UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

LARISSA KIM HIGASHI DE CARVALHO

**Avaliação dos efeitos pró apoptóticos da fosfoetanolamina sintética e da
formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma
espinocelular de cavidade oral**

São Paulo

2017

LARISSA KIM HIGASHI DE CARVALHO

**Avaliação dos efeitos pró apoptóticos da fosfoetanolamina sintética e da
formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma
epinocelular de cavidade oral**

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

Nome: CARVALHO, Larissa Kim Higashi de

Título: Avaliação dos efeitos pró apoptóticos da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma espinocelular de cavidade oral

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à minha mãe, à minha Bá (batchan) e ao meu noivo. Sem vocês este trabalho não existiria!

AGRADECIMENTOS

À Deus que iluminou meus caminhos durante a realização deste trabalho e me permitiu chegar até aqui.

À minha mãe, mulher batalhadora e exemplo de força. Agradeço a educação e formação que me proporcionou em meio a tantas dificuldades.

Ao meu noivo, Rodrigo, que esteve ao meu lado em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, me apoiando no que fosse possível.

A toda a minha família, que sempre me incentivou a continuar estudando.

Ao Professor Durvanei Augusto Maria, pela oportunidade e paciência de ensinar uma cirurgiã-dentista como trabalhar em um laboratório. Além da dedicação e orientação em todas as etapas deste projeto, sou uma pessoa melhor após conviver diariamente com o senhor.

Aos meus queridos amigos de laboratório, Manuela, Antenor, Aline, Thaís e Arthur por toda ajuda, conselhos, conversas e risadas que tornaram o nosso convívio mais produtivo, feliz e harmonioso. Este trabalho também é de vocês!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

RESUMO

Carvalho, LKH. **Avaliação dos efeitos pró apoptóticos da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma espinocelular de cavidade oral [dissertação]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Os carcinomas de cabeça e pescoço correspondem a 10% de todos dos tumores malignos, destes aproximadamente 40% se manifestam na boca e 90% correspondem ao carcinoma espinocelular. Os principais agentes carcinogênicos relacionados ao câncer bucal são o tabaco e o álcool. A cirurgia é o tratamento de eleição para o carcinoma de boca seguido dos tratamentos quimio e radioterápicos. O uso de lipossomas como vetor de quimioterápicos abre grandes perspectivas para o tratamento do câncer, pois possibilitam maior eficácia, reduzindo a toxicidade e a dosagem do fármaco. Neste projeto foram avaliados os efeitos pró apoptóticos “*in vitro*” da fosfoetanolamina sintética (FOS) e da sua formulação lipossomal DODAC/FOS em duas linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua humano, SCC-9 e SCC-25. A FOS, a formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio apresentam diferentes significados em seu potencial citotóxico. A FOS aumentou significativamente a formação de lipoperóxidos pela membrana celular nas maiores concentrações estudadas. A análise das fases do ciclo celular mostrou aumento significativo da população de células com DNA fragmentado em ambas as linhagens celulares induzindo a morte celular por apoptose com aumento da expressão de Bad, Bax, citocromo c e diminuição de Bcl-2, como também alterou o potencial elétrico mitocondrial promovendo a ativação da caspase-3. A FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS induziram retração dos filamentos de actina e fragmentação do DNA. O conjunto de resultados mostra que o composto FOS e a sua formulação lipossomal DODAC/FOS atuam nos efeitos citotóxicos e antitumoral promovidos por estes alquilfosfoésteres, sendo capazes de induzir a morte celular por apoptose em diferentes apresentações.

Descritores: Neoplasias bucais. Carcinoma espinocelular (CEC) de língua. Fosfoetanolamina sintética (FOS). Apoptose.

ABSTRACT

CARVALHO, L.K.H. **Evaluation of pro apoptotic effects of synthetic phosphoethanolamine and DODAC/FOS liposomal formulation in oral cavity squamous cell carcinoma cells [dissertation]**. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Head and neck carcinomas account for 10% of all malignant tumors, approximately 40% of these tumors manifest in the mouth and 90% correspond to squamous cell carcinoma. The main carcinogenic agents related to oral cancer are tobacco and alcohol. Surgery is the treatment of choice for oral carcinoma followed by chemo and radiotherapeutic treatments. The use of liposomes as a vector of chemotherapy offers great prospects for treatment of cancer, as they allow greater efficacy, reducing the toxicity and the dosage of drug. In this project, in vitro pro apoptotic effects of synthetic phosphoethanolamine (Pho-S) and DODAC/Pho-S liposomal formulation were evaluated in two human tongue squamous cell carcinoma cell lines, SCC-9 and SCC-25. Pho-S, DODAC/Pho-S liposomal formulation and the empty DODAC carrier have different meanings in their cytotoxic potential. Pho-S significantly increased the formation of lipoperoxides by cell membrane in higher concentrations studied. Analysis of the cell cycle phases showed a significant increase in the cell population with fragmented DNA in both cell lines inducing apoptosis cell death with increase expression of Bad, Bax, cytochrome c and decrease of Bcl-2, as well as altered the potential mitochondrial activation promoting caspase-3 activation. Pho-S and the DODAC/Pho-S liposomal formulation induced retraction of the actin filaments and DNA fragmentation. The set of results shows that the Pho-S compound and its liposomal formulation DODAC/Pho-S act on the cytotoxic and antitumor effects promoted by these alkylphosphoesters, being able to induce cell death by apoptosis in different presentations.

Descriptors: Mouth Neoplasms. Squamous cell carcinoma (SCC) of tongue. Synthetic phosphoethanolamine (Pho-S). Apoptosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Câncer Bucal.....	9
1.2. Tratamento Câncer Bucal.....	12
1.3. Fosfolipídios Antitumorais.....	19
1.4. Mecanismo de Ação dos Fosfolipídios Antitumorais.....	21
1.5. Fosfoetanolamina Sintética.....	23
1.6. Nanocarreadores.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos Gerais.....	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Preparação dos lipossomas de DODAC/FOS.....	30
3.2. Cultura Celular.....	30
3.3. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e determinação da IC50%.....	31
3.4. Determinação de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados.....	32
3.5. Análise da Senescência	33
3.6. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo.....	34
3.7. Determinação da proporção de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo (Anexina V/PI).....	35
3.8. Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo	36
3.9. Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) por citometria de fluxo	37
3.10. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) por microscopia confocal a laser	38
3.11. Análise das alterações morfológicas do citoesqueleto por microscopia confocal a laser	38
3.12. Marcação de lisossomos através do fluorocromo laranja de acridina por microscopia confocal a laser	39

3.13.	Análise Estatística	40
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Avaliação dos efeitos citotóxicos e determinação da IC50% em células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9 e SCC-25).....	41
4.2.	Análise de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados	48
4.3.	Análise da indução de senescência em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25	51
4.4.	Efeitos da FOS, da formulação lipossomal DODAC/FOS e do DODAC vazio nas fases do ciclo celular das células de carcinoma espinocelular de língua humana SCC-9 e SCC-25.....	59
4.5.	Avaliação da proporção de células apoptóticas e necróticas	68
4.6.	Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular programada e na progressão tumoral.....	76
4.7.	Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	89
4.8.	Análise das alterações morfológicas do citoesqueleto das células SCC-9 e SCC-25 por microscopia confocal a laser.....	95
4.9.	Análise da indução de autofagia pela marcação com laranja de acridina (AO) por microscopia confocal a laser	98
5.	DISCUSSÃO	101
6.	CONCLUSÃO	127
7.	BIBLIOGRAFIA.....	129

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Bucal

O câncer bucal é um distúrbio neoplásico da cavidade oral que inclui as seguintes áreas loco regionais: lábio, mucosa bucal, rebordos alveolares superior e inferior, região retromolar, assoalho bucal, palato duro e língua. Os carcinomas de cabeça e pescoço correspondem a 10% de todos dos tumores malignos, destes aproximadamente 40% se manifestam na boca e 90% correspondem ao carcinoma espinocelular (CEC). Há uma estimativa de 686.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço e 376.000 mortes relacionadas por ano em todo o mundo. O câncer bucal é a neoplasia mais comum da cabeça e pescoço, a maioria dos pacientes são diagnosticados com a doença locorregional, enquanto 10% dos pacientes já são diagnosticados com metástases (JU AHNA et al., 2016; CHEN et al, 2013; HILLBERTZ et al., 2012; SCULLY et al., 2006; GRIMALDI et al., 2005; ALVES et al., 2004 ;).

Os cânceres orais têm sido uma das principais causas de morte em particular nos países em desenvolvimento. A principal razão para essa alta morbidade e mortalidade é atribuída à demora no diagnóstico e tratamento imediato (JUREL et al., 2014).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou para os anos de 2016 e 2017, 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800. São estimados 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade

oral em homens é o 4º mais frequente na região Sudeste. Nas regiões Nordeste e Centro-Oeste ocupa a 5ª posição. Na região Sul ocupa a 6ª posição, e na região Norte é o 7º mais frequente. Para as mulheres é o 9º mais frequente na região Nordeste. Na região Sudeste ocupa a 10ª posição. Nas regiões Norte e Centro-Oeste é o 12º mais frequente, e na região Sul ocupa a 15ª posição (INCA: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>).

Os principais fatores de risco relacionados ao câncer bucal são o tabagismo e o consumo de álcool, fatores presentes em 90% dos casos e que possuem efeito sinérgico. É evidente que o risco de desenvolver o câncer bucal está relacionado com a intensidade e duração do consumo de álcool e tabaco (RIVERA, 2015; HILLBERTZ et al., 2012; HIROTA et al. 2008; GILLISON, 2007; ALVES et al., 2004).

Como exemplo do efeito sinérgico, podemos observar que o risco de desenvolver câncer bucal por conta do consumo de grandes quantidades de álcool (> 5 doses por dia) acompanhado por cigarros (> 20 por dia) é 13 vezes maior do que o esperado com base nos efeitos independentes do mesmo montante de álcool ou tabaco consumidos separadamente (GILLISON, 2007).

Os elementos químicos presentes na fumaça do cigarro diminuem a imunidade da cavidade oral, promovendo a gengivite, periodontite e o câncer oral (RIVERA, 2015). Esta fumaça contém vários elementos que atuam tanto como iniciadores quanto como promotores da carcinogênese e que, basicamente, podem ser agrupados em três grupos distintos: nitrosaminas, benzopirenos e as aminas aromáticas. Estes produtos químicos são

carcinogênicos e sofrem alterações coordenadas por enzimas oxidativas, de modo que o produto final se torne um agente pobre em elétrons e que pode ser ligado covalentemente ao DNA, gerando mutação em sequências alvo. A oxidação enzimática ou metabolismo não enzimático também pode produzir substâncias cancerígenas, tais como radicais livres, que têm elétrons desemparelhados que os tornam extremamente reativos sendo capazes de promover mutações por mecanismos complexos. O risco de desenvolver câncer bucal por conta do tabagismo continua sendo significativo até cerca de cinco anos após o indivíduo parar de fumar (RIVERA, 2015; CHEN et al., 2013; HILLBERTZ et al., 2012; SEITZ et al., 2007; GILLISON, 2007; SCULLY et al., 2006).

O álcool pode atuar tanto como um fator de risco local quanto como um fator de risco sistêmico: aumentando a permeabilidade da mucosa oral, dissolvendo componentes lipídicos do epitélio, causando a atrofia do epitélio e interferindo na síntese e reparação do DNA através da produção do acetaldeído, um metabólito do álcool; ele também tem efeitos genotóxicos e mutagênicos, causando diminuição do fluxo salivar, afetando a capacidade do fígado de metabolizar os compostos tóxicos ou potencialmente carcinogênicos. O consumo crônico do álcool está associado a disfunção da imunidade inata e adquirida, resultando em aumento da susceptibilidade às infecções e neoplasias (CHEN et al., 2013; HILLBERTZ et al., 2012; REIDY et al., 2011; GILLISON, 2007; SEITZ et al., 2007; SCULLY et al., 2006).

Além dos agentes carcinogênicos principais temos as lesões cancerizáveis, que podem progredir para um tumor maligno. Algumas dessas

lesões cancerizáveis são: as eritroplasias (lesão com maior probabilidade de evoluir para um carcinoma), as leucoplasias, a queilite actínica (vista principalmente no lábio inferior), o líquen plano (principalmente o tipo erosivo) e a fibrose submucosa (ocorre pelo hábito de mascar betel) (MESSADI, 2013).

O câncer bucal é uma doença agressiva e letal, sem melhorias significativas na sobrevida global nas últimas décadas. Esta neoplasia oral desenvolve-se através de numerosos desequilíbrios moleculares que afetam genes-chave e vias de sinalização. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese e progressão dos tumores orais ainda não foram totalmente determinados. O estágio da doença atribuído no diagnóstico permanece como o indicador prognóstico mais importante para o CEC de boca. Assim, a taxa de sobrevida de 5 anos para cânceres no estágio I é de quase 80%, enquanto que para os cânceres em estágio IV essa taxa diminui para quase 20% (RIBEIRO et al., 2016).

A carcinogênese é um processo complexo, no qual eventos genéticos dentro de vias de transdução de sinal que regem a fisiologia celular normal são subvertidos ou alterados, resultando na melhora da capacidade de proliferação celular, crescimento descontrolado, invasão local e formação de metástases para locais distantes. (KRISHNA et al., 2015).

1.2. Tratamento Câncer Bucal

O carcinoma espinocelular de boca apresenta uma taxa de sobrevivência de até 80%, se for detectado na fase inicial (T1), mas se for

detectado em fases posteriores (T3 - T4) a taxa de sobrevivência diminui para 20 - 30% (DUMACHE et al., 2015).

Geralmente é necessária uma abordagem multidisciplinar, envolvendo cirurgiões, médicos oncologistas e radioterapeutas, bem como dentistas, nutricionistas e terapeutas de reabilitação para o planejamento do tratamento ideal e manejo dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A possibilidade de um segundo tumor primário deve ser considerada durante a avaliação diagnóstica dos casos de câncer de cabeça e pescoço, bem como durante a preservação. Os objetivos do tratamento são, não só para melhorar os resultados de sobrevivência, mas também para preservar a função do órgão. Estes cânceres são geralmente tratados com uma combinação de cirurgia, radioterapia, e quimioterapia (ERNANI & SABA, 2015).

Os pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentam desafios únicos devido à proximidade de muitas estruturas críticas que podem ser danificadas pelo tumor ou pelo tratamento. As decisões do plano de tratamento devem ser baseadas na probabilidade de cura, bem como nos déficits estruturais, estéticos e funcionais resultantes, que podem ter um impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes (RATHOD et al., 2015).

A escolha do tipo de tratamento (cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia) está relacionada ao estadiamento clínico e ao grau de diferenciação histopatológico do tumor. A cirurgia para ressecção do tumor primário deve incluir sempre toda a lesão tumoral e uma margem de tecido livre de tumor em todas as dimensões (BRENER et al., 2007).

A reconstrução dos defeitos após ressecção do câncer oral é um desafio por conta do papel crítico desta área tanto estética quanto funcionalmente. A ressecção radical afeta todas as funções orais, e pode resultar em problemas subsequentes. A cavidade oral tem muitas funções diferentes, incluindo mastigação, deglutição, produção de saliva, fala, respiração e contatos interpessoais, como beijar, o déficit funcional leva a mudanças drásticas na qualidade de vida dos pacientes (YANG et al., 2015).

Pacientes em fase clínica inicial (fases I e II), são geralmente tratados com cirurgia ou radioterapia, com controle da doença e excelente taxa sobrevida à longo prazo. Já em pacientes com a doença mais avançada, em estádios III e IV, o regime de tratamento principal consiste em cirurgia e/ou radioterapia, com ou sem quimioterapia (JIE et al., 2013) . Enquanto os pacientes com câncer metastático de cabeça e pescoço são mais susceptíveis a serem tratados com quimioterapia paliativa (LAL et al., 2013).

A radioterapia primária, com ou sem quimioterapia, vem sendo cada vez mais administrada nos tumores primários para melhorar os resultados locorregionais. Diferentes regimes fracionados alterados de radioterapia e quimioterapia foram testados e têm mostrado benefício na melhoria da sobrevivência, porém à custa do aumento da toxicidade (FELICE et al., 2015).

A radioterapia melhorou com a diminuição da exposição à radiação dos tecidos normais com o uso da terapia de radiação de intensidade modulada (IMRT), que atinge o tumor, mas poupa parcialmente os tecidos saudáveis circundantes. No entanto, os efeitos adversos agudos e tardios continuam sendo uma preocupação importante no tratamento dos pacientes com câncer

de cabeça e pescoço. Os efeitos adversos agudos podem ser intensos e debilitantes, mas geralmente desaparecem ao longo do tempo. Por outro lado, eventos adversos tardios podem ser mais problemáticos porque podem ser permanentes. A osteorradionecrose, xerostomia, trismo, disfagia, cárie por radiação, dor neuropática e a drenagem crônica podem deixar os pacientes física e emocionalmente incapacitados (BUGLIONE et al., 2016).

Dada à heterogeneidade do câncer de cabeça e pescoço, o tratamento de pacientes com a doença avançada é um desafio clínico. Apesar de terem sido feitos vários esforços para melhorar os resultados, o prognóstico continua ruim, com uma taxa de sobrevida global de 5 anos em 30-35%. Algumas alterações no regime quimioterápico em combinação com a radioterapia conduziram a melhora no controle locorregional e, em alguns casos, a sobrevivência mais prolongada, como a adição de cisplatina na radioterapia fracionada convencional, a modificação do cronograma do tratamento com radioterapia ou a utilização de agentes específicos, como o cetuximab que é um anticorpo monoclonal quimérico humano murino que compete na ligação ao domínio extracelular do EGFR (*epidermal growth factor receptor*) prevenindo a sua ativação por ligantes endógenos (BERGAMINI et al., 2016; BUGLIONE et al., 2016).

A introdução da terapia alvo com o cetuximab (Erbix®) na prática clínica foi um grande avanço. No entanto, nem todos os pacientes tratados com cetuximab respondem bem à terapêutica devido à resistência primária ou adquirida, limitando significativamente o benefício clínico desta droga (BUGLIONE et al., 2016).

A cisplatina é um dos fármacos mais amplamente utilizados para o tratamento dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. No entanto, seus efeitos colaterais nefrotóxicos e ototóxicos continuam sendo grandes limitações clínicas. Embora a ligação da cisplatina ao DNA seja o principal mecanismo citotóxico nas células tumorais em proliferação, a nefrotoxicidade e ototoxicidade parecem resultar de níveis tóxicos de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a desregulação de proteínas (KARASAWA et al., 2015).

