células da linhagem NSCLC foram tratadas durante 6 horas com FS na concentração de 90 mM e a expressão dos receptores DR4 e DR5 foram avaliadas por citometria de fluxo. O nível de expressão de superfície dos receptores foi reduzido em todas as células H460, induzido pela FS. Os valores são apresentados em gráficos de barras expressos em média e desvio padrão de três experimentos independentes (**p<0.01; *p<0.05).

TRAIL R1 (DR4)

TRAIL R2 (DR5)

Figura 55. Fotomicrografia das alterações na distribuição dos receptores DR4 e DR5. As células H460 WT foram tratadas com FS e com TRAIL 50 ng/ml durante 6 horas e coradas com Alexa 488 (verde). O tratamento com o TRAIL induziu a internalização dos receptores DR4 e DR5 nas células H460 WT, reduzindo a sua presença na membrana. A FS foi capaz de induzir a internalização dos receptores, porém, é possível notar o aumento da densidade intracelular dos receptores DR4 e DR5 localizados próximo ao núcleo celular.

4.3.4 FS induz apoptose nas células NSCLC de forma caspase-dependente avaliado pelo teste de Anexina V/PI

A utilização do pan-inibidor das caspases z-VAD-fmk forneceu dados importantes sobre o mecanismo de indução da apoptose pela FS, bem como, o recrutamento das caspases. O tratamento das células H460 WT na presença do z-VAD-fmk reduziu a porcentagem de células mortas por apoptose na fase inicial ($16 \pm 0,14\%$), quando comparado com tratamento sem o z-VAD-fmk ($26 \pm 1,20\%$). Nas células H460 Bcl-2, a indução de apoptose na fase inicial foi bloqueada pelo uso do inibidor ($4 \pm 0,78\%$), entretanto, na fase tardia a porcentagem de células em apoptose foi igual às células que foram mortas por apoptose e detectadas no estágio inicial, respectivamente ($17 \pm 0,78\%$) e ($17 \pm 1,07\%$). A capacidade de indução de morte celular apresentada pela FS não foi detectada no tratamento das células H460 CrmA, mesmo na ausência no inibidor (Figura 56).

Figura 56. Avaliação da apoptose induzida pela FS através do teste de Anexina V/PI. As células NSCLC foram pré-tratadas por 2 horas com o pan-inibidor de caspase z-VAD-fmk 5 μ M, seguida do tratamento por 6 horas com FS 90 mM (A). Nas células H460 WT mesmo com a presença do inibidor a FS induziu apoptose, efeito esse também observado no estágio tardio da apoptose nas células H460 Bcl-2. Na ausência do z-VAD-fmk a FS induziu apoptose nas células H460 WT e H460 Bcl-2, porém, nas células H460 CrmA, a FS nesta condição não induziu apoptose (B).

4.3.5 FS induz apoptose nas células NSCLC pela ativação da via mitocondrial dependente da ativação das caspases

Como consequência do colapso de membrana, ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma formando um complexo chamado de apoptossomo capaz de ativar a caspase-9. Foi observado que as células H460 WT tratadas com FS na presença do z-VAD-fmk não apresentam modificação da caspase-9, entretanto, na ausência do inibidor houve um aumento de sua expressão. A presença da forma clivada da caspase-3 corrobora com este resultado, sendo que, a forma ativa da caspase-9 é responsável pela clivagem da forma inativa da caspase-3, aumentado nas células H460 Bcl-2 tratadas com FS. Este efeito foi observado pela presença da forma ativa da caspase-3 nas células H460 WT tratadas com a FS, mesmo com a pré-incubação com z-VAD-fmk.

A avaliação da caspase-8 foi estudada como forma de avaliar o envolvimento da via extrínseca da apoptose. Os resultados demonstraram que a FS apresenta um importante efeito na ativação da caspase-8 nas células H460 WT, aumentando a regulação da pró-caspase com a presença do fragmento de 42/43 KDa, assim como, o aumento da expressão da sua forma ativa representado pela presença do fragmento de 18 KDa, que contém o sítio catalítico da cisteína protease. O aumento da expressão da caspase-8 foi detectada também nas células H460 CrmA, com restrição apenas para o domínio de 42/43 KDa da caspase-8. Além disso, um importante aspecto observado na superexpressão da caspase-8 foi que a FS mesmo com a pré-incubação com o z-VAD-fmk, induziu o aumento na regulação da caspase iniciadora (Figura 57).

Figura 57. Avaliação da ativação das caspases nas células NSCLC tratadas com FS. Análise do Western blot das diferentes caspases após 6 horas de tratamento demonstram que a FS induz apoptose de forma caspase dependente mesmo na presença do z-VAD-fmk. A presença dos fragmentos de 19 e 17 kDa para a caspase-3 e 18 kDa para a caspase-8 indicam a forma ativa das cisteíno proteases. O aumento da expressão da pró-caspase 3 e 8 também foram observados nas células H460 Bcl-2 e H460 CrmA. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

4.3.6 FS reduz a expressão da Bcl-2, promovendo a translocação do Bax e induzindo a clivagem do Bid

Após identificar que a FS induz apoptose com a participação da via das caspases, o próximo passo foi investigar como a ativação das cisteíno proteases foram reguladas. O tratamento das células H460 WT e H460 CrmA não apresentaram modificação na expressão da proteína Bcl-2. Por outro lado, o tratamento das células H460 Bcl-2 com a FS resultou na redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2.

A translocação do Bax da mitocôndria para o citoplasma é um mecanismo chave na apoptose mediada pela mitocôndria, em resposta a vários estímulos apoptóticos. O aumento da expressão do Bax nas células H460 Bcl-2, indica que a FS é capaz de recrutar mediadores envolvidos na apoptose pela via mitocondrial. A presença do aumento da forma truncada tBid nas células H460 Bcl-2 mostra um importante aspecto na identificação do mecanismo de morte induzido pela FS. A modulação da proteína antiapoptótica Bclxl também foi avaliada, porém, não houve nenhuma alteração de expressão nas células H460. Esta evidência demonstrou que a FS apresentou um mecanismo alternativo que leva a morte celular por apoptose, em condições que proteínas pró-apoptóticas, localizadas no espaço mitocondrial, estão impossibilitadas de serem liberadas para o citoplasma, e que são fundamentais na apoptose. A via alternativa como observada envolve o recrutamento ou ativação de vias que modificam a conformação da proteína o Bid. A avaliação do membro da família Bcl-2 que apresenta somente o domínio BH3, a Noxa representa um mediador da apoptose induzido pela regulação da proteína p53 em resposta a danos no DNA ou outros estímulos apoptóticos. Nas células H460 WT e H460 CrmA, o

tratamento com a FS aumentou a regulação da expressão da Noxa. Este efeito foi observado em especial nas células H460 CrmA mesmo com a inibição das caspases pelo z-VAD-fmk, que possivelmente neste caso está ligado ao recrutamento na proteína p53, que seria a alternativa comum quando o estímulo de morte por apoptose é deflagrado e as vias das caspases estão inibidas (Figura 58).

A desregulação do ciclo celular é uma das características envolvendo a carcinogênese, sendo que compostos que atuem modulando a via de sinalização das Ciclina-quinase dependente (CDK) são consideradas candidatas a fármacos para a terapêutica antitumoral. Neste contexto, avaliamos a modulação da expressão da CDK4,CDK6,CDK9,CDK7 e da Ciclina D1 nas células NSCLC tratadas com FS. As células H460 Bcl-2 tratadas com FS apresentaram redução na expressão da CDK4/6, que atua na regulação da passagem da G1 para fase S do ciclo associadas as Ciclinas D, E e A, assim ,como a redução da expressão da CDK9. Alterações no nível de expressão das proteínas CDK7 e CDK6, e da Ciclina D1 não foram observados nas células tratadas com a FS (Figura 59).

Figura 58. FS modula a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e induz a clivagem do Bid. Análise do Western blot demonstra que a FS foi capaz de reduzir a expressão da Bcl-2 nas células H460, que superexpressão a proteína antiapoptótica. A forma truncada do Bid (tBid) indica o recrutamento da via mitocondrial na apoptose induzida pela FS através da sua clivagem pela caspase-8. Aumento da expressão da NOXA em resposta a FS também foi detectado devido ao perfil de resistência apresentado pelas células H460 Bcl-2 e H460 CrmA, que induz a participação de outras proteínas que participam da apoptose como a p53, que é regulada pela NOXA. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 59. FS atua na regulação da CDK4/6 e a CDK 9. As análises das CDKs por Western blot indicam que a FS é capaz de interferir no ciclo celular pelo bloqueio das CDKs nas células H460 Bcl-2. A redução da expressão das CDKs demonstrou que a FS apresentou um mecanismo alternativo de controle do crescimento tumoral na presença de fenótipos de resistência como no caso a superexpressão da proteína Bcl-2. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

4.4 Modelo experimental de leucemia promielocítica aguda

4.4.1 Transplante de células leucêmicas de camundongos PR C/EBP α +/- utilizando camundongos NOD/Scid

As células leucêmicas foram obtidas do baço de três doadores leucêmicos PR C/EBP α +/- diferentes. Os receptores NOD/Scid foram irradiados com 300 cGy (~ 33cGy/minuto), e transplantados com 100 μ l da suspensão celular contendo 2×10^6 células leucêmicas pela via retro-ocular. Após o transplante, os animais receptores foram monitorados semanalmente, e submetidos a coletas de sangue periférico para avaliação da progressão da doença. Após o 15º dia do implante, modificações hematológicas como; leucocitose, anemia e plaquetopenia que confirmaram o sucesso do transplante (Figura 60). Ainda com a finalidade de confirmar o sucesso do transplante, um grupo de 4 animais foram eutanasiados e os órgãos, baço, fígado e medula óssea foram processados para análise citológica. Na análise citológica foram observados numerosos blastos com características de mieloblastos indiferenciados, infiltradas no parênquima hepático, esplênico e medular (Figura 61).

Figura 60. Análise hematológica dos animais NOD/Scid após o 15º de **transplante**. Análise quantitativa do número total de leucócitos (A) eritrócitos (B) e plaquetas (B) dos animais receptores. Os valores são expressos em média $\pm$ DP (n=10).

