THAIS DE OLIVEIRA CONCEIÇÃO

Caracterização das propriedades antitumorais da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina em células de leucemia humana K-562

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

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo
2017

THAIS DE OLIVEIRA CONCEIÇÃO

Caracterização das propriedades antitumorais da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina em células de leucemia humana K-562

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

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto
Maria

São Paulo

2017

Dedico, não apenas este trabalho, mas todas as minhas conquistas aos meus pais *Ilza* e *Walter*, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos, que me ensinaram a nunca desistir e lutar pelos meus sonhos. Sem vocês eu nada seria.

Muito obrigada!

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.

A meu querido Pietro Trevisanello Puglia, pacientemente sempre me dando conselhos, força, coragem, incentivo e por me ensinar a ser uma pessoa melhor com todo amor. Mais uma etapa concluída, de muitas que virão, Palê amo-te!

Ao meu orientar e amigo, Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, pela confiança depositada em meu trabalho, pela sua disponibilidade irrestrita, pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço imensamente aos ensinamentos que levo deste grande período no laboratório, pelo aprendizado e crescimento pessoal, ético e moral.

A minha querida amiga Manuela Garcia Laveli da Silva, aprendi com você o valor da verdadeira amizade. Sei que foi difícil me aguentar durante todo este tempo, mais isso foi apenas o começo, obrigada Manulis!

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, por todo carinho e companheirismo nestes últimos anos, por todas as conversas jogadas foras em horas de descontração, agradeço pelo apoio e pela amizade de vocês Arthur, Aline, Daniel, Rosely, Angelina, Larissa e Antenor.

Então,
vamos às aventuras –
“porque explicações sempre levam um tempo medonho”.

[Lewis Carroll](#)

(ALICE NO PAÍS DAS MARAVILHAS)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1- INTRODUÇÃO	12
1.1.Leucemia	12
1.2.Leucemia mielóide crônica.....	13
1.3.Modelo de células leucêmicas humanas K-562 Lucena (MDR+).....	15
1.4.Fosfolipídeos antineoplásicos	15
1.5.Fosfoetanolamina sintética (Pho-s)	17
1.6.Formulação lipossomal-DODAC.....	18
2- OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos específicos	21
3- MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Formulação lipossomal DODAC/Pho-s	22
3.1.1. Formulação da Pho-s	22
3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC	22
3.1.3. Preparação das dispersões sonicadas	22
3.1.4. Preparação das amostras de DODAC/Pho-s	23
3.1.5. Medidas de absorção óptica.....	23
3.2. Cultura Celular	23
3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método Sulforodamina B	24
3.4. Determinação da viabilidade celular.....	24
3.5. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	25
3.6. Avaliação de atividade apoptótica-Anexia V/PI	25
3.7. Avaliação da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo.....	26
3.8. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	27
3.9. Análises estatísticas.....	27

4- RESULTADOS	28
4.1. Determinação da atividade citotóxica e da IC50% em células de leucemia K-562 e K-562 Lucena (MDR+)	28
4.1.1. Avaliação da viabilidade celular com o tratamento da Pho-s	28
4.1.2. Avaliação da viabilidade celular do tratamento com DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s	32
4.2. Determinação da viabilidade celular após o tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC em células leucêmicas humanas	35
4.3. Análises das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	42
4.4. Avaliação da apoptose das células tumorais por Anexina V/PI por citometria de fluxo	58
4.5. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo	62
4.6. Análises dos marcadores/receptores de membrana e nucleares por citometria de fluxo	66
5- Discussão	96
6- Conclusão	110
REFERENCIAS	111

RESUMO

Conceição TO. *Caracterização das propriedades antitumorais da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina em células de leucemia humana K-562* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Fosfoetanolamina sintética (Pho-s) é um monoéster análogo à fosfoetanolamina da membrana celular fosforilada artificialmente, com propriedades antiinflamatórias e apoptóticas para vários tipos de células tumorais humanas e murinas. Neste projeto foram avaliados os efeitos antitumorais *in vitro* da Pho-s e da formulação lipossomal DODAC/Pho-s na linhagem tumoral de leucemia mielóide crônica humana (K-562), em comparação ao modelo resistente a múltiplas drogas K-562 Lucena (MDR+). Os efeitos de citotoxicidade da Pho-s na linhagem tumoral K-562 e K-562 Lucena (MDR+) foram avaliados pela viabilidade celular utilizando o teste da Sulforodamina B, e os valores da IC50% obtidos foram de 43.1 mM e 145.9 mM, respectivamente após 24 horas de tratamento. O tratamento com o carreador DODAC vazio nas células K-562 e K-562 Lucena (MDR+) a IC50% foi de 0,0003mM e 0,008mM respectivamente, e com o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s a IC50% obtida respectivamente de, 0,56 mM e 0,31 mM. A viabilidade celular foi determinada a exclusão pelo azul de tripan 0,2%, em sistema automatizado Vi-Cell e foram significativas as diminuições da viabilidade celular em comparação ao grupo controle não tratado nas diversas concentrações e em diferentes períodos de tempo de tratamento. As alterações nas distribuições nas populações celulares nas fases do ciclo celular determinadas por citometria de fluxo mostraram aumento do DNA fragmentado (Sub/G1) em 12 e 24 horas de tratamento. Atividade apoptótica das células tumorais pela expressão da Anexina V/PI, no estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose foram quantificadas em citometria de fluxo, o tratamento com Pho-s, quando comparado ao grupo controle K-562 (40 e 80 mM) e K-562 Lucena (MDR+) (146 e 292 mM) ocorreu aumento

significativo do número de células apoptóticas e em menor percentual o número de células necróticas. O tratamento com a Pho-s em célula leucêmica K-562 e K-562 Lucena (MDR+) tratadas, respectivamente com 40 e 80 mM e 146 e 292 mM mostraram que independente da expressão do fenótipo de resistência há uma redução significativa no potencial elétrico mitocondrial, analisado pelo o ensaio da rodamina-123. Os marcadores de controle e progressão do ciclo celular e da apoptose, mostraram efeitos moduladores da Pho-s dependentes da p53 na expressão da moléculas pró-apoptóticas. Esse conjunto de informações demonstrou os efeitos apoptóticos da Pho-s e da formulação lipossomal nas células tumorais independentemente do perfil molecular de resistência (MDR+), o que possibilita dizer que esse composto possui significativo potencial terapêutico nesse grupo de leucemias.

Descritores: leucemia mielóide crônica; células de resistência a multidrogas; fosfoetanolamina sintética; formulação lipossomal; apoptose; ciclo celular.

ABSTRACT

Conceição TO. Characterization of the antitumor properties of synthetic phosphoethanolamine and the liposomal formulation DODAC/phosphoethanolamine in human K-562 leukemia cells [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Synthetic phosphoethanolamine (Pho-s) is a monoester analogous to the phosphoethanolamine which composes the membrane of an artificially phosphorylated cell, with anti-inflammatory and apoptotic properties for various types of human and murine tumor cells. In this project, we evaluated *in vitro* antitumor effects of Pho-s and the DODAC/Pho-s liposomal formulation in the human chronic myeloid leukemia (K-562) tumor line in comparison with the K-562 Lucena (MDR+). The effects of cytotoxicity of Pho-s on K-562 and K-562 Lucena (MDR +) tumor cells lines were evaluated by cell viability using the Sulforhodamine B test, and the IC₅₀% values obtained were 43.1 mM and 145.9 mM after 24 hours of treatment, respectively. Treatment with the empty DODAC carrier on the K-562 and K-562 Lucena (MDR+) at IC₅₀% cells was 0.0003 mM and 0.008 mM, and the treatment with the DODAC/Pho-s liposomal formulation obtained results of 0.56 mM and 0.31 mM, respectively. Cell viability was determined by 0.2% trypan blue exclusion in automated Vi-Cell system and the decreases in cell viability were significant in comparison to the untreated control group at various concentrations and different treatment time periods. Alterations in the distributions of cell populations in the cell cycle phases determined by flow cytometry showed increment of fragmented DNA (Sub/G1) in 12 and 24 hours of treatment. Apoptotic activity of tumor cells by the expression of Annexin V/PI, in the early apoptosis, late apoptosis phase and necrosis stage were quantified in flow cytometry, the treatment with Pho-s, when compared to the control group K-562 (40 and 80 mM) and K-562 Lucena (MDR +) (146 and 292 mM) demonstrated that there was a significant increase in the number of apoptotic cells and, in a lower percentage, the number of necrotic cells. Treatments with Pho-s in leukemic cell K-56 with 40 and 80 mM and in K-562 Lucena (MDR+) with 146 and 292 mM showed that independent of the expression of the resistance phenotype there is a significant

reduction in the electrical potential of the mitochondrial membrane, analyzed with the rhodamine-123 assay. Control and progression markers of cell cycle and apoptosis showed p53-dependent modulating effects on the expression of pro-apoptotic molecules. This set of information demonstrated the apoptotic effects of Pho-s and liposomal formulation on tumor cells independently of the molecular resistance profile (MDR+), which makes it possible to say that this compound has significant therapeutic potential in this group of leukemias.

Descriptors: chronic myeloid leukemia; multidrug resistance cells; synthetic phosphoethanolamine; liposomal formulation; apoptosis; cell cycle.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia

O câncer em geral provoca cerca de 7 milhões de mortes no mundo, as estimativas da Sociedade Americana do Câncer e da União Internacional Contra o Câncer indicam que em 2030 são esperados 27 milhões de novos casos, com 17 milhões de óbitos e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer, o que torna essa doença responsável por 12,5% das mortes mundiais (AGGARWAL et al., 2009). Estima-se que um terço dessas mortes poderia ter sido evitado com mais prevenção, detecção precoce e acesso aos tratamentos existentes.

No Brasil, o INCA estima cerca de 596 mil casos novos de câncer para 2016/2017, entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 30.800, o qual deve estar relacionado ao aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização. O número de casos novos de leucemia, estimado para o ano de 2017 é de 5.540 casos em homens e de 4.530 em mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a sexta mais frequente na região Norte. Nas regiões Nordeste e Sudeste ocupam a nona posição. Nas regiões Sul e Centro-Oeste ocupam a 10ª e a 11ª posição respectivamente. Para as mulheres é a sétima mais frequente na região Norte e a oitava na região Sul. Na região Nordeste ocupa a 10ª posição. É a 11ª mais frequente na região Centro-Oeste e na região Sudeste ocupa a 12ª posição, não havendo dados epidemiológicos para LMC especificamente (INCA, 2017), os países em desenvolvimento serão os mais afetados.

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas decorrentes da proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas (ISLAM, 1992; SWERDLOW et al., 2008). As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (stem cell), a qual forma o clone leucêmico. A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea sob o aspecto biológico e morfológico. Em

relação ao estado de maturação celular, as leucemias podem ser classificadas em agudas e crônicas (MELO, et al., 2003). As leucemias agudas, que compreendem a leucemia mielóide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), são progressivas e agressivas caracterizadas por rápida proliferação de células imaturas. Isso ocorre porque a célula que origina o clone neoplásico é um precursor cuja alteração mutacional causa perda da capacidade maturativa, com consequente acúmulo de blastos na medula óssea e no sangue periférico. Nas leucemias crônicas, leucemia mielóide crônica (LMC) e a leucemia linfocítica crônica (LLC), as mutações permitem a manutenção da capacidade de diferenciação e maturação celular, havendo um característico aumento no número de células maduras na medula óssea e no sangue periférico. A progressão é lenta, porém seguida de fase acelerada e pode se transformar, tardiamente, em leucemia aguda (PUI, 2008; OLIVEIRA & NETO, 2004).