A quimioterapia associada à radioterapia é recomendada no estágio III e IV da doença. O tipo de droga sistêmica é individualizada com base na comorbidade do paciente. Normalmente carboplatina (AUC 5) ou cetuximab (semanal de 250 mg/m², dose de ataque 400 mg/m²) é usado quando a cisplatina (dia 100 mg / m² 1-29) é contra indicada (FELICE et al., 2015). O protocolo padrão para pacientes com extensões extracapsulares e lesões ressecadas com margens cirúrgicas positivas é a radioterapia adjuvante concomitante com três doses elevadas de cisplatina (100 mg / m² nos dias 1, 22 e 43) (GEIGER et al., 2014).

O tratamento com quimioradioterapia concomitante tem melhorado a sobrevida dos pacientes em relação ao tratamento com a radioterapia (RT) isolada. A cisplatina de dose elevada concomitante a radioterapia (100 mg / m² nos dias 1, 22 e 43 durante a RT) foi identificada como o regime mais eficaz para o tratamento de pacientes aptos com a doença locoregionalmente avançada (JU AHNA et al., 2016).

A administração de altas doses de cisplatina é um regime intensivo com toxicidade de curto e longo prazo, incluindo náuseas, vômitos, citopenias,

ototoxicidade, nefrotoxicidade, e neuropatia. Muitos pacientes não são elegíveis para receber quimiorradioterapia com alta dose de cisplatina devido à presença de co-morbididades ou baixa capacidade de desempenho (GEIGER et al., 2014; JU AHN et al., 2016).

Tradicionalmente, os regimes de cisplatina em altas doses têm sido substituídos por regimes alternativos, quando o paciente possui contraindicação para a dose mais elevada. Embora, esquemas alternativos usando cisplatina semanal (30-40 mg / m² / semana) ou diariamente (6 mg / m² / dia) tenham sido estudados, na prática não se sabe se estes regimes alternativos são equivalentes ou inferiores a cisplatina em doses elevadas. O regime alternativo mais comum, cisplatina semanal, é mais bem tolerado com um perfil de efeitos colaterais mais favoráveis (GEIGER et al., 2014).

A recidiva loco-regional no sítio primário e metástase em linfonodos cervicais são as principais causas de falha do tratamento em pacientes com CEC de boca (JERJES et al., 2010).

Em fase avançada do CEC, o tumor primário e os linfonodos metastáticos frequentemente contêm regiões de muito baixa concentração de oxigênio e muitas vezes áreas de necrose circundante. É um consenso que esta mudança na hipóxia do CEC está relacionada com o seu mecanismo de resistência contra o tratamento antitumoral (CHENG CHEN et al., 2015).

A necrose tumoral no sítio primário e nos linfonodos metastáticos são frequentemente encontradas em pacientes com a doença avançada. Para esses pacientes, o tratamento atual sugere cirurgia além de quimiorradioterapia

adjuvante pós-operatória. Infelizmente, mesmo após este tratamento, a taxa de sobrevida dos pacientes com doença avançada ainda não é satisfatória. Os tumores desses pacientes podem ser radioresistentes e/ou quimiorresistentes, levando a piores resultados frente ao tratamento. Em geral, as alterações que resultam em hipóxia nos tumores mostram associações significativas com radio e quimioresistência. Além disso, essas células tumorais estão distantes de vasos sanguíneos e por isso não são adequadamente expostas a alguns tipos de drogas antitumorais (CHENG CHEN et al., 2015).

A radioterapia é uma modalidade de tratamento importante no câncer de cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma espinocelular de boca, matando efetivamente as células neoplásicas causando danos ao DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, as células neoplásicas com capacidade antioxidante para escapar dos efeitos deletérios da radiação por eliminação ROS, levam à radioresistência, que continua sendo um grande obstáculo clínico para a cura do CEC de boca (MATSUOKA et al., 2016).

Em estágio avançado (estádio IV) da doença, as abordagens multidisciplinares não cirúrgicas estão sendo usadas com maior frequência para melhorar o controle da doença, prolongar a sobrevivência, e manter uma qualidade de vida aceitável para os pacientes. Os efeitos tóxicos a curto e longo prazo da terapia de combinação para a cavidade oral são significativos. Mesmo quando a melhor combinação de abordagens cirúrgicas e não cirúrgicas é usada, mais do que 50% dos pacientes com CEC terá recidiva, localmente nos gânglios linfáticos regionais, ou num local distante. Além disso,

o CEC recorrente e com metástases distantes tem prognósticos particularmente ruins. Independentemente da localização ou da fase do CEC são necessárias terapias mais eficazes (CHOI & MYERS, 2008).

1.3. Fosfolipídios Antitumorais

No final da década de 1960, um grupo de pesquisadores alemães composto por Hansjorg Eibl, Dieter Arnold, Huns Ulrich Weltzien e Otto Westphal do Instituto de Max-Planck, Freiburg-Zahringer, Alemanha, identificaram o primeiro análogo metabolicamente estável da lisofosfatidilcolina (LisoFC). Esta descoberta da possível obtenção de LisoFC na forma sintética possibilitou a avaliação dos seus efeitos sobre a modulação do sistema imunológico *in vitro* e *in vivo*. Ainda no final dos anos 60, a estrutura química desses análogos foi modificada e houve a substituição da ligação éster por éter na região que liga o glicerol à cadeia de hidrocarbonetos, melhorando a estabilidade química destes compostos e tornando-os resistentes às enzimas acetiltransferase e lisofosfolipase (EIBL et al., 1967).

Os alquilfosfolipídios são um grupo de análogos metabolicamente estáveis da LisoFC e são classificados de acordo com a sua estrutura molecular em alquillisofosfolipídio ou alquilfosfocolina. A primeira geração de alquilfosfolipídios é distinguida por ligações éter nas cadeias laterais alifáticas a um esqueleto de glicerol, e são conhecidos como alquillisofosfolipídios, ou éter lipídios (VERHEIJ et al., 2014).

Alguns destes análogos éter sintéticos mostraram ser potentes imunomoduladores e, surpreendentemente Munder e colaboradores descobriram que alguns destes éter lipídios exerciam atividades antitumorais *in*

vitro e *in vivo* de forma bastante seletiva (MUNDER et al., 1979; ANDREESEN et al., 1978).

Entre estes análogos sintéticos, o 1-O-octadecil-2-metil-glicero-3-fosfocolina (edelfosina, ET-18- OCH₃) mostrou ter propriedades antitumorais muito eficazes, e rapidamente se tornou o protótipo mais amplamente estudado em ensaios de atividade antitumoral (BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2008). Estudos sobre o potencial citotóxico da edelfosina em células tumorais e normais indicaram efeito antitumoral seletivo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mas apesar destes resultados pré-clínicos encorajadores, a aplicação clínica tem sido decepcionante e limitada ao tratamento de leucemias agudas (VERHEIJ et al., 2014; PACHIONI et al., 2013).

Um segundo alquilfosfolipídio que foi avaliado na clínica é a variante tioéter da edelfosina, 1-hexadecil-tio-2-metoximetil-rac-glicero-3-fosfocolina (ilmofosina BM 41.440,). Embora a ilmofosina tenha mostrado ampla atividade antitumoral em estudos pré-clínicos, não conseguiram demonstrar eficácia clínica significativa. Tanto para ilmofosina quanto para edelfosina, o fator de toxicidade limitante da dose mais frequente foi o distúrbio gastrointestinal, enquanto que a mielossupressão foi encontrada (VERHEIJ et al., 2014; Pachioni et al., 2013).

Em busca de outras moléculas com atividade antitumoral, no final dos anos 80, Eibl e Unger sintetizaram a miltefosina (hexadecilfosfocolina, HepC), um novo análogo que não apresenta o glicerol na sua estrutura (EIBL & UNGER, 1990). A miltefosina tornou-se o protótipo de uma nova classe, chamada alquilfosfocolina, e liderou o caminho na busca de novas moléculas. Da mesma forma que os alquilfosfolipídios sintéticos anteriores, a miltefosina

apresentou *in vitro* atividade antiproliferativa. No entanto, a miltefosina é altamente hemolítica quando administrada por via parenteral (VERHEIJ et al., 2014; PACHIONI et al., 2013). Quando usada como um agente tópico, no entanto, a miltefosina foi efetiva no tratamento de pacientes com linfoma cutâneo e metástases cutâneas de câncer de mama, também é frequentemente usada no tratamento da leishmaniose visceral (EIBL et al., 1990; DUMMER et al., 1993; LEONARD et al., 2001; KHADEM VATAN et al., 2011). No Brasil, a partir de Janeiro de 2017, a aprovação pelo Ministério da Saúde e da Agricultura possibilitou a comercialização do Milteforan® para o tratamento da leishmaniose canina (Nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS).

Devido aos promissores efeitos antitumorais a edelfosina e a miltefosina são os modelos estruturais e protótipos moleculares utilizados na busca de novos alquilfosfolipídios. Posteriormente, foram desenvolvidas duas outras moléculas, a erucilfosfolcolina e seu análogo homocolina. As modificações estruturais feitas nessas moléculas resultaram na redução da atividade hemolítica, e, portanto permitindo a administração intravenosa, que não era possível com os alquilfosfolipídios anteriores (BERGER et al., 1998; KAUFMANN-KOLLE et al., 1996).

1.4. Mecanismo de Ação dos Fosfolipídios Antitumorais

Há cada vez mais interesse na atividade biológica destes análogos lipídicos uma vez que inibem seletivamente o crescimento de células tumorais e poderiam complementar o efeito de quimioterápicos dirigidos ao DNA sem causar efeitos colaterais (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010).

Os alquilfosfolipídios sintéticos diferentemente da maioria dos quimioterápicos usados atualmente não interferem no DNA ou no arranjo do citoesqueleto celular. Em vez disso, devido à sua estrutura química, essencialmente com cabeça polar e uma longa cadeia de hidrocarbonetos apolares, os alquilfosfolipídios antitumorais se inserem facilmente na bicamada lipídica da membrana plasmática. Por apresentar propriedades de um detergente, em concentrações elevadas, ele mesmo é capaz de causar a lise das células. O acúmulo dos alquilfosfolipídios nas membranas celulares tem impacto sobre o metabolismo dos lipídios e das vias de sinalização dependentes de lipídio, levando à inibição da proliferação e indução de apoptose em células tumorais (SEMINI et al., 2014; JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010; BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2008).

Em menores concentrações, os alquilfosfolipídios antitumorais metabolicamente estáveis são inseridos na membrana, interferindo no *turnover* da membrana celular e vias de transdução de sinal à base de lipídios, afetando então a produção de precursores de segundos mensageiros lipídicos, tais como o diacilglicerol, ácido fosfatídico e fosfoinositídeo que, em diversas vias de sinalização e em locais celulares distintos, são essenciais para o funcionamento celular, sobrevivência e proliferação. A interferência com estas vias metabólicas provocaria estresse celular suficiente para iniciar o mecanismo de apoptose (SPRONG et al., 2001).

Os alvos dos alquilfosfolipídios antitumorais podem estar na membrana plasmática, bem como no interior da célula. O alvo molecular mais importante para a inibição da proliferação e/ou indução da morte celular pode depender do

tipo de célula. No entanto, as evidências sugerem que na extensa maioria dos casos os alquilfosfolipídios antitumorais levam a inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e consequentemente a indução de apoptose. Neste caso, o alvo dos alquilfosfolipídios antitumorais seria a inibição da enzima CTP: fosfocolina citidiltransferase (BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2008).

O bloqueio da CTP: fosfocolina citidiltransferase causado pelos alquilfosfolipídios antitumorais leva à inibição da síntese da fosfatidilcolina e do diacilglicerol, que é catalisada pela enzima esfingomielina sintase. Esta por sua vez, está envolvida no metabolismo da esfingomielina e da ceramida, promovendo a conversão de ceramida para esfingomielina na rede trans-Golgi. Com esta redução de atividade, ocorreria acúmulo de ceramida, que é uma molécula comumente associada à indução de apoptose (HUANG et al., 2011).

1.5. Fosfoetanolamina Sintética (FOS)

A fosfoetanolamina foi isolada de tumores malignos bovinos em 1936 por Outhouse, e é um monoéster cujo grupo R corresponde a $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza (OUTHOUSE, 1936). Após seus trabalhos, outros pesquisadores encontraram a fosfoetanolamina em intestinos de ratos e em tecidos cerebrais de bovinos (AWAPARA et al., 1950; FOLSCH et al., 1959).

A fosfoetanolamina endógena é sintetizada por duas rotas biológicas, a primeira corresponde à via clássica de Kennedy utilizando colina e a etanolamina quinase, que são amplamente presentes em células de eucariotos. Estas enzimas catalisam o passo da via Kennedy, que é a fosforilação ATP-dependente na etanolamina, formando fosfoetanolamina. A segunda via de

formação da fosfoetanolamina ocorre por um processo não clássico, utilizando como substrato a esfingosina-1-fosfato (S1P) pela ação da S1P lyase, com a formação do produto final fosfoetanolamina e o hexadecanol (GIBELLINI & SMITH, 2010).

Dhakshinamoorthy et al. (2015) realizaram estudo metabolômico para investigar o processo pelo qual a menaquinona (vitamina K2) exerce atividade antiproliferativa utilizando os níveis de metabólitos nas células tumorais tratadas com menaquinona, quando empregado no modelo de linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat). Um dos metabólitos mais significativamente afetados foi a fosfoetanolamina, que aumentou duas vezes nas células tumorais Jurkat tratadas por 24 horas com menaquinona em comparação com o controle tratado somente com o veículo e após 72 horas observou-se aumento em torno de cinco vezes. A elevação dos níveis de fosfoetanolamina foi observada antes da indução da apoptose, e não foi observada em linfoblastos normais tratados com menaquinona ou nas células tumorais Jurkat tratadas com quimioterápicos, isso indica que o acúmulo de fosfoetanolamina não é apenas um resultado comum de morte celular, mas é específica para o tratamento com menaquinona. O acúmulo de fosfoetanolamina ocorre antes da indução de apoptose, sugerindo que a fosfoetanolamina desempenha um papel fundamental na apoptose. Com base nestas informações, surgiu a hipótese de que a fosfoetanolamina em si pode ter um efeito antiproliferativo. Também foi validada a relação entre a menaquinona e fosfoetanolamina em uma linhagem celular de câncer de

ovário, sugerindo ampla potencialidade e aplicabilidade de seu relacionamento (DHAKSHINAMOORTHY et al., 2015).

O estudo realizado por Meneguelo no ano de 2007 em sua dissertação de mestrado realizada em nosso laboratório observou que a fosfoetanolamina sintética (FOS) apresentou potencial inibitório em células de melanoma murino B16F10, sem causar efeitos sobre as células normais. Além disso, a FOS induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M e aumentou significativamente a população de células em sub-G1, possivelmente em processo de apoptose porque apresentaram DNA fragmentado. Quando comparado ao tratamento com os quimioterápicos comerciais taxol e etoposídeo houve aumento da taxa de sobrevivência dos animais tratados com a fosfoetanolamina sem os efeitos colaterais importantes, como a caquexia e também reduziu drasticamente a formação de metástases. De acordo com os padrões estabelecidos pelo NCI (*National Cancer Institute*) para determinação da concentração inibitória (IC 50%) em células tumorais, com relação à eficácia, a FOS poderia ser classificada como um novo agente antitumoral com efetividade significativa (MENEGUELO, 2007).

Estudos mostraram que a FOS apresenta seletividade e especificidade inibindo a proliferação de células tumorais e sua disseminação, pelo aumento da apoptose através da via mitocondrial. As principais vantagens do tratamento com a FOS são os efeitos antitumorais evidenciados pela regressão do volume tumoral e aumento da taxa de sobrevivência global dos animais tratados (FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2011).

A alteração no metabolismo é uma das características chave do câncer (*hallmarks of cancer*), logo, a compreensão do metabolismo está se tornando um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas antineoplásicas. O desenvolvimento de medicamentos é muitas vezes orientado no sentido de encontrar pequenas moléculas, muitas vezes sintéticas, inibidoras de proteínas. (DHAKSHINAMOORTHY et al., 2015). Neste sentido, destaca-se a FOS, composto utilizado neste estudo.

A biossíntese de fosfolipídios da membrana, incluindo a fosfatidiletanolamina é de grande importância no controle do crescimento celular e na progressão do ciclo celular. A proliferação desregulada é uma característica das células tumorais, assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação das principais enzimas envolvidas na síntese de fosfolipídio pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas e prognósticas. A fosfatidiletanolamina é o lipídio mais abundante nas membranas celulares, exercendo papel importante em processos celulares, tais como, a fusão da membrana, ciclo celular, autofagia e apoptose (PAVLOVIC, 2014).

1.6. Nanocarreadores

Inúmeros trabalhos estão sendo realizados no intuito de melhorar, através do uso de nanocarreadores, os efeitos dos fármacos nos tumores, evitando atingir as células normais. Entre os nanocarreadores, podem ser citados os lipídicos, como os lipossomas e as nanopartículas lipídicas. Os nanocarreadores lipídicos são sistemas biocompatíveis, biodegradáveis e

desprovidos de toxicidade, portanto, com enorme potencial para carrear fármacos citotóxicos (OLIVEIRA et al., 2012).

Os lipídios catiônicos interagem com o DNA carregado negativamente através de interações eletrostáticas e são habitualmente utilizados na terapia gênica. Desde o primeiro a ser utilizado para a terapia gênica em 1987 por Felgner e colaboradores, vários lipídios catiônicos foram sintetizados e utilizados em cultura de células, animais, e pacientes inscritos nas fases I e II de ensaios clínicos. Os lipídios catiônicos são constituídos por uma cabeça catiônica, responsável pela ligação aos grupos fosfato do ácido nucléico, ligada a um grupo hidrofóbico de lipídios (FELGNER et al., 1987; MORILLE et al., 2008).

Exemplos de compostos anfifílicos catiônicos incluem DOTAP (*1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane*), DOTMA (*1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane*), DODAC (*N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride*), DODAB (*Dioctadecyldimethylammonium bromide*) entre outros (ULRICH, 2002).

Estudos vêm demonstrando que os lipossomas catiônicos podem ser utilizados como sistemas de entrega de droga antiangiogênica, devido a sua capacidade de interação seletiva com as células endoteliais associadas ao tumor. Esta ideia tem contribuído para o desenvolvimento de formulações de lipossomas catiônicos associados a drogas, tais como paclitaxel, etoposídeo e a cisplatina (HO et al., 2010; KUNSTFELD et al., 2003; SENGUPTA et al., 2000; LEE et al., 2010).