Figura 61. Análise citológica dos órgãos dos animais NOD/Scid após o 15º de transplante. Análise quantitativa do número total de blastos infiltrados no baço (A) Fígado (B) e Medula Óssea (B) nos animais receptores. Os valores são expressos em média $\pm$ DP (n=10).

4.4.2 Avaliação do tratamento dos animais NOD/Scid portadores de leucemia promielocítica aguda

Após a confirmação do sucesso dos transplantes, foi iniciado os tratamentos dos animais com 40 e 80 mg/Kg da FS, 10 mg/Kg de Daunorrubicina (DA) e 1mg/Kg do Ácido all-trans retinóico (ATRA). Os animais foram tratados durante 15 dias e ao término deste período foram avaliados quanto as modificações nos parâmetros hematológicos e a avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos. Alterações quantitativas do número de leucócitos foram frequentes nos animais não tratados. Todas estas modificações são parte do processo da leucomogênese que incluem, modificações medulares como: aplasia medular e expansão periférica de células indiferenciadas para o microambiente extracelular. Em contraste, todos os tratamentos experimentais dos animais portadores de leucemia foram eficazes em reduzir o número total de leucócitos no sangue periférico (Figura 62). Os tratamentos com FS, DA e ATRA, reduziram o número de células circulantes indiferenciadas características de blastos em relação ao grupo de animais não tratados (Figura 63).

Figura 62. Análise quantitativa do número de leucócitos dos animais NOD/Scid leucêmicos. Os tratamentos com FS, DA e ATRA reduziram o número total de leucócitos no sangue periférico após o 15º de tratamento. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA (***) $p < 0,01$).

Figura 63. Análise quantitativa do número de blastos dos animais NOD/Scid leucêmicos. Os tratamentos com FS, DA e ATRA reduziram o número total de blastos no sangue periférico após o 15º de tratamento. Valores são expressos em média $\pm$ DP. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA (***) $p < 0,001$.

4.4.3 Avaliação por imunofenotipagem das células obtidas dos órgãos dos animais NOD/Scid leucêmicos após os tratamentos com FS, DA e ATRA

Após o 15º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos (fígado, baço e medula óssea) foram processados para obtenção das suspensões celulares. As células foram analisadas pela técnica de *cytospin* e pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, possibilitando a caracterização dos blastos leucêmicos infiltrado nos parênquimas. As células foram marcadas com anticorpos de superfície CD117⁺, Gr-1⁺, CD34⁺ e CD45⁺. As células infiltradas nos diferentes parênquimas foram classificadas de acordo com o critério proposto por Bethesda, para a classificação de neoplasias não-linfóide em camundongos. As células foram coradas com Wright-Giemsa e um mínimo de 200 células foram contadas e classificadas como imaturas, intermediárias ou maduras. O aumento de células imaturas e intermediárias foi observado em todas as amostras obtidas dos animais do grupo tratado com solução salina (controle). Os aspectos morfológicos destas células se assemelham aos promielócitos com núcleo grande e numerosas granulações primárias azurófilas. A análise citomorfológica realizada com as células obtidas da medula óssea, fígado e baço demonstraram que os tratamentos com 40 e 80 mg/Kg FS e 1 mg/Kg ATRA reduziram de forma superior ao tratamento com 10 mg/Kg DA, o número de células imaturas e intermediárias característica de blastos mieloides (Tabela 2).

A caracterização imunofenotípica demonstrou que os parênquimas esplênicos e hepáticos dos animais do grupo controle apresentaram infiltrados de células CD117⁺ e Gr-1⁺, que são marcadores de maturação e progressão encontrados em estágios

avanzados em leucemias promielocíticas aguda (LPA). Ainda, o aumento da expressão destes marcadores está relacionado à ineficácia terapêutica dos diferentes tratamentos quimioterápicos convencionais. A expressão reduzida das células infiltradas no baço com o fenótipo CD117⁺ foi observado apenas no grupo de animais tratados com FS em ambas as concentrações de tratamento (Figura 64). Em contraste, as células CD117⁺ infiltradas no fígado foram reduzidas significativamente (**p<0.01) em respostas aos tratamentos com 40 e 80 mg/Kg de FS, 1mg/Kg ATRA e 10 mg/Kg DA (Figura 65.). Em conjunto, a redução do número das células CD117⁺ infiltradas no fígado em respostas aos tratamentos com FS, DA e ATRA, foi acompanhada pela redução das células mielóides imaturas que apresentam o fenótipo Gr-1⁺ que são frequentemente elevadas em pacientes com síndromes mielodisplásicas e em animais portadores de tumores. A redução das células mieloides imaturas Gr-1⁺ também foi observada nas células obtidas do parênquima hepático dos animais tratados com 40 e 80 mg/Kg FS e o 1mg/Kg ATRA (Figura 66). Por outro lado, o tratamento com a 10 mg/Kg de DA não foi eficaz em reduzir a colonização do baço de células Gr-1⁺ (Figura 67).

As células obtidas da medula óssea também foram caracterizadas por citometria de fluxo. As células viáveis foram selecionadas como a porcentagem de células CD45 positivas, onde foram gerados subconjuntos de células e avaliadas quanto a expressão dos marcadores CD117⁺, CD34⁺ e a co-expressão assíncrona CD117/34. A porcentagem de células que co-expressão CD45/117⁺ na medula óssea não foi modificada em nenhum dos tratamentos, porém, houve aumento no número de células com o fenótipo CD45⁺ nos tratamentos com 10 mg/Kg DA e 80 mg/Kg FS

(Figura 68). As células pluripotentes progenitoras CD34⁺ foram reduzidas nos tratamentos com o 1 mg/Kg ATRA e 40 mg/Kg FS, bem como as células que co-expressão CD45/34⁺, ainda esta redução foi acompanhada com o aumento das células CD45⁺ (Figura 69). O aumento da co-expressão assíncrona destes dois antígenos com fenótipo CD117/CD34 são específicos de síndromes mieodisplásicas. A redução do número destes clones malignos presentes na medula óssea dos animais NOD/Scid foram reduzidos nos tratamentos com 1 mg/Kg ATRA e 40 e 80 mg/Kg de FS (Figura 70).

Tabela 2. Contagem e classificação das células segundo critério estabelecido por Bethesda para leucemias em camundongos.

Células (%)	Controle	ATRA 1 mg/Kg	DA 10 mg/Kg	FS 40 mg/Kg	FS 80 mg/Kg
Sangue periférico					
Imaturas	19,0±4,8	0,00±0,00*	9,0±4,7*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Intermediárias	16,7±8,4	1,00±0,02*	5,3±0,78*	8,00±0,13*	5,4±0,65*
Maduras	42,1±12,6	16,7±2,8*	32,2±12,8	18,7±3,1*	14,2±4,9*
Linfócitos	29,0± 9,4	82,3±17,2	53,5±20,0	73,3±14,8	80,3±14,8
Medula Óssea					
Imaturas	50,6±20,4	18,9±12,0*	32,5±17,4*	13,9±2,1*	10,1±1,1*
Intermediárias	28,7±12,6	25,2±8,7	23,2±9,7	19,0±12,7*	18,0±7,2*
Maduras	18,5±8,4	38,3±2,8*	19,5±4,8	38,6±5,5*	36,6±4,5*
Linfócitos	4,1±0,98	16,1±4,6*	24,1±4,8*	28,1±4,6*	35,0±14,0*
Fígado					
Imaturas	41,2±10,7	18,1±7,7*	24±4,2*	16,8±2,3*	20,0±7,5*
Intermediárias	23,8±5,5	9,1±0,51*	16,7±2,8*	18,1±0,45*	15,6±2,5*
Maduras	14,0±1,7	20,4±9,1*	32,4±7,5*	10,1±0,57	18,4±9,0*
Linfócitos	20,0±3,4	52,4±4,9*	27,8±12,2	55,0±21,2*	47,1±3,8*
Baço					
Imaturas	43,6±11,4	13,4±2,5*	15,0±1,8*	4,7±0,5*	2,3±0,25*
Intermediárias	23,9±7,5	3,1±0,18*	20,1±0,98	2,1±0,18*	3,2±0,22*
Maduras	11,0±0,21	14,4±8,9	26,4±12,3*	12,4±3,7	16,1±0,21
Linfócitos	27,1±5,1	70,0±13,0*	38,6±6,7*	81,2±18,2*	78,4±18,2*

Os resultados são expressos em média ±DP de três animais por grupo de tratamento. Os valores estatísticos foram obtidos pelo *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (*p<0,05).

Figura 64. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD117⁺ infiltradas no baço dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações de células em cada *gate* representando a porcentagem de células CD117⁺. (B) As barras representam a média $\pm$ DP das células obtidas de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (** $p < 0,01$).

Figura 65. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD117⁺ infiltradas no fígado dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) Dot plot representativo das populações de células em cada *gate* representando a porcentagem de células CD117⁺. (B) As barras representam a média $\pm$ DP das células obtidas de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,05$).

Figura 66. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células Gr-1⁺ infiltradas no baço dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) Dot plot representativo das populações de células em cada gate representando a porcentagem de células Gr-1⁺. (B) As barras representam a média $\pm$ DP das células obtidas de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,05$).