1.2 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é um câncer hematológico caracterizado pela presença do oncogene *BCR-ABL*, cromossomo *Philadelphia* ou translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 [t (9,22)], que une o protoncogene C-ABL presente no cromossomo 9 à região BCR do cromossomo 22, em uma célula-tronco hematopoiética (BENNOUR et al., 2016). O gene de fusão formado, BCR-ABL, causa uma expressão desregulada da atividade tirosina quinase do ABL (PACHECO et al., 2009). Esta oncoproteína interage com vias de sinalização que levam à célula ao crescimento e ativam programas antiapoptóticos que prolongam a sobrevivência celular na ausência de fatores de crescimento (CLARK et al., 2002). Sendo capaz de ativar NFκB, Ras e Rac, PI3 quinase e induzir expressão de c-Myc e Bcl-2 (GOLDMAN, 2008). A ativação de vários desses mecanismos pelo BCR/ABL é necessária para a transformação das células hematopoiéticas pelo oncogene (SOKAL et al., 2002) e a progressão da doença é resultado de aquisições espontâneas de uma série de mudanças moleculares que são acompanhadas de novas mudanças citogenéticas (GOLDMAN, 2008).

Figura 01 – O cromossomo Philadelphia, o resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Mais especificamente, a região de cluster ponto de interrupção (BCR) do cromossomo 22 é fundida com uma parte do gene Abelson (ABL) no cromossomo 9. O resultante domínio BCR-ABL genética agora localizado dentro cromossomo 22 e codifica para uma mutação na tirosina quinase, também conhecido como BCR-ABL. Fonte: <http://www.mayoclinic.com/>

A atividade tirosina quinase, encontrada na porção ABL, é uma das principais propriedades da proteína quimérica BCR-ABL. A atividade tirosina quinase está diretamente associada ao seu potencial de transformação oncogênica (GOLDMAN, 2008).

Neste projeto foram avaliados os efeitos da Pho-s e de sua formulação no modelo de células de leucemia humana K-562. A linhagem celular K-562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com leucemia mielóide crônica (LMC) apresentando o cromossomo *Philadelphia* (translocação cromossômica t(9;22)). Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade, se diferenciando quando submetida a determinados

agentes químicos em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal, ou em células megacariocíticas com aumento de tamanho e ploidia, além de marcadores específicos (TSIFTSOGLU et al, 2003). Esta plasticidade faz da linhagem celular K-562 um excelente modelo experimental na avaliação da “terapia da diferenciação celular”, com agentes indutores de diferenciação celular.

1.3 Modelo de células leucêmicas humanas K-562 Lucena (MDR+)

O principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer tem sido a resistência múltipla aos fármacos, nesse estudo usamos um modelo experimental que apresenta esse fenótipo em comparação, as células K-562 Lucena (MDR+), inicialmente caracterizada por expressar o produto do gene de resistência à múltiplas drogas (MDR+), a P-glicoproteína, no entanto, esse processo de resistência é multifatorial (RUMJANEK et al, 2000).

As células tumorais K-562 Lucena (MDR+) foram obtidas e caracterizadas, pela exposição e aumento gradual de doses de Alcalóides da Vinca a Vincristina (VCR), a partir de 3 nM e em intervalos de doses a cada duas semanas com 3 nM, até que as células se tornassem resistentes a 60 nM de vincristina, sendo nomenclatura definida como K-562 Lucena (MDR+). A linhagem tumoral, K-562 Lucena (MDR+), super expressão a glicoproteína-P e tem sua resistência revertida por verapamil, a quimiosensibilizantes, trifluoperazina e ciclosporinas A, D e G, além disso, demonstrou-se que o azul de metileno foi capaz de reverter a resistência parcialmente nesta linhagem celular (RUMJANEK et al., 1994).

1.4 Fosfolipídeos antineoplásicos

As membranas biológicas são compostas por três componentes fundamentais: os fosfolipídeos (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolipídeos 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 várias funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma grande variedade de processos catalíticos e atuando como doadores para a síntese de macromoléculas. Além de ativamente influenciar na comunicação entre o meio intra e extracelular pela transdução de sinal celular e a interação lipídeo/proteína (VAN MEER et al., 2008).

Munder e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que entre alguns análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquilados, apresenta efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais (MUNDER et al., 1973; ANDREENSEN et al., 1978). Atualmente, estes éteres derivados da lisofosfatidilcolina pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade citostática. Contudo, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os alquilfosfolípeos antitumorais (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-LOPES et al., 2010).

Os lipídeos antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes subtipos: o primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolípeos, chamados de éter lipídios antitumorais ou análogos AFTs. Sua estrutura contém ligações éter no glicerol dos fosfolípeos, o principal protótipo da classe é o 1-O-octadecil-2-Ometil-rac-glicero-3 fosfocolina (ET-18-OCH₃; Edelfosina). O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina, que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formada por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (BUSTO et al., 2008; MOLLINEDO et al., 2010;).

O mecanismo de ação dos AFTs é direcionado a membrana celular, em especial das células tumorais. Embora seu mecanismo não esteja totalmente compreendido, foi demonstrado que seus efeitos são dependentes da incorporação na membrana celular, devido à sua longa cadeia apolar de hidrocarbonetos que facilita sua inserção na membrana celular (NGWENYA et al., 1992). Uma das primeiras hipóteses para explicar a seletividade dos AFTs em células tumorais foi levantada com base que, as células tumorais não apresentavam a enzima alquil-mono-glicero oxidase, que é uma oxidase de

função mista que hidrolisa o átomo do carbono α da cadeia de carbonos do éter gliceril, envolvida no metabolismo do éter lipídico (TAGUCHI; ARMAREGO, 1998).

1.5 Fosfoetanolamina sintética (Pho-s)

Fosfoetanolamina (Pho-s) foi isolada em 1936 por Outhouse, de tumores malignos bovinos, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza. Após seus trabalhos, outros pesquisadores encontraram a Pho-s em intestinos de ratos normais e em tecido cerebrais de bovinos (AWAPARA et al., 1950; FOLSCH et al., 1959). Por estarem presentes em tecidos, surgiu um especial interesse científico nos composto fosforilados, com objetivo de se elucidar os diferentes comportamentos químicos das fosfoproteínas e outras classes de organofosforados (FOLSCH et al., 1959).

Os fosfolipídeos derivados a partir da etanolamina são componentes estruturais essenciais das membranas celulares e desempenham papéis regulatórios na divisão celular, sinalização, ativação, autofagia e fagocitose (BAKOVIC et al., 2007). A fosfoetanolamina primária (PEA) é um substrato para diversos fosfolipídeos das membranas celulares, especialmente fosfatidilcolina. (ELLISON; BEAL; MARTIN, 1987).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética (Pho-s). Tendo se mostrado eficaz na redução da expressão pró-apoptótica Bad/Bax em células de melanoma murino B16F10, o que leva ao aumento da atividade da caspase-3 fosforilada, desencadeando a apoptose e bloqueando o ciclo celular na fase de síntese ou na fase G2/M, dependendo da concentração do fármaco. O tratamento *in vivo* de camundongos portadores de melanoma B16F10 com a Pho-s resultou na inibição de crescimento tumoral, aumento da sobrevivência e redução de metástases (FERREIRA et al., 2012). Entretanto, quando testada em fibroblastos e células endoteliais humanas normais, a Pho-s não foi capaz de alterar a viabilidade ou induzir citotoxicidade (FERREIRA et al., 2011). A Pho-s também resultou na inibição da formação de ascite neoplásica e evitou aumento dos níveis séricos de marcadores bioquímicos, pois a análise

bioquímica dos camundongos BALB/c não tratados mostraram aumento na dosagem de transaminases hepáticas. Pode-se sugerir que a inibição da ascite neoplásica pela Pho-s impede insuficiência hepática (FERREIRA et al., 2012). Estudos recentes têm mostrado que a fosfoetanolamina sintética (Pho-s) tem um grande potencial para induzir a citotoxicidade em células tumorais com IC 50% de 1.69ug/ml, sem afetar a capacidade proliferativa de células normais (MENEGUELO, 2007), sendo altamente citotóxica para uma grande variedade de células tumorais, incluindo o melanoma humano SK-MEL-28 e MEWO e o melanoma murino B16-F10, capaz de induzir a apoptose (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b).

1.6 Formulação lipossomal - DODAC

Os lipossomas são vesículas lipídicas possuindo uma fase aquosa que é totalmente cercada por uma ou mais lamelas (bicamadas de fosfolídeos), constituindo, ao lado de aerossóis, hidrogéis, micro/nanopartículas poliméricas, um dos sistemas mais importantes para encapsulação e liberação sustentada de fármacos *in vivo*. Eles podem encapsular ingredientes hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos. Drogas hidrofílicas têm tendência a permanecer no compartimento central aquoso e drogas hidrofóbicas/anfifílicas encontram-se inseridas na bicamada lipídica. As drogas lipofílicas permanecem mais tempo encapsuladas devido ao alto particionamento na fase membranar (SHARATA, 1996). Para uso humano, os sistemas lipossomais têm sido empregados para reduzir a toxicidade clínica sistêmica de fármacos aumentando, assim, a eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos, antineoplásicos e outros (TORCHILIN, 2005).

Recentemente, nosso grupo tem desenvolvido diversos experimentos associando a Pho-s com as vesículas de lipossomas DODAC (dioctadecildimetilamônio). Os resultados são satisfatórios quanto à eficácia da formulação lipossomal, pois apesar da eficácia comprovada utilizando o composto Pho-s, o tratamento antitumoral tem sido maximizado com a utilização de lipossomas. Estes carreadores baseados em sistemas de entrega de drogas têm como objetivo atingir as células tumorais com maior eficiência e especificidade, além de diminuir os efeitos colaterais, uma vez encapsulados,

os fármacos são liberados lentamente e o seu tempo de vida no plasma é maior, fato esse que desta forma tem apresentado melhor eficácia em modelos animais. (SHARMA et al., 1997).

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

O sal cloreto dioctadecildimetilamônio (DODAC) é obtido por cromatografia de troca iônica a partir do sal brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) em resina Dowex 21K, na forma de cloreto e recristalizado para a retirada de impurezas. O brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) tem sido utilizado na formulação de drogas hidrofóbicas (VIEIRA et al., 2006). Os anfifílicos derivados de sais de amônio quaternário, como o DODAB e o DODAC, quando dispersos em água, tendem a se associarem, formando grandes agregados que podem assumir estruturas de bicamadas fechadas (vesículas) e com sua superfície carregada positivamente. As propriedades de organização de moléculas anfifílicas em águas são determinadas por diferentes fatores do sistema (OLIVEIRA, 2008).

As vesículas encapsuladas com DODAC em nosso laboratório, por ultrasonicação foram caracterizadas por métodos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a análise das características morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e mostraram que as vesículas formadas apresentaram aspecto esferóide e repulsão entre elas. A interação entre o DODAC e a Pho-s ocorre devido à hidratação do contra íon cloreto, possibilitando a liberação do sítio polar da cadeia para uma possível interação eletrostática com o grupo fosfato da Pho-s. A formulação com anfifílicos catiônicos DODAC demonstrou

eficiência em carrear a Pho-s, tendo em vista que os valores de IC50% para todas as linhagens são significativamente menores (LUNA et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos antitumorais na proliferação, indução de apoptose e aspectos morfológicos do tipo de morte celular em linhagem tumoral de leucemia mielóide crônica humana K-562 e K-562 Lucena (MDR+), tratadas com a fosfoetanolamina sintética (Pho-s) e sua formulação lipossomal DODAC/Pho-s e DODAC vazio.