Em estudo recente realizado por Thakur et al. (2013) utilizando o paclitaxel encapsulado em lipossomas e a miltefosina mostraram efeito sinérgico em células de glioblastoma humano resistentes a agentes quimioterápicos, com liberação destes fármacos e inversão da resistência, demonstrando que a utilização de nanocarreadores como sistemas de administração de fármacos para agentes quimioterápicos pode ser uma alternativa para diminuir a possibilidade de efeitos adversos e maximizar os efeitos terapêuticos dos fármacos encapsulados (THAKUR et al., 2013).

O efeito citotóxico e a seletividade da FOS contra células tumorais podem aumentar com a encapsulação em cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) devido à interação eletrostática entre estes lipossomas e a membrana das células tumorais (LUNA et al., 2016).

Neste projeto analisamos a efetividade da FOS e da formulação com lipossomas do tipo DODAC associado à FOS em melhorar a especificidade do tratamento de células de linhagens de CEC de língua, para avaliar se no futuro será viável a realização de estudos pré-clínicos para que a FOS e a formulação lipossomal possam ser utilizadas como coadjuvante em protocolos de quimioterapia convencional ou de indução para melhorar as condições de redução da carga tumoral e desta forma conduzir outras terapias de ressecção do tumor e assim manter melhores condições estéticas e funcionais dos pacientes acometidos pelo câncer bucal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos pró apoptóticos e os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose induzidos pela FOS e pela formulação lipossomal DODAC/FOS em células de carcinoma espinocelular de língua humano (SCC-9 e SCC-25).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração citotóxica (IC₅₀%) da FOS e da sua formulação lipossomal DODAC/FOS pelo método colorimétrico MTT;
- Determinar a formação dos produtos da peroxidação de lipídios polissaturados induzidos pela FOS;
- Analisar as fases do ciclo celular das células tumorais por citometria de fluxo;
- Analisar a indução de senescência em células tratadas com FOS;
- Determinar por microscopia confocal a laser as alterações morfológicas no citoesqueleto;
- Avaliar a atividade apoptótica das células tumorais através do ensaio de Anequina V/PI por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão de proteínas Bad, Bax, Bcl-2, caspase-3, citocromo-c, p53, receptor de interleucina-6 e TNF-DR4 por citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\psi$).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação dos lipossomas de DODAC/FOS

O DODAC (Sigma-Aldrich Cód.40167) em pó foi pesado e dissolvido em 10 mL de água, de forma a obter-se concentrações de 0,07; 0,15; 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM. Posteriormente, a FOS foi acrescentada a solução na mesma razão molar do DODAC. As dispersões de DODAC/FOS foram colocadas em banho maria à 45°C por 20 minutos. Após este processo, as amostras foram agitadas no vortex até a completa homogeneização, e em seguida sonicadas usando o ultrasonicador BraunSonic 1510, em um recipiente cilíndrico de 15 mL de volume e 2,5 cm de diâmetro. A potência selecionada foi de $\cong 70$ watts de potência, por 3 a 4 minutos. Durante a sonicação as amostras foram mantidas à aproximadamente 60°C. Após a sonicação, as amostras foram filtradas com sistema de filtro de seringa 22 μ m para a retirada dos resíduos de titânio provenientes da ponta do sonicador.

3.2. Cultura Celular

As linhagens celulares do carcinoma espinocelular bucal (SCC-9 e SCC-25) utilizadas neste projeto foram gentilmente cedidas pelo Prof. Décio dos Santos Pinto Júnior (Departamento de Patologia Disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP). As células SCC-9 (ATCC CRL-1629) e SCC-25 (ATCC CCRL-1628) de carcinoma espinocelular de língua, inicialmente obtidas da ATCC foram cultivadas em meio de cultura com uma mistura 1:1 de meio DMEM (Cultilab, Campinas-SP) e meio Ham's F12 (Cultilab, Campinas-SP), contendo 1,2 g/L bicarbonato de sódio, 2,5 mM de L-

glutamina, 15 mM de HEPES e 0,5 mM piruvato de sódio suplementado com 400 ng/ml de hidrocortisona e 10% de soro fetal bovino.

Os frascos de cultura de 75 cm² foram mantidos em estufa para incubação de células, contendo atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem confluência de aproximadamente 90%, as células foram subcultivadas para ampliação, realização de experimentos ou foram congeladas em solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Cód. C6164) em meio de crescimento completo e estocadas em nitrogênio líquido.

3.3.Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e determinação da IC50%

O teste colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazólio brometo] (Sigma Aldrich Cód. M2128) é empregado em *screening* inicial para a identificação de compostos com atividade citotóxica. Este ensaio de redução de tetrazólio é baseado na quantidade de cristais de formazan formados, mensurados através do registo das alterações de absorbância a 540 nm. As células com metabolismo ativo convertem MTT em cristal de formazan que possui coloração roxa. Quando as células estão inviáveis, perdem a capacidade de converter MTT em formazan. O mecanismo que permite avaliar a viabilidade celular envolve a atividade das enzimas NADH e NADPH presentes no citoplasma, e da enzima succinato desidrogenase, localizada nas mitocôndrias. Porém, este teste não discrimina o tipo de mecanismo envolvido na redução da viabilidade celular. (VAN MEERLOO et al., 2011; RISS et al., 2015).

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico do MTT. As células foram plaqueadas em quadruplicata na densidade de 10^4 células por poço, em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C . Após o período de incubação as células foram tratadas durante 24 e 48 horas com FOS nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM e tratadas por 72 horas com FOS nas concentrações 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM. O tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio foram realizados no período de 24 horas nas mesmas concentrações equimolares utilizadas na preparação da formulação lipossomal. Após o tratamento com FOS, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em outra placa de 96 poços sob refrigeração de -20°C . Nas placas tratadas foram adicionados 10 μL de MTT (5mg/ml) e 90 μL de meio de cultura incompleto e em seguida incubadas por 3 horas. Após este período, o meio foi removido e acrescentado 150 μL de metanol para dissolver os cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate) com comprimento de onda de 540nm, a determinação da concentração inibitória ($\text{IC}_{50\%}$), os dados obtidos da densidade óptica foram normalizados em relação ao grupo controle não tratado (100%) e posteriormente calculadas a equação da reta considerando-se o valor da concentração molar na função logarítmica ($\log[x]$ mM) utilizando o programa GraphPad Prism 5.

3.4. Determinação de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados

A quantificação da peroxidação de lipídios é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (YANG et al., 2005)

predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica que é medida espectrofotometricamente. Neste experimento foi utilizado o sobrenadante previamente recolhido do teste colorimétrico de MTT. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50µL da referida amostra juntamente com 200µL de ácido tricloroacético - TCA 20% (Sigma Aldrich Cód. T4885), em outra placa foi adicionado 50µL da mesma amostra juntamente com 200µL de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86% (Sigma Aldrich Cód. S388033). As placas foram colocadas em banho-maria 100°C por 20 minutos, seguida de resfriamento a 0°C por 20 minutos, centrifugação a 6000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante das placas foi utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate) com comprimento de onda de 535 nm.

3.5. Análise da Senescência

A senescência das células SCC-9 e SCC-25 foi analisada através do Kit *Senescence β -Galactosidase Staining* (Cell Signaling Technology Cód. 9860). Para tanto, as células SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 10^5 por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS nas concentrações 20, 30, 40, 50 e 60 mM por 24 e 48 horas e com a formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio 0,3 e 0,6 mM por 24 horas. Após o período de tratamento o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x. As células foram fixadas com a solução fixadora fornecida pelo fabricante, foi adicionado 250 µL desta

solução por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Foi adicionado a cada poço 250 μ L da solução de coloração de β -Galactosidase fornecida pelo fabricante. As placas foram vedadas com parafilme para evitar a evaporação, que pode levar a formação de cristais. As placas foram incubadas *overnight* à 37°C em incubadora seca, sem CO₂. Após o período de incubação a solução de coloração de β -Galactosidase foi removida, adicionado 200 μ L de glicerol 70% e as placas foram armazenadas a 4°C até o momento da análise. A análise foi realizada em microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e no programa NIS-Elements F.

O cálculo das células senescentes foi realizado pela contagem das células em média de 10 campos aleatórios e o número de células positivas foi expresso em porcentagem.

3.6. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo

As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de 10⁶ por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS (30 à 60 mM) durante 24 e 48 horas e tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio (0,3 e 0,6mM) por 24 horas. Após o tratamento as células foram ressuspensas em 300 μ L de solução de tripsina (Sigma Aldrich Cód. T3924) a 0,2% à 37°C e bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com SFB 20%. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, e o pellet ressuspensado em 1 mL de “Cold GM” (glicose 6,1 mM; NaCl 137 mM; KCl 4,4 mM; 14 Na₂HPO₄ 1,5 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; EDTA 0,5 mM).

Em seguida, adicionou-se lentamente etanol absoluto (4°C) agitando. As células foram fixadas por 30 minutos. Após este período, foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FAC's Flow, 10 µL de Triton X, 10 µL de iodeto de propídio (PI) (50µg/ml) e 1 µL de RNase-A (0,3mg/ml). As células foram mantidas a temperatura ambiente durante 1 hora, no escuro. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur BD, EUA), no canal de fluorescência FL2-H. Os resultados obtidos demonstraram em qual fase do ciclo celular as células se encontram, sub-G1 (DNA fragmentado), G0/G1, S ou G2/M, os dados foram apresentados em porcentagem.

3.7.Determinação da proporção de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo (Anexina V/PI)

As proporções de células apoptóticas foram detectadas utilizando o teste de externalização da fosfatidilserina marcada com Anexina V, detectando as populações de células com os resíduos da fosfatidilserina expostos em sua superfície. As células necróticas são identificadas utilizando o fluorocromo PI, que penetra nas células com membrana rompida. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do PI. O ensaio foi realizado com o Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Sigma Anldrich Cód. APOAF).

As células de carcinoma espinocelular SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de 10^6 . Após 24 horas, as células foram tratadas com 30 e 60 mM de FOS (24 e 48 horas), 0,3 e 0,6 mM de DODAC e DODAC/FOS (12 horas). Após o tratamento, as células foram lavadas 3 vezes com PBS a 4°C e suspensas por 1 hora em 100 µL de tampão de ligação 1x fornecido pelo fabricante, em seguida foram incubadas com 4

$\mu\text{g/mL}$ de Anexina V (Sigma Aldrich, EUA) por 1 hora e $1,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PI (Sigma Aldrich, EUA) por 20 minutos a 37°C . Posterior a incubação, as células foram centrifugadas 1500 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 200 μL de tampão FAC's Flow. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur da BD® (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8 (Instituto de Scripps, La Jolla, CA, EUA).

3.8. Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Após o tratamento por 24 horas com FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio em diferentes concentrações, as células foram fixadas em tampão FAC's Flow com paraformaldeído 4% por 1 hora e as membranas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1%, por 30 minutos, a 4°C . As suspensões celulares foram lavadas e ressuspensas em 200 μL de tampão FAC's Flow. Em seguida, adicionou-se 1 μg do anticorpo primário específico para as proteínas e receptores discriminados abaixo (Tabela 1). Após 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e adicionou-se o anticorpo secundário marcado, seguido da incubação com o anticorpo anti-IgG humano (Alexa-Fluor® 488 – Life Technologies Cód. Z25402) com albumina do soro bovino (BSA) 0,2%, por 24 horas, a 4°C protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 μL de tampão FAC's Flow. A aquisição dos eventos celulares foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur da BD® (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA), no canal de fluorescência FL2-H (Alexa Fluor 488).

Tabela 1: Anticorpos Primários

Anticorpo Primário	Fabricante
anti-caspase-3	Abcam Cód. ab13847
anti-Bax	Abcam Cód. ab77566
anti-Bad	Abcam Cód. ab32445
anti-p53	Abcam Cód. ab1101
anti-bcl-2	Abcam Cód. ab32124
anti-citocromo c	Abcam Cód. ab13575
anti-receptor interleucina-6 (IL-6R)	Invitrogen Cód. AHR0961
anti-TNF-DR4	Abcam Cód. ab13890

3.9. Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$) por citometria de fluxo

Para a avaliação do potencial elétrico mitocondrial as células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 10^6 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS (30-60 mM) , formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio (0,3 e 0,6 mM) por 24 horas. Após o período de tratamento as células foram recolhidas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 200 μ L de tampão FAC's Flow e incubadas por 30 minutos a 37°C com 15 μ g/mL de rodamina-123 (Sigma Aldrich Cód. R8004). Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão FAC'sFlow. A análise foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur da BD® (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA).

3.10. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$) por microscopia confocal a laser

Para a análise do potencial mitocondrial utilizando a microscopia confocal laser, as células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 10^5 por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com 30 e 60 mM de FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio 0,3 mM, por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas uma vez com meio de cultura DMEM+HAN F12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a 37°C e incubadas com 15 $\mu\text{g/mL}$ de rodamina-123 (Sigma Aldrich Cód. R8004), por 30 minutos no escuro, a 37°C. O excesso de rodamina foi lavado com meio de cultura a 37°C. A preparação das lâminas foi realizada com auxílio de uma pinça e as lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro. A leitura foi feita logo após a preparação das lâminas em microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Alemanha).

3.11. Análise das alterações morfológicas do citoesqueleto por microscopia confocal a laser

A análise das alterações morfológicas do citoesqueleto por microscopia confocal a laser foi realizada utilizando a Faloidina-FITC para marcação dos filamentos de actina e os núcleos das células foram marcados com PI.

As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 10^5 por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS nas concentrações 30 e 60 mM, DODAC/FOS e DODAC 0,3 mM por 24 horas. Após o período de tratamento o

sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes, por 5 minutos cada. A membrana das células foi permeabilizada com Triton X-100 0,1% em temperatura ambiente por 15 minutos. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi feito com PBS+BSA 1%+ RNase (100ug/mL), por 40 minutos à 37°C. Após o bloqueio as células foram incubadas com Faloidina conjugada com FITC (2ug/mL) (Sigma Aldrich Cód. P5282) por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes, por 5 minutos cada e incubadas com PI (20ug/mL) por 5 minutos. Após a marcação as células foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada com PBS.

A preparação das lâminas foi realizada com auxílio de uma pinça e as lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro. A leitura foi feita em microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Alemanha).

3.12. Marcação de lisossomos através do fluorocromo laranja de acridina por microscopia confocal a laser

As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 10^5 por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60mM, formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio 0,3 mM por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura DMEM+HAN F12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a 37°C e incubadas com 10 µg/mL de laranja de acridina (One Lambda Inc. Cód. FQAE100), por 15 minutos no escuro, a 37°C. O

excesso do fluorocromo foi lavado com meio de cultura a 37°C. As lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro, com o auxílio de uma pinça e fixadas com ProLong®. A leitura foi feita em microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Alemanha).

3.13. Análise Estatística

Os valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle foram expressos em média $\pm$ desvio (DP). A análise dos dados para identificar as diferenças estatísticas entre as medidas dos grupos estudados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Os gráficos foram obtidos através dos programas GraphPad Prism 5.0, ModFit 3.2 e WinMDI 2.8. Os dados foram considerados significantes quando o valor de p foi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos efeitos citotóxicos e determinação da IC50% em células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9 e SCC-25)

O ensaio colorimétrico de MTT foi realizado a fim de se calcular os valores da concentração inibitória (IC50%) da FOS, da formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC em diversas concentrações e por diferentes tempos de tratamento nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25.

Os resultados demonstraram que após 24 horas de tratamento a FOS, induz citotoxicidade significativa nas células tumorais SCC-9 a partir de 30 mM, tendo a IC50% calculada de 82,7mM (R^2 0,8567) (Figura 1 A), já a viabilidade das células tumorais SCC-25 é reduzida significativamente a partir de 60 mM e a IC50% calculada de 79,2 mM (R^2 0,9168) (Figura 1 B). A IC50% de ambas as linhagens celulares diminuíram conforme o tempo de tratamento de 48 a 72 horas. Após 48 horas a IC50% foi de 34,7 Mm (R^2 0,9423) nas células tumorais SCC-9 (Figura 2 A) e 35,7 mM (R^2 0,9792) (Figura 2 B) nas células tumorais SCC-25. O tratamento de 72 horas obteve IC50% de 3,8 mM (R^2 0,5874) (Figura 3 A) e 8,3 mM (R^2 0,7964) (Figura 3 B) nas células SCC-9 e SCC-25, respectivamente. Demonstrando o seu potencial citotóxico em função do tempo de tratamento.

Os lipossomas DODAC vazios também foram avaliados quanto sua capacidade de induzir citotoxicidade e mostraram ser citotóxicos em todas as concentrações. A IC50% das células SCC-9 (Figura 4 A) e SCC-25 (Figura 5 A) após 24 horas de tratamento foi de 0,10 (R^2 0,9263) e 0,15 mM (R^2 0,1524), respectivamente. Por outro lado, a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,07 –

2,0 mM), após 24 horas de tratamento também apresentou citotoxicidade significativa, o valor de IC50% obtido para a linhagem SCC-9 foi 0,44 mM (R^2 0,9375) (Figura 4 B) e para linhagem SCC-25 foi 0,27 mM (R^2 0,9902) (Figura 5 B).

O efeito de citotoxicidade causada pela FOS foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento, as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As células tumorais SCC-9 e SCC-25, tratadas com as diferentes concentrações da FOS (20 – 60 mM), apresentaram perda da morfologia fusiforme, retração citoplasmática, presença de debri, bem como de aglomerados celulares no sobrenadante (Figuras 6, 7,8 e 9).

Figura 1 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais SCC-25 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores normalizados em escala logarítmica.

Figura 2 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais SCC-25 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores normalizados em escala logarítmica.

Figura 3 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células SCC-9 após 72 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais SCC-25 após 72 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). Grau de significância estatística *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores normalizados em escala logarítmica.

Figura 4 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com DODAC/FOS (0,07 – 2,0 mM); (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais SCC-9 após 24 horas de tratamento com DODAC (0,07 – 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores normalizados em escala logarítmica.

Figura 5 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com DODAC/FOS (0,07 – 2,0 mM); (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais SCC-25 após 24 horas de tratamento com DODAC (0,07 – 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. Os gráficos no quadrante superior direito representam os valores normalizados em escala logarítmica.

Figura 6 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. Aumento 10x. No controle é possível observar a morfologia celular fusiforme. Nas células tratadas ocorre diminuição da densidade celular, presença de debris celular (seta branca) e perda da morfologia fusiforme.