Figura 67. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células Gr-1⁺ infiltradas no fígado dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) Dot plot representativo das populações de células em cada *gate* representando a porcentagem de células Gr-1⁺. (B) As barras representam à média $\pm$ DP das células obtidas de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Figura 68. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD45⁺ e CD 117⁺ na medula óssea obtida dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) Dot plot representativo das populações de células em cada gate representando a porcentagem de células CD45⁺ e CD117⁺. As barras representam à média $\pm$ DP das células CD45⁺ (A), CD117⁺ (B) e a co-expressão expressão CD45/117 (C) das células obtidas da medula óssea de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (*p<0,01;p<0,05).**

Figura 69. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD45⁺ e CD 34⁺ da medula óssea obtida dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações de células em cada *gate* representando a porcentagem de células CD45⁺ e CD34⁺. As barras representam à média $\pm$ DP das células CD45⁺ (A), CD117⁺ (B) e a co-expressão CD45/34 (C), das células obtidas da medula óssea de três animais por grupo experimental. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey- Kramer* (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

A

B

Figura 70. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD117⁺ e CD 34⁺ da medula óssea obtida dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) Dot plot representativo das populações de células em cada gate representando a porcentagem de células CD45⁺ e CD34⁺. (B) As barras representam à média $\pm$ DP da co-expressão assíncrona das células CD117/CD34. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (*p<0,01;p<0,05).**

4.4.4 Avaliação dos efeitos na indução de apoptose pelos tratamentos por citometria de fluxo

Após a caracterização pela imunofenotipagem, a proporção de células mortas encontradas do parênquima hepático e esplênico foi avaliada pela dupla marcação Anexina V/PI. As populações celulares selecionadas dos *gates* com as marcações CD117⁺ e Gr-1⁺ foram avaliadas quanto ao número de células mortas por apoptose. Como o número de células marcadas com seus respectivos antígenos variam em função do tratamento, o número de células mortas por apoptose é apresentado em porcentagem, relativa ao número de células selecionadas nos *gates*. Assim, os valores foram corrigidos com base no número total de células CD117⁺ e Gr-1⁺ para cada tratamento.

Além de reduzir o número de células CD117⁺ no baço, a FS nas concentrações de tratamento de 40 e 80 mg/Kg foi superior em comparação aos outros tratamentos na indução de apoptose das células CD117⁺ infiltradas no parênquima (Figura 71). A FS 40 mg/Kg induziu significativamente apoptose nas células CD117⁺ presentes no parênquima hepático (Figura 72). Com relação às células Gr-1⁺ os tratamentos com 1 mg/Kg ATRA, 10 mg/Kg DA e 40 e 80 mg/Kg FS, foram efetivos em induzir apoptose nas células presentes no baço (Figura 73). Em contraste, a capacidade de induzir morte celular por apoptose em clones malignos Gr-1⁺ infiltrados no fígado também foi observada em todos os tratamentos experimentais (Figura 74).

Figura 71. Avaliação da morte celular por apoptose das células CD117⁺ infiltradas no fígado dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações das células CD117⁺ que foram selecionadas para a marcação com Anexina V/PI. (B) As barras representam à média $\pm$ DP das células CD117 em apoptose e aos valores corrigidos baseado na porcentagem de células CD117⁺ totais presentes no fígado dos animais. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,001$).

Figura 72. Avaliação da morte celular por apoptose das células CD117⁺ infiltradas no baço dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações das células CD117⁺ que foram selecionadas para a marcação com Anexina V/PI. (B) As barras representam à média $\pm$ DP das células CD117 em apoptose e aos valos corrigidos baseado na porcentagem de células CD117⁺ totais presentes no baço dos animais. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey- Kramer* (* $p < 0,01$).

Figura 73. Avaliação da morte celular por apoptose das células Gr-1⁺ infiltradas no baço dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações das células Gr-1⁺ que foram selecionadas para a marcação com Anexina V/PI. (B) As barras representam à média $\pm$ DP das células Gr-1⁺ em apoptose e aos valores corrigidos baseado na porcentagem de células Gr-1⁺ totais presentes no baço dos animais. Foi realizado o teste estatístico *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,001$).

Figura 74. Avaliação da morte celular por apoptose das células Gr-1⁺ infiltradas no fígado dos animais NOD/Scid leucêmicos. (A) *Dot plot* representativo das populações das células Gr-1⁺ que foram selecionadas para a marcação com Anexina V/PI. (B) As barras representam à média $\pm$ DP das células Gr-1⁺ em apoptose e aos valores corrigidos baseado na porcentagem de células Gr-1⁺ totais presentes nos fígado dos animais. Foi realizado o teste estatístico *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* (* $p < 0,001$).

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas drogas anti-tumorais com amplo espectro e ação terapêutica permanece sendo o maior obstáculo da medicina moderna no tratamento contra o câncer. Em contraste aos clássicos agentes quimioterápicos que exercem seus efeitos terapêuticos promovendo danos ao DNA, os fosfolipídeos antineoplásicos como, a Miltefosina, Edelfosina e Perifosine, são um grupo de AFTs estruturalmente semelhantes, que atuam sobre a membrana das células tumorais. Considerando que os fosfolipídios como a Edelfosina, apresentam na sua estrutura o grupo químico éter, esses formam ligações estáveis com a membrana celular bloqueando o *turnover* de membrana interrompendo vias sinalização dependente de lipídios, e induzindo a morte celular (Van der Luit et al., 2007).

No entanto, o uso dos AFTs como uma classe de drogas anti-tumorais são de forma limitada devido seus efeitos colaterais graves e indesejáveis, especificamente na administração oral da Miltefosina, que induz toxicidade gastrointestinal e em particular, náuseas, anorexia, vômitos e diarreia. Devido a estes graves efeitos colaterais e a impossibilidade da administração injetável dos AFTs, tem-se buscado a síntese de novos fosfolipídios ou análogos com maior seletividade e menores efeitos adversos (Papazafiri et al., 2005).

Ao longo de nossos estudos foram demonstrado que a FS, um fosfomonoéster que estruturalmente representa a região da cabeça dos AFTs, tem apresentado importantes efeitos terapêuticos em diferentes linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Estes estudos suportam o fato que apenas a região da cabeça dos fosfolipídios composta pela fosfoetanolamina seja suficiente para promover os efeitos antitumorais. Desta forma, muitos dos efeitos adversos citados acima, que são

atribuídos à presença da longa cadeia de hidrocarbonetos na estrutura dos AFTs, podem ser reduzidos proporcionando uma utilização terapêutica mais segura.

Neste estudo foram avaliados os efeitos citotóxicos da FS em várias linhagens de células tumorais e comparados aos tratamentos já utilizados na prática clínica. Os efeitos citotóxicos da FS nas células tumorais RENCA, nas células normais HTRP e nas células endoteliais HUVEC, foram comparados aos efeitos do múltiplo inibidor de tirosino quinase, Sunitinib. Para as células SK-MEL-28 e os melanócitos normais (Melan A), os efeitos citotóxicos foram comparados ao agente alquilante Dacarbazina (DITC), utilizado para o tratamento de melanoma maligno. Após 24 horas de tratamento das células normais e tumorais, todos os compostos foram citotóxicos. Entretanto, o nível de sensibilidade dos tratamentos foi diferente entre as células normais e tumorais. Além da indução de citotoxicidade nas células RENCA, a FS foi capaz também de reduzir a viabilidade das células HUVEC e HTRP. Em contraste, o Sunitinib apresentou uma citotoxicidade maior para as células normais, HUVEC e HTPR, ainda sendo necessárias concentrações 10 vezes superior para causar citotoxicidade nas células RENCA. Os efeitos citotóxicos da FS também foram avaliados nas células NSCLC que portam diferentes níveis de resistência como, o aumento da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (H460; Bcl-2) e da *cytokine response modifier A* (H460; CrmA), responsável pelo bloqueio das caspases 1 e 8. Os resultados mostraram que os efeitos citotóxicos da FS não se limitaram nas células H460 WT, que apresentaram um menor perfil de resistência. A FS também foi citotóxica para as células H460 Bcl-2 e H460 CrmA, que portam um fenótipo molecular de resistência a múltiplos quimioterápicos. Os resultados de citotoxicidade indicam que a FS exibe seus efeitos antitumorais através de um mecanismo de

toxicidade que parece comum. Essa hipótese é baseada na maior sensibilidade e nos semelhantes valores de IC50 obtidos para as células tumorais independente do perfil molecular. O fato da FS induzir citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais indica que seus efeitos são independentes do perfil molecular, tais como, resistência e agressividade. Assim, nossa principal hipótese é que os efeitos antitumorais da FS podem estar associados a um novo mecanismo de reconhecimento molecular, como um tipo exclusivo de receptor expresso nas celulares estudadas neste projeto.

O teste colorimétrico MTT é empregado em *screening* inicial para a identificação de compostos com atividade citotóxica. Este teste permite avaliar a viabilidade celular pela atividade das enzimas NADH e NADPH presentes no citoplasma, e da enzima succinato desidrogenase, localizada nas mitocôndrias (van Meerloo et al., 2011). Porém, este teste não discrimina o tipo de mecanismo envolvido na redução da viabilidade celular. Assim, para investigar os mecanismos envolvidos na morte celular, primeiramente foram utilizados critérios morfológicos baseados nas análises da dupla coloração com Hoechst/PI por microscopia de fluorescência. Nos tratamentos realizados nas células RENCA, a FS mostrou-se ser mais eficaz na indução da apoptose, quando comparado ao Sunitinib, através da contagem do números de células apoptóticas, e pelas alterações morfológicas como, a retração citoplasmática e fragmentação da cromatina.

A morte celular representa um processo altamente heterogêneo que pode seguir a ativação de distintas cascatas bioquímicas. Os critérios morfológicos nem sempre são precisos na diferenciação do processo de indução e na distinção das alterações celulares, que possam discriminar o fenótipo de morte celular. Neste contexto, foram

estudadas as modificações celulares, para identificar se a redução da viabilidade celular e as alterações morfológicas induzidas pela FS estão associadas com o processo de morte celular por apoptose.

Em acordo, os resultados obtidos pelo teste de Anexina V/PI apresentaram uma boa correlação com os achados morfológicos. Desta forma, a externalização da fosfatidilserina permite afirmar de forma quantitativa que o aumento da permeabilidade da membrana plasmática detectado pela coloração de Hoechst/PI nas células RENCA, trata-se de um mecanismo de morte celular. Além de demonstrar novamente que a FS apresenta efeitos na indução da apoptose superior ao Sunitinib. As alterações morfológicas das células SK-MEL-28 induzidas pelos tratamentos com FS também foram associadas à morte celular por apoptose. A detecção do aumento de células subdiploides nas análises do ciclo celular, também demonstrou que a FS é capaz de induzir apoptose nas células SK-MEL-28. Ainda que preliminar, os resultados também indicam que a FS é um agente indutor de apoptose com maior potência, quando comparada ao DITC.