2.1. Objetivos Específicos

Em todos os experimentos foram utilizadas as seguintes condições experimentais de tratamento: I - Grupo Tratado – fosfoetanolamina sintética, II – DODAC/Pho-s, III - DODAC vazio, IV - Grupo Controle – veículo/meio, foram avaliadas as seguintes metodologias:

- Determinação da atividade citotóxica (IC50%) pelo ensaio colorimétrico sulforodamina B;
- Determinação da viabilidade celular;
- Análise das fases do ciclo celular das células tumorais por citometria de fluxo;
- Avaliação da atividade apoptótica das células tumorais pela marcação com Anexina V/PI por citometria de fluxo;
- Avaliação do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo;
- Avaliação da expressão dos marcadores celulares por citometria de fluxo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Formulação lipossomal DODAC/Pho-s

3.1.1. Formulação da Pho-s

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

3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC

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

3.1.3. Preparação das dispersões sonicadas

Após a preparação das vesículas, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução para o início do processo de sonicação. Esse processo foi realizado em um recipiente cilíndrico de 15 mL de volume e 2,5 cm de diâmetro, utilizando-se do ultrassom Virsonic (Virtis Company Inc., Nova Iorque, Estados Unidos) 500 cm ponta de 11 mm, a 30% da potência máxima em 15 ciclos por min, com 30 segundos de intervalo entre cada ciclo. Durante a sonicação, as amostras foram mantidas à aproximadamente 60 °C. Após o procedimento acima, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm em 24 °C, durante 1 hora

para que fossem retirados os resíduos de titânio provenientes da ponta do sonificador.

3.1.4. Preparação das amostras de DODAC/Pho-s

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

3.1.5. Medidas de absorção óptica

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

3.2 Cultura Celular

Foram utilizadas as linhagens tumorais de leucemia humana: K-562 originária do *American Type Culture Collection* (ATCC), tendo o respectivo código CCL-243TM, e K-562 Lucena (MDR+) cedida pela Prof.^a. Dr.^a. Vivian Rumjanek (Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ) mantida e estocada no banco de células sob responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Laboratório Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi

determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.3 Determinação da atividade citotóxica pelo método Sulforodamina B (SRB)

As células tumorais foram incubadas em placas de 96 orifícios à concentração 10^5 células/mL e tratadas com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio em diversas concentrações, como grupo controle foi utilizado o meio de cultura, veículo para a diluição da solução estoque da Pho-s. Após 24 horas de tratamento foram adicionados 50µL de ácido tricloroacético (TCA) gelado 50% (m/v) e mantida a 4°C por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas e centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, por cinco vezes com água destilada para remover o sobrenadante. Após secagem, foi adicionado em cada poço 100µl de solução de SRB 0,2% (m/v) em 1% ácido acético mantendo a placa por 10 minutos à temperatura ambiente. O SRB foi removido, as células foram lavadas (cinco vezes) com solução 1% de ácido acético e a placa centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. Após secagem, foram adicionados 100µL de tampão (Tris base pH=10,5) em cada poço para posterior leitura da absorbância no comprimento de onda de 550nm.

3.4 Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular, as células foram submetidas aos tratamentos com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, nos períodos de 12 e 24 horas, removidas das placas, transferidas para tubos estéreis de centrifugação para a contagem celular. Os tubos de 15 mL contendo células em suspensão foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o “pellet” foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Em seguida, foram realizadas as análises automatizadas da viabilidade celular (Vi-Cell™ XR - Analyzer; Beckman Coulter Inc., Fullerton, Califórnia, EUA). O aparelho realizou um ensaio de exclusão automatizado pelo método de azul de tripan 0,2% (células com a membrana plasmática comprometida permitem a entrada do azul de tripan e são identificadas coradas de azul pelo analisador), fornecendo a porcentagem da viabilidade celular.

3.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

As células foram submetidas ao tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, nos períodos de 12 e 24 horas. As células dos grupos tratadas e controle foram recolhidas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o “pellet” foi ressuspensão em solução de álcool 70° e álcool RNase e armazenado no freezer -20°C por 24 horas. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 200 µL de tampão Fac’s, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo MUSE em intensidade de fluorescência FL-2 e os histogramas adquiridos pelo programa MUSE e analisados no programa ModFit .

3.6 Avaliação da atividade apoptótica – Anexina V/PI

As células apoptóticas foram determinadas quantitativamente utilizando o Kit FITC-Anexina V, que detecta as células com os resíduos de fosfatidilserina expostos na superfície celular. As células necróticas são determinadas utilizando o fluorocromo iodeto de propídio (PI), que penetra nas células cuja membrana esteja rompida. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do iodeto de propídeo; portanto, apresentam baixa fluorescência. As células tumorais após 24 horas do tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio. Os controles foram lavados 2 vezes em PBS a 4°C, resuspensas em 100 µL de PBS e incubadas por 30 minutos com 1µg de anexina V-FITC diluído em tampão e 18 µg/mL de solução de iodeto de propídio. A leitura da quantidade da expressão de Anexina V (apoptose) e do PI (necrose) foi realizada em citômetro de fluxo - MUSE em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2 de acordo com cada anticorpo. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

3.7 Avaliação da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo

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

Marcadores	Função	Fabricante
Caspase 3 ativa	Via intrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Caspase 8 ativa	Via extrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Citocromo-c	Indutor de apoptose	Abcam ®
Bax	Promotor da apoptose	Abcam ®
Bad	Promove a morte celular	Abcam ®
Bcl-2	Inibidor da apoptose	Abcam ®
p 53	Supressor tumoral	Abcam ®
p 21	Regulação do ciclo celular	Abcam ®
p 27	Regulação do ciclo celular	Abcam ®
Ciclina D1	Progressão do ciclo celular	Abcam ®

3.8 Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorecendo verde. Alterações ao nível da integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da rodamina-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON, 1980). As amostras das células tumorais dos grupos tratados com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, por 24 horas, foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionados 200µl de tampão Fac's Flow e 10 µl de Rh-123 (5 mg/mL⁻¹ diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% CO₂ a 37°C no escuro por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 200 µL de tampão Fac's Flow. A leitura e análise da marcação da Rh-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo MUSE em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa MUSE.

3.9 Análises estatísticas

Os valores numéricos foram expressos em média ± desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA) e de comparações múltiplas Tukey-Kramer foram realizadas para identificar as diferenças estatísticas entre as medidas dos grupos estudados. Os gráficos foram obtidos através dos Prism versão 4.0, ModFi 3.2 e WinMDI 2.8, utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Os dados foram considerados significantes quando o valor de p foi *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da atividade citotóxica e da IC50% em células de leucemia K-562 e K-562 Lucena (MDR+)

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

As células de leucemia humana K-562 e K-562 Lucena (MDR+) foram incubadas com a Pho-s nas concentrações de 10 a 100 mM e 10 a 160 mM, respectivamente, no tempo de 24 horas, em placas de 96 poços.

Após o tratamento, nas células de leucemia humana K-562 foram observados aspectos morfológicos de formação de debri celular, a partir da concentração de 40 mM, com a obtenção da IC50% no valor de 43,1mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9761$ (Figura 02).

Figura 2: Aspectos morfológicos das células de leucemia humana K-562 após 24 horas de tratamento com Pho-s na concentração de 40 mM. Observa-se na figura A células tumorais agrupadas do grupo controle, semelhantes à cachos de uva, e na figura B células tumorais picnóticas, debri celular após o tratamento com Pho-s.

Figura 3: Gráfico de determinação da citotoxicidade em células de leucemia humana K-562 pelo método sulforodamina B. Média $\pm$ DP da viabilidade das células K-562 após 24 horas de tratamento com Pho-s (10 – 100mM); Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores de DO versus concentração e os valores normalizados em escala logarítmica.

Com o tratamento com a Pho-s, após 24 horas, nas células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), mostraram aspectos morfológicos de citotoxicidade, com células picnóticas e formação de grande quantidade de debri celular, a partir da concentração de 120 mM Pho-s, com a obtenção da IC50% no valor de 145,9 mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,8914$ (Figura 04).

Figura 4: Aspectos morfológicos das células de leucemia humana K-562 Lucena (MDR+), após 24 horas de tratamento com Pho-s na concentração de 120 mM. Observa-se na figura A células tumorais agrupadas, semelhantes á cachos de uva, e na figura B células tumorais picnóticas, e debri celular após o tratamento com Pho-s.

Figura 5: Gráfico da determinação da citotoxicidade em células de leucemia humana K-562 Lucena (MDR+), pelo método sulforodamina B. Média $\pm$ DP da viabilidade das células K-562 Lucena (MDR+) após 24 horas de tratamento com Pho-s (10 – 160 mM); Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores de DO versus concentração e os valores normalizados em escala logarítmica.

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

As células de leucemia humana K-562 e K-562 Lucena (MDR+) foram incubadas com o DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s nas concentrações de 0.005, 0.01, 0.15, 0.3, 0.6, 1.0, 1.3, 1.6, 2.0 mM no tempo de 24 horas de tratamento.

Com o tratamento DODAC vazio em célula leucêmica humana K-562 foi observado que o debris celular aumentou significativamente, a partir da concentração de 0,3 mM, com a obtenção da IC50% no valor de 0,0003mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0.6296$ (Figura 6A). Contudo, com o tratamento da formulação lipossomal DODAC/Pho-s observou debris celular a partir da concentração de 0,3 mM, com a obtenção da IC50% no valor de 0,008mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,7886$ (Figura 6B).

Figura 6: Gráfico da determinação da citotoxicidade em células de leucemia humana K-562 pelo método sulforodamina B. Média $\pm$ DP da viabilidade das células K-562 após 24 horas de tratamento com DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B); Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores de DO versus concentração e os valores normalizados em escala logarítmica.

Com o tratamento em célula leucêmica humana K-562 Lucena (MDR+), com DODAC vazias as células, a partir da concentração de 0,3mM, com a obtenção da IC50% no valor de 0,56mM, com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,6013$ (Figura 7A). Contudo, com o tratamento de DODAC/Pho-s as células, a partir da concentração de 0,3mM, com a obtenção da IC50% no valor de 0,31mM, com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,8708$ (Figura 7B).

Figura 7: Gráfico da determinação da citotoxicidade em células de leucemia humana K-562 Lucena (MDR+) pelo método sulforodamina B. Média $\pm$ DP da viabilidade das células K-562 após 24 horas de tratamento com DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B); Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores de DO versus concentração e os valores normalizados em escala logarítmica.

4.2. Determinação da viabilidade celular após o tratamento como Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC em células leucêmicas humanas

A viabilidade celular foi determinada por exclusão pelo azul de tripan 0,2% pelo sistema Vi-Cell™ XR - Analyzer; Beckman Coulter Inc., Fullerton, Califórnia, EUA. A concentração utilizada em todas as condições experimentais foi obtida da concentração inibitória IC50% e em associação a Pho-s DODAC/Pho-s e DODAC vazio, no período de 12 e 24 horas. Foram significativas as diminuições da viabilidade celular em comparação ao grupo controle não tratado nas diversas concentrações e em diferentes períodos de tempo de tratamento.