Figura 7 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. Aumento 10x. Observa-se a morfologia fusiforme das células no controle. Presença de debri (seta branca) e diminuição da densidade celular.

Figura 8 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. No controle é possível observar as células confluentes. Nas células tratadas a partir de 20 mM é possível observar a presença de debri celular (seta branca) e alteração da morfologia nas maiores concentrações de FOS.

Figura 9 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. Aumento 10x. As células tratadas com FOS demonstram diminuição da densidade celular, alteração da morfologia celular e presença de debri (setas brancas).

4.2. Análise de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) pelas células tumorais SCC-9 e SCC-25, foi avaliada no sobrenadante das culturas celulares após 24, 48 e 72 horas de tratamento com FOS para a

quantificação da formação de radicais livres formados à partir da peroxidação dos lipídios das membranas celulares e liberação de malondialdeído.

O tratamento de 24 horas com a FOS resultou no aumento significativo da formação de radicais peroxidados lipídicos das membranas celulares das células tumorais SCC-9 (Figura 10 A) e SCC- 25 (Figura 10 B) a partir das concentrações de 60 e 70 mM de FOS, respectivamente. Há um aumento significativo após 48 horas de tratamento, onde as células tumorais SCC-25 (Figura11 B) apresentam uma maior produção a partir de 60 mM e as células tumorais SCC-9 (Figura 11 A) a partir de 70 mM de FOS. O tratamento de 72 horas com a FOS resultou em aumento significativo a partir de 50 mM em ambas as linhagens tumorais (Figura 12 A e B).

Figura 10 - Análise da produção de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados produzidos por células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25. O gráfico mostra a correlação da produção expressa em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. **(A)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-9 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-25 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). Grau de significância estatística * $p<0.05$ e *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 11 - Análise da produção de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados produzidos por células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25. O gráfico mostra a correlação da produção expressa em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. **(A)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-9 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-25 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 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 comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 12 - Análise da produção de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados produzidos por células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25. O gráfico mostra a correlação da produção expressa em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=4$. **(A)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-9 após 72 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); **(B)** Média $\pm$ DP da produção de lipídios polissaturados pelas células SCC-25 após 72 horas de tratamento com FOS (10 – 100 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 comparações múltiplas de Dunn's.

4.3. Análise da indução de senescência em células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25

A análise da senescência das células tumorais SCC-9 e SCC-25 induzida pela FOS foi avaliada após o tratamento com FOS (20 - 60 mM) por 24 e 48 horas, com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e com DODAC vazio (0,3 e 0,6 mM) por 24 horas.

Através das fotomicrografias das células tumorais SCC-9 após 24 e 48 horas de tratamento com a FOS foram determinadas as porcentagens de células positivas, coradas em azul. Foi observado que no grupo controle existem poucas células positivas e o tratamento com a FOS induziu a diminuição das células positivas em todas as concentrações do composto após 24 e 48 horas de tratamento (Figura 13 e 14). Esta pequena porcentagem de células positivas não indica que a FOS induza às células tumorais SCC-9 a entrarem em senescência.

Em relação às células tumorais SCC-25 tratadas por 24 horas com FOS, foi possível observar apenas uma marcação sutil no grupo controle, houve diminuição significativa das células positivas tratadas com 50 e 60 mM, ou seja, não há nenhuma evidência de indução de senescência nas células tumorais SCC-25 tratadas por 24 horas (Figura 15). Entretanto, o tratamento de 48 horas mostra marcação evidente no grupo tratado com 20 mM, acompanhada pela diminuição de células positivas nas demais concentrações de FOS em relação ao grupo controle e aos respectivos tratamentos de 24 horas (Figura 16).

Os tratamentos com DODAC/FOS e DODAC vazio em ambas as células tumorais não demonstraram nenhuma evidência de senescência (Figura 17 e

18). A porcentagem da expressão das células em senescência e as comparações estatísticas estão apresentadas na Figura 19.

Figura 13 - Análise da senescência das células SCC-9 após tratamento de 24 horas com a FOS. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FOS (20 – 60 mM) por um período de 24 horas. As células positivas estão em azul.

SCC 9 FOS

Figura 14 - Análise da senescência das células SCC-9 após tratamento de 48 horas com a FOS. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FOS (20 – 60 mM) por um período de 48 horas. As células positivas estão em azul.

Figura 15 - Análise da senescência das células SCC-25 após tratamento de 24 horas com a FOS. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FOS (20 – 60 mM) por um período de 24 horas. As células positivas estão em azul.

Figura 16 - Análise da senescência das células SCC-25 após tratamento de 48 horas com a FOS. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FOS (20 – 60 mM) por um período de 48 horas. As células positivas estão em azul.

SCC 9

Figura 17 - Análise da senescência das células SCC-9 após tratamento com DODAC/FOS e DODAC. As células SCC-9 foram tratadas com 0,3 e 0,6 mM de DODAC/FOS e DODAC por um período de 24 horas. As células positivas estão em azul.

SCC 25

Figura 18 - Análise da senescência das células SCC-25 após tratamento com DODAC/FOS e DODAC. As células SCC-25 foram tratadas com 0,3 e 0,6 mM de DODAC/FOS e DODAC por um período de 24 horas. As células positivas estão em azul.

Figura 19 - Análise da senescência das células SCC-9 e SCC-25 após tratamento com a FOS, DODAC/FOS e DODAC. As células foram tratadas com FOS (20 – 60 mM) por 24 e 48 horas e DODAC/FOS e DODAC por 24 horas. Valores expressos em média $\pm$ DP das células SCC-9 e SCC-25 senescentes após os tratamentos. 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 comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.4.Efeitos da FOS, da formulação lipossomal DODAC/FOS e do DODAC vazio nas fases do ciclo celular das células de carcinoma espinocelular de língua humana SCC-9 e SCC-25

Os efeitos da FOS, da formulação lipossomal DODAC/FOS e o DODAC vazio foram avaliados quanto à sua capacidade de modificar a distribuição das células nas fases do ciclo celular. As células tumorais SCC-9 e SCC- 25 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30, 40, 50 e 60 mM por 24 e 48 horas e tratadas com DODAC/FOS e DODAC vazio nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por 24 horas. As concentrações de tratamento foram determinadas levando em consideração o resultado da citotoxicidade avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT.

As células tumorais SCC-9 tratadas com FOS por 24 horas apresentaram diminuição significativa da porcentagem de células na fase G0/G1 em relação ao grupo controle em todas as concentrações de FOS, com percentuais de 29,9% (30 mM), 23,5% (40 mM), 24,8% (50 mM) e 17,6% (60 mM). Também houve diminuição da população de células na fase S tratadas com FOS (40, 50 e 60 mM) por 24 horas, com valores de 18,5%, 15,2% e 10,4%, respectivamente. Não houve alterações significativas nas porcentagens de células na fase G2/M do ciclo celular. No entanto, as células SCC-9 apresentaram aumento significativo na porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular em relação ao grupo controle em todas as concentrações, apresentando valores de 27,7% (30 mM), 46,9% (40 mM), 47,5% (50 mM) e 62,6% (60 mM) (Figura 20).

Figura 20 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 tratadas com FOS. As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações da FOS (30 – 60 mM) por um período de 24 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

O tratamento das células tumorais SCC-9 por 48 horas com FOS resultou em diminuição significativa na população de células SCC-9 na fase G0/G1 nas concentrações de 30, 40, 50 e 60 mM com percentuais de 22,8%, 16,5%, 16,8% e 18,6%, respectivamente. Além disso, também houve diminuição significativa da fase S em todas as concentrações de tratamento com a FOS, a maior diminuição ocorreu no tratamento de 60 mM, com percentual de 18,1%. O tratamento com FOS também levou ao aumento significativo da população de células tumorais SCC-9 na fase sub-G1,

apresentando percentuais de 38% (30 mM), 44,6% (40 mM), 42,3% (50 mM) e 42,6% (60 mM). Não foi observada nenhuma alteração significativa na fase G2/M do ciclo celular, demonstrando que a atividade antiproliferativa da FOS neste tipo de tumor apresenta efeitos específicos (Figura 21).

Figura 21 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 tratadas com FOS. As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações da FOS (30 – 60 mM) por um período de 48 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

O número de células tumorais SCC-9 na fase G0/G1 do ciclo celular diminuiu significativamente após o tratamento com DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM) tendo percentuais de 31,7%, 21,2%, 26,8% e 22,5%, respectivamente. O tratamento com DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e

DODAC (0,3 e 0,6 mM) também resultou em diminuição da fase S, com valores de 20,2%, 14%, 18,2% e 12,4%, respectivamente. Houve diminuição significativa da fase G2/M do ciclo celular com a formulação lipossomal DODAC/FOS 0,6mM apresentando percentual de 8,2% e DODAC 0,6mM com valor de 4,6%. O tratamento das células tumorais SCC-9 com DODAC/FO-S (0,3 e 0,6 mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM) levaram ao aumento significativo da fase sub-G1 do ciclo celular em relação ao grupo controle, com valores percentuais de 37,2%, 56,6%, 41,3% e 60,5%, respectivamente (Figura 22).

Figura 22 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 tratadas com DODAC/FOS e DODAC. As células tumorais foram tratadas com DODAC/FOS (0,3 e 0,6mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM) por um período de 24 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

A distribuição das células tumorais SCC-25 nas diferentes fases do ciclo celular também sofreu alterações percentuais em relação ao grupo controle. O tratamento de 24 horas com FOS levou à diminuição significativa das células na fase G0/G1 a partir de 30 mM com percentual médio de 45,3%, 38,8% (40 mM), 39% (50 mM) e 10,4% (60 mM). A população de células na fase S aumentou em relação ao controle em todas as concentrações, porém este aumento só foi significativo nas concentrações de 30 e 40 mM, com valores de

39,1% e 42,5%, respectivamente. A fase G2/M aumentou significativamente em relação ao grupo controle apenas com o tratamento de 60 mM de FOS, apresentando valor médio de 31,6%. Além disso, o tratamento por 24 horas das células tumorais SCC-25 com FOS (50 e 60 mM) também levou ao aumento significativo da proporção de células na fase sub-G1, com valores médios de 31,7% e 36%, respectivamente (Figura 23).

Figura 23 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 tratadas com FOS. As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações da FOS (30 – 60 mM) por um período de 24 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

As células tumorais SCC-25 tratadas por 48 horas com FOS apresentaram diminuição significativa da população celular na fase G0/G1 do ciclo celular nas concentrações 40, 50 e 60 mM, com percentual de 17,3%, 17,6% e 16,2%, respectivamente. A proporção de células tumorais SCC-25 na fase S também diminuiu significativamente com o tratamento com FOS (50 e 60 mM) com valor percentual de 25,3% e 12,6 %, respectivamente. O tratamento com 30, 40 e 50 mM por 48 horas resultou na diminuição da fração de células tumorais SCC-25 na fase G2/M do ciclo celular, com percentuais de

10,1%, 6,6% e 12,8%, respectivamente. Houve aumento da proporção de células SCC-25 na fase sub-G1 em todas as concentrações de FOS (30 a 60 mM), apresentando percentuais de 26,1%, 44,2%, 44,1% e 52,1%, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 tratadas com FOS. As células tumorais foram tratadas com diferentes concentrações da FOS (30 – 60 mM) por um período de 48 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. 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 comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

O tratamento das células tumorais SCC-25 com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM) levou a mudanças na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular em relação ao

grupo controle. Entretanto, não foi observada nenhuma mudança significativa no percentual de células na fase G2/M do ciclo celular entre os tratamentos e o grupo controle. O número de células tumorais SCC-25 na fase G0/G1 diminuiu significativamente em relação ao grupo controle após o tratamento com DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM), com percentuais de 24,8%, 16,2%, 32,7% e 19,2%, respectivamente. Não houve alterações significativas nas fases S e G2/M do ciclo celular nas células tumorais SCC-25 tratadas com DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM). No entanto, o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e com o carreador DODAC (0,3 e 0,6 mM) das células tumorais SCC-25 também resultou em aumento significativo do número de células na fase sub-G1, com valores de 52,1%, 61,7%, 45,8% e 62,6%, respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Análise das fases do ciclo celular nas células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 tratadas com DODAC/FOS e DODAC. As células tumorais foram tratadas com DODAC/FOS (0,3 e 0,6mM) e DODAC (0,3 e 0,6 mM) por um período de 24 horas. Os gráficos de barra mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$.

4.5. Avaliação da proporção de células apoptóticas e necróticas

As células tumorais SCC-9 foram tratadas com a FOS (30 e 60 mM) por 24 e 48 horas, com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC vazio (0,3 e 0,6 mM) por 12 horas. Após o período de tratamento, as proporções das células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose foram quantificadas por citometria de fluxo. Houve diminuição

significativa do número de células viáveis em todos os grupos de tratamento em relação aos grupos controle.

O tratamento das células tumorais SCC-9 com FOS (30 e 60 mM) por 24 horas aumentou significativamente o número de células necróticas. A porcentagem de células necróticas foi de 11,2% para o tratamento com a FOS 30 mM e na concentração de FOS 60 mM o percentual de células necróticas foi de 12,2% (Figura 26).

Figura 26: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-9 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por um período de 24 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

O tratamento por 48 horas das células tumorais SCC-9 com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM resultou em aumento da porcentagem de células

em apoptose tardia e necrose, com valor de 50,8% de células em apoptose tardia e 9,5% de células necróticas para o tratamento com a concentração de 30 mM de FOS e 43,7% de células em apoptose tardia e 16,3% de células necróticas para o tratamento com a concentração de 60 mM (Figura 27).

Figura 27: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-9 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por um período de 48 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média ± DP de três experimentos independentes n=2. Grau de significância estatística ***p<0.001, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

As células tumorais SCC-9 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) apresentaram aumento significativo da população celular em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, com percentual de 10,1% de células em apoptose inicial, 16% de células em apoptose tardia e 6,8% de células necróticas para o tratamento com DODAC/FOS 0,3 mM e 14,2% de células em apoptose inicial, 23,2% de células em apoptose tardia e

9,7% de células necróticas no grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/FOS 0,6 mM (Figura 28).

Figura 28: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-9 foram tratadas com DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

O tratamento das células tumorais SCC-9 com DODAC 0,3 e 0,6 mM aumentou significativamente o número de células necróticas, em maior proporção quando comparamos aos outros tratamentos, com valor de 26,7% para o tratamento com a menor concentração e 37% para o tratamento com a maior concentração. Apenas na maior concentração (DODAC 0,6 mM) foi possível observar aumento no número de células em apoptose tardia, apresentando valor percentual de 7,2% (Figura 29).

Figura 29: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-9 foram tratadas com DODAC nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média ± DP de três experimentos independentes n=2. Grau de significância estatística *p<0.05 e ***p<0.001, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

As células tumorais SCC-25 também foram tratadas com a FOS (30 e 60 mM) por 24 e 48 horas, formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e DODAC vazio (0,3 e 0,6 mM) por 12 horas. O tratamento com a FOS por 24 horas levou ao aumento significativo da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, com porcentagens de 9,9% de células em apoptose inicial, 6,9% de células em apoptose tardia e 8,5% de células necróticas para o tratamento com 30 mM e 12,1% de células em apoptose inicial, 7,9% de células em apoptose tardia e 11,7% de células necróticas para o tratamento com 60 mM de FOS (Figura 30).

Figura 30: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-25 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por um período de 24 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

O tratamento das células tumorais SCC-25 com FOS (30 e 60 mM) por 48 horas resultou em aumento significativo da quantidade de células em apoptose tardia, em maior proporção do que os demais tratamentos, com percentual de 35,4% para o tratamento com menor concentração e 46% para o tratamento com maior concentração. Houve aumento das células necróticas em ambas as concentrações, com percentual de 12,6% (30 mM) e 13,6%(60 mM) (Figura 31).

Figura 31: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-25 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por um período de 48 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

As células tumorais SCC-25 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) apresentaram aumento significativo do número de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, com valores de 12,2% de células em apoptose inicial, 18,1% de células em apoptose tardia e 5,4% de células necróticas para o tratamento com 0,3 mM e 15,2% de células em apoptose inicial, 23,9% de células em apoptose tardia e 5,2% de células necróticas para o tratamento com DODAC/FOS 0,6 mM (Figura 32).

Figura 32: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-25 foram tratadas com DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística * $p<0.05$ e *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

O tratamento das células tumorais SCC-25 com o DODAC vazio (0,3 e 0,6 mM) levou ao aumento significativo da quantidade de células em apoptose tardia, apresentando valor de 8,4% na menor concentração e 7% na maior concentração. O número de células necróticas aumentou significativamente e em maior proporção, em relação aos demais grupos de tratamento, com percentual de 23,6% para o tratamento com 0,3 mM e 30,2% para o tratamento com 0,6 mM (Figura 33).

Figura 33: Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma espinocelular SCC-25 foram tratadas com DODAC nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. **(A)** Os *density plots* representativos mostram a distribuição das células em relação à marcação com Anexina V (canal FL1-H) e com o PI (canal FL2-H). **(B)** O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

4.6. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular programada e na progressão tumoral.

As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com FOS 30 e 60 mM, formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio 0,3 e 0,6 mM por 24 horas, e analisadas quanto à ativação da caspase 3 fosforilada, liberação do citocromo c, expressão das proteínas Bad, Bax, p53, Bcl-2 e dos receptores de morte celular DR4 e de interleucina-6 (IL-6).

Os tratamentos foram efetivos em aumentar a expressão da caspase 3 fosforilada nas células tumorais SCC-9, com valores médios de 29,6% e 34,8% FOS (30 e 60 mM), 64,1% e 68,9% DODAC/FOS (0,3 e 0,6 mM) e 20,6% DODAC (0,6 mM), respectivamente (Figura 34 B). Por outro lado nas células tumorais SCC-25 houve aumento significativo da caspase 3 fosforilada, com percentuais de 23,6% e 51,1% FOS (30 e 60 mM), 48,7% DODAC/FOS (0,6 mM) respectivamente (Figura 35 B). Este resultado demonstra que o DODAC vazio 0,6 mM na célula tumoral SCC -9 modula a expressão da caspase 3 fosforilada, porém em menor proporção do que o tratamento com a FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS, enquanto que nas células tumorais SCC-25 o DODAC vazio não demonstrou aumentar a expressão da caspase 3 fosforilada.

Houve aumento na expressão do citocromo c nas células tumorais SCC-9 tratadas com FOS (60 mM) com percentual de 37,9%, formulação lipossomal DODAC/FOS 0,3 mM apresentando 58,8% e 0,6 mM com valor de 66,7% e o carreador DODAC vazio 0,6 mM com 31,4% (Figura 34 D). As células tumorais SCC-25 também apresentaram aumento significativo na expressão de citocromo c, porém somente no tratamento com a maior concentração de FOS, apresentando valor percentual de 45,4% (Figura 35 D).