A utilização do pan-inibidor de caspases z-VAD-fmk e do inibidor do canal de transição de permeabilidade mitocondrial CsA, tem como finalidade determinar se a FS depende da atividade das caspases na indução da morte celular nas células RENCA. O uso do pan-inibidor z-VAD-fmk revelou que mesmo com o bloqueio das caspases, a FS induziu estímulos de morte celular, capaz de sensibilizar as células e direcioná-las a uma via alternativa de morte celular, chamada de necroapoptose.

Com o pré-tratamento das células RENCA com CsA a liberação do citocromo *c* e de outros fatores apoptogênicos, incluindo o Smac/Diablo, HtrA2/Omi e o fator indutor de apoptose (AIF), que são liberados para o citoplasma como resultado da abertura

dos poros de transição, ou ainda através de um poro proteolipídeo inserido na membrana externa mitocondrial, são todos inibidos (Guo et al., 2012). De maneira independente deste bloqueio, a FS foi capaz de induzir morte celular nas células RENCA impossibilitando a liberação de fatores apoptóticos mitocondriais pela inibição da formação dos poros, mediado pela interrupção da interação da Ciclofilina D (cyp D) com o transportador de nucleotídeos de adenina (ANT), bloqueada pela CsA (Varanyuwatana e Halestrap, 2012).

O processo de morte celular induzido pela FS também foi estudado nas células NSCLC. Como citado acima, a utilização do pan-inibidor de caspases z-VAD-fmk foi utilizado com a finalidade de determinar se a FS depende da atividade das caspases na indução da morte celular. Nas células H460 WT e H460 CrmA a FS induziu apoptose de forma expressiva após 24 horas de tratamento na ausência do z-VAD-fmk, enquanto que, nas células H460 Bcl-2, pré-tratadas com o inibidor, a capacidade de induzir apoptose pela FS foi bloqueada. Porém, as células H460 Bcl-2 foram detectadas em apoptose tardia, mesmo na presença do z-VAD-fmk. A avaliação em torno deste resultado poderia sugerir que o z-VAD-fmk não apresenta uma boa capacidade de inibição das caspases, contudo, o mecanismo pelo qual o z-VAD-fmk bloqueia a ativação das caspases é um processo irreversível. Sendo assim, o esperado nesta circunstância, seria o favorecimento de outros tipos de morte celular como a autofagia, entretanto, o tipo de morte celular identificado nesta condição de tratamento foi à necrose. A justificativa para este fenômeno já descrito para várias linhagens celulares é a presença de uma serina-treonina-quinase RIP1 associada ao domínio de morte, fundamental no processo de necrose (Linkermann et al., 2012). Ainda, estudos em células Jurkat RIP1^{-/-} demonstraram que os indutores de apoptose

TNFR1 e FasL induzem morte celular por necrose (Vandenabeele et al., 2006). Desta forma, os efeitos resultantes do pré-tratamento das células com z-VAD-fmk seria a indução de necrose, porém, a FS induziu morte celular por apoptose nas células H460 WT e H460 Bcl-2, tal fato permite hipotetizar com base nos dados presentes na literatura, que independente da presença da proteína RIP1, a FS induz apoptose nas células H460 WT e Bcl-2, sem promover necrose mesmo na presença do inibidor.

Moléculas que promovam disfunção mitocondrial de forma direta ou indireta como foram observado no tratamento das células tumorais com a FS, desencadeiam o principal evento que antecede na apoptose pela via mitocondrial, a redução do $\Delta\psi$. Este resulta na despolarização da mitocôndria levando ao aumento da permeabilidade da membrana externa (Gu et al., 2011). Este evento, é responsável pela translocação do citocromo *c* para o citoplasma, promovendo à formação de um complexo chamado apoptossomo, que em conjunto com a proteína adaptadora citoplasmática Apaf-1 e o ATP, induzem a auto-clivagem da pró-caspase-9, ativando a forma ativa da caspase-3.

Na maioria dos eventos apoptóticos são requeridos à participação de cisteíno proteases, que são divididas em iniciadores, caspase 8, 9 e 12 e executores caspase 3, 6 e 7, responsáveis pelas alterações morfológicas no núcleo e citoesqueleto, devido à clivagem de proteínas como, a laminina nuclear e a actina (Mashima et al., 1999). Os resultados mostraram que somente nas células RENCA tratadas com FS, ocorreu o aumento da clivagem da caspase-3, que quando comparado ao Sunitinib não foram detectados níveis expressivos de sua ativação. Por outro lado, a presença da clivagem da caspase-8 foi significativamente ativada no tratamento com Sunitinib. Em acordo com o aumento da ativação da caspase-3 induzida pela FS nas células SK-MEL-28

observada neste trabalho, recentemente, demonstramos que a FS é capaz de ativar a caspase-3 também em células de melanoma murino B16F10, assim, esses resultados enfatizam que possivelmente a via intrínseca ou mitocondrial está envolvida no mecanismo antitumoral pró-apoptótico da FS (Ferreira et al., 2012).

As vias que levam à ativação das caspases variam de acordo com o estímulo apoptótico, que podem direcionar as células a distintas ações após o estímulo de morte. A família da proteína Bcl-2 controla e direciona os sinais apoptóticos, da via intrínseca onde a mitocôndria tem uma papel fundamental na apoptose sobre influência das proteínas antiapoptóticas, incluindo a Bcl-2 e Bcl-XL, que impedem a liberação do citocromo *c* das mitocôndrias. Nos diferentes tratamentos das células RENCA com a FS e o Sunitinib e nas células SK-MEL-28 tratadas com DITC, o nível de expressão da proteína Bcl-2 não foi alterado comparada ao controle. Outro fato importante, é que a proteína Bcl-2 não foi substrato de clivagem da caspase que poderia inativar sua atividade antiapoptótica durante a morte celular por apoptose. Assim, podem inferir que os efeitos apoptóticos da FS nas células RENCA e SK-MEL-28 são independentes do nível de expressão da proteína Bcl-2 (Cheng et al., 1997; Belizário et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Nas células RENCA o tratamento com FS e Sunitinib reduziram a expressão da proteína pró-apoptótica Bad, o que pode estar associado com a clivagem desta proteína pelas caspases, resultados que se concluíram as análises da expressão da proteína Bax. Em contraste, a FS aumentou a expressão da proteína Bad nas células SK-MEL-28. A clivagem das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax pela caspase-3 geram a forma truncada da proteína tBad. Ambas as proteínas e fragmentos gerados podem se translocar para a membrana da mitocôndria modificando a permeabilidade

da membrana externa, induzindo a liberação de proteínas pró-apoptóticas (Cheng et al., 2005). Assim, o aumento da ativação da caspase-3 pode contribuir para a morte celular induzida pela FS nas células RENCA e SK-MEL-28. As análises ultraestruturais das células SK-MEL-28 tratadas com FS confirmam que o mecanismo molecular está relacionado a modificações celulares. As modificações como a formação de *blebs* de membrana, picnose, fragmentação nuclear e a presença de mitocôndrias eletrodensas, são as principais modificações ultraestruturais observadas neste estudo, todas consideradas como as principais características morfológicas da apoptose, confirmando que a FS é um agente indutor de apoptose (Zhang et al., 2012).

Diferentes modelos têm sido propostos para explicar como as mitocôndrias liberam os fatores apoptogênicos, porém, uma consequência direta da perda de integridade da membrana mitocondrial interna, é a redução do $\Delta\psi$. A análise morfométrica das mitocôndrias isoladas nas células RENCA e a avaliação do potencial elétrico em células SK-MEL-28 indicaram que o tratamento com FS induziu apoptose, com participação dependente da mitocôndria. A FS induziu mudanças acentuadas nas análises morfométricas das mitocôndrias isoladas realizadas por citometria de fluxo. Essas alterações morfológicas estão relacionadas com a inibição da fusão mitocondrial, abertura e remodelação das cristas mitocondriais, após estímulos apoptóticos, que culminam na liberação do citocromo *c*, AIF, HTrA2/Omi, endonuclease G, OPA1 e o Smac/Diablo (van Gurp et al., 2003). A redução do potencial elétrico mitocondrial nas células SK-MEL-28 tratadas com FS foi associada à diminuição da produção de ROS e RNS. Esta interrupção prejudica o gradiente eletroquímico através da membrana interna, reduzindo o fornecendo de

energia celular em forma de ATP. Como consequência, a atividade metabólica celular diminui drasticamente, reduzindo a produção de ROS e RNS, especialmente ao nível dos complexos da cadeia respiratória I e III, e pela via independente de arginina (Nicolaije et al., 2011).

Os mecanismos subjacentes à ativação da apoptose induzida pela FS nas células H460 foram avaliadas com base na estratégia de tratamento proposta para os tumores de pulmão, devido a falha na via que induz a ativação da caspase-9, quando ocorre algum dano no DNA (Pore et al., 2010). Assim, foi investigando primeiramente se a FS é capaz de recrutar a participação dos receptores TRAILR1 (DR4), e TRAILR2 (DR5). A redução da expressão dos receptores de superfície DR4 e DR5 induzido pela FS podem estar associadas ao seu recrutamento seguido de sua ativação, ou até mesmo, pelo aumento do tráfego intracelular. Todas essas possibilidades estão sugeridas pelas seguintes possibilidades; i) a sensibilidade do tratamento do NSCLC, ao TRAIL, é limitada pelo fato que o tráfego destes receptores está desregulado; ii) pela redução na densidade dos receptores de morte na membrana celular (Steghuis et al., 2010; Barblu e Herbeuval, 2012). O que pode ser sugerido é que a FS forme um complexo com os DR4 e DR5, que representa um mecanismo pelo qual os AFTs são movidos até o citoplasma pela formação de co-agregação com os receptores da família TNF em especial o FasL (Lee et al., 2012).