Figura 8: Gráfico da determinação da viabilidade celular (Vi-Cell), em células leucêmicas K-562, tratadas com a Pho-s, após 12 (A) e 24 horas (B). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Figura 9: Gráfico da determinação da viabilidade celular, em células leucêmicas K-562, tratadas com a DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B), após 12 horas. Grau de significância estatísticas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Figura 10: Gráfico da determinação da viabilidade celular, em células leucêmicas K-562, tratadas com a DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B), após 24 horas. Grau de significância estatísticas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Figura 11: Gráfico da determinação da viabilidade celular, em células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com a Pho-s, após 12 (A) e 24 horas (B). Grau de significância estatísticas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. (ns = não significativo)

Figura 12: Gráfico da determinação da viabilidade celular, em células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B), após 12 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Figura 13: Gráfico da determinação da viabilidade celular, em células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com DODAC (A) e DODAC/Pho-s (B), após 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

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

A Pho-s foi testada para avaliar a sua capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de leucemias humanas K-562 e K-562 Lucena(MDR+) foram tratadas com a Pho-s nas concentrações de 40 e 80 mM, 146 e 292 mM, respectivamente no período de 12 e 24 horas. Estas concentrações foram escolhidas a partir do cálculo da IC50% nos diferentes tempos. As porcentagens de células K-562 e K-562 Lucena (MDR+) nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas após os tratamentos.

Nas células de leucemia humana K-562 com tratamento de 12 horas com a Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, as fases do ciclo celular sofreram alterações quando comparado ao grupo controle (Figura 14 A – G), sendo a fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto a fase Sub/G1 aumentou, representando as células sub-diplóides com DNA fragmentados.

Figura 14: Histogramas e gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de leucemia humana K-562 dos grupos controle (A) e tratados com 12 horas (B = Pho-s 40mM), (C = Pho-s 80mM), (D = DODAC/Pho-s 0,3mM), (E = DODAC/Pho-s 2,0mM), (F = DODAC 0,3mM), (G = DODAC 2,0mM); Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Em células de leucemia humana K-562 Lucena (MDR+) com o tratamento de 12 horas com a Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações quando comparado ao grupo controle, (Figura 15 A – G) ocorreu diminuição na fase G0/G1 e aumento na fase Sub/G1 (DNA/fragmentado).

Figura 15: Histogramas e gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de leucemia Lucena (MDR+) dos grupos controle (A) e tratados com 12 horas (B = Pho-s 146mM), (C = Pho-s 292mM), (D = DODAC/Pho-s 0,3mM), (E = DODAC/Pho-s 2,0mM), (F = DODAC 0,3mM), (G = DODAC 2,0mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Em células de leucemia humana K-562 o tratamento de 24 horas com a Pho-s, formulação lipossomal DODAC/Pho-s e DODAC vazio, as fases do ciclo celular sofreram alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 16 A – G), também observamos uma diminuição na fase G0/G1 e aumento da população das células com DNA fragmentado.

Figura 16: Histogramas e gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de leucemia K-562 dos grupos controle (A) e tratados com 24 horas (B = Pho-s 40mM), (C = Pho-s 80mM), (D = DODAC/Pho-s 0,3mM), (E = DODAC/Pho-s 2,0mM), (F = DODAC 0,3mM), (G = DODAC 2,0mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

Em células de leucemia humana K-562 Lucena (MDR+) com o tratamento de 24 horas com a Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC vazio, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações quando comparado ao grupo controle (Figura 17 A – G). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto a fase Sub/G1 aumentou.

Figura 17: Histogramas e gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de leucemia Lucena (MDR+) dos grupos controle (A) e tratados com 24 horas (B = Pho-s 146mM), (C = Pho-s 292mM), (D = DODAC/Pho-s 0,3mM), (E = DODAC/Pho-s 2,0mM), (F = DODAC 0,3mM), (G = DODAC 2,0mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

4.4 Avaliação da apoptose das células tumorais por Anexina V/PI por citometria de fluxo

A finalidade desta análise foi determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por sua habilidade de se ligar a Anexina V e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolípido com atividade anticoagulante vascular que é encontrada, normalmente na face citosólica das membranas celulares. A utilidade da Anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva por fosfolípidos negativamente carregados. As células leucêmicas humanas K-562 foram tratadas com a Pho-s por um período de 24 horas nas concentrações de 40 e 80 mM. Ocorreu aumento significativamente do número de células mortas por apoptose tardia e inicial, e em menor percentual diminuição do número de células necróticas (Figura 18).

Figura 18: Gráfico da determinação das relações da apoptose inicial/tardia e necrose das células leucêmicas K-562, tratadas com a Pho-s 40 e 80mM após 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

As células K-562 foram tratadas com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s por 24 horas, nas concentrações 0,3 e 2,0 mM. A porcentagem das células viáveis diminuiu significativamente em todas as concentrações. Além disso, também foi observado aumento significativo da apoptose inicial e tardia, e na necrose, sendo observado no tratamento DODAC/Pho-s 2,0 Mm um aumento significativo da necrose (Figura 19).

Figura 19: Gráfico da determinação das relações da apoptose inicial/tardia e necrose das células leucêmicas K-562, tratadas com a DODAC e DODAC/Pho-s, após 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

As células leucêmicas humanas K-562 Lucena (MDR+) foram tratadas com a Pho-s por um período de 24 horas nas concentrações de 146 e 292 mM. Ocorreu aumento significativamente do número de células mortas por apoptose tardia e apoptose inicial, e em menor percentual, a diminuição do número de células necróticas (Figura 20).

Figura 20: Gráfico de determinação das relações da apoptose inicial/tardia e necrose das células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com a Pho-s 146 e 292mM após 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

As células K-562 Lucena (MDR+) foram tratadas com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s por 24 horas, nas concentrações 0,3 e 2,0 mM. A porcentagem das células viáveis diminuiu significativamente em todas as concentrações. Além disso, também foi observado aumento significativo da apoptose inicial e tardia, e na necrose, sendo observado no tratamento DODAC/Pho-s 2,0 mM um aumento da necrose (Figura 21).

Figura 21: Gráfico de determinação das relações da apoptose inicial/tardia e necrose das células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com a DODAC e DODAC/Pho-s, após 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. (ns = não significativo)

4.5 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo

Para a análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi utilizada o ensaio da rodamina 123. Alguns corantes fluorescentes, tais como a rodamina 123, possibilitam a avaliação do $\Delta\Psi_m$ das células, sendo fluorocromo catiônico que possui a capacidade de transpor a membrana mitocondrial, usando como força eletrostática o gradiente negativo da organela, e incorporar-se em seu interior, emitindo alta fluorescência em células viáveis. Por outro lado, em células em apoptose, especificamente pela via intrínseca mitocondrial, ocorrem alterações do potencial transmembrânico, ocorrendo efluxo da rodamina 123 da mitocôndria, acarretando numa emissão menor de fluorescência.

As células de leucemia K-562 que foram tratadas com Pho-s 40 e 80mM, por um período de 24 horas, mostraram que o tratamento diminui significativamente o potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 22).

Figura 22: Gráfico da avaliação do potencial elétrico mitocondrial das células leucêmicas humanas K-562, tratadas com Pho-s nas concentrações 40 e 80 mM por 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

A avaliação do potencial elétrico mitocondrial em células de leucemia K-562 tratadas com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s diminuiu quando comparada ao grupo controle (Figura 23).

Figura 23: Gráfico da avaliação do potencial elétrico mitocondrial das células leucêmicas humanas K-562, tratadas com DODAC vazio e DODAC/Pho-s nas concentrações 0,3 e 2,0 mM por 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

As células de leucemia K-562 Lucena (MDR+) que foram tratadas com Pho-s 146 e 292 mM, por um período de 24 horas, mostraram que independente da expressão do fenótipo de resistência há uma redução significativa no potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 24).

Figura 24: Gráfico da avaliação do potencial elétrico mitocondrial das células leucêmicas humanas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com Pho-s nas concentrações 146 e 292mM, por 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

A avaliação do potencial elétrico mitocondrial em células de leucemia K-562 Lucena (MDR+) tratadas com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, mostraram que independente da expressão do fenótipo de resistência há uma redução significativa no potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 25).

Figura 25: Gráfico da avaliação do potencial elétrico mitocondrial das células leucêmicas humanas K-562 Lucena (MDR+), tratadas com DODAC vazio e DODAC/Pho-s nas concentrações 0,3 e 2,0 mM por 24 horas. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$.

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

Após os tratamentos com Pho-s, DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s as células tumorais K-562 e K-562 Lucena (MDR+) foram analisadas as expressões dos marcadores de controle, progressão do ciclo celular e da apoptose, por citometria de fluxo. Foram comparadas as porcentagens da expressão dos marcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle, a partir dos dados e *dots plots* adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo programa WinMDI versão 2.9, e apresentados em gráficos de barras das médias $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Foram definidos os padrões de expressão a partir da definição os quadrantes (Gates) dos gráficos adquiridos pelo programa (*dot plot*), e da positividade das células marcadas no quadrante superior em função da intensidade de fluorescência (FL1-H para os marcadores fluorescentes marcados com isotiocianato de fluoresceína - FITC (verde) e FL2-H para os marcadores fluorescentes marcados com ficoeritrina – PE (vermelho)).

A expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, em células leucêmicas K-562, diminuiu drasticamente nos grupos tratados com Pho-s, DODAC e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo controle, não tratado. Entretanto, o membro da família das proteínas pró-apoptóticas Bax e o Bad aumentaram significativamente no grupo tratado com Pho-s e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, não havendo diferenças estatísticas com o carreador vazio (DODAC) (Figura 26).

A

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bcl-2

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bad

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bcl-2

B

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bax

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bad

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bcl-2

C

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bax

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bad

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bcl-2

Figura 26: Gráficos do tipo *dot plots* e de barras representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose: Bax, Bad e Bcl-2 em células leucêmicas K-562, com tratamento com Pho-s nas concentrações de 40 e 80mM, formulação lipossomal DODAC/Pho-s 0,3 e 2,0 mM e carreador vazio DODAC 0,3 e 2,0 mM. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes em duplicata. (A) Bax, Bad e Bcl-2 grupo Pho-s; (B) Bax, Bad e Bcl-2 grupo carreador vazio DODAC; (C) Bax, Bad e Bcl-2 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s). (ns = não significativo)

A expressão das capases 3 e 8 fosforiladas apresentaram aumento nos grupos tratados com a Pho-s e com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s. Contudo, no grupo tratado com o carreador vazio DODAC, apesar do aumento numérico não houve uma menor diferença significativa. Por outro lado, o grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo DODAC, há um aumento extremamente significativo.

Os marcadores envolvidos no controle da progressão e checagem do ciclo celular, ciclina D1, citocromo c mostraram um aumento significativo e suas expressões nos grupos tratados com a Pho-s e com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, comparado ao grupo controle. No grupo tratado com o carreador vazio DODAC, houve uma menor diferença significativa. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador DODAC (Figura 27).

A

Volume celular (FHS)K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Citocromo C

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Ciclina D1

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 3

Volume celular (FHS)K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 8

B

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Citocromo C

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Ciclina D1

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 3

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 8

C

Volume celular (FHS) K562

Controle

DODAC/Pho-s 0,3 mM

DODAC/Pho-s 2,0 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Citocromo C

Volume celular (FHS) K562

Controle

DODAC/Pho-s 0,3 mM

DODAC/Pho-s 2,0 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Ciclina D1

Volume celular (FHS) K562

Controle

DODAC/Pho-s 0,3 mM

DODAC/Pho-s 2,0 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 3

Volume celular (FHS) K562

Controle

DODAC/Pho-s 0,3 mM

DODAC/Pho-s 2,0 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Caspase 8

Figura27: Gráficos do tipo dot plots e de barras representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose: Citocromo C, Ciclina D1, Caspase 3 e Caspase 8 em células leucêmicas K-562, com tratamento com Pho-s nas concentrações de 40 e 80mM, formulação lipossomal DODAC/Pho-s 0,3 e 2,0 mM e carreador vazio DODAC 0,3 e 2,0 mM. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes em duplicata. (A) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo Pho-s; (B) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo carreador vazio DODAC; (C) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s).