Figura 34: Modulação da atividade da caspase-3 e do citocromo c pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão da caspase-3 ativa em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão do citocromo c em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 35: Modulação da atividade da caspase-3 e do citocromo c pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão da caspase-3 ativa em relação às com concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão do citocromo c em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

A expressão das proteínas pró apoptóticas Bad e Bax aumentou significativamente tanto nas células tumorais SCC-9 quanto nas células SCC-25 quando tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM. Os valores percentuais das células tumorais SCC-9 para Bad foram de 30,1% e 87,2% (Figura 36 B) e para Bax 31,2% e 49,5% (Figura 36 D), respectivamente. As células tumorais SCC-25 apresentaram porcentagem para Bad de 20,9% (30 mM) e 33,1% (60 mM) (Figura 37 B) e para Bax 25,2% (30 mM) e 27,8% (60 mM) (Figura 37 D). O tratamento com as duas concentrações da formulação lipossomal DODAC/FOS também resultou em aumento destas proteínas em ambos os tipos celulares. As células tumorais SCC-9 apresentaram valores médios para Bad de 26% (0,3 mM) e 56,6% (0,6 mM) (Figura 36 B), as células tumorais SCC-25 apresentaram percentual de 16,2% (0,3 mM) e 27,05% (0,6 mM) (Figura 37 B). A expressão da proteína Bax apresentou percentual de 22,7% (0,3 mM) e 52,1% (0,6 mM) (Figura 36 D) nas células tumorais SCC-9 e 17,8% (0,3 mM) e 34,4% (0,6 mM) (Figura 37 D) nas células tumorais SCC-25 para o mesmo tratamento.

O tratamento com o carreador DODAC vazio não modificou a expressão de Bad e Bax nas células tumorais SCC-9 e SCC-25, não havendo diferença significativa em sua expressão.

Figura 36: Modulação da atividade das proteínas pró apoptóticas Bad e Bax pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bad em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bax em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística $**p<0.01$ e $***p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 37: Modulação da atividade das proteínas pró apoptóticas Bad e Bax pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bad em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bax em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística $*p<0.05$ e $***p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

A expressão da proteína p53 aumentou significativamente nos tratamentos com maior concentração de FOS e da formulação lipossomal DODAC/FOS em ambos os tipos celulares estudados. As células tumorais SCC-9 apresentaram percentuais de 32,8% (FOS 60 mM), 60,1% (DODAC/FOS 0,6 mM) e nas células tumorais SCC-25 os valores percentuais foram de 30,2% (FOS 60 mM), 36,9% (DODAC/FOS 0,6 mM). Não foi observada modificação de p53 nas células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com DODAC (Figuras 38 B e 39 B).

Em relação à expressão da proteína anti apoptótica Bcl-2, podemos afirmar que há diminuição significativa da expressão desta proteína em ambos os tipos celulares estudados e em todos os grupos de tratamento. As células tumorais SCC-9 apresentaram percentuais de 38% (FOS 30 mM), 23,1% (FOS 60 mM), 32% (DODAC/FOS 0,3 mM), 30,1% (DODAC/FOS 0,6 mM), 34,9% (DODAC 0,3 mM) e 15,5% (DODAC 0,6 mM) (Figura 38 D). Os valores das células tumorais SCC-25 foram 33,6% (FOS 30 mM), 21,5% (FOS 60 mM), 40,2% (DODAC/FOS 0,3 mM), 19,1% (DODAC/FOS 0,6 mM), 21,6% (DODAC 0,3 mM) e 21,5% (DODAC 0,6 mM) (Figura 39 D).

Figura 38: Modulação da atividade da p53 e da proteína anti apoptótica Bcl-2 pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão da p53 em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bcl-2 em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 39: Modulação da atividade da p53 e da proteína anti apoptótica Bcl-2 pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão da p53 em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão de Bcl-2 em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística $***p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

A expressão do receptor DR4 (TRAIL) aumentou significativamente no tratamento das células tumorais SCC-9 com a formulação lipossomal DODAC/FOS 0,6 mM e nas células tumorais SCC-25 tratadas com FOS 60 mM, formulação lipossomal DODAC/FOS 0,6 mM (Figura 40 D) e DODAC 0,6 mM (Figura 41 D), os respectivos valores percentuais foram de 48,1%, 35,5%, 27,2% e 27,1%.

A expressão do receptor relacionado à progressão tumoral IL-6 diminuiu significativamente em todos os tratamentos, tanto nas células tumorais SCC-9 quanto nas células tumorais SCC-25. Os valores apresentados pelas células tumorais SCC-9 foram de 55,6% (FOS 30 mM), 29% (FOS 60 mM), de 44,3% tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS 0,3 mM, 48,2% com DODAC/FOS 0,6 mM, 20,7% (DODAC 0,3 mM) e 23,5% (DODAC 0,6 mM) (Figura 40 B). Enquanto que as células tumorais SCC-25 obtiveram positividade percentual de 21,3% (FOS 30 mM), 21,9% (FOS 60 mM), 23,8% (DODAC/FOS 0,3 mM), 32,1% (DODAC/FOS 0,6 mM), 20,6% (DODAC 0,3 mM) e 25,9% (DODAC 0,6 mM) (Figura 41 B).

Os resultados demonstraram que os tratamentos resultam em ativação de vias de apoptose através do aumento da expressão de proteínas pró apoptóticas, inibição da proteína anti apoptótica (Bcl-2) e diminuição da expressão do receptor de progressão tumoral (IL-6). Os resultados mostraram-se significativos quando comparados em relação aos grupos controle não tratados.

Figura 40: Modulação da atividade do receptor de IL-6 e do receptor de morte TRAIL DR4 pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão do receptor de IL-6 em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão do receptor TRAIL DR4 em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 41: Modulação da atividade do receptor de IL-6 e do receptor de morte TRAIL DR4 pela FOS, DODAC/FOS e DODAC avaliada por citometria de fluxo. As células de carcinoma espinocelular de língua SCC-25 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a expressão do receptor de IL-6 em relação às concentrações dos tratamentos. **(C)** *Density plots* representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(D)** O gráfico de barras demonstra a expressão do receptor TRAIL DR4 em relação às concentrações dos tratamentos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística $**p<0.01$ e $***p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

4.7. Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A análise do $\Delta\Psi_m$ foi realizada utilizando a sonda rodamina 123, que possibilita a avaliação do $\Delta\Psi_m$ das células viáveis e metabolicamente ativas por diferentes técnicas, como a microscopia confocal a laser e a citometria de fluxo. A rodamina 123 é um fluorocromo catiônico que possui a capacidade de transpor a membrana mitocondrial, usando como força eletrostática o gradiente negativo da organela, e incorpora-se em seu interior, emitindo alta fluorescência em células viáveis. Em células em apoptose, especificamente pela via mitocondrial, ocorrem alterações do potencial transmembrânico, ocorrendo efluxo da rodamina 123 da mitocôndria, levando à diminuição da emissão de fluorescência.

Nós avaliamos o $\Delta\Psi_m$ em células tumorais SCC-9 e SCC-25 por microscopia confocal a laser e por citometria de fluxo. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com a FOS (30 e 60 mM), formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 mM e 0,6 mM) e DODAC vazio (0,3 mM e 0,6 mM) por 24 horas. A análise realizada por citometria de fluxo possibilitou a determinação da porcentagem de células com mitocôndria ativas e inativas através da alteração da intensidade de fluorescência.

As células tumorais SCC-9 e SCC-25 demonstraram que houve diminuição significativa da porcentagem de células com mitocôndrias ativas, em relação ao grupo controle, em todos os grupos de tratamento. As células tumorais SCC-9 apresentaram valores percentuais de células com mitocôndrias ativas de 63,1% (FOS 30 mM), 45,9% (FOS 60 mM), 57,3% (DODAC/FOS 0,3 mM), 37,7% (DODAC/FOS 0,6 mM), 50,7% (DODAC 0,3 mM) e 39,5% (DODAC 0,6 mM) (Figura 42) e as células tumorais SCC-25 apresentaram 60%

(FOS 30 mM), 44,9% (FOS 60 mM), 63,2% (DODAC/FOS 0,3 mM), 36,9% (DODAC/FOS 0,6 mM), 44,5% (DODAC 0,3 mM) e 36,9% (DODAC 0,6 mM) de células com mitocôndrias ativas (Figura 43).

Figura 42: Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células SCC-9 por citometria de fluxo. As células SCC-9 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** Density plots representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Figura 43: Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células SCC-25 por citometria de fluxo. As células SCC-25 foram tratadas por 24 horas com FOS, DODAC/FOS e DODAC em diferentes concentrações. **(A)** Density plots representativos mostrando a distribuição das células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=2$. Grau de significância estatística *** $p<0.001$, obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's.

A microscopia confocal a laser das células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por 24 horas mostrou redução no $\Delta\Psi_m$ em relação ao grupo controle, apresentando modificação na distribuição das mitocôndrias no compartimento citoplasmático. As mitocôndrias nos grupos controles não tratado distribuíram-se, preferencialmente ao redor do núcleo. Observou-se grande intensidade na emissão de fluorescência, indicativo da maior densidade e potencial elétrico desta organela. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com as

concentrações de 30 e 60 mM de FOS mostraram modificações na distribuição e intensidade de fluorescência das mitocôndrias que se distribuíram ao longo de todo o compartimento citoplasmático difusamente. Este fato demonstra a capacidade de interferência da FOS na função mitocondrial (Figura 44).

O tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS em ambos tipos celulares demonstrou diminuição da intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle, além das mitocôndrias apresentarem alteração na distribuição citoplasmática. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com o carreador DODAC vazio se tornaram esféricas e as mitocôndrias apresentaram maior intensidade de fluorescência em comparação com o grupo tratado com formulação lipossomal DODAC/FOS provavelmente por estarem agrupadas. Além das alterações funcionais nas mitocôndrias, promovidas pela formulação lipossomal DODAC/FOS destacam-se os arranjos morfológicos destas organelas no grupo de células tumorais tratadas, há uma diminuição significativa da densidade celular, redistribuição das mitocôndrias no compartimento citoplasmático e alterações no volume citoplasmático (Figura 45).

Figura 44: Fotomicrografias das células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 com mitocôndrias marcadas em verde com rodamina-123 analisadas por microscopia confocal a laser. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com FOS nas concentrações de 30 e 60 mM por 24 horas.

Figura 45: Fotomicrografias das células de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 com mitocôndrias marcadas em verde com rodamina-123 analisadas por microscopia confocal a laser. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com DODAC/FOS e DODAC 0,3 mM por 24 horas.

4.8. Análise das alterações morfológicas do citoesqueleto das células SCC-9 e SCC-25 por microscopia confocal a laser

A análise das alterações morfológicas através da marcação dos filamentos de actina com Faloidina FITC (verde) e do núcleo com PI (vermelho), permitiu a observação da reorganização citoplasmática dos filamentos de actina tanto das células tumorais SCC-9, quanto das células tumorais SCC-25 após 24 horas de tratamento com FOS (30 e 60 mM), DODAC/FOS (0,3 mM) e DODAC (0,3 mM).

As células tumorais SCC-9 e SCC-25 do grupo controle apresentaram morfologias semelhantes, com filamentos de actina organizados de forma regular, são mononucleadas e fusiformes. O tratamento com FOS 30 mM causa alteração da morfologia celular em ambos os tipos celulares pela perda dos prolongamentos citoplasmáticos. A FOS 60 mM afetou ainda mais a morfologia de ambas as células, induzindo ampla retração citoplasmática e significativa redução na densidade celular. As células se tornaram esféricas devido à modificação do citoesqueleto celular e apresentaram fragmentação nuclear, características de células em processo de apoptose (Figura 46).

A formulação lipossomal DODAC/FOS também demonstrou alterações morfológicas semelhantes às encontradas no tratamento com FOS, apresentando perda dos prolongamentos citoplasmáticos causada pela retração citoplasmática. As alterações provocadas pelo carreador DODAC vazio modificaram parcialmente a distribuição do citoesqueleto, porém não foi observada a presença de fragmentação nuclear (Figura 47).

Figura 46: Fotomicrografias das células SCC-9 e SCC-25 com filamentos de actina marcados com Faloidina FITC e núcleo marcado com PI e analisadas por microscopia confocal a laser. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas nas concentrações 30 e 60 mM de FOS por 24 horas e marcadas com Faloidina FITC (verde) e PI (vermelho).

Figura 47: Fotomicrografias das células SCC-9 e SCC-25 com filamentos de actina marcados com Faloidina FITC e núcleo marcado com PI e analisadas por microscopia confocal a laser. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com DODAC/FOS e DODAC 0,3 mM por 24 horas e marcadas com Faloidina FITC (verde) e PI (vermelho).

4.9. Análise da indução de autofagia pela marcação com laranja de acridina (AO) por microscopia confocal a laser

Os lisossomos são compartimentos ácidos por conta do conteúdo rico em enzimas digestivas, possibilitando a sua marcação por parte do fluorocromo laranja de acridina. A laranja de acridina é um fluoróforo metacromático que, sob excitação de luz azul fluoresce vermelho em ambiente com pH baixo, como nos lisossomos, e verde no núcleo e no citosol. As células tumorais SCC-9 e SCC-25 foram tratadas com a FOS (30 e 60 mM), formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio 0,3 mM por 24 horas.

As células tumorais do grupo controle apresentaram intensa marcação do citoplasma e núcleo tanto nas células SCC-9 quanto nas células SCC-25. No grupo de células SCC-9 tratadas com 30 mM de FOS é possível observar a marcação de alguns lisossomos (fluorescência alaranjada). As células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com 60 mM de FOS apresentam aumento significativo no número de lisossomos, com emissão de fluorescência em vermelho, em comparação ao grupo controle (Figura 48).

As células tumorais SCC-9 e SCC-25 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio por 24 horas, não apresentaram marcação alaranjada ou avermelhada relacionada aos lisossomos que podem estar envolvidos no processo autofágico, porém foram observadas significativas alterações na morfologia nuclear (Figura 49).

Figura 48: Fotomicrografias das células SCC-9 e SCC-25 marcadas com laranja de acridina e analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FOS 30 e 60 mM por 24 horas e analisadas por microscopia confocal a laser. Lisossomos com conteúdo ácido (seta vermelha).

Figura 49: Fotomicrografias das células SCC-9 e SCC-25 marcadas com laranja de acridina e analisadas por microscopia confocal a laser. As células tumorais foram tratadas com DODAC/FOS e DODAC 0,3 mM por 24 horas e analisadas por microscopia confocal a laser.

5. DISCUSSÃO

A cisplatina, utilizada para o tratamento de carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral, induz o DNA a formar ligações cruzadas intra e inter-estrutura, resultando em distorção da hélice de DNA e morte celular por apoptose. Contudo, os doentes inevitavelmente experimentam progressão ou recaídas tumorais devido à aquisição de resistência aos fármacos ou ao surgimento de subpopulações de células resistentes às drogas (CHEN et al. 2016).

Desde quando foram descobertos, e principalmente após a aprovação da miltefosina para o tratamento de metástases cutâneas de câncer de mama e leishmaniose, a atividade dos alquilfosfolipídios (ALPs) contra muitas outras doenças têm sido extensivamente estudada. No entanto, o mecanismo de ação dos ALPs não é totalmente compreendido, porém acredita-se que eles interfiram com a homeostase lipídica levando à apoptose. Devido à atividade citotóxica dos ALPs, esta classe de moléculas mostrou ser eficaz contra muitas doenças. Além da aprovação da miltefosina para aplicação em metástases cutâneas de câncer de mama e leishmaniose visceral e cutânea, outros análogos têm demonstrado eficácia e são alternativas promissoras e menos tóxicas (PACHIONI et al. 2013).

A FOS é um precursor de fosfolipídio da classe dos alquil éster fosfórico que induz citotoxicidade em células de carcinoma espinocelular de língua.

Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado a capacidade da FOS, um fosfomonoéster que estruturalmente representa somente a região da cabeça dos fosfolipídios antineoplásicos, em induzir morte por apoptose em diferentes células tumorais, como por exemplo, melamona murino B16F10 e

adenocarcinoma de mama MCF-7 (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b). Na literatura não há nenhum estudo utilizando a FOS nas linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25.

Neste estudo foram avaliados os efeitos citotóxicos e os possíveis mecanismos de apoptose após o tratamento com FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio nas linhagens de células de CEC de língua humana SCC-9 e SCC-25. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade indicam que a FOS, sua formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio promovem efeitos antitumorais após todos os períodos de tratamento testados em ambas as linhagens tumorais de maneira dose dependente. Entretanto, o nível de sensibilidade foi diferente em função do tempo de tratamento com FOS. A linhagem de células tumorais SCC-9 se mostrou mais resistente ao tratamento após 24 horas em relação à linhagem SCC-25, no entanto, nos demais períodos de tempo avaliados, as células SCC-25 passaram a ter comportamento de maior resistência. Os resultados relacionados à citotoxicidade mostraram que diferentemente do que já foi descrito em relação a outras linhagens tumorais, a sensibilidade destas células é menor e os valores de IC50% obtidos para as células tumorais SCC-9 e SCC-25 são maiores, e provavelmente dependem da resistência, perfil mutagênico e agressividade destas células (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b).

Anteriormente, Ferreira et al. (2011) demonstraram que a citotoxicidade específica da FOS em células de melanoma B16F10 induz apoptose via caspase-3, sem causar toxicidade em fibroblastos normais.

A formulação DODAC/FOS forma lipossomas esféricos, polidispersos em solução e estáveis, apresentando taxa de encapsulação de FOS de 50%, com uma pequena redução após 40 dias. As nanopartículas DODAC/FOS tem tamanho médio de 100-200 nm, são capazes de permear as fenestrações dos vasos tumorais, mas não penetram a maior parte das fenestrações do endotélio de tecido saudável que são estreitas, resultando em maior acúmulo das nanopartículas, especialmente nos tecidos tumorais (LUNA et al., 2016).