Os efeitos moleculares seguido da modulação dos receptores DR4 e DR5, associado à indução de apoptose nas células NSCLC induzidos pela FS, foram investigados. De uma forma geral, a via clássica de morte celular que envolve a ativação da caspase-9 no NSCLC está prejudicada, o que torna o tratamento deste tipo tumor resistente a compostos indutores de apoptose (Zhang et al., 2012). A presença dos fragmentos de

19 e 17 KDa nas células H460 WT indicam que a caspase-3 está presente na sua forma ativa, o que contribui para as principais alterações morfológicas da apoptose, que são modificações estruturais em resposta aos processamentos proteolíticos da lamina nuclear, poly-ADP ribose e do citoesqueleto (Leadsham et al., 2010). Nas células H460 WT a FS utiliza a mesma via pelo qual o TRAIL induz apoptose, ativando a via extrínseca iniciada pela ativação da caspase-8. Este mecanismo é deflagrado quando o sinal para a apoptose é irreversível ou insuficiente, assim, a via mitocondrial é recrutada pela ativação da caspase-3 mediada pela clivagem do Bid, uma proteína com o domínio do tipo BH3. A sua translocação para a mitocôndria facilita sua interação com outros membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bak, que formam os poros na membrana externa mitocondrial com a liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como, o citocromo *c* e o Smac/Diablo (Yi et al., 2003). Os resultados da atividade das caspases nas células H460 CrmA tratadas com FS, apontaram um aspecto interessante. Como estas células apresentam um bloqueio na via extrínseca da apoptose, o resultado esperado é que se a FS mediasse apoptose dependente das proteínas da via extrínseca, a apoptose não ocorreria. Entretanto, o aumento da expressão da pró-caspase-3 pode sugerir que a FS utilize vias alternativas de ativação da caspase. O fato que chama a atenção é que a FS induziu apoptose nestas células com aumento da expressão da pró-caspase-8 que pode ser classificada como uma caspase-8-like, fato sustentado, devido ao bloqueio desta cisteína nestas células. Assim, o aumento da expressão da NOXA reforça a hipótese que a FS pode utilizar uma rota alternativa, quando as vias comuns de apoptose forem bloqueadas, que seria a indução da apoptose pela regulação da proteína p53 (Schuler e Green, 2001).

Diversos agentes vêm sendo investigados, devido sua capacidade de inibir a proteína antiapoptótica Bcl-2 ao nível do mRNA ou da proteína. Com base no aspecto molecular das células H460 que superexpressam a proteína Bcl-2, associados aos efeitos apoptóticos e inibição a expressão da proteína Bcl-2 induzidos pela FS, pode ser indicado que este efeito seja um dos mecanismos pleotrópicos exercidos pela FS. Este efeito é um importante aspecto a ser considerado na quimioterapia atual, no qual novas moléculas que apresentam efeitos inibitórios da Bcl-2 podem ser promissoras quando utilizadas contra tumores com alto grau de resistência. Além, da modulação da Bcl-2 a FS demonstrou novamente que a morte celular por apoptose é um mecanismo envolvido na atividade antitumoral. Ainda, o aumento da expressão da pró-caspase-3 e a presença do tBid indicam que a via intrínseca foi recrutada em resposta a ativação da caspase-8 (Orth et. al., 2012).

O controle do ciclo celular compreende a uma série de mecanismos coordenados que controlam a replicação do DNA e divisão celular. A transição entre as fases do ciclo celular é controlada através da mudança na atividade específica das ciclinas dependentes de quinases (CDKs). Como as células tumorais apresentam modificações oncogênicas destas proteínas, sendo essas, essenciais para a proliferação, à inibição seletiva destas vias pode proporcionar benefícios terapêuticos importantes (Bockstaele, 2006). A inibição da CDK4 pela FS nas células H460 Bcl-2 foi um achado importante, abrindo uma nova linha de investigação molecular de atuação da FS sustentada pela redução da expressão da CDK4/6, que é frequentemente alterada em muitos tumores (Dean et al., 2010). Como apresentado neste estudo a FS não modificou o nível de expressão da Ciclina D1, mais reduziu a expressão da CDK4 impedindo a formação do complexo Ciclina D1-CDK4/6, o que

resulta na não fosforilação da proteína retinoblastoma (pRB), inibindo a fosforilação do E2F-mediated transcription of genes. Este é um fator crucial para a síntese de DNA, e sua redução retarda a passagem das células da fase G1 para a S no ciclo celular, um dos mecanismos que poderia inibir a proliferação celular (Natoni et al., 2011).

A CDK9 é uma proteína reguladora chave na transcrição e apresenta um potencial alvo de inibição por novos compostos antitumorais. A CDK9 conhecida como cdc2-quinase com serino/treonina, cujos complexos com as Ciclinas T e do tipo K constituem a ativação do fator de transcrição basal (P-TEFb), conhecido por promover a transcrição e alongamento, por fosforilar o domínio carboxi-terminal da maior subunidade da RNA polimerase II (RNAPII CTD) (Wang e Fischer, 2008). Os resultados que demonstram a redução da expressão da CDK9 pela FS, abri uma nova janela para a interpretação dos efeitos pró-apoptóticos da FS em tumores resistentes, como no caso das células H460 CrmA e H460 Bcl-2. A evidência que a FS induz apoptose mesmo na ausência da ativação das caspases, pode ser justificada pelo fato que, a inibição da CDK9 nas células H460 Bcl-2 e H460 CrmA reduz a expressão de proteínas antiapoptóticas de um modo independente da p53, que se correlaciona mais estreitamente com a inibição da RNAPII CTD (Ser-2) (Debebe et al., 2011).

As alterações morfológicas das células RENCA crescidas em cultura 3D e tratadas com FS mostraram que os tratamentos induziram desorganização dos filamentos de actina e fragmentação nuclear como observado pela microscopia confocal. As alterações no citoesqueleto celular induzidas pela FS podem ser resultantes da inibição da polarização nas fibras de actina, ou ainda pelo aumento da atividade da caspase-3, sendo que a actina é um substrato de clivagem proteolítica destas

proteases (Johnson et al., 2000). Principal componente estrutural das células, o citoesqueleto desempenha um papel importante para a migração celular capacitando a célula a realizar alterações morfológicas como a protrusão da membrana, adesão a matriz extracelular, translocação do corpo celular e retração da membrana, todas estas alterações estruturais que antecedem a migração celular. Essas alterações permitem que as células se adaptem em qualquer microambiente celular, principalmente em sítios metastáticos. Compostos que bloqueiam a organização do citoesqueleto como observado neste trabalho com o uso da FS, apresentam a capacidade de inibir a migração celular resultando na redução da capacidade metastática e proliferativa das células tumorais (Yamazaki et al., 2005).

Os detalhes das modificações estruturais nas células RENCA tratadas com FS foram avaliadas nas células cultivadas e tratadas na matriz 3D pela MEV. Os arranjos estruturais das células não tratadas demonstraram um aspecto diferenciado. As células tumorais do grupo controle formaram uma complexa rede tubular e septada semelhantes aos túbulos renais luminiais. O alto nível de organização morfológica é notável, observa-se a presença de uma estrutura central que se ramifica para túbulos classificados como proximais e distais, que estão interconectados e organizados em subníveis. A detecção da organização das fibras de actina pela microscopia confocal mostraram que as grandes projeções citoplasmáticas nas células do grupo controle, foram responsáveis pela sua capacidade migratória. Em algumas figuras podem ser visualizadas o rompimento de parte da matriz 3D, que é resultante da retração celular e da reorganização da matriz.

Uma das mudanças mais marcantes observadas nas células tratadas foram as saliências na superfície celular chamada de *blebs* observados em estágios iniciais da

apoptose, decorrente da reorganização do citoesqueleto celular e da perda do contato com a matriz 3D. As alterações na membrana plasmática durante a apoptose são principalmente de natureza bioquímica, não envolvendo alterações morfológicas com exceção da perda das microvilosidades com consequente retração citoplasmática, que foi observada nas células tratadas com FS, sendo essas as principais características da apoptose. Essas mudanças na membrana plasmática são responsáveis pela formação dos corpos apoptóticos que formam vesículas lipídicas com produto de degradação nuclear e citoplasmático que *in vivo* são fagocitados pelos macrófagos teciduais (Häcker, 2000; Freitas et al., 2008).

A toxicidade induzida pela quimioterapia clássica é uma das principais causas da mortalidade em pacientes com câncer. Os fármacos denominados de anti-angiogênicos, em combinação com a quimioterapia estão cada vez mais sendo utilizados como linha de frente para a terapia contra tumores resistentes aos tratamentos atuais convencionais (Kiselev et al., 2003). Os efeitos antiproliferativos da FS foram investigados nas células endoteliais HUVEC a fim de determinar se a FS apresenta efeitos anti-angiogênicos, que possam justificar o seu uso em combinação ou na forma de monoterapia contra tumores malignos. Os efeitos inibitórios da FS na proliferação das células endoteliais HUVEC forneceram informações importantes sobre os seus efeitos anti-angiogênicos. Os dados obtidos mostram que FS inibe a proliferação das células HUVEC analisados pelo MTT, bem como, pela incorporação do CFDA SE. Estes resultados demonstram o bloqueio do número de gerações (mitose), indicando que a FS interrompe o processo considerado fundamental na angiogênese, a proliferação celular (Mojzis et al., 2008; Gupta et al., 2010).

A atividade anti-proliferativa induzida pela FS pode ser um mecanismo suficiente para bloquear a formação de novos vasos, que é o passo posterior à degradação da membrana basal de vasos sanguíneos existentes, que ocorre na primeira etapa na angiogênese (Hadjizadeh e Doillon, 2010). Outro importante aspecto em torno deste evento, é que a inibição da proliferação das células endoteliais bloqueia a formação do novo broto capilar (Tortora et al., 2004).

A evidência que a FS pode apresentar atividade anti-angiogênica foi comprovada pelos resultados do ensaio de formação do tubo, demonstrando que a FS afeta outra etapa importante na angiogênese, à organização das células endoteliais em tubos capilares e *loops* vasculares que levam a formação de ramificações e extensões tubulares, com deposição de membrana basal (Pircher et al., 2011). Estes efeitos sobre a organização tubular foram evidenciados também pela MEV, mostrando que a FS inibe a formação dos túbulos através de um efeito inibitório destas células e não devido a uma possível toxicidade celular. Ainda, de forma relevante, a FS não apenas inibiu a proliferação das células HUVEC mais também a migração destas, como apresentado no ensaio da ferida, que é o segundo passo na estruturação da angiogênese, no qual as células endoteliais migram em direção ao estímulo angiogênico (Lammert e Axnick, 2012). A importância deste efeito é altamente relevante, quando comparamos que a FS apresentou os mesmos efeitos dos inibidores como o BAY11-7082, que inibe o NF- κ B induzindo o acúmulo citoplasmático do I κ B (peptídeo inibidor de quinase), bloqueando a translocação nuclear e atividade transcricional do NF- κ B e o Roscovitine, múltiplo inibidor das CDKs, que inibe a progressão no ciclo celular (Steffan et al., 1995; Huber e O'Day, 2012).