Os marcadores envolvidos no controle da checagem na progressão do ciclo celular, p53, p21 e p27 obtiveram aumento significativo no grupo tratado com a Pho-s, e com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, comparado ao grupo controle. No grupo tratado com o carreador vazio DODAC, houve uma menor diferença significativa. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador DODAC (Figura 28).

B

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p53

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p21

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p27

C

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p53

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p21

Volume celular (FHS) K562

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p27

Figura28: Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos no controle da checagem na progressão do ciclo celular p53, p21 e p27 em células leucêmicas K-562, com tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC; Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes em duplicata. (A) p53, p21, p27 grupo Pho-s; (B) p53, p21, p27 grupo carreador vazio DODAC; (C) p53, p21, p27 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s). (ns = não significativo)

A expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 por citometria de fluxo, em células leucêmicas K-562 Lucena (MDR+), diminuiu drasticamente nos grupos tratados com Pho-s, DODAC 2,0 mM e DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo controle, e não houve diferença significativa no grupo DODAC 0,3 mM. Entretanto, o membro da família das proteínas pró-apoptóticas Bax e o Bad aumentaram significativamente no grupo tratado com Pho-s e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador vazio DODAC (Figura 29).

Volume celular (FHS) Lucena

A

Controle

Pho-s 146 mM

Pho-s 292 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bax

Volume celular (FHS) Lucena

Controle

Pho-s 146 mM

Pho-s 292 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bad

Volume celular (FHS) Lucena

Controle

Pho-s 146 mM

Pho-s 292 mM

Intensidade de fluorescência (FLH 1) Bcl-2

Figura 29: Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose Bax, Bad e Bcl-2 em células K-562 Lucena (MDR+), com tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC; Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n = 4$. (A) Bax, Bad e Bcl-2 grupo Pho-s; (B) Bax, Bad e Bcl-2 grupo carreador vazio DODAC; (C) Bax, Bad e Bcl-2 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s).

A expressão das formas fosforiladas das capases 3 e 8 apresentaram aumento no grupo tratado com a Pho-s, com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s e com o carreador vazio DODAC. Já no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, quando comparado ao grupo DODAC, há um aumento extremamente significativo.

Os marcadores envolvidos no controle da progressão e checagem do ciclo celular, ciclina D1, citocromo c obtiveram aumento significativo nos grupos tratados com a Pho-s e com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s e com o carreador vazio DODAC, comparado ao grupo controle. No grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador DODAC (Figura 30).

Figura 30: Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose Citocromo C, Ciclina D1, Caspase 3 e Caspase 8 em células K-562 Lucena (MDR+), com tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC; Grau de significância estatísticas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. (A) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo Pho-s; (B) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo carreador vazio DODAC; (C) citocromo c, ciclina D1, caspase 3 e 8 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s).

Os marcadores envolvidos no controle da checagem do ciclo celular, p53, p21 e p27 o tratamento induziu o aumento significativo no grupo tratado com a Pho-s, a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, e formulação lipossomal DODAC. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento significativo, quando comparado ao grupo carreador DODAC (Figura 31).

Volume celular (FHS) Lucena

C

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p53

Volume celular (FHS) Lucena

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p21

Volume celular (FHS) Lucena

Intensidade de fluorescência (FLH 1) p27

Figura 31: Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da média $\pm$ DP da porcentagem da expressão dos marcadores envolvidos na apoptose p53, p21 e p27 em células K-562 Lucena (MDR+), com tratamento com Pho-s, DODAC/Pho-s e DODAC; Grau de significância estatísticas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltiplos de Dunn. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. (A) p53, p21, p27 grupo Pho-s; (B) p53, p21, p27 grupo carreador vazio DODAC; (C) p53, p21, p27 grupo formulação lipossomal (DODAC/Pho-s). (ns = não significativo)

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o câncer tem se tornado um importante problema de saúde pública mundial e, por essa razão, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver diferentes tratamentos com novos fármacos antineoplásicos, bem como, elucidar os seus mecanismos de ação com alvo (*target*) específico e menos efeitos colaterais.

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de células de leucemia humana K-562 e K562 Lucena (MDR⁺), que mostraram após o tratamento com fosfoetanolamina sintética(Pho-s) e a sua formulação lipossomal DODAC/Pho-s efeitos citotóxicos significativos em função da concentração de tratamento. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade da Pho-s no modelo *in vitro* de leucêmicas mielóide humana K-562 e das células leucêmicas que expressam o gene de resistência a múltiplas drogas (MDR⁺), K-562 Lucena (MDR⁺), indicam que o composto e a sua formulação lipossomal promovem seus efeitos antitumorais semelhantes aos mecanismos que parecem comum a todas as linhagens, independente da expressão do MDR⁺. Diversos estudos têm sido publicados mostrando que, contrário aos agentes quimioterapêuticos convencionais, os fosfolipídeos antineoplásicos agem em membranas celulares tumorais, interferindo no *turnover* dos fosfolipídeos e na ativação de processo de morte celular do tipo apoptose. Devido às suas ligações éter estáveis que não são metabolizadas e por interferir em lipídios de sinalização, causam apoptose em células de tumores malignos (VAN BLITTERSWIJK, 2008).

Em contraste aos clássicos agentes quimioterápicos, que exercem seus efeitos terapêuticos promovendo em geral danos ao DNA, compostos sintéticos e secreções animais, são ferramentas importantes para a seleção e identificação de fármacos potenciais e em particular os estudos conduzidos pelo nosso grupo do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, realizados em vários tipos de linhagens tumorais, que mostraram os efeitos e atividades da Pho-s na inibição da proliferação tumoral, por exemplo, a Pho-s, como um fosfomonoéster demonstrou elevada seletividade e especificidade na proliferação de células tumorais de melanoma murino B16F10 e humano SKmel-28. Nestes estudos, foi desencadeado pelo aumento

da apoptose via caspase-3 e decaimento na expressão das proteínas pró-apoptóticas de Bad/Bax (FERREIRA et al., 2011).

Nossos dados reiteram a proposta de que os efeitos antitumorais da Pho-s podem estar associados a um novo mecanismo de reconhecimento molecular, com um tipo exclusivo de receptor expresso nas linhagens tumorais. Corroborando os dados obtidos, a Pho-s foi citotóxica para todas as linhagens tumorais estudadas, EAT (tumor ascítico de Ehrlich); células B16F10 (melanoma murino); células MCF-7 (câncer de mama humano); células H292 (câncer de pulmão); células Skmel-28 e Mewo (melanoma humano). Entretanto, o tratamento com a Pho-s não foi citotóxico para células normais, tais como fibroblastos e células endoteliais (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013b; FERREIRA et al., 2013c).

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

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

Os fosfolípidos (PLs) fazem parte da fração não polar de amostras biológicas e são investigados do ponto de vista dos teores de ácidos graxos em conjunto com lipídios apolar. PLs são formados por um esqueleto de glicerol com duas moléculas de éter ligado a ácidos graxos (parte hidrofóbica), o qual o grupo fosfato funcional está ligado, o que é frequentemente modificado por

uma estrutura de baixo peso molecular adicional (parte hidrofílica, por exemplo, serina, etanolamina, glicerol, colina, etc.) (BIERHANZL et al., 2015). A fosfatidiletanolamina é o fosfolípídeo mais abundante em células eucarióticas. Neste trabalho foi utilizado um fosfolípídeo artificialmente fosforilado análogo aos fosfolípídeos de membrana, a fosfoetanolamina sintética (Pho-s) solúvel que difere dos atuais fosfolípídeos utilizados na clínica médica, por não causar efeitos colaterais, como a hemólise, distúrbios da coagulação ou mesmo hemorragias.

Clinicamente os grupos alquilados sintéticos de fosfolípídeos (ALP) diminuem a viabilidade celular tumoral, edelfosina, por exemplo, foi o primeiro análogo ALP sintético avaliado como um potencial agente antitumoral, seguido de ilmofosina que possui uma fração tioéter em vez do substituinte metoxi. A modificação estrutural adicional para remover o núcleo de glicerol produziu o análogo de fosfato de alfa fosfocolina e a substituição da porção de colina com um sistema de piperidina produziu perifosina. Mais recentemente, foram desenvolvidas duas outras moléculas, a erucilfosfocolina e a sua análoga homocolina, a erufosina, que possuem uma cadeia mais longa de 22 carbonos e uma ligação dupla ω -9- cis. A absorção celular de ALPs depende dos microdomínios lipídicos (*lipids rafts*) (VAN DER LUIT et al., 2007). As ALPs provocam uma série de ações antitumorais nas células, incluindo interferência com a função nos microdomínios lipídicos da membrana, sinalização alterada de sobrevivência via PI3K/Akt, inibição da síntese de fosfatidilcolina, geração de ROS e ativação do estresse do retículo endoplasmático. Assim, a evidência até o momento suporta vários mecanismos potenciais no modo de ação. Os ALPs diminuem a viabilidade das células tumorais de várias maneiras: promovem a parada do ciclo celular na fase G2 / M; induzem os inibidores CDK p21 Cip1 e inibem a atividade proliferativa via ERK e a sinalização PI3K/Akt, possivelmente interferindo na expressão de Raf-1 (GAJATE et al., 2012).

Com o frequente avanço da nanotecnologia, vários sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*) têm sido desenvolvidos para contornar limitações relacionadas à solubilidade nos fluidos biológicos, estabilidade físico-química, biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade para células normais. Dentre estes sistemas, os lipossomos consistem um dos tipos de nanocarreadores

mais investigados com relação ao câncer. Diversos estudos demonstram que esse tipo de formulação pode maximizar a farmacocinética e a eficácia antitumoral de vários compostos (DRBOHLAVOVA et al., 2013).

Lipossomas carregados positivamente são moléculas formuladas que aumentam a atividade e especificidade da resposta antitumoral e antiproliferativa. A formulação lipossomal com anfífilos catiônicos DODAC demonstrou eficiência em carrear a Pho-s, tendo em vista que os valores de IC50% para as linhagens são significativamente menores. No entanto, sabe-se que anfífilos catiônicos, de um modo geral, são reconhecidamente tóxicos, tanto para células procarióticas como para as eucarióticas (PANTANI et al., 1995-a; PANTANI et al., 1995-b; SALT et al., 1970; CARMONA-RIBEIRO 2003). Entretanto, a citotoxicidade dos lipossomas DODAC vazios foi menor em comparação aos lipossomas contendo a formulação DODAC/Pho-s, e o mais interessante inibindo a progressão nas fases do ciclo celular, o que não ocorre com o lipossoma vazio. Esses dados são explicados porque moléculas anfífilas catiônicas em suspensão são citotóxicas, pois são instáveis e reativas, pois interage molécula eletronegativa devida à sua carga eletropositiva, o que não ocorreu com a formulação lipossomal, mais estável e supostamente se liga a receptores na membrana celular.