A formulação lipossomal com o anfifílico catiônico DODAC demonstrou eficiência em carrear a FOS, tendo em vista que os valores de IC50% das linhagens tumorais SCC-9 e SCC-25 são significativamente menores em relação ao tratamento com a FOS isoladamente. No entanto, o tratamento com o carreador DODAC vazio mostrou-se mais citotóxico do que a formulação DODAC/FOS, isto é explicado pelo fato dos anfifílicos catiônicos em suspensão serem tóxicos em células procarióticas e eucarióticas, bem como serem instáveis e reativos, pois interagem com qualquer molécula eletronegativa devido a sua carga eletropositiva (PANTANI et al., 1995-a; PANTANI et al., 1995-b; SALT et al., 1970; CARMONA-RIBEIRO, 2003). A menor citotoxicidade da formulação lipossomal DODAC/FOS, pode ocorrer devido à interação eletrostática do grupo fosfato da FOS com o DODAC, reduzindo a capacidade do DODAC de interagir com outras moléculas eletronegativas melhorando sua estabilidade e levando a redução da citotoxicidade do carreador de maneira a aumentar a sua especificidade.

O efeito de citotoxicidade do carreador DODAC vazio foi 4,4 vezes e 1,8 vezes maior do que a formulação lipossomal DODAC/FOS para as células tumorais SCC-9 e SCC-25, respectivamente. Enquanto a formulação lipossomal DODAC/FOS comparada a FOS após 48 horas de tratamento aumentou os valores de toxicidade em 78,8 vezes e 132,2 vezes para as células SCC-9 e SCC-25, respectivamente.

Luna et al. (2016) analisaram a maximização do efeito terapêutico da FOS carreada pelo lipossoma DODAC e demonstraram que a formulação DODAC/FOS apresentou valores mais baixos de IC50%, em comparação com a FOS, para as células de melanoma murino B16F10 e para as células de hepatocarcinoma Hepa1c1c7, sem efeitos citotóxicos significativos nas células endoteliais humanas HUVEC. As células de melanoma B16F10 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC vazio se acumularam na fase sub-G1 do ciclo celular e houve diminuição de células em G0/G1 em todos os tratamentos. Quando tratadas com FOS houve aumento de células nas fases-S e G2/M do ciclo celular. A formulação lipossomal DODAC/FOS aumentou as células paradas na fase G2/M, já o tratamento com DODAC vazio não causa modificação nesta fase do ciclo celular.

O tipo de morte celular mediada pela FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio foi avaliado pelo ensaio de Anexina-V/PI. A Anexina V é comumente utilizada em conjunto com o PI para determinar quais células estão em apoptose inicial antes da perda da integridade da membrana celular. A translocação da fosfatidilserina (PS) da face interna para a externa da membrana citoplasmática ocorre nas células apoptóticas, permitindo assim que as células em apoptose inicial (Anexina V

positiva / PI negativo) e tardia (Anexina V positiva/ PI positivo) sejam marcadas pela Anexina V (SHAGHAYEGH et al., 2016).

O PI é um bom indicador de viabilidade celular, devido a sua capacidade de ser excluído das células vivas. A capacidade do PI de entrar numa célula depende da permeabilidade da membrana, portanto as células em apoptose inicial (Anexina V positiva / PI negativo) e as células viáveis (Anexina V negativo/ PI negativo) não são marcadas pelo PI devido à presença da membrana plasmática íntegra. Nas células em apoptose tardia (Anexina V positiva/ PI positivo) e necrose (Anexina V negativa/ PI positivo), a integridade das membranas plasmáticas e nucleares diminui, permitindo que o PI atravessasse as membranas e se intercale nos ácidos nucleicos exibindo a fluorescência vermelha (RIEGER et al., 2011).

Os estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram a capacidade da FOS em induzir morte celular por apoptose em diversos tipos de linhagens tumorais (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b; LUNA et al., 2016). O ensaio de Anexina V/PI realizado com as células tumorais SCC-9 e SCC-25 comprovaram os resultados encontrados nos estudos anteriores e demonstraram que o tratamento com a FOS por 48 horas foi mais eficaz em promover aumento do número de células em apoptose tardia. Por outro lado, o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 e 0,6mM) induziu apoptose inicial em proporções maiores do que os demais tratamentos. O carreador DODAC apresentou o maior aumento no número de células mortas por necrose quando comparado aos demais tratamentos, mostrando sua inespecificidade e alta toxicidade. A FOS e a

formulação lipossomal DODAC/FOS promoveram aumento da porcentagem de células apoptóticas em proporções significativamente maiores do que o DODAC vazio, demonstrando a melhor especificidade da FOS e da formulação lipossomal DODAC/FOS em relação ao carreador DODAC vazio.

A apoptose é um programa coordenado morte celular. Existem duas principais vias de apoptose: a via extrínseca (receptor de morte) e intrínseca (mitocondrial). Na via extrínseca, os receptores da família do fator de necrose tumoral são ativados por FasL e ligantes relacionados que modulam as vias de sinalização intracelular que conduzem à morte celular. A via intrínseca, ou mitocondrial pode ser ativada intracelularmente por espécies reativas ao oxigênio (ROS), através da inibição de cascatas de sinalização pró sobrevivência ou por grande stress celular, incluindo danos no DNA a partir da exposição a drogas citotóxicas antineoplásicas (MURRAY et al., 2014).

A via mitocondrial depende da liberação de citocromo c das mitocôndrias para o citosol, este é um processo importante na ativação das caspases e dos processos apoptóticos (SHAGHAYEGH et al., 2016). De acordo com os estudos anteriores a FOS leva a morte celular pela ativação da via intrínseca da apoptose (FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b).

A permeabilização da membrana mitocondrial externa, que resulta na liberação de citocromo c, é um ponto decisivo que determina se a célula entra em apoptose. Esta permeabilização é regulada por membros anti e pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 (FUCHS & STELLER, 2015). A família de proteínas Bcl-2 compreende dois subconjuntos funcionalmente opostos: as proteínas pró e anti apoptóticas. As proporções destes dois subconjuntos

controlam o equilíbrio entre a sobrevivência celular e a morte pela via intrínseca da apoptose. As proteínas anti apoptóticas, tais como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W e MCL-1 e A1, agem bloqueando a apoptose inibindo suas contrapartes pró-apoptóticas (ROY et al., 2014).

As proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 incluem várias proteínas da classe "BH3-only" (por exemplo, Bid, Bim e Puma) que promovem a permeabilização das mitocôndrias ativando os membros Bad e Bax da família Bcl-2 para formar um poro na membrana mitocondrial (WESTPHAL et al., 2014). Quando o citocromo c é liberado ele se liga e ativa as proteínas citoplasmáticas Apaf-1 e procaspase-9, em conjunto estas proteínas formam uma estrutura denominada apoptossomo, que por sua vez conduz à clivagem da procaspase-9 para formar a caspase-9 ativa (TOWER, 2015). A ativação da caspase-9 (caspase iniciadora) cliva e ativa caspases efetoras, como por exemplo, a caspase-3 que por sua vez cliva numerosas proteínas celulares propagando assim uma cascata proteolítica que conduz à clivagem de proteínas cruciais, incluindo a clivagem inativadora de um inibidor de DNase, que causa a fragmentação do DNA (FUCHS & STELLER, 2015; TOWER, 2015).

A proteína p53 nuclear induz a expressão do gene Mdm2, responsável pela regulação negativa da atividade da p53 pela ligação, ubiquitinação, e degradação via proteossomo. Sinais de stress celular, tais como a lesão do DNA, interrompem a inibição de p53 mediada por Mdm2, conduzindo ao acúmulo de p53 tanto no núcleo como no citoplasma. Múltiplos mecanismos têm sido propostos para explicar como p53 desencadeia a permeabilização da membrana mitocondrial externa. A p53 estabilizada acumula-se no núcleo e

liga-se a sequências de DNA específicas que conduzem à ativação de vários genes pró apoptóticos, incluindo os que codificam membros da família Bcl-2, tais como as proteínas “BH3 only” Bax, Noxa e Puma (CHAABANE et al., 2013). Demonstrando que o aumento da expressão de p53 após os tratamentos com FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS contribuem para a indução de apoptose das células tumorais SCC-9 e SCC-25.

Corroborando os dados encontrados nos estudos anteriores, a FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS nas células tumorais SCC-9 promoveram morte celular pela via intrínseca da apoptose induzindo o aumento das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax, que possivelmente auxiliaram no processo de aumento de citocromo c no citosol, assim como, da caspase-3 ativa. Estes aumentos foram acompanhados pela diminuição da proteína anti apoptótica Bcl-2 e na expressão do receptor relacionado à progressão tumoral IL-6.

A IL-6 desempenha um papel no desenvolvimento tumoral. No entanto, a informação disponível sobre o significado prognóstico de IL-6 e do receptor IL-6 (IL-6R) no carcinoma espinocelular de boca é limitada. O estudo realizado por Wang et al. (2002) analisou as taxas de expressão dos transcritos de RNAm de IL-6R e IL-6 em espécimes de tumor e demonstraram porcentagens muito superiores às da mucosa não tumoral. A sobreexpressão de IL-6R foi associada aos maiores tumores e ao grau histológico mais avançado. A presença de transcritos de RNAm de IL-6 foi inversamente correlacionada com metástase à distância, envolvimento de linfonodos e segundo carcinoma espinocelular primário e previsão de melhor sobrevida.

A IL-6 é conhecida por desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da inflamação crônica, resultando em escape imune e aceleração da progressão tumoral (MULTHOFF & RADONS, 2012). Os efeitos biológicos da IL-6 são bem conhecidos por serem mediados pela ativação do transdutor de sinal e do ativador da transcrição 3 (STAT3), o STAT3 demonstrou ter um papel crítico na interação entre os macrófagos associados a tumores (TAMs) e as células tumorais no interior do microambiente tumoral, conduzindo à quimiorresistência e à radiorresistência (YU et al, 2007; MASUDA et al., 2010; KOMOHARA et al., 2014).

O lipossoma DODAC pode promover morte celular pela via intrínseca da apoptose nas células SCC-9, demonstrada pelo aumento da expressão da proteína caspase-3 ativa e liberação de citocromo c no citosol, acompanhado pela diminuição da proteína anti apoptótica Bcl-2 e do receptor associado a progressão tumoral IL-6. No entanto, o aumento da caspase-3 e do citocromo c são significativamente menores do que os tratamentos com FOS e com a formulação lipossomal DODAC/FOS, confirmando a inespecificidade do carreador DODAC vazio demonstrada no ensaio de Anexina V/PI, onde houve aumento de células em apoptose em menor proporção do que os tratamentos com FOS e com a formulação lipossomal DODAC/FOS, além do aumento de células necróticas.

Nas células tumorais SCC-25 o carreador DODAC vazio também mostra sua inespecificidade, porém induzindo morte celular provavelmente pela via extrínseca da apoptose, explicada pelo aumento da expressão somente do receptor de morte DR-4 na maior concentração do carreador DODAC, porém em menor proporção do que o aumento induzido pela FOS, corroborando o

dado do ensaio de Anexina V/PI que mostrou aumento de células em apoptose tardia e aumento ainda mais significativo de células necróticas.

Os resultados das expressões de marcadores relacionados à morte celular das células SCC-25, assim como das células SCC-9, também sugerem que as células tratadas com FOS e DODAC/FOS morrem pela via intrínseca da apoptose. Esta suposição é explicada pelo aumento da expressão de p53 (maiores concentrações dos tratamentos), das proteínas pró apoptóticas Bad e Bax em todas as concentrações, aumento da caspase-3 ativa nos tratamentos com FOS e na maior concentração de DODAC/FOS, além do aumento de citocromo c no tratamento com FOS na maior concentração. Estes eventos são acompanhados pela diminuição significativa da proteína anti apoptótica Bcl-2 e do receptor relacionado a progressão tumoral IL-6.

A via extrínseca da apoptose é ativada pela ligação dos receptores transmembrana de morte aos seus ligantes, esta ligação induz os domínios de morte citoplasmáticos a atraírem moléculas adaptadoras como o FADD e iniciam uma cascata de caspases. Existem diferentes pares de receptores e ligantes, como por exemplo TRAIL/DR. Todos eles levam à ativação da caspase-8, que por sua vez ativa outras caspases (CHAABANE et al., 2013).

Os receptores de morte Fas, DR4 e DR5 desencadeiam diretamente a cascata apoptótica pela via extrínseca através da montagem de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que deve conter minimamente a proteína adaptadora Fas associada ao domínio de morte (FADD) e a caspase-8 (ASHKENAZI & SALVESEN, 2014).

A via extrínseca da apoptose também foi avaliada através da expressão do receptor de morte celular DR-4, e demonstrou que as células tumorais SCC-

25 aumentam a expressão deste receptor quando tratadas com FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e DODAC na maior concentração, porém deve-se destacar que a inespecificidade do DODAC neste processo foi acompanhado pelo aumento de necrose. Por outro lado, as células SCC-9 só apresentam este comportamento quando tratadas com a maior concentração da formulação DODAC/FOS, sugerindo que uma porção destas células também pode estar morrendo pela via extrínseca da apoptose.

O ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) induz a apoptose através dos seus receptores de morte (DRs) 4 e/ou 5 expressos na superfície das células alvo. A seletividade do TRAIL em relação às células cancerígenas promoveu a avaliação clínica do TRAIL recombinante humana (rhTRAIL) e dos seus anticorpos agonistas no tratamento de cânceres humanos importantes, incluindo cólon e linfoma não Hodgkin. Contudo, pouco se sabe sobre a sua capacidade para matar células de carcinoma espinocelular oral (CHEN et al., 2013).

O estudo realizado por Chen et al. (2013), analisou as respostas apoptóticas de sete linhagens de células de carcinoma espinocelular humanas (HN31, HN30, HN12, HN6, HN4, Cal27 e OSCC3) ao rhTRAIL e anticorpos monoclonais contra DR4 ou DR5. Verificou-se que o rhTRAIL é um potente indutor de apoptose na maioria das linhagens testadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Demonstrou-se também que o DR5 foi expresso na superfície das linhagens celulares testadas que se correlacionaram com a susceptibilidade celular à apoptose induzida por rhTRAIL e o anticorpo anti-DR5. Em contrapartida, pouco ou nenhum DR4 foi detectado na superfície das células

OSCC3 e HN6, levando a resistência celular ao anticorpo DR4 e uma sensibilidade reduzida ao rhTRAIL.

As características bioquímicas fundamentais da apoptose incluem a disfunção mitocondrial, inibição da cadeia respiratória, perda do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e externalização da fosfatidilserina (RYTER et al., 2014). Corroborando os dados relacionados à expressão dos marcadores e dos achados anteriores, tanto as células tumorais SCC-9 quanto às células SCC-25 demonstraram diminuição significativa do potencial elétrico mitocondrial, pela diminuição da porcentagem de células com mitocôndrias ativas nos tratamentos com a FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio e confirmado pela microscopia confocal a laser com diminuição da intensidade de fluorescência das mitocôndrias, diminuição da densidade celular e alteração na distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas pela sonda rodamina 123. Ferreira et al. (2013b) também observou por microscopia confocal a laser a presença de agregados mitocondriais no citoplasma e fragmentação do DNA em células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

Ferreira et al. (2013b) mostraram que a FOS levou a parada no ciclo celular, através da proteína p53, assim como também mediou a diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). A FOS aumentou a expressão da proteína pró apoptótica Bax nas células de adenocarcinoma de pulmão não pequenas células (H460), indicando que a FOS age sobre mediadores envolvidos na via mitocondrial da apoptose (FERREIRA, 2013).

Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo têm mostrado que a FOS inibiu a proliferação e migração celular, levando ao acúmulo das células de melanoma murino B16F10, melanoma humano SKmel-28 e adenocarcinoma de mama MCF-7 na fase S ou G2/M do ciclo celular dependendo da concentração do composto (FERREIRA et al., 2012 b, FERREIRA, 2013, FERREIRA et al., 2013 b).

A supressão do ciclo celular é um alvo na terapia antitumoral para o desenvolvimento de novos agentes citotóxicos. O ciclo celular possui uma série de pontos de verificação para varredura da integridade genômica, bem como para confirmar que a replicação do DNA continua de forma coordenada. Depois de induzir a parada do ciclo celular, caso algo esteja errado, a sinalização do ponto de verificação pode levar à ativação de vias que resultam em apoptose se o dano celular não puder ser adequadamente reparado (SHAGHAYEGH et al., 2016).

Existem pontos de verificação na entrada da fase S (ponto de verificação G1/S), na entrada para mitose (ponto de verificação G2/M) e durante a replicação (pontos de verificação intra-S) (BERTOLI et al., 2013). Os quimioterápicos usuais atuam causando danos no DNA. Na maioria dos casos, os agentes que causam danos no DNA não matam as células tumorais diretamente, eles agem inicialmente ativando os pontos de verificação e bloqueando a progressão do ciclo celular (DIJKSTRA et al., 2010). Os fosfolipídios antitumorais atuam em outros alvos moleculares preferencialmente, no *turnover* de fosfolipídios da membrana celular (GAJATE & MOLLINEDO, 2014).

Somente as células tumorais SCC-25 tratadas com FOS por 24 horas demonstraram aumento significativo da população de células paradas nas fases S e G2/M do ciclo celular. Além disso, também houve aumento das células em sub-G1 com DNA fragmentado nas maiores concentrações. Após 48 horas de tratamento com FOS, na linhagem celular SCC-25 houve aumento das células na fase sub-G1 com DNA fragmentado em todas as concentrações testadas. Entretanto, nas células tumorais SCC-9 tratadas com FOS ocorreu aumento das células com DNA fragmentado em todas as concentrações. Corroborando os efeitos de citotoxicidade de 24 horas mostradas pelo ensaio colorimétrico do MTT, onde as células SCC-9 obtiveram diminuição significativa da viabilidade celular a partir de 30 mM e as células SCC-25 a partir de 60 mM de FOS.

Os tratamentos com a formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio induziram diminuição nas fases G0/G1, S em todas as concentrações e diminuição da fase G2/M somente nos tratamentos com a maior concentração de DODAC/FOS e DODAC. Além do aumento de DNA fragmentado nas células tumorais SCC-9. Enquanto que as células tumorais SCC-25 demonstraram diminuição da fase G0/G1 em todas as concentrações de tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS e com o carreador DODAC vazio, acompanhado pelo aumento do número de células com DNA fragmentado que foi caracterizada no ensaio de determinação de apoptose por Anexina V/PI.

Os resultados da análise do ciclo celular das células tumorais SCC-9 são diferentes dos resultados encontrados com outras linhagens celulares tratadas com FOS, onde foi relatada a parada do ciclo celular nas fases S ou G2/M do

ciclo celular (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b). Apesar da FOS, da formulação lipossomal DODAC/FOS induzirem a apoptose pela via intrínseca como foi demonstrado pela expressão dos marcadores relacionados à morte celular, não há indução de parada do ciclo celular pelo acúmulo de células SCC-9 nas fases S e G2/M. No entanto, as células tumorais SCC-25 apresentam parada na fase S quando tratadas com menores concentrações de FOS e parada na fase G2/M apenas no tratamento com maior concentração de FOS por 24h.