O processo de neoangiogênese é essencial para o crescimento de tumores sólidos e sua sobrevivência. A redução da expressão do receptor de superfície (VEGF -A), induzido pela FS, que é ativado em resposta ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é um dos mais potentes e altamente específicos fatores angiogênicos, pode representar um mecanismo pelo qual a FS inibe a angiogênese. A redução do VEGF induzido pela FS pode bloquear a atividade de fatores de crescimento sobre a ativação dos dois principais receptores para o VEGF, o *c-fms-like tyrosine kinase* (Flt-1) e o *fetal liver kinase 1* (Flk-1), (referido como KDR), que são em grande parte expressos exclusivamente em células endoteliais (Park et al., 1994; Pennock e Kazlauskas, 2012).

O controle proliferativo do desenvolvimento vascular no processo da angiogênese tumoral tem sido alvo de novas abordagens terapêuticas para muitos distúrbios relacionados com a angiogênese. A avaliação da FS quanto a sua capacidade inibitória nas células HUVEC no ciclo celular foram estudadas. Os tratamentos com as combinações; FS + BAY e/ou FS + ROSC e Sunitinib induzem acúmulo de células na fase G0/G1. Porém, quando comparado aos efeitos do VEGF pode ser sugerido que os inibidores não modificaram a distribuição das células na fase G0/G1 do ciclo celular, e sim que este acúmulo pode estar associado a um mecanismo inibitório. Assim, o acúmulo das células na fase G2/M induzidas pela FS novamente chama atenção para o efeito inibitório sobre a CDKs demonstrado primeiramente nas células NSCLC. Este mecanismo inibitório é sustentado pelo fato de que o ciclo celular é regulado pela ativação de específicas CDKs como; CDK4/6 e 9 que foram inibidas pela FS nas células NSCLC que controlam a transição entre as diferentes fases do ciclo.

Os atuais direcionamentos para a pesquisa de novos agentes antitumorais têm incidido sobre a busca de novas estratégias para controlar o crescimento celular e a inibição da formação das metástases. Uma das estratégias atuais utilizadas para o tratamento do carcinoma renal humano (CRH) é o emprego de agentes que são capazes de inibir a angiogênese tumoral. O Sunitinib tem sido amplamente usado clinicamente pela sua atividade inibitória sobre o VEGF e os inibidores do *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Ele também exerce outras funções ainda desconhecidas, responsáveis pelas atividades citotóxicas, dentre elas a indução da morte celular por apoptose (Powles et al., 2011).

Neste trabalho os efeitos terapêuticos da FS foram avaliados em modelos de tumores experimentais, afim de, validar a utilização da FS como um agente antitumoral. A eficácia da FS foi primeiramente avaliada em tumores sólidos, e no modelo de metástase induzida. Previamente, demonstramos que a FS é altamente ativa comparada ao quimioterápico Taxol no tratamento do melanoma murino B16F10, sendo que os principais efeitos observados foram à capacidade de redução do volume tumoral, inibição da formação de metástases e aumento da taxa de sobrevida global (Ferreira et al., 2011)

A avaliação da regressão dos tumores sólidos dorsais demonstrou que a FS em ambas as concentrações, exibe efeito inibitório superior à utilização do Sunitinib, nas concentrações avaliadas. Fato que foi previamente demonstrado no modelo de melanoma murino B16F10, o qual a FS apresentou efeitos terapêuticos na concentração-dependente. Na concentração de tratamento de 7 mg/Kg a FS induziu o aumento do número de células mortas com redução do volume tumoral, enquanto que o tratamento com a concentração de 14 mg/Kg, houve um estímulo na produção

de uma estrutura fibrilar de matriz extracelular delimitando o crescimento do tumoral (Ferreira et al., 2011).

O experimento de metástase pulmonar e a avaliação da taxa de sobrevivência global dos animais mostraram como a FS pode fornecer uma terapia altamente eficaz contra a disseminação metastática de tumores renais. Estes resultados são significativos por duas razões; i) o tratamento com FS comparado ao Sunitinib foi significativamente eficaz na redução dos nódulos metastáticos pulmonares, como observado pelas análises histopatológicas; ii) tendo em vista que o multi-inibidor de quinase, Sunitinib é o atual agente em uso de maior resposta frente ao tratamento de estágios avançados de tumores renais (Adams & Leggas, 2007).

As metástases principalmente pulmonares são um dos maiores problemas no tratamento do carcinoma renal humano (CRH), na qual um terço dos pacientes tem doença metastática detectável no momento do diagnóstico. Tratamentos que induzam regressão de metástases pulmonares ou estabilização da doença, independente do tempo podem justificar a sua utilização clínica em pacientes que apresente prognóstico desfavorável (Huland et al., 1997).

Após o término do período experimental dos tratamentos com os animais portadores dos tumores sólidos, os grupos de animais que receberam Sunitinib apresentaram expressiva redução na estimativa de sobrevivência global, porém, sem redução da massa corpórea. Os tratamentos realizados com a FS proporcionaram aumento no período de sobrevivência global, com estimativa superior a 60%, mesmo após a descontinuidade do tratamento, o que pode sugerir a inexistência de doença residual mínima. Atualmente, os pesquisadores e clínicos repensam sobre o objetivo primário do tratamento do carcinoma renal metastático que seria focado para novas estratégias e

terapias onde o objetivo seria o aumento da taxa de sobrevida global. A taxa de sobrevida global em geral é de 5 anos com sobrevida média para os pacientes com metástases de 10 meses e a longo prazo inferior a 2% (Merimsky et al., 2004). Mesmo com os tratamentos imunoterápicos e a nova era de tratamento alvo com emprego dos inibidores multiquinases (Sunitinib) e os inibidores da via mTOR (Everolimus), a resposta terapêutica ao carcinoma metastático continua decepcionante com base nos recentes dados da literatura (Di Lorenzo et al., 2011). Assim, os resultados dos ensaios pré-clínicos, projeta a FS como uma molécula candidata a um possível ensaio clínico para o tratamento de tumores metastáticos renais.

As análises hematológicas do número total de leucócitos e eritrócitos circulantes foram parâmetros importantes na avaliação de possíveis toxicidades medulares induzidos pelos compostos. As análises quantitativas revelaram que tanto o tratamento com a FS e o Sunitinib não induzem mielossupressão ou distúrbios hemolíticos que são principais causas de efeitos adversos de muitos agentes quimioterápicos. Esses resultados fornecem importantes evidências principalmente quanto à avaliação da FS, pois o principal problema enfrentado com o uso clínico de AFTs, como no caso do Miltefosina, é o seu efeito hemolítico, que limita sua utilização. Ainda foi possível observar que os animais tratados com Sunitinib responderam aos tratamentos, aumentando a cinética de produção de eritrócitos detectados pelo número de reticulócitos. Essas alterações podem ser decorrentes da atividade hemolítica do Sunitinib, porém, os animais apresentaram uma resposta medular ativa na restauração da eritropoiese (Papazafiri et al., 2005).

A quantificação do número de plaquetas pode auxiliar na identificação da disseminação metastática devido à interação que existe entre as plaquetas e as células tumorais. As células tumorais produzem fatores pró-coagulantes, como o fator tecidual que é responsável por aumentar a produção de plaquetas. Após a ativação das plaquetas pela trombina, ocorre a liberação de substâncias bioativas, incluindo glicoproteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator de von willebrand FvW), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), as citocinas (IL-1), metabólitos do ácido araquidônico [tromboxano A₂, 12 (S)-HETE, aminas], e fatores de coagulação (como o fator V). Esses fatores podem modular a expressão da P-selectina ativando a integrina α IIb β 3, auxiliando a interação das células tumorais com as plaquetas que potencializa a atividade metastática (De Cicco, 2004; Gale & Gordon, 2001).

Neste trabalho todos os animais apresentaram aumento no número de plaquetas circulantes o que é evidente em um tumor que apresenta como principal característica de progressão, a formação de metástases pulmonares. O tratamento com FS em ambas as concentrações reduziu o número de plaquetas circulantes que pode estar associado com a probabilidade da redução de metástases. As análises bioquímicas das transaminases hepáticas foram utilizadas para avaliar o comprometimento hepático e as alterações do metabolismo primário e intermediário provocadas pelo crescimento tumoral e induzidas pelo tratamento com a FS e o Sunitinib. A atividade da AST/ALT são os principais marcadores bioquímicos na monitorização das alterações metabólicas e nas lesões hepáticas de origem aguda ou crônica. Os animais tratados com FS e Sunitinib não apresentaram elevação dos níveis séricos da enzima, comparado ao grupo controle. A enzima DHL catalisa o

último passo da glicólise, onde o piruvato é reduzido a lactato pela permuta de elétrons doados pelo 3-fosfogliceraldeído (Asanuma et al., 2009). O aumento da dosagem sérica da enzima DHL nos animais tratados com o Sunitinib pode estar relacionado com a doença recidiva, que estão em acordo com a evolução tumoral dos animais, após a interrupção do tratamento.

Os efeitos terapêuticos da FS também foram avaliados no modelo do melanoma humano em animais BALB/c ^{nu/nu}, e seus efeitos foram comparados ao quimioterápico DITC. A avaliação do volume tumoral demonstra que os tratamentos com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg da FS exibiram uma potente e superior atividade antitumoral, quando comparado ao tratamento com 50 mg/Kg DITC. A FS impediu a progressão e reduziu o tempo de duplicação da massa tumoral. O emprego do micro PET/CT com a utilização do [¹⁸F] FDG captado pelas células em alta atividade metabólica, em especial as tumorais, demonstram que os tumores tratados com a FS, em ambas as concentrações, apresentaram baixa atividade metabólica refletindo em redução captação do [¹⁸F] FDG. Este mecanismo está correlacionado com a redução do volume tumoral e a diminuição da densidade celular no microambiente tumoral, evidenciando que a FS apresenta efeitos antitumorais superiores ao tratamento com a DITC. Nas análises histopatológicas e citoquímicas dos tumores tratados com FS e DITC, foi possível observar extensas regiões de necrose compostas por fibras de colágeno comprovando a formação de fibrose. A redução de fibras elásticas identificadas pela coloração de Verhoeff indica que os tratamentos com FS e DITC reduziram a vascularização intratumoral, diminuindo o aporte de oxigênio, em acordo com a extensiva área de necrose observada pela coloração de H&E.