Os resultados publicados por nosso grupo mostram que as moléculas de DODAC interagem com a Pho-s em solução aquosa após ser submetida a ultrassom e posterior sonicação, originando uma formulação lipossomal DODAC/Pho-s. As suspensões lipossomais obtidas de DODAC/Pho-s foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e determinação do teor (%) de fosfato das partículas anteriormente por nosso grupo para sua caracterização físico-química. Os lipossomas com concentração de 2,0 mM de Pho-s demonstraram ser estáveis em relação ao tempo (LUNA et al., 2016). Como a estabilidade físico-química é um parâmetro importante para biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade seletiva para células tumorais, as concentrações escolhidas para o tratamento com o DODAC e DODAC/Pho-s foram de 0,3 a 2,0 mM.

Os tamanhos dos lipossomas DODAC/Pho-s, obtidos por meio da microscopia eletrônica de varredura, são entre 60-100 nm, sendo considerados

alvos específicos para o tratamento antitumoral, pois o endotélio vascular de tecidos saudáveis é formado por fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, enquanto que os neovasos dos tumores apresentam fenestrações bem maiores (100 a 780 nm) (FANG et al., 2011; TAURIN et al., 2012). Dessa forma, as nanopartículas com tamanho médio de 100-200 nm conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos vasos tumorais, mas não penetram nas fenestrações estreitas do endotélio dos tecidos saudáveis.

Neste estudo, foram avaliados efeitos citotóxicos e os mecanismos de indução de apoptose, após o tratamento com Pho-s, formulação lipossomal DODAC/Pho-s e o carreador vazio DODAC. A Pho-s e sua formulação lipossomal promoveram efeitos antitumorais com valores de IC₅₀% para as células leucêmicas K-562 foram de 43,1 mM e de 145,9 mM para K-562 Lucena (MDR+). O nível de sensibilidade para as duas linhagens foi diferente, e provavelmente dependem da resistência do perfil mutagênico no caso, em particular MDR+ e agressividade.

Além do teste de citotoxicidade SRB foi realizada a contagem automatizada da viabilidade celular pelo sistema Vi-Cell™ XR, após 12 e 24 horas de tratamento com a Pho-s. O tratamento induziu redução da viabilidade celular tempo-concentração dependente. Após 12 e 24 horas as células leucêmicas K-562 e K-562 Lucena (MDR+) apresentaram aspectos de formação de debri celular, a partir da concentração de 40 mM e 120 mM, respectivamente. Dados que corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo, no qual o tratamento com Pho-s mostrou-se citotóxico em células tumorais, como em células de melanoma B16 F10 (FERREIRA et al., 2013).

O tratamento com o carreador DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s nas células leucêmicas K-562 e K-562 Lucena (MDR+) mostrou formação de debri celular, formação de grande quantidade de precipitado no sobrenadante.

O mecanismo mais estudado de morte celular programada é a apoptose, que ocorre pelas vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por sinais de estresse intracelular que lesão o DNA e geram espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses estímulos aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial modificando a interação entre as proteínas da família

Bcl-2 que interagem com os canais de íons dependentes da tensão da membrana mitocondrial (SHIMIZU et al., 2000). As proteínas Bcl-2 têm funções pró-apoptóticas (Bak, Bax ou Bok) ou anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1). As proteínas BH3 (por exemplo, Bid, Bim ou Puma) também modulam as interações proteicas Bcl-2 pró e anti-apoptóticas. A apoptose pode ser iniciada por ativação de um receptor de morte na membrana plasmática, pelos efeitos das proteínas da família Bcl-2 sobre as mitocôndrias, ou ainda pelos efeitos tóxicos diretos sobre mitocôndrias que levam à perda de potencial de membrana mitocondrial e a liberação de proteínas pró-apoptótica intermembranar mitocondrial. A ativação de diferentes caspases pode iniciar ou amplificar a resposta apoptótica depende ou não das mitocôndrias, e por vias independentes da caspase.

Nossos resultados mostraram que a Pho-s, e a sua formulação lipossomal DODAC/Pho-s alteraram as expressões das proteínas pró e anti-apoptóticas; nas células tumorais K-562 há uma diminuição da Bcl-2 e aumento de Bad e Bax nas concentrações estudadas, porém estes mesmos efeitos não foram encontrados com o carreador vazio DODAC. Por outro lado, na linhagem K-562 Lucena, houve um aumento significativo de Bcl-2 e aumento de Bad e Bax nos tratamentos com a formulação Pho-s e DODAC/Phos. Devemos salientar que além da ativação mitocondrial pela via intrínseca e pela participação da família da proteína da Bcl-2, os ROS medeiam a fosforilação oxidativa onde participam a ciclooxigenases, citocromos P450, lipoxigenases, NADPH e xantinas oxidases que operam por mecanismos dependentes desses radicais (ROUZER & MARNETT, 2003). As ciclooxigenases atuam sobre ácidos graxos saturados que levam a formação hidroperóxidos lipídicos reativos que causam danos às proteínas, estes dados podem corroborar com os efeitos da formulação lipossomal DODAC/Pho-s e o carreador vazio DODAC, que por sua vez não modulou de maneira significativa a expressão de Bad e Bax.

A via extrínseca da apoptose transduz sinal do TNF- α , FasL e TRAIL (ligante de morte induzido pelo TNF). Após a ativação do receptor, os receptores de morte recrutam proteínas adaptadoras, a MAPK-ASK1, pró-caspases e outras proteínas moduladoras para seus domínios de morte

citoplasmática para formar complexos de sinalização indutores de morte (DISCs). ASK1 é ativada pelo N-terminal Jun-N (JNK) e p38 MAPKs que medeiam a apoptose e a parada do ciclo celular (TOBIUME et al., 2001). Ao contrario da apoptose, a necrose foi previamente considerada uma forma passiva de morte celular em resposta a agentes carcinogênicos ou toxinas que promovem a depleção maciça de ATP. A morte celular necrótica é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática, a liberação de conteúdos celulares e uma resposta pro-inflamatória inespecífica, isto constata a desestruturação que ocorre na apoptose. No entanto, surgiu recentemente que a necrose programada, ou a necroptose, é ativada por ligantes de receptores de morte e também envolve a montagem de DISC intracelulares, mas é independente da caspase. Os sinais que determinam quais proteínas permanecem dentro do DISC e, portanto, determinam se a apoptose ou a necroptose se apresentam, não estão completamente esclarecidas, mas podem estar relacionadas à disponibilidade de ATP (CHRISTOFFERSON & YUAN, 2010).

As células leucêmicas humanas K-562 e K-562 Lucena (MDR+) tratadas com a Pho-s mostraram aumento da proporção de células em processo de apoptose tardia e inicial e, e um aumento significativo do percentual de células necróticas. Esses dados sustentam a hipótese de que a Pho-s não induz danos lesivos à membrana celular e, sim, supostamente se liga os receptores da membrana celular, do tipo *lipids rafts*, que são ligantes de fosfolipídeos e indutores de apoptose, independente do fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Por outro lado, o carreador vazio DODAC não mostrou nenhuma especificidade da resposta biológica mediada pela apoptose, entretanto, é indutor de necrose. Dados que corroboram com essas observações foi à independência da expressão do fenótipo de resistência para a redução significativa no potencial elétrico mitocondrial, o que promove a expressão pela liberação das proteínas pró-apotóticas da matriz intermembranar mitocondrial e a liberação do citocromo c. E essas modificações no potencial mitocondrial já foram descritos em vários trabalhos publicados pelo grupo, o que demonstra os efeitos apoptóticos da Pho-s e de sua nova formulação lipossomal, o que não

necessariamente seja dependente da ativação de outras vias, por exemplos, dependentes da caspase 3 ou a via CD95/Fas.

A proliferação celular pode ser influenciada por condições fisiológicas e patológicas, e está amplamente controlada por sinais, solúveis ou contato-dependentes, de microambientes que agem estimulando-a ou inibindo-a. O mecanismo de proliferação celular mais importante é a conversão de células quiescentes em proliferativas. O recrutamento das células quiescentes e a progressão do ciclo celular requerem sinais estimulantes para sobrepujar a inibição fisiológica da proliferação celular. As atividades do ciclo celular são comandadas por ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK-s) e seus inibidores. Durante todo o ciclo, a função das ciclinas é ativar as CDK-s, sendo que seus níveis caem após exercerem essa função. A atividade dos complexos ciclina-CDK é regulada por fatores inibidores de CDK-s. Existem duas classes principais de inibidores: as famílias Cip/Kip e INK-4/ARF. Dentro da família Cip/Kip destacam-se p21, p27 e p53 e, pertencentes à família INK-4/ARF, p16 e p14, que funcionam como supressores da progressão do ciclo celular. A atividade transcricional de p21 está sob o controle da proteína p53. A p21 também irá competir com a ciclina D com a mesma intenção de provocar a parada no ciclo celular. A p27 responde aos supressores de crescimento e irá competir com o complexo ciclina E/CDK-2, também provocando uma parada do ciclo celular no ponto de restrição G1/S, modificando a proporção de células paradas e quiescentes/senescentes (ROBBINS & COTRAN, 2005).

A proteína supressora de tumor p53 é proteína chave na apoptose, e desempenha um papel importante nas vias de transdução de sinal em diversos tipos de células, incluindo fibroblastos e células endoteliais vasculares. A função de p53 é de grande importância a no estresse genotóxico onde modula e integra vários tipos de resposta que controlam a apoptose, a parada do ciclo celular, senescência e outros processos fisiológicos.

Os marcadores estudados neste trabalho envolvidos no controle da checagem na progressão do ciclo celular, p53, p21 e p27 mostraram efeito modulador nos grupos de células tratadas com a Pho-s, e com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, comparado ao grupo controle. No grupo tratado com o carreador vazio DODAC, houve uma menor diferença demonstrando o seu

efeito inespecífico e de induzir necrose. Contudo, no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s houve um aumento altamente significativo, neste grupo de proteínas reguladoras da progressão do ciclo dependente da p53, o que não foi constatado com o carreador vazio DODAC (SPEIDEL, 2010).

Normalmente os níveis de expressão da proteína p27 apresentam-se aumentada em células quiescentes e caem rapidamente após estimulação por mitógenos. O aumento na expressão p27 nas células K-562 e K-562 Lucena (MDR+) com a Pho-s e a formulação lipossomal DODAC/Pho-s, possivelmente representam os efeitos no controle proliferação ou diferenciação celular. Por outro lado, a proteína p21 é um efetor crítico da via p53-dependente e provoca uma parada no ciclo celular pela inibição da quinase dependente de ciclina. Portanto, p21 exerce papel central na apoptose, e também está relacionada com na manutenção do estado de diferenciação ou maturação promovidos pelos tratamento com a Pho-s e formulação lipossomal DODAC/Pho-s, o que não foi obtido no tratamento com o carreador vazio (NGUYEN et al., 2017).