Como foi determinado no ensaio de citotoxicidade, há um maior número de células inviáveis no grupo tratado em relação ao grupo controle, demonstrando que as células estão ativando o mecanismo de morte celular, no entanto, o mecanismo que resulta na morte das células tumorais SCC-9 e SCC-25 possui características diferentes das células de melamona murino B16F10 e de adenocarcinoma de mama MCF-7 (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b).

Ferreira et al. (2012a) estudaram os efeitos antitumorais da FOS em células do tumor ascítico de Erlich e evidenciaram a toxicidade específica da FOS nas células tumorais, não apresentando efeito citotóxico para as células normais (fibroblasto normal FN1, linfócitos e células endoteliais humanas HUVEC). A FOS induziu apoptose pelo aumento da porcentagem de células marcadas por Anexina, diminuição do potencial elétrico mitocondrial, aumento da atividade de caspase-3 e aumento da fase sub-G1 do ciclo celular. Corroborando os dados encontrados tanto nas células tumorais SCC-9 quanto nas células SCC-25 tratadas com FOS.

No ano de 2012, Ferreira et al. observaram que as células B16F10 tratadas com FOS em menor concentração leva a parada do ciclo celular na fase G2/M e quando utilizada em maior concentração acaba por induzir a apoptose através da perda do potencial elétrico mitocondrial e do aumento da caspase-3 ativa. Dois efeitos antitumorais foram sugeridos para a FOS, o primeiro é que a FOS induz apoptose quando utilizada em maiores concentrações e o segundo efeito antitumoral sugerido é que a FOS age modulando o ciclo celular (FERREIRA et al., 2012b).

Em 2013, Ferreira et al. mostraram que a FOS foi mais citotóxica nas células de carcinoma renal murinho (RENCA) do que nas células de cordão umbilical humano (HUVEC). Nas células HUVEC houve diminuição da proliferação e parada do ciclo celular na fase G2/M, porém sem apoptose. A FOS induziu morte celular das células RENCA pela via mitocondrial acompanhada pela perda do potencial elétrico mitocondrial e aumento da atividade de caspase-3 (FERREIRA et al., 2013a).

Ferreira et al. (2013b) também verificaram os efeitos da FOS em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 e puderam observar que a FOS levou à ativação da via mitocondrial da apoptose pelo aumento da expressão de citocromo c e caspase-3 ativa, acompanhada pela perda do potencial elétrico mitocondrial, inibição de Bcl-2, parada do ciclo celular na fase G1 pela inibição de ciclina D1 e estímulo de p53. Na microscopia confocal a laser foi observada a presença de agregados mitocondriais no citoplasma e fragmentação do DNA.

Ainda no ano de 2013, Ferreira et al. demonstraram os efeitos anti leucêmicos da FOS através da indução da apoptose pela via mitocondrial, com

diminuição do potencial elétrico mitocondrial e ativação de p53 em linhagens celulares KG-1, K562 e Jurkat (FERREIRA et al., 2013c).

Vink et al. (2006) investigaram se a perifosina, um alquilfosfolípido antitumoral que atua na membrana celular, potencializa o efeito antitumoral da radiação *in vitro* e *in vivo* em CEC de cabeça e pescoço e mostraram que *in vitro*, a perifosina reduziu a sobrevivência clonogênica da linhagem celular de CEC de cabeça e pescoço KB, aumentou a apoptose e levou a parada do ciclo celular na fase G2/M após a radiação. *In vivo*, a radiação e a perifosina isoladas, induziram atraso do crescimento tumoral dependente da dose. Quando combinadas, múltiplas administrações de perifosina com doses únicas ou divididas de radiação, houve regressão completa do tumor. A análise histopatológica dos tumorais revelou uma resposta apoptótica proeminente após o tratamento combinado de radiação e perifosina.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas em um amplo espectro de doenças, incluindo inflamação crônica (obesidade, Alzheimer, doença cardiovascular) e uma ampla variedade de diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de boca. As proteínas e os lipídios são alvos para o ataque oxidativo, levando a modificação destas moléculas e podendo aumentar o risco de mutagênese (REUTER et al., 2010).

O câncer é um processo de múltiplos estágios definido por pelo menos três: iniciação, promoção e progressão. O estresse oxidativo interage nos três estágios deste processo. Durante o estágio de iniciação, as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem produzir danos ao DNA através da introdução de mutações genéticas e alterações estruturais do DNA. Na fase de promoção, ROS podem contribuir para a expressão gênica anormal, bloqueio da

comunicação célula-célula e modificação dos sistemas de segundos mensageiros, resultando em aumento da proliferação celular ou na diminuição de apoptose da população de células iniciadas. Finalmente, o estresse oxidativo também pode participar do estágio de progressão da carcinogênese, adicionando mais alterações ao DNA da população de células iniciadas (REUTER et al., 2010).

O tabaco e o álcool, que são os principais fatores de risco associados ao câncer de boca são capazes de gerar radicais livres e ROS, responsáveis pela alta taxa de peroxidação lipídica. O malondialdeído (MDA) é o marcador mais amplamente utilizado da peroxidação lipídica (CHOLE et al., 2010).

A interação entre MDA-proteína causa danos na integridade da membrana celular e na atividade de proteínas transportadoras, provocando colapso do gradiente iônico e conduzindo a morte celular (SHIVANANDA NAYAK & SNEHA PINTO, 2007).

Durante a produção de ATP, as ROS são formadas e alteram o estado redox intracelular e ativam a apoptose. A disfunção mitocondrial é um componente bem conhecido na patogênese do câncer. A mitocôndria é a principal fonte de ROS que determina o estado redox intracelular e modulam a proliferação celular e a apoptose. A geração de ROS tem várias consequências nas células, incluindo danos peroxidativos diretos nas membranas e modificação de bases de DNA que podem iniciar a carcinogênese (MURRAY et al., 2014).

Em relação à avaliação da produção de produtos lipoperoxidados, a FOS aumenta significativamente à formação de radicais peroxidados em ambas as linhagens celulares em todos os períodos de tratamento, indicando

que o stress oxidativo causado pelo aumento da produção de produtos lipoperoxidados pode estar relacionado aos efeitos citotóxicos da FOS e em parte pela capacidade de induzir morte celular.

As terapias antineoplásicas são desenvolvidas principalmente para atuar através da indução de apoptose. A senescência celular limita a capacidade replicativa das células, evitando assim a proliferação de células que se encontram em diferentes fases de malignidade. Para combater a proliferação celular anormal, a célula pode entrar em uma fase de parada do crescimento, através da apoptose ou da senescência (DIMRI, 2005).

A senescência celular também é um importante mecanismo anticancerígeno (CHILDS et al., 2014), caracterizada pela parada irreversível do ciclo celular, causada por repetidas divisões celulares e encurtamento dos telômeros, bem como da ativação de oncogenes, desestruturação da cromatina e estresse oxidativo. A ativação da expressão de p53 pode fazer com que as células sofram apoptose ou senescência celular dependendo do tipo de célula e da natureza do stress (ZUCKERMAN et al., 2009).

A coloração histoquímica de senescência associada à enzima β -galactosidase (SA-Betagal) é um marcador utilizado para a determinação de senescência. Esta capacidade é explicada pela presença da β -galactosidase lisossomal ácida em células senescentes, que é detectável em pH próximo do neutro. SA-Betagal foi o primeiro marcador que permitiu a detecção de células senescentes *in situ* em tecidos, mostrando que células senescentes, de fato aumentam *in vivo* com a idade. É ainda amplamente utilizada para identificar as células senescentes, tanto em cultura quanto em uma variedade de tecidos de vertebrados (CAMPISI, 2013). Além disso, a SA- β etagal é frequentemente

expressa em células senescentes que têm vesículas autofágicas, sugerindo que a autofagia pode ser uma parte integrada do programa de senescência (PÉREZ-MANCERA et al., 2014).

Uma vez que a característica essencial de uma célula senescente é a parada do crescimento, um marcador necessário, mas insuficiente de células senescentes é a ausência de marcadores de proliferação. Além disso, as células senescentes geralmente ampliam seu tamanho, duplicam seu volume, e, se forem aderentes, adotam uma morfologia achatada (CAMPISI, 2013).

Houve aumento da porcentagem de células senescentes apenas nas células tumorais SCC-25 tratadas com a menor concentração de FOS, porém pelo período de tratamento de 48 horas, sugerindo que a FOS além de induzir morte celular por apoptose, pode levar a parada da proliferação celular através da senescência em uma pequena porcentagem de células SCC-25. Nas imagens das células SCC-9 e SCC-25 dos grupos tratados observa-se diminuição do número de células, outro indicativo da diminuição da capacidade de proliferação celular.

Apesar do papel amplamente aceito da autofagia na sobrevivência celular, a autofagia também tem sido associada com a regulação de várias vias de morte celular, principalmente a apoptose. A autofagia é um programa associado à sobrevivência ou à adaptação ao estresse. No entanto, o aumento da formação de autofagossomos é frequentemente encontrado em células que estão morrendo. As características morfológicas e bioquímicas da autofagia e apoptose são distintas. As células autofágicas exibem aumento dos autofagossomos e autofagolisossomos. Embora a condensação parcial da cromatina apareça em células autofágicas, a fragmentação do DNA não ocorre.

As distinções entre autofagia e apoptose permanecem incompletamente delineadas, já que os dois processos nem sempre são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente no mesmo tipo de célula. (RYTER et al., 2014).

A Beclin1 e LC3 são os dois principais genes relacionados com a autofagia. A Beclin 1 é um modificador essencial do processo de autofagia, indispensável para as primeiras fases da autofagia e foi encontrada desregulada em vários cânceres. A LC3, incluindo LC3-I e LC3-II, desempenha um papel central na formação de autofagossomos. Particularmente, a LC3-II é um marcador específico do processo autofágico porque está correlacionada diretamente ao número de autofagossomos. Portanto, a combinação Beclin1 e LC3 é utilizada para monitorar a atividade autofágica (WANG et al., 2013).

A microscopia confocal a laser das células tumorais SCC-9 e SCC-25 marcadas com laranja de acridina foi utilizada para avaliação dos lisossomos ácidos que poderiam estar relacionados ao processo autofágico, e foi demonstrado que as células tratadas com FOS apresentam aumento da quantidade de lisossomos ácidos, este comportamento não foi observado nas células SCC-9 e SCC-25 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS e carreador DODAC vazio, indicando que este processo pode estar relacionado à concentração de FOS utilizada, ou mesmo da sua forma de apresentação. No entanto, não podemos afirmar que os lisossomos ácidos estão relacionados ao processo autofágico, esta afirmação só poderia ser feita após a análise da expressão de Beclin-1 e/ou de LC3. Por outro lado, o aumento de lisossomos ácidos nas células tratadas com FOS fornece um indício que deve ser

estudado mais profundamente sobre o papel da autofagia na morte celular das células SCC-9 e SCC-25 tratadas com FOS.

Wu et al. (2014) demonstraram que a radiação ionizante induz tanto a autofagia como a morte celular. No entanto, não está claro se a morte celular é o resultado da autofagia citotóxica ou se a autofagia é ativada como resultado do estresse celular induzido pela radiação.

Um estudo do tratamento concomitante de linhagens celulares de câncer oral quimiorresistentes com cisplatina e com os inibidores de autofagia cloroquina e 3-metiladenina (3-MA) demonstrou aumento de morte por apoptose, sugerindo que a inibição da autofagia pode ser uma estratégia adjuvante para pacientes que recebem quimioterapia (COSWAY & LOVAT, 2016).

A survivina está amplamente expressa em pacientes com CEC de cabeça e pescoço e está associada há baixa taxa de sobrevivência e resistência à quimioterapia. O brometo de sepantronium é um supressor seletivo de survivina que exibe atividade antitumoral potente. Quando combinado com o docetaxel promoveu melhor regressão tumoral do que os tratamentos isolados sem causar perda considerável de peso corporal nos modelos de xenoenxerto de CEC de cabeça e pescoço. O brometo de sepantronium mostrou ser capaz de beneficiar a terapia aumentando a morte celular por apoptose e autofagia além de suprimir as vias de sobrevivência celular (ZHANG et al., 2015). Estudos em linhagens tumorais de cavidade oral tem relatado o potencial da autofagia em exacerbar e promover morte por apoptose das células tumorais (BAI et al., 2013; HUANG et al., 2013).

Nos estudos anteriores realizados com a FOS não foi analisada a indução de senescência e de autofagia. Entretanto, os resultados apresentados em relação a estes mecanismos são promissores e sugerem que a FOS também induz morte celular por mecanismos de senescência e autofagia nas linhagens de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25, porém, em menor proporção do que a apoptose.

As primeiras alterações celulares visíveis da apoptose são o encolhimento da célula, condensação do núcleo e da cromatina e perda da adesão célula-célula. Seguido pela fragmentação nuclear e da cromatina, formação de bolhas na membrana celular, e finalmente o aparecimento dos corpos apoptóticos, que possuem no seu interior pequenos fragmentos citoplasmáticos, são quase esféricos e cercados pela membrana celular (TOWER, 2015; CHAABANE et al., 2013).

As células em apoptose reorganizam seu citoesqueleto com a fragmentação dos feixes de microfilamentos, isto confere plasticidade à célula e promove a diminuição do volume, bem como o encolhimento celular. A detecção por microscopia confocal a laser dos filamentos de actina revelou que os estímulos apoptogênicos afetam a sua organização e podem conduzir à conversão de segmentos do citoesqueleto cortical em um anel. Os filamentos de actina formam feixes que se tornam progressivamente mais espessos, especialmente na periferia da célula (BOTTONE et al., 2013).

A microscopia confocal a laser nos permitiu avaliar as alterações morfológicas do citoesqueleto através da marcação dos filamentos de actina, demonstrando que o tratamento com a FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS induziram a perda dos prolongamentos citoplasmáticos e

diminuição do volume celular em ambas as células tumorais, acompanhado por condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Estas alterações morfológicas são características da apoptose e também foram evidenciadas no estudo feito por Ferreira et al. (2013a) em células de carcinoma renal murinho (RENCA).

A morte celular induzida pela edelfosina, um agente antitumoral éter lipídico, também mostra todos os sinais bioquímicos e ultraestruturais típicos e característicos da apoptose, incluindo formação de bolhas na membrana, condensação da cromatina, degradação da membrana nuclear, vacuolização, degradação internucleosomal do DNA, ativação de caspase e perda do potencial elétrico mitocondrial (GAJATE & MOLLINEDO, 2014).

Kapoor et al. (2012) investigaram a atividade antitumoral da erufosina em linhagens celulares de carcinoma espinocelular de boca (Cal27, FaDu, SCC-9 e SCC-25) em termos de proliferação celular, formação de colônias, indução de autofagia/apoptose e ciclo celular e demonstraram que a erufosina exibiu citotoxicidade dose dependente em todas as linhagens celulares, induziu autofagia assim como apoptose, parada do ciclo celular na fase G2/M e modulação da expressão de ciclina D1. Além disso, os efeitos citotóxicos da combinação da erufosina com a cisplatina e o Fluorouracil (5-FU) foram 30% superiores aos efeitos esperados. Demonstrando o potencial antitumoral dos fosfolipídios antitumorais em CEC de boca.

A edelfosina apresenta efeitos colaterais hemolíticos, toxicidade gastrointestinal e baixa biodisponibilidade oral. Para superar estes obstáculos a edelfosina foi encapsulada em nanopartículas lipídicas de Precirol ATO 5 (ET-LN) e o potencial antitumoral foi testado *in vitro* em câncer de mama e mostrou

que a encapsulação da edelfosina é mais eficaz na inibição da proliferação celular e diminuição da viabilidade celular, evidenciando que o efeito citotóxico da edelfosina é consideravelmente melhorado quando encapsulada. Além disso, a edelfosina e ET-LN foram capazes de promover a parada do ciclo celular na fase G1. Apesar de ambos os tratamentos terem provocado efeito apoptótico dependente do tempo de tratamento, os efeitos antitumorais foram sensivelmente melhorados com o tratamento com ET-LN. Indicando que o encapsulamento da edelfosina desempenhou um papel essencial na melhoria da eficácia do fármaco (AZNAR et al., 2013).

A toxicidade *in vivo* da edelfosina livre e da edelfosina encapsulada em nanopartículas lipídicas foram avaliadas. O fármaco livre, o carreador vazio e a edelfosina encapsulada foram administrados oralmente em camundongos e demonstraram que a administração 4 vezes maior do que a dose terapêutica de edelfosina causou a morte dos animais dentro de 72 horas. Além disso, a histopatologia revelou toxicidade gastrointestinal e efeito imunossupressor. Por outro lado, o carreador mostrou efeito protetor contra a toxicidade da edelfosina mesmo na dose mais elevada e foi completamente seguro. A nanopartícula lipídica é, portanto, um veículo seguro para a administração de edelfosina pela via oral. Os nanosistemas desenvolvidos podem ser ainda utilizados para a administração de outros fármacos (LASA-SARACÍBAR et al., 2014).

Argiris et al. (2006) realizaram um estudo clínico de fase II da perifosina, em câncer recorrente ou metastático de cabeça e pescoço. A perifosina mostrou atividade antitumoral em estudos pré-clínicos com células de cabeça e pescoço e xenotransplantes. Foram incluídos 19 pacientes neste estudo, a perifosina foi administrada por via oral com uma dose de carga de 150 mg a

cada 6 horas por 6 doses nos primeiros dois dias, com profilaxia antiemética, seguida por 100 mg/dia por via oral sem interrupção. A resposta tumoral foi avaliada a cada dois ciclos (oito semanas). Os biomarcadores em vias potencialmente afetadas pela perifosina, incluindo AKT, P-AKT, P38, p53 e p21 foram mensurados em tecido tumoral por imunohistoquímica e não foram observadas respostas objetivas. Um paciente apresentou doença estável como melhor resposta, e 18 pacientes evoluíram na primeira avaliação. O tempo médio de sobrevida global foi de 5,5 meses e o tempo médio de sobrevida livre de progressão foi de 1,7 meses. As toxicidades mais frequentes foram gastrointestinais (constipação, náuseas, vômitos) e fadiga. Um paciente desenvolveu anorexia grau 4. Demonstrando que os resultados da perifosina nas doses e no esquema utilizado não justificam uma investigação mais aprofundada da perifosina como agente único no tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Talvez a utilização da perifosina como agente coadjuvante das terapias tradicionais mostre resultados promissores (ARGIRIS et al., 2006).