A proteína *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), é um membro da família das proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPKs), constitutivamente ativada no melanoma maligno. Sua expressão é regulada pelo gene BRAF, relatado como o principal gene que constitui aproximadamente 60% das lesões moleculares desta via. A superexpressão da ERK1/2 é responsável pelo fenótipo de resistência a apoptose e pela proliferação descontrolada das células de melanoma resultando na constante ativação da via RAS/RAF/MAPK. De forma simultânea, a superexpressão da proteína p38 através da ativação da via da proteína NF-κB, induz migração e proliferação das células de melanoma (Mirmohammadsadegh et al.,2007). Desta forma, os efeitos inibitórios do crescimento tumoral observados no tratamento com a FS, podem estar associados com a redução da expressão da proteína ERK1/2 e p38. Nosso argumento é suportado pelo fato de que a redução do crescimento tumoral e a indução da apoptose foram efeitos resultantes do tratamento com FS, em resposta a diminuição da expressão da proteína ERK1/2 e p38 reduzindo a sinalização da via RAS/RAF/MAPK e do NF-κB, respectivamente. Devido às dificuldades de encontrar novas moléculas potencialmente efetoras com satisfatória capacidade de inibição das isoformas da RAS, novos compostos que modulem a ativação constitutiva da via RAS/RAF/MAPK apresentam-se como candidatas promissoras para o tratamento do melanoma.

O efeito terapêutico da FS foi avaliado no modelo de camundongos transgênicos portadores de LPA, utilizando como modelo de estudo as células resultantes do gene de fusão PML/RARA. Este modelo é amplamente utilizado para elaboração de novas estratégias terapêuticas e o desenvolvimento de novas drogas alvo. Representa um subtipo específico de leucemia mielóide aguda invariavelmente com recorrentes

translocações cromossômicas envolvendo o receptor do ácido retinóico α (RAR α) locus no cromossomo (Santana et al., 2006).

Como se trata de uma neoplasia hematológica, a progressão da doença e os efeitos terapêuticos foram avaliados pela imunofenotipagem e análise morfológica das células do sangue periférico. A FS em ambas as concentrações de tratamento de 40 e 80 mg/Kg, assim como, a DA 10 mg/Kg e o ATRA 1mg/Kg reduziram o número de leucócitos totais e de blastos circulantes. Um importante efeito promovido pela FS foi à capacidade de induzir remissão na fase avançada da doença, efeito este desejável para um composto no tratamento de neoplasias hematológicas. Este efeito foi demonstrado pelo predomínio de células maduras como, os neutrófilos e linfócitos circulantes, sendo indicativo de restauração da hematopoiese normal. Após o 15º dia de tratamento os animais foram eutanasiados e as células da medula óssea foram avaliadas. As análises quantitativas mostraram que a FS apresenta efeitos terapêuticos iguais ao tratamento com DA e ATRA, reduzindo o número total de células no compartimento medular com redução dos clones malignos leucêmicos.

A imunofenotipagem das células obtidas do parênquima esplênico, hepático e medular foi determinada por citometria de fluxo, para identificar os estágios de diferenciação das células leucêmicas infiltradas. A redução das células CD117+ infiltradas no baço, induzido somente pelo tratamento com a FS, estabelece a boa relação da biodistribuição da FS para diferentes órgãos. Em relação aos efeitos terapêuticos da FS, ATRA e DA contra as células CD117 infiltradas no fígado, indicam que os compostos apresentam efeitos inibitórios sobre os clones malignos CD117+. Ainda, a redução da expressão do CD117 que é codificado pelo oncogene c-kit pelos tratamentos, resulta na progressão da diferenciação normal das linhagens

mieloides (Li et al., 2012). A redução das células Gr-1+ no baço e fígado em resposta aos tratamentos com FS e ATRA indicam indução da diferenciação com redução da colonização e migração de clones malignos para o fígado.

Entre os tratamentos, a concentração de 40 mg/Kg da FS foi altamente eficaz em reduzir o número de células CD117+ e Gr-1+, até mesmo em comparação ao ATRA e a DA. Estes resultados indicam que a FS, apresenta efeito terapêutico independente na localização dos clones malignos, e de forma superior ao tratamento com o ATRA e a DA.

A expressão dos marcadores CD34 e CD117 na t(15;17) da LMA compõem o painel de fenotipagem, como marcador de diagnóstico e prognóstico em pacientes com LMA. A diminuição da co-expressão assíncrona do CD34/CD117 está relacionada com a remissão completa da doença e melhor resposta ao tratamento (Macedo et al., 1995). Desta forma, estes dois marcadores em conjunto traçam o perfil de diagnóstico de LMA e a detecção de doença residual mínima. A redução das células com o fenótipo CD34+ na medula óssea dos animais tratados com ATRA 1 mg/Kg e da FS 40 mg/Kg demonstram que estes tratamentos inibem o crescimento, diferenciação e a expansão clonal das células malignas tanto das células CD34+ como as células CD117+ infiltradas na medula óssea. Ainda, estas células apresentam apenas uma pequena parcela de expressão em camundongos adultos normais. Apesar de o ATRA induzir a maturação dos promielócitos na medula óssea, os seus efeitos depende do fenótipo celular, o qual células CD34 têm retardado os efeitos do ATRA, sugerindo que estas células persistam, após terapia com ATRA. As análises por imunofenotipagem realizadas com a utilização dos marcadores CD117 e o Gr-1 foram determinantes para a identificação da capacidade da FS em eliminar os

clones leucêmicos infiltrados na medula óssea, baço e fígado. A redução de células CD117+/Gr-1+, assim como, o aumento da apoptose destas células infiltradas nos parênquimas analisados, indicam que a FS, quando comparado ao ATRA e a DA, apresenta um importante efeito terapêutico contra a LMA. Ainda a seletividade farmacodinâmica da FS nos clones neoplásicos infiltrados no baço pode ser devido a eventos farmacocinéticos ainda não esclarecidos. Os efeitos terapêuticos da FS apresentado neste trabalho são equivalentes ao do ATRA, um potente agente diferenciador de granulócitos, que apresenta altas taxas de remissão completa, mesmo em casos resistentes a quimioterapia (Freitas et al. 2008). Os achados morfológicos também contribuem para essa afirmação, pois os achados morfológicos e moleculares indicam que a FS assim, como o ATRA promove a maturação terminal na linhagem granulocítica. Ainda de forma superior ao ATRA e a DA, o tratamento com a FS foi à indução de morte celular por apoptose e a eliminação de clones malignos. Diante destes fatos, a FS é considerada um futuro agente a ser utilizado no tratamento da LMA e em outros tipos de combinações terapêuticas.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

A FS exibiu efeitos citotóxicos seletivos para as células de melanoma humano SK-MEL-28, carcinoma renal murino RENCA e para as células do carcinoma de pulmão de não pequenas células NSCLC. As modificações ultraestruturais, redução do potencial elétrico, aumento da ativação da caspases 3 e 8, aumento da expressão da proteína Bax e redução da CDK9 e CDK4/6, sugerem que a FS apresenta efeitos antitumorais pela indução de apoptose e efeitos antiproliferativos pela inibição das quinases;

A FS apresenta efeitos sobre a angiogênese pela redução da expressão dos receptores VEGF-A, inibindo a proliferação e migração levando ao acúmulo das células na fase G2/M do ciclo celular, que resulta em redução na inibição da tubulogênese *in vitro*;

Os estudos *in vivo* no modelo de melanoma e do carcinoma renal murino demonstraram que a FS apresenta efeitos terapêuticos superiores ao tratamento com a DITC e Sunitinib, como demonstrado pela redução do crescimento dos tumores dorsais e inibição da formação de metástases pulmonares. A inibição da ativação das proteínas ERK1/2 e p38 indicam que a FS apresenta efeitos antitumorais pela regulação das proteínas envolvidas na via MAPKs no melanoma;

A FS foi efetiva em reduzir o número de blastos periféricos e infiltrados na medula óssea, baço e fígado dos animais que receberam transplantes com as células leucêmicas PML/RARA. O tratamento com a FS foi superior a DA e o ATRA, quanto à redução dos clones malignos que expressão o CD34+, bem como, das células que expressam os marcadores CD117+/Gr-1+. Ainda, a FS foi capaz de induzir morte celular por apoptose nos blastos infiltrados nos parênquimas estudados.

REFERÊNCIA

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams VR, Leggas M. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin Ther.* 2007;29(7):1338-53.

Andreesen R, Modolell M, Weltzien HU, Eibl H, Common HH, Löhr GW, Munder PG. Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res.* 1978; 38(11 Pt 1):3894-9.

Al-asfour, Sandra Vasconcellos. Estudo de equilíbrios químicos com 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato para fins biológicos. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-10122008-163040/>>. Acesso em: 2011-11-03.

Asanuma N, Yoshizawa K, Hino T. Properties and role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the control of fermentation pattern and growth in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Curr Microbiol.* 2009;58(4):283-7.

Barblu L, Herbeuval JP. Three-dimensional microscopy characterization of death receptor 5 expression by over-activated human primary CD4 T cells and apoptosis. *PLoS One.* 2012;7(3):32874.

Bagley RG, Kurtzberg L, Rouleau C, Yao M, Teicher BA. Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(6):1537-46.

Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(8):1011-24.

Berkovic D. Cytotoxic etherphospholipid analogues. *Gen Pharmacol.* 1998;31(4):511-7.

Bockstaele L, Coulonval K, Kookken H, Paternot S, Roger PP. Regulation of CDK4. *Cell Div.* 2006;8(1):25.