As bicamadas da membrana celular são compostas por fosfolípidos com cadeias de ácidos graxos esterificados que são flanqueados por moléculas de colesterol e esfingolípídios. Dentro das membranas, as regiões denominadas de *lipids rafts* ou microdomínios lipídicos, são pequenas regiões de 10-200 nm, dinâmicas, heterogêneas e resistentes a detergentes (SIMONS & TOOMRE, 2000). Os microdomínios lipídicos estão implicados em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo apoptose, sinalização celular, virulência e neurodegeneração (SIMONS & TOOMRE, 2000; HANCOCK, 2006; ADAMSON & FREED, 2010). As integrinas, os receptores do fator de crescimento e as moléculas de sinalização intracelular associadas são regiões enriquecidas por microdomínios lipídicos (*lipids rafts*), que podem ser considerados como locais para o início de vias de sinalização. Os microdomínios lipídicos no folheto externo da membrana plasmática são ricos em colesterol e esfingolípídios. A esfingomielina, que é composta por uma fração de ceramida hidrofóbica e um grupo hidrofílico de fosforilcolina, é o esfingolípídio mais comum na membrana plasmática. As ceramidas são amidas de ácidos graxos e esfingosina e são constituintes de membranas biológicas. O

enriquecimento da ceramida nos microdomínios lipídicos faz com que a fusão dos microdomínios seja maior e mais estável (SILVA et al., 2009). Os receptores de morte associados aos microdomínios lipídicos podem ativar a esfingomielinase acidosa lisossômica e a liberação de ceramida a partir de esfingomielina de membrana celular (SESSLER et al., 2013). Ceramidas são reconhecidas por seus papéis de sinalização na regulação da proliferação celular, diferenciação e morte celular. A hidrólise da esfingomielina em ceramida é catalisada por esfingomielinases, enquanto a síntese de novo é mediada por múltiplas sintases de ceramida que produzem ceramidas endógenas com uma gama de comprimentos de cadeia de ácido graxo. As ceramidas de cadeia longa são pró-apoptóticas. O acúmulo de ceramida nas células ocorre após o tratamento com agentes quimioterápicos ou ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico (MERRILL & JONES, 1990). A adição direta no carbono -2 da ceramida ($\sim 1 \mu\text{M}$) alterou o potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$) pela formação de canais ou pelo controle das proteínas Bcl-2, que liberaram o citocromo c e a caspase 3 ativada (GARCIA-RUIZ et al., 1997). Essas ações proapoptóticas de ceramida são mediadas por p38 e JNK MAPKs (CHEN et al., 2008). A ceramida também pode ser clivada pela ceramidase que termina as ações apoptóticas de ceramidas de cadeia longa (SEELAN et al., 2000).

Como mencionado, há evidências de ações antitumorais adicionais de ALPs. Sugeriu-se que a edelfosina redistribua os microdomínios lipídicos da membrana plasmática para a mitocôndria e modula o conteúdo de fosfocolina mitocondrial, que altera a permeabilidade da membrana, induz o inchaço da organela e ativa a apoptose (MOLLINEDO et al., 2011). Dados que suportam os achados neste trabalho, Pho-s e sua formulação lipossomal modularam as atividades do potencial elétrico mitocondrial, liberação do citocromo c e aumento de Bad e Bax, que confirmam a proporção de células em apoptose, marcadas positivamente com Anexina – V. ALPs podem induzir a apoptose em células de linfoma S49 estão relacionadas à capacidade de inibir a enzima CTP/fosfocolina que participa na síntese de fosfatidilcolina (VAN DER LUIT et al., 2007). Foi proposto que a síntese contínua de fosfatidilcolina é essencial

para a sobrevivência celular e que a falta de fosfatidilcolina bloqueia a síntese de lipídios da membrana adjacentes ao colesterol.

Outros mecanismos apoptóticos também foram propostos para explicar as ações de ALPs em células tumorais. Em alguns tipos celulares, ALPs ativam a produção de ROS, o que oxida a tioredoxina e permite a sua dissociação do N-terminal de ASK1, como mencionado anteriormente (MATSUKAWA et al., 2004). A superexpressão das proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas Bcl-XL ou Bcl-2 impediu a liberação de citocromo c, induzida por ALP em mitocôndria em células de mieloma múltiplo (GAJATE & MOLLINEDO, 2007).

As APLs também induzem o estresse do retículo endoplasmático, possivelmente, como consequência da perda de produção de fosfatidilcolina e que poderia ser um mecanismo alternativo de ativação de ASK1-JNK (NIETO-MIGUEL et al., 2007). A depleção de fosfatidilcolina foi avaliada separadamente para induzir o coeficiente de transcrição pró-apoptótico relacionado ao estresse retículo endoplasmático CHOP/GADD153 (VAN DER SANDEN et al., 2003), que pode ativar o Bcl-2 pró-apoptótico. A sensibilidade das células tumorais às APLs pode estar relacionada à ativação diferencial do perfil das proteínas Bcl-2 pró e anti-apoptóticas (MOLLINEDO et al., 1997). Em nosso estudo, Pho-s e sua formulação lipossomal, modularam positivamente a expressão de Bcl-2, Bad e Bax, associados à diminuição das atividades do potencial mitocondrial e a liberação do citocromo c. A Pho-s é um fosfomonoéster com propriedade pro-apoptóticas em célula leucêmicas K-562 e K-562 Lucena (MDR+).

Devemos salientar que, embora bem tolerado em estudos pré-clínicos, o uso clínico sistêmico de ALPs sintéticas foi restringido pelo seu potencial hemolítico e toxicidade gastrointestinal (BERDEL et al., 1987). Outras toxicidades importantes relatadas em estudos clínicos incluem febre, mialgia, artrite e dor. A aplicação tópica de miltefosina, por exemplo, como solução ou pomada a 6% tem atividade no tratamento de metástases cutâneas tumores de mama e linfomas cutâneos (SMORENBURG et al., 2000; DUMONTET et al., 2006). A atividade sistêmica da miltefosina em tumores do tipo sarcomas, colorretal cabeça e pescoço, no entanto, não foi tão promissora, embora pacientes individuais, pudessem tolerar a droga e remissões parciais forma

observadas por períodos limitados (PLANTING et al., 1993; VERWEIJ et al., 1993a; VERWEIJ et al., 1993b). Outro exemplo é a perifosina, utilizada no tratamento da macroglobulinemia de Waldenström, uma desordem linfoproliferativa rara caracterizada pela infiltração da medula óssea com células linfoplasmocíticas. A atividade da perifosina está relacionada à inibição da atividade de PI3K/Akt, que diminuiu a proliferação, aumentou a apoptose e inibiu a migração e adesão das células tumorais de macroglobulinemia de Waldenström em cultura e, em um modelo de xenoinxerto subcutâneo, a droga impediu a migração das células tumorais para o microambiente da medula óssea (LELEU et al., 2007).

Friedman et al., 2014 demonstraram que utilização clínica da perifosina no tratamento de pacientes com leucemia linfática crônica pareceu promissor aos três meses, mas só foi mantido em um único paciente após seis meses de sua administração.

O uso de combinações de fármacos antitumorais como a Pho-s é promissor, neste modelo experimental de células leucemias. Nossa proposta é talvez avaliar no futuro a associação com esquemas e protocolos quimioterápicos já existentes, o que poderiam aumentar as taxas de sobrevida global ou minimizar os efeitos colaterais, principalmente as neutropenias, no tratamento de leucemias e linfoma. Em estudos clínicos, a perifosina aumentou o efeito antineoplásico de lenalidomida e dexametasona em mieloma múltiplo (JAKUBOWIAK et al., 2012) e bortezomib, com ou sem dexametasona, (RICHARDSON et al., 2011). No entanto, um ensaio de fase III com a última combinação não apresentou benefício clínico, embora a sobrevida global tenha sido prolongada (RICHARDSON et al., 2013).

Um estudo recente também avaliou a combinação em pacientes com doenças linfoproliferativas. O tratamento dos pacientes que receberam perifosina de agente único para doenças linfoproliferativas recidivantes e refratárias e que obtiveram menos de uma resposta parcial receberam a terapia combinada até que a doença evoluiu ou a toxicidade fosse inaceitável. Os resultados iniciais apoiaram uma resposta clínica em 7 dos 25 pacientes com linfoma de Hodgkin. Também promissor, 4 dos 8 pacientes com leucemia linfocítica crônica responderam à perifosina isoladamente (GUIDETTI et al.,

2014). As respostas clínicas observadas nos pacientes com linfoma de Hodgkin recidivante e refratário sugerem que este subgrupo poderia servir como população-alvo para novos estudos (GUIDETTI et al., 2014).

Em estudos pré-clínicos identificaram várias combinações de medicamentos adicionais a perifosina de grande valor potencial. O tratamento de células de leucemia mielóide aguda humana com perifosina e o inibidor de quinase dependente de ciclina SNS-032 aumentaram a morte celular em comparação com o tratamento com qualquer agente isolado, provavelmente devido à diminuição na sinalização de sobrevivência de PI3K/Akt (MENG et al., 2013). A combinação de perifosina com o inibidor de mTOR CCI-779 produziu parada do ciclo celular e inibição do crescimento em várias linhagens celulares tumorais humanas. Esses dados pré-clínicos sugerem que a inibição da via PI3K/Akt/mTOR em dois pontos na cascata de sinalização que pode produzir efeitos otimizados, alvo de pesquisa clínica (PITTER et al., 2011).

Na literatura existem descritos classes de moléculas de lipídios com grande potencial para desenvolvimento de alvos moleculares no tratamento do câncer. Estes incluem grupos de ácidos graxos saturados e ceramidas, sendo considerados bem tolerados e produzem toxicidade mínima em células não alvo e/ou modelos pré-clínicos. O único modelo experimental utilizando a Pho-s desenvolvido por nosso grupo em células leucêmicas obtidas a partir de camundongos inoculadas em camundongos NOD/SCID e tratadas em associação com Pho-s, ácido trans retinóide e daunorubicina. Os resultados mostraram que o tratamento in vivo com a Pho-s apresenta efeitos antiproliferativos no modelo transgênico hCG-PML-RARa, reduzindo o número de células mielóides imaturas CD117 + e Gr-1 + transgênicos hCG-PML-RARa na medula óssea, baço e fígado. A Pho-s diminuiu a expansão dos clones malignos CD34 + / CD117 +, CD34 + e Gr-1 + na medula óssea, como também foi capaz de induzir apoptose de células imaturas no baço e fígado (FERREIRA et al., 2013).

Os fosfolipídeos sintéticos, como a Pho-s são particularmente interessantes, são reguladores de vias de sinalização, crescimento e diferenciação, que isoladamente ou em combinação podem amplificar respostas terapêuticas convencionais. A ligação em microdomínios lipídicos e a

capacidade de modular proteínas pro-apoptóticas possam reforçar os tratamentos sem toxicidade associada aos agentes citotóxicos convencionais, fato que poderia ter uma abordagem clínica útil, em particular em tumores hematológicos, como base de associação a Pho-s.