É importante ressaltar que a formulação lipossomal DODAC/FOS demonstrou eficácia em induzir efeitos pró-apoptóticos nas células tumorais SCC-9 e SCC-25 de forma semelhante à FOS, porém em concentrações molares significativamente menores que as concentrações utilizadas para o tratamento com a FOS, evidenciando a potencialização do efeito citotóxico da formulação lipossomal DODAC/FOS em relação à FOS.

6. CONCLUSÃO

A FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS apresentaram efeito citotóxico nas linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 induzindo a morte celular por apoptose. Além disso, o conjunto de resultados obtidos mostraram que:

- A FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS foram citotóxicas nas linhagens de carcinoma espinocelular de língua em função do tempo de tratamento;
- Ocorreu formação significativa na produção de lipídios peroxidados nas maiores concentrações de FOS em decorrência de sua citotoxicidade;
- A FOS induz senescência nas células SCC-25, porém dependente de concentração e tempo de tratamento;
- A FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador DODAC vazio aumentam a população de células SCC-9 e SCC-25 com DNA fragmentado;
- A FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS induzem aumento das células SCC-9 e SCC-25 em apoptose, enquanto o DODAC aumenta a população de células necróticas;
- As análises da expressão dos marcadores indicam que as células tumorais SCC-9 e SCC-25 morrem principalmente por apoptose quando tratadas com FOS e formulação lipossomal DODAC/FOS;

- Todos os tratamentos induziram perda do potencial elétrico mitocondrial de ambas às células utilizadas;
- A maior concentração de FOS induz aumento do número de lisossomos ácidos em ambas as células, podendo estar relacionados à autofagia;
- A FOS e a formulação lipossomal DODAC/FOS induziram alteração na distribuição dos filamentos de actina de ambas as linhagens celulares estudadas e levaram a retração citoplasmática e fragmentação do DNA, características da apoptose.

7. BIBLIOGRAFIA

ALVES, A.P.N.N. et al. **Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256**. Acta Cir. Bras 19(4):406-414, 2004.

ANDREESEN R.; MODOLELL M.; MUNDER P.G. **Selective sensitivity of chronic myelogenous leukemia cell populations to alkyllysophospholipids**. Blood 54: 519-23, 1979.

ANDREESEN R. et al. **Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids**. Cancer Res 38: 3894-9, 1978.

Argiris A. et al. **A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer**. Cancer Biology & Therapy. 5:7, 766-770, 2006.

ARIAS-MENDOZA F.; SMITH M.R.; BROWN T.R. **Predicting treatment response in non-Hodgkin's lymphoma from the pretreatment tumor content of phosphoethanolamine plus phosphocholine**. Acad Radiol 11(4):368-76, 2004.

ASHKENAZI A.; SALVESEN G. **Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms**. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30:337–56, 2014.

AZNAR M.A. et al. **Efficacy of edelfosine lipid nanoparticles in breast cancer cells**. International Journal of Pharmaceutics 454: 720– 726, 2013.

AWAPARA J. **Alanine and taurine formation from injected cysteine in the rat**. Nature 14(4185):165-176, 1950.

BAIA L.Y. et al. **G15, a GPR30 antagonist, induces apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells**. Chemico-Biological Interactions. 206: 375–384; 2013.

BERGAMINI C. **Does a multidisciplinary team approach in a tertiary referral centre impact on the initial management of head and neck cancer?** Oral Oncol 54: 54–57, 2016.

BERGER M.R.; KONSTANTINOV S.M.; EIBL R.H. **Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines**. Drugs Today 34: 73–81, 1998.

BERTOLI C.; SKOTHEIM J.M.; BRUIN R.A.M. **Control of cell cycle transcription during G1 and S phases**. Nature reviews molecular cell biology 14: 518-528, 2013.

BHATTACHARYA S.; BAJAJ A. **Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids**. Chem Commun (Camb) 21(31): 4632-56, 2009.

BOTTONE M.G. et al. **Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview**. Cells 2: 294-305, 2013.

BRENER S.; JEUNON F.A.; BARBOSA A.A.; GRANDINETTI H.A.M. **Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente,**

estadiamento clínico e tratamento proposto. Revista Brasileira de Cancerologia 53(1): 63-69, 2007.

BUGLIONE M. et al. **Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Dental pathologies and osteoradionecrosis (Part 1) literature review and consensus statement.** Critical Reviews in Oncology/Hematology 97: 131–142, 2016.

CAMPISI J. **Aging, Cellular Senescence, and Cancer.** Annu Rev Physiol. 75: 685–705, 2013.

CARMONA-RIBEIRO A.M. **Bilayer-forming synthetic lipids: drugs or carriers?** Current medicinal chemistry 10(22): 2425-46, 2003.

CHAABANE W. et al. **Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer.** Arch. Immunol. Ther. Exp. 61:43–58, 2013.

CHEN J.J. et al. **TRAIL induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells: a crosstalk with oncogenic Ras regulated cell surface expression of death receptor 5.** Oncotarget. 4(2): 206–217, 2013.

CHEN K.M. et al. **Mechanisms of oral carcinogenesis induced by dibenzo[a,l]pyrene: an environmental pollutant and a tobacco smoke constituent.** International Journal of Cancer 02-27, 2013.

CHEN S. et al. **Sam68 reduces cisplatin-induced apoptosis in tongue carcinoma.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 35:123, 2016.

CHEN T.C. et al. **Associations among pretreatment tumor necrosis and the expression. of HIF-1a and PD-L1 in advanced oral squamous cell carcinoma and the prognostic impact thereof.** Oral Oncology 51:1004–1010, 2015.

CHILDS, B.G.; BAKER, D.J.; KIRKLAND, J.L.; CAMPISI, J.; VAN DEURSEN, J.M. **Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?** EMBO Rep.15(11):1139-53, 2014.

CHOI S.; MYERS J.N. **Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy.** J Dent Res 87(1):14-32, 2008.

CHOLE R.H. et al. **Estimation of serum malondialdehyde in oral cancer and precancer and its association with healthy individuals, gender, alcohol, and tobacco abuse.** J Can Res Ther 6:487-91, 2010.

COSWAY B.; LOVAT P. **The role of autophagy in squamous cell carcinoma of the head and neck.** Oral Oncol. 54:1-6, 2016.

DE FELICE F. et al. **Analysis of loco-regional failures in head and neck cancer after radical radiation therapy.** Oral Oncology 51:1051–1055, 2015.

DHAKSHINAMOORTHY S. et al. **Metabolomics identifies the intersection of phosphoethanolamine with menaquinone-triggered apoptosis in an in vitro model of leukemia.** Mol. BioSyst. 11(9): 2385–2598, 2015.

DIJKSTRA K.K.; BLANCHETOT C.; BOONSTRA J. **Evasion of G1 Checkpoints in Cancer.** In: SIDDIK, A.H. **Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy.** New York: Humana Press. p. 3-26, 2010.

DIMRI G.P. **What has senescence got to do with cancer?** Cancer Cell. 7(6): 505–512, 2005.

DUMACHE R. et al. **Genetic and Epigenetic Biomarkers of Molecular Alterations in Oral Carcinogenesis.** Clin Lab. 61(10):1373-8, 2015.

DUMMER R. et al. **Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study.** J. Am. Acad. Dermatol. 29: 963-970, 1993.

EIBL H.; ARNOLD D; WELTZIEN H.U.; WESTPHAL O. **Synthesen von Cholinphosphatiden, I. Zur Synthese von α - und β -Lecithinen und ihren Ätheranaloga.** Liebigs Ann. Chem. 709: 226-230, 1967.

EIBL H.; UNGER C. **Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug.** Cancer Treatment Reviews 17: 233-242, 1990.

ERNANI V.; SABA N.F. **Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management.** Oncology 89:187-195, 2015.

FELGNER P.L. et al. **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** Proc Natl Acad Sci U S A. 84(21): 7413–7417, 1987.

FERREIRA A.K. **Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolípidios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais.** Tese - Programa de Fisiopatologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FERREIRA A.K. et al. **Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine.** PLoS One 8(3):e57937, 2013a.

FERREIRA A.K. et al. **Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma.** Journal of Cancer Science and Therapy. 3(1): 53-59, 2011.

FERREIRA A.K. et al. **Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway.** Biomed Pharmacother. 67(6): 481-7, 2013b.

FERREIRA A.K. et al. **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.** Biomedicine & Pharmacotherapy. 66(1): 541-548, 2012b.

FERREIRA A.K. et al. **Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects.** British Journal of Cancer. 109, 2819–2828, 2013c.

FERREIRA A.K. et al. **Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study.** Anticancer Research 32(1): 95–104, 2012a.

FUCHS, Y.; STELLER H. **Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells.** Nat Rev Mol Cell Biol.16(6):329-44, 2015.

GAJATE C.; MOLLINEDO F. **Lipid Rafts, Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in the Antitumor Action of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine.** Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 14: 509-527, 2014.

GEIGER J.L. et al. **Adjuvant chemoradiation therapy with high-dose versus weekly cisplatin for resected, locally-advanced HPV/p16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma.** Oral Oncology 50:311–318, 2014.

GIBELLINI F.; SMITH T.K. **The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine.** IUBMB Life. 62(6):414-28, 2010.

GILLISON M.L. **Current Topics in the Epidemiology of Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers.** Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancers 779-792, 2007.

GRIMALDI N. et al. **Conduta do cirurgião-dentista na prevenção e tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura.** Revista Brasileira de Cancerologia 51(4): 319-324, 2005.

HENERY S. **Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods.** Apoptosis 13(8):1054-63, 2008.

HILLBERTZ N.S. **Viral and Molecular Aspects of Oral Cancer.** Anticancer Research 32:4201-4212, 2012.

HIROTA S.K. et al. **Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: A comparative analysis.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal 13(4):E227-31, 2008.

HO E.A. et al. **Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties.** Journal of Pharmaceutical Sciences 99(6): 2839-53, 2010.

HUANG A.C. et al. **Tetrandrine induces cell death in SAS human oral cancer cells through caspase activation-dependent apoptosis and LC3-I and LC3-II activation-dependent autophagy.** International Journal Of Oncology. 43: 485-494, 2013.

HUANG W.C. et al. **Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy.** Journal of Lipids ID565316 p.1-15, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> acessado dia 26/01/2017.

JERJES W. et al. **Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients.** *Head Neck Oncol* 2:9, 2010.

JIE M. et al. **Induction chemotherapy in patients with resectable head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis.** *World Journal of Surgical Oncology* 11:67, 2013.

JIMÉNEZ-LÓPEZ J.M. et al. **Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids** *Lipids in Health and Disease* 9:33, 2010.

JU AHNA M. et al. **Clinical recommendations for defining platinum unsuitable head and neck cancer patient populations on chemoradiotherapy: A literature review.** *Oral Oncology* 53:10–16, 2016.

JUREL S.K. et al. **Genes and oral cancer.** *Indian J Hum Genet.* 20(1): 4–9, 2014.

KAPOOR V.; ZAHARIEVA M.M.; DAS S.N.; BERGER M.R. **Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating.** *Cancer Letters* 319: 39–48, 2012.

the Akt–mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma

KARASAWA T.; STEYGER P.S. **An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity.** *Toxicology Letters* 237:3 219–227, 2015.

KAUFMANN-KOLLE P.; BERGER M.R.; UNGER C.; EIBL H. **Systemic administration of alkylphosphocholines. Erucylphosphocholine and liposomal hexadecylphosphocholine.** *Adv Exp Med Biol* 416: 165-168, 1996.

KHADEM VATAN S.; GHARAVI M.J.; RAHIM F.; SAKI J. **Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains.** *Korean J Parasitol* 49(1):17-23, 2011.

KOMOHARA Y.; JINUSHI M.; TAKEYA M. **Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumours.** *Cancer Sci* 105(1): 1–8, 2014.

KRISHNA A. et al. **Molecular concept in human oral cancer.** *Natl J Maxillofac Surg* 6(1):9-15, 2015.

KUNSTFELD R. et al. **Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a “humanized” SCID mouse model.** *The Journal of investigative dermatology* 120(3):476–482, 2003.

LAL A. et al. **A gene expression profile test to resolve head & neck squamous versus lung squamous cancers.** *Diagnostic Pathology* 8:44, 2013.

LASA-SARACÍBAR B. et al. **Lipid nanoparticles protect from edelfosine toxicity in vivo.** International Journal of Pharmaceutics. 474: 1–5, 2014.

LE X.F.; BAST JR R.C. **p27Kip1 as a Biomarker and Target for Treatment of Cancer.** In: **SIDDIK, A.H. Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy.** New York: Human Press. p. 215-233, 2010.

LEONARD R. et al. **Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer.** J. Clin. Oncol. 19: 4150-4159, 2001.

LOBRICH M.; JEGGO P. **The impact of a negligent G2M checkpoint on genomic instability and cancer induction.** Nat Rev Cancer 7(11): 861–869, 2007.

LUNA A.C.L.L. et al. **Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes.** Int J Nanomedicine. 11: 1577–1591, 2016.

MASUDA M. et al. **Stat3 orchestrates tumour development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers?** Curr Cancer Drug Targets 10(1): 117–126, 2010.

MATSUOKA Y. et al. **IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma.** British Journal of Cancer 115: 1234–1244, 2016.

MENEGUELO R. **Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10.** 2007. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/8/282131/tde-12022008-135651/.

MESSADI D.V. **Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions.** International Journal of Oral Science. 5, 59–65, 2013.

MODELELL M. et al. **Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids.** Cancer Res; 39:4681-6, 1979.

MORILLE M. et al. **Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer.** Biomaterials 29: 3477–3496, 2008.

MULTHOFF G.; RADONS J. **Radiation, inflammation, and immune responses in cancer.** Front Oncol 2: 58, 2012.

MUNDER, P.G.; MODELELL, M.; ANDREESSEN, R; WELTZIEN, H. U.; WESTPHAL, O. **Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects.** Immunopathology; 2: 187–203, 1979.

MURRAY M. et al. **Lipid analogues as potential drugs for the regulation of mitochondrial cell death.** British Journal of Pharmacology 171:2051–2066, 2014.

OLIVEIRA L.C. et al. **Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura.** Revista Brasileira de Cancerologia 58(4): 695-701, 2012.

OUTHOUSE E.L. **Amino-ethyl phosphoric ester from tumours.** Biochem J. 30(2): 197-201, 1936.

PACHIONI J.A. et al. **Alkylphospholipids – A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum.** J Pharm Pharm Sci 16(5) 742 – 759, 2013.

PANTANI C. et al. **Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod Echonogammarus-Tibaldll.** B. Enrion. Contam. Toxicol 55(2) 179-186, 1995a.

PANTANI, C. et al. **Effect of particulate matter on copper and surfactants acute toxicity to Echonogammarus-Tibaldll (crustacean, amphipoda).** Environ. Technol. 16: 263-270, 1995b.

PAVLOVIC Z. **Distinctive Roles and Molecular Regulation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase Alpha and Gamma Splice Variants.** Thesis Doctor of Philosophy in Human Health and Nutritional Sciences. University of Guelph, Canada, 2014.

PÉREZ-MANCERA P.A.; YOUNG A.R.J.; NARITA M. **Inside and out: the activities of senescence in cancer.** Nat Rev Cancer 14(8):547-58, 2014.

RATHOD S. et al. **A systematic review of quality of life in head and neck cancer treated with surgery with or without adjuvant treatment.** Oral Oncology 51 888–900, 2015.

REFAAT, A.; ABD-RABOU, A.; REDA, A. **TRAIL combinations: the new ‘trail’ for cancer therapy (review).** Oncol. Lett. 7, 1327–1332, 2014.

REIDY J.; MCHUGH E.; STASSEN L.F. **A review of the relationship between alcohol and oral cancer.** Surgeon 9: 278-283, 2011.

REUTER S.; GUPTA S.C.; CHATURVEDI M.M.; Aggarwal B.B. **Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?** Free Radic Biol Med. 1; 49(11): 1603–1616; 2010.

RIBEIRO I.P. et al. **Early detection and personalized treatment in oral cancer: the impact of omics approaches.** Molecular Cytogenetics 9:85, 2016.

RIEGER, A.M. et al. **Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death.** J. Vis. Exp. (50) e2597, 2011.

RISS T.L.; MORAVEC R.A.; NILES A.L.; BENINK H.A.; WORZELLA T.J.; MINOR L. in: SITTAMPALAM G.S.; COUSSENS N.P.; NELSON H.; ARKIN M.; AULD D.; AUSTIN C.; BEJCEK B.; GLICKSMAN M.; INGLESE J.; IVERSEN P.W.; LI Z.; MCGEE J.; MCMANUS O.; MINOR L.; NAPPER A.; PELTIER J.M.; RISS T.; TRASK OJ J.R.; WEIDNER J.; EDITORS. **Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli**

Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.2013 May 1 [updated 2015 Jun 29].

RIVERA C. **Essentials of oral cancer.** Int J Clin Exp Pathol 8(9):11884-11894, 2015.

ROY M.J. et al. **Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2family-driven pathway.** British Journal of Pharmacology 171 1973–1987, 2014.

RYTER SW; MIZUMURA K.; CHOI A.M.K. **The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities.** Hindawi Publishing Corporation International Journal of Cell Biology Volume 2014, Article ID 502676, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/502676>

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. 22: 261-4, 1970.

SARASTE A.;PULKKI K. **Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.** Cardiovascular Research 45:528–537, 2000.

SEITZ H.Z.; BECKER P. **Alcohol metabolism and cancer risk.** Alcohol Res Health 30(1):38-47, 2007.

SEMINI G. et al. **Glycosidated phospholipids - a promising group of anti-tumour lipids.** .Anticancer Agents Med Chem. 14(4):607-17, 2014.

SENGUPTA S. et al. **Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: Pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies.** Pharmacology Research 42(5): 459–464, 2000.

SHAGHAYEGH G. et al. **Cell cycle arrest and mechanism of apoptosis induction in H400 oral cancer cells in response to Damnacanthal and Nordamnacanthal isolated from Morinda citrifolia.** Cytotechnology 68:1999–2013, 2016.

SHERREE L.F. et al. **Analyzing cellular internalization of nanoparticles and bacteria by multi-spectral imaging flow cytometry.** J Vis Exp: e3884, 2012.

SCULLY C.; FELIX D.H. **Oral Medicine — Update for the dental practitioner Oral câncer.** British Dental Journal 200: 13-17, 2006.

SHIVANANDA NAYAK B.; PINTO S. **Protein thiols and thiobarbituric acid reactive substance status in colon cancer patients.** Scandinavian Journal of Gastroenterology