Busto JV, Del Canto-Jañez E, Goñi FM, 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.* 2008;1(1-4):89-94.

Cheng An-Chin, Huang Tzou-Chi, Laic Ching-Shu, Pan Min-Hsiung. Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *European Journal of Pharmacology.* 2005;509(1):1-10.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 1997; 278(5345):1966-8.

Dean JL, Thangavel C, McClendon AK, Reed CA, Knudsen ES. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene*. 2010; 29(28):4018-32

Debebe Z, Ammosova T, Breuer D, Lovejoy DB, Kalinowski DS, Kumar K, Jerebtsova M, Ray P, Kashanchi F, Gordeuk VR, Richardson DR, Nekhai S. Iron chelators of the di-2-pyridylketone thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series inhibit HIV-1 transcription: identification of novel cellular targets--iron, cyclin-dependent kinase (CDK) 2, and CDK9. *Mol Pharmacol*. 2011;79(1):185-96.

Di Lorenzo G, Casciano R, Malangone E, Buonerba C, Sherman S, Willet J, Wang X, Liu Z, De Placido S. An adjusted indirect comparison of everolimus and sorafenib therapy in sunitinib-refractory metastatic renal cell carcinoma patients using repeated matched samples. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(10):1491-7.

De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(3):187-96.

Dummer R, Krasovec M, Röger J, Sindermann H, Burg G. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. *J Am Acad Dermatol*. 1993;29(6):963-70.

Eibl H, Arnold D, Weltzien HU, Westphal O. On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1967;709:226-30

Ferreira AK, Meneguelo R, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. 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*. 2011;3(3):053-059.

Ferreira AK, Meneguelo R, Marques FL, Radin A, Filho OM, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. 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*. 2012;66(7):541-8.

Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Mendonça Filho O, Chierice GO, Maria DA. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. *Anticancer Res*. 2012;32(1):95-104.

Freitas RA, Silva dos Santos GA, Gimenes Teixeira HL, Scheucher PS, Lucena-Araujo AR, Lima AS, Abreu e Lima RS, Garcia AB, Jordão AA Jr, Falcão RP, Vannucchi H, Rego EM. Apoptosis induction by (+)alpha-tocopheryl succinate in the absence or presence of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in NB4, NB4-R2 and primary APL cells. *Leuk Res.* 2009;33(7):958-63.

Freitas VM, Rangel M, Bisson LF, Jaeger RG, Machado-Santelli GM. J The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. *Cell Physiol.* 2008;216(3):583-94.

Fujiwara, K. et al. Cytokinetic and morphologic differences in ovarian cancer cells treated with ET-18-OCH₃ and the DNA-interacting agent, etoposide. *Anticancer Res.* 1997;17(3):2159-67.

Gajate C, et al. Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer.* 2000;86(2):208-18.

Gale AJ, Gordon SG. Update on tumor cell procoagulant factors. *Acta Haematol.* 2001;106(1-2):25-32.

Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* 2010;62(6):414-28.

Gu X, Yao Y, Cheng R, Zhang Y, Dai Z, Wan G, Yang Z, Cai W, Gao G, Yang X. Plasminogen K5 activates mitochondrial apoptosis pathway in endothelial cells by regulating Bak and Bcl-x(L) subcellular distribution. *Apoptosis.* 2011;16:846-55.

Guo L, Sun YL, Wang AH, Xu CE, Zhang MY. Effect of polysaccharides extract of rhizoma *atractylodis macrocephalae* on thymus, spleen and cardiac indexes, caspase-3 activity ratio, Smac/DIABLO and HtrA2/Omi protein and mRNA expression levels in aged rats. *Mol Biol Rep.* 2012;39(10):9285-90.

Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(3):405-34.

Hac-Wydro K, Dynarowicz-Łatka P. Effect of edelfosine on tumor and normal cells model membranes--a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;76(1):366-9.

Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):5-17.

Hadjizadeh A, Doillon CJ. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4(7):524-31.

Huber RJ, O'Day DH. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits kinase activity, cell proliferation, multicellular development, and Cdk5 nuclear translocation in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biochem*. 2012;113(3):868-76.

Huland E, Heinzer H, Mir TS, Huland H. Inhaled interleukin-2 therapy in pulmonary metastatic renal cell carcinoma: six years of experience. *Cancer J Sci Am*. 1997; 3 Suppl 1:S98-105.

Jiménez-López JM, et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis*. 2010;9(33).

Johnson VL, Ko SC, Holmstrom TH, Eriksson JE, Chow SC. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *J Cell Sci*. 2000;113(17):2941-53.

Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L. tropica* strains. *Korean J Parasitol*. 2011;49(1):17-23.

Kiselev SM, Lutsenko SV, Severin SE, Severin ES. Tumor angiogenesis inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 2003;68(5):497-513.

Lammert E, Axnick J. Vascular lumen formation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):006619

Leadsham JE, Kotiadis VN, Tarrant DJ, Gourlay CW. Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Cell Death Differ*. 2010;17(5):754-62.

Lee BS, Kang SU, Hwang HS, Kim YS, Sung ES, Shin YS, Lim YC, Kim CH. An agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in head and neck cancer cells through mitochondrial ROS generation. *Cancer Lett*. 2012;322(1):45-57.

Li YF, Deng Z, Din BH, Zhu JB. Effect of homoharringtonine on bone marrow CD34 + CD117 + cells in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(5):934-9.

Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S. Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2012;81(8):751-61.

Macedo A, Orfao A, Vidriales MB et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Annals of Hematology*. 1995;70:189-194.

Mashima T, Naito M, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene*. 1999;18(15): 2423-30.

Merimsky O, Gez E, Weitzen R, Nehushtan H, Rubinov R, Hayat H, Peretz T, Ben-Shahar M, Biran H, Katsenelson R, Mermershtein V, Loven D, Karminsky N, Neumann A, Matcejevsky D, Inbar M. Targeting pulmonary metastases of renal cell carcinoma by inhalation of interleukin-2. *Ann Oncol*. 2004;15(4):610-2.

Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, de Frias M, Roué G, Gil J, Colomer D, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ.. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(7):2046-2054.

Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res*. 2008;57(4):259-65.

Munder PG, Modolell M. Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1973;45(1):133-5

Mirmohammadsadegh A, Mota R, Gustrau A, Hassan M, Nambiar S, Marini A, Bojar H, Tannapfel A, Hengge UR. ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2207-15.

Natoni A, Murillo LS, Kliszczak AE, Catherwood MA, Montagnoli A, Samali A, O'Dwyer M, Santocanale C. Mechanisms of action of a dual Cdc7/Cdk9 kinase inhibitor against quiescent and proliferating CLL cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(9):1624-34.

Ngwenya BZ, Fiavey NP, Mogashoa MM. Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids. *Eur J Cancer*. 1992; 28A(10):1637-42.

Nicolaije C, Koedam M, van Leeuwen JP. Decreased oxygen tension lowers reactive oxygen species and apoptosis and inhibits osteoblast matrix mineralization through changes in early osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2012 Apr;227(4):1309-18.

Orth JD, Loewer A, Lahav G, Mitchison TJ. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Mol Biol Cell*. 2012;23(4):567-76.

Outhouse EL. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. *Biochem J.* 1936; 30 (2): 197-201.

_____. Further studies of amino-ethyl phosphoric ester-a compound apparently specific to malignant tumours. *Biochem J.* 1937;31(9):1459-63.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994;25646–25654

Papazafiri P, Avlonitis N, Angelou P, Calogeropoulou T, Koufaki M, Scoulica E, Fragiadaki I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;56 (3):261-70.

Pennock S, Kazlauskas A. VEGF-A competitively inhibits PDGF-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses. *Mol Cell Biol.* 2012;32(10):1955-66.

Pircher A, Hilbe W, Heidegger I, Dreves J, Tichelli A, Medinger M. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):7077-99.

Pore MM, Hiltermann TJ, Krut FA. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Lett.* 2010.

Powles T, Chowdhury S, Jones R, Mantle M, Nathan P, Bex A, Lim L, Hutson T. Sunitinib and other targeted therapies for renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011; 1;104(5):741-5.

Santana BA, Pintão MC, Abreu e Lima RS, Scheucher PS, Santos GA, Garcia AB, Falcão RP, Rego EM. Asynchronous expression of myeloid antigens in leukemic cells in a PML/RARalpha transgenic mouse model. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(5):615-20.

Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(6):684-8.

Sprong H, Van Der Sluijs P, Van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(7):504-13.

Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV. Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. *J Immunol.* 1995;155(10):4685-91

Stegehuis JH, Wilt LH, Vries EG, Groen HJ, Jong S, Kruyt FA. TRAIL receptor targeting therapies for non-small cell lung cancer: current status and perspectives. *Drug Resist Updat*. 2010;13(1-2):2-15.

Taguchi H, Armarego WL. Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. *Med Res Rev*. 1998;18(1):43-89.

Tortora G, Melisi D, Ciardiello F. Angiogenesis: a target for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(1):11-26.

Van Gurp M, Festjens N, Van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):487-97.

Van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* 2008;14(21): 2061-74.

Van der Luit AH, Vink SR, Klarenbeek JB, Perrissoud D, Solary E, Verheij M, van Blitterswijk WJ. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(8): 2337-45.

Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE*. 2006;1(358):44.

Van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des*. 2008;14(21): 2061-74.

Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):112-24.

van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45.

Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012;12(1):120-5.

Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*. 2005;96(7):379-86.

Yi X, Yin XM, Dong Z. Inhibition of Bid-induced apoptosis by Bcl-2. tBid insertion, Bax translocation, and Bax/Bak oligomerization suppressed. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16992-9.

Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Increased generation of lipid-derived and ascorbate free radicals by L1210 cells exposed to the ether lipid edelfosine. *Cancer Res.* 1993;53(4):711-3.

Wang S, Fischer PM. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(6):302-13.

Zhang S, Li G, Ma X, Wang Y, Liu G, Feng L, Zhao Y, Zhang G, Wu Y, Ye X, Qin B, Lu J. Norcantharidin enhances ABT-737-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by transcriptional repression of Mcl-1. *Cell Signal.* 2012; 24:1803-9.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science.* 2009;325(5938):332-6.