6. CONCLUSÃO

O tratamento das células leucêmicas mielóides humanas K-562 e K-562 Lucena (MDR+) com a Pho-s e especialmente a formulação DODAC/Pho-s mostrou efeitos citotóxicos dose e tempo dependentes. Essa citotoxicidade induziu diminuição da capacidade proliferativa, diminuição do potencial elétrico mitocondrial, consequentemente liberação do citocromo c, inibição da expressão de proteínas da família Bcl-2, aumento dos membros da família pro-apoptótica Bad e Bax, dependentes da p53. Esse conjunto de informações demonstrou os efeitos apoptóticos da Pho-s nas células tumorais independentemente do perfil molecular de resistência (MDR+), o que possibilita dizer que esse composto e sua formulação lipossomal possui significativo potencial terapêutico nesse grupo de leucemias.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, C.S.; & FREED, E.O. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. **Antiviral Res** 85, 119–141, 2010.
- AGGARWAL, B.B.; DANDA, D.; GUPTA, S.; GEHLOT, P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1083-1094, 2009.
- ANDREESSEN, R.; MODOLELL, M.; WELTZIEN, H. U.; EIBL, H.; COMMON, H. H.; LOHR, G. W.; MUNDER, P. G. Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids. **Cancer Res.** 38: 3894-9, 1978.
- AWAPARA, J. Alanine and taurine formation from injected cysteine in the rat. **Nature**. v.14, n.4185, p.165-176, 1950.
- BAKOVIC, M.; FULLERTON M.D.; MICHEL, V. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Biochem. Cell Biol.**, 85: 283-200, 2007.
- BENNOUR, A.; SAAD, A.; SENNANA, H. Leucemia mielóide crônica: relevância de ensaios citogenéticos e moleculares. **Crit Rev Oncol Hematol** v.97: p. 263-74. Doi: 10.1016 / j.critrevonc.2015.08.020, 2016.
- BERDEL, W.E.; FINK, U.; & RASTETTER, J. Clinical phase I pilot study of the alkyllysophospholipid derivative ET-18-OCH₃. **Lipids** 22, 967–969, 1987.
- BIERHANZL, V. M.; ABALA, R. C.; STON, M.; KUBINEC, R.; SZABO, A. H.; PODOLEC, P. Gas chromatography with mass spectrometry analysis of phosphoserine, phosphoethanolamine, phosphoglycerol, and phosphate. **J. Sep. Sci.** 38, 67–72, 2015.
- BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. **ISRN Pharm.** 2012:738432. doi: 10.5402/2012/738432, 2012.
- BUSTO, J. V.; DEL CANTO-JAÑEZ, E.; GOÑI, F. M.; MOLLINEDO, F.; ALONSO, A. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. **J Chem Biol.** 1: 89-94, 2008.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer-forming synthetic lipids: Drugs or carriers? **Curr. Med. Chem.**, v. 10, p. 2425-2446, 2003.
- CHEN, C.L.; LIN, C.F.; CHANG, W.T.; HUANG, W.C.; TENG, C.F.; & LIN, Y.S. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. **Blood** 111, 4365–4374, 2008.
- CLARK, S.S.; PERMAN, S.M.; SAHIN, M.B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J.A. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia.** 16: 213–222, 2002.

CHIRTOFFERSON, D.E.; YUAN, J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin. Cell Bio* 22, pp. 263-268, 2010.

DRBOHLAVOVA, J.; CHOMOUEKA, J.; ADAM, V.; RYVOLOVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. *Currente Drug Metabolism*. 14: 547-564., 2013.

DUMONTET, C.; THOMAS, L.; BERARD, F.; GIMONET, J.F.; & COIFFIER, B. A phase II trial of miltefosine in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Bull Cancer* 93, E115–E118, 2006.

ELLISON, D. W.; BEAL, M. F.; MARTIN, J. B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Res*. 417: 389–92, 1987.

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

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

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

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

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

FOLSCH, G.; OSTERBERG, R. The apparent acid ionization constants of some O-phosphorylated peptides and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, v.234, p.2298- 2303, 1959.

FRIEDMAN, D.R.; LANASA, M.C.; DAVIS, P.H.; ALLGOOD, S.D.; MATTA, K.M.; BRANDER, D.M., et al. Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and in vitro studies. *Leuk Lymphoma* 55, 1067–1075, 2014.

GAJATE, C.; MATOS-DA-SILVA, M.; DAKIR, EL-H.; FONTERIZ, R.I.; ALVAREZ, J.; et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* 31, 2627–2639, 2012.

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

GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; & FERNANDEZ-CHECA, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem** 272, 11369–11377, 1997.

GOLDMAN, J.M. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Medicine**. 37(4), 2008.

GUIDETTI, A.; CARLO-STELLA, C.; LOCATELLI, S.L.; MALORNI, W.; MORTARINI, R.; VIVIANI, S., et al. Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases. **Clin Cancer Res** 20, 5641–5651, 2014.

HANCOCK, J.F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol** 7, 456–462, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2017: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

ISLAM, A. The origin and spread of human leukemia. **Med hypotheses**, v. 39, n. 1, p. 110-118, 1992.

JAKUBOWIAK, A.J.; RICHARDSON, P.G.; ZIMMERMAN, T.; ALSINA, M.; KAUFMAN, J.L.; KANDARPA, M., et al. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. **Br J Haematol** 158, 472–480, 2012.

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

LEIGHL, N.B.; DENT, S.; CLEMONS, M.; VANDENBERG, T.A.; TOZER, R.; WARR, D.G., et al. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 108, 87–92, 2008.

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

MELO, J.V. et al. Chronic myeloid leukemia. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program), p.132-52, 2003.

MATSUKAWA, J.; MATSUZAWA, A.; TAKEDA, K.; & ICHIJO, H. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. **J Biochem** 136, 261–265, 2004.

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

MENG, H.; JIN, Y.; LIU, H.; YOU, L.; YANG, C.; YANG, X., et al. SNS-032 inhibits mTORC1/ mTORC2 activity in acute myeloid leukemia cells and has synergistic activity with perifosine against Akt. **J Hematol Oncol** 6, 18, 2013.

MERRILL, A.H.; JR. & JONES, D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. **Biochim Biophys Acta** 1044, 1–12, 1990.

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

MOLLINEDO, F.; FERNANDEZ-LUNA, J.L.; GAJATE, C.; MARTIN-MARTIN, B.; BENITO, A.; MARTINEZ-DALMAU, R., et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Cancer Res** 57, 1320–1328, 1997.

MOLLINEDO, F.; FERNÁNDEZ, M.; HORNILLOS, V.; DELGADO, J.; AMAT-GUERRI, F.; ACUÑA, A.U.; et al. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell Death Dis** 2, e158, 2011.

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

NGUYEN, D.; LIAO, W.; ZENG, S.X.; LU, H. Reviving the guardian of the genome: Small molecule activators of p53. **Pharmacol Ther.** doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.013, 2017.

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

NIETO-MIGUEL, T.; FONTERIZ, R.I.; VAY, L.; GAJATE, C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, S.; & MOLLINEDO, F. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. **Cancer Res** 67, 10368–10378, 2007.

OLIVEIRA, R.A.G. & NETO, A.P. Anemias e Leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. **Roca**, São Paulo 2004.

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

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

PACHECO, J.M.; TRAULSEN, A.; DINGLI, D. The allometry of chronic myeloid leukemia. *J. Theor. Biol.* 2009.

PANTANI, C.; SPRETI, N.; MAGGITT, M.C.; GERMANI, R. Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod *Echinogammarus-Tibaldii*. *B. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 55, p. 179-186, 1995-a.

PANTANI, C.; SPRETI, N.; NOVELLI, A.A.; GHIRARDINI, A.V.; GHETTI, P.F. Effect of particulate matter on copper and surfactants acute toxicity to *Echinogammarus-Tibaldii* (crustacean, amphipoda). **Environ. Technol.**, v. 16, p. 263-270, 1995-b.

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

PITTER, K.L.; GALBAN, C.J.; GALBAN, S.; TEHRANI, O.S.; LI, F.; CHARLES, N., et al. Perifosine and CCI 779 co-operate to induce cell death and decrease proliferation in PTEN-intact and PTEN-deficient PDGF-driven murine glioblastoma. **PLoS One** 6, e14545, 2011.

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

PUI, C.H.; ROBISON, L.; LOOK, A.T. Acute Lymphoblastic Leukemia. **The Lancet**; 371: 1030-1043, 2008.

RICHARDSON, P.G.; NAGLER, A.; BEN-YEHUDA, D.; BADROS, A.Z.; HARI, P.; HAJEK, R., et al. Randomized placebo-controlled phase III study of perifosine combined with bortezomib and dexamethasone in relapsed, refractory multiple myeloma patients previously treated with bortezomib. **Am Soc Hematol. Annual Meeting** (abstr: 3189), 2013.

RICHARDSON, P.G.; WOLF, J.; JAKUBOWIAK, A.; ZONDER, J.; LONIAL, S.; IRWIN, D., et al. Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I/II trial. **J Clin Oncol** 29, 4243–4249, 2011.

ROBBINS, S.; COTRAN, R. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**. p. 300-23, 2005.

ROUZER, C. A.; & MARNETT, L. J. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. **Chem Rev** 103, 2239–2304, 2003.

RUMJANEK, V.M.; LUCENA M.; CAMPOS M.M.; MARQUESS ILVA V.M.; MAIA R.C. Multidrogas resistência nas leucemias: o problema e alguns caminhos para sua evasão. **Ciencia Cult** 46: 6369, 1994.

RUMJANEK, V.M.; TRINDADE, G.S.; SOUZA, K.W.; OLIVEIRA, M.C.M.; SANTOS, L.F.M.; MAIA, R.C.; CAPELLA, M.A.M. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **National Cancer Institute**, Rio de Janeiro, Brazil, 2000.

SALT, W. G.; WISEMAN, D. Relation between uptake of cetyltri-methylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 22, p.216, 1970.

SEELAN, R.S.; QIAN, C.; YOKOMIZO, A.; BOSTWICK, D.G.; SMITH, D.I.; & LIU, W. Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 29, 137–146, 2000.

SESSLER, T.; HEALY, S.; SAMALI, A.; & SZEGEZDI, E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. **Pharmacol Ther** 140, 186–199, 2013.

SILVA, L.C.; FUTERMAN, A.H.; & PRIETO, M. Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations. **Biophys J** 96, 3210–3222, 2009.

SIMONS, K.; & TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol** 1, 31–39, 2000.

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

SHARATA, H.H.; KATZ, K.H. Liposomes. **International Journal of Dermatology**, v.35, n.11, p.761-769, 1996.

SHIMIZU, S.; KONISHI, A.; KODAMA, T.; & TSUJIMOTO, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97, 3100–3105, 2000.

SMORENBURG, C.H.; SEYNAEVE, C.; BONTENBAL, M.; PLANTING, A.S.; SINDERMAN, H., et al. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. **Anticancer Drugs** 11, 825–828, 2000.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARANI, M. *et al.* Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. **Blood**. New York, v.63, p.789-99, Apr. 2002.

SPEIDEL, D.I. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. **Trends. Cell Biol.**, 20, pp. 14–24, 2010.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Geneva: **WHO Press**, 2008.

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

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

TOBIUME, K.; MATSUZAWA, A.; TAKAHASHI, T.; NISHITOH, H.; MORITA, K.; TAKEDA, K.; et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. **EMBO Rep** 2, 222–228, 2001.

TORCHILIN, V.P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.2, p.145-160, 2005.

TSIFTSOGLOU, A.S; PAPPAS, I.S; and VIZIRIANAKIS, I.S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacol Ther** 100:257- 290, 2003.

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

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

VAN DER LUIT, A.H.; VINK, S.R.; KLARENBECK, J.B.; PERRISSOUD, D.; SOLARY, E.; VERHEIJ, M.). A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Mol Cancer Ther** 6, 2337–2345, 2007.

VAN DER SANDEN, M.H.; HOUWELING, M.; VAN GOLDE, L.M.; & VAANDRAGER, A.B. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein–homologous protein (CHOP/GADD153). **Biochem J** 369, 643–650, 2003.

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

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

VERWEIJ, J.; GANDIA, D.; PLANTING, A.S.; STOTER, G.; & ARMAND, J.P. Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer. **Eur J Cancer** 29A, 778–779, 1993a.

VERWEIJ, J.; KRZEMIENIECKI, K.; KOK, T.; POVEDA, A.; VAN POTTELSBERGHE, C.; VAN GLABBEKE, M., et al. Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult—an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. **Eur J Cancer** 29A, 208–209, 1993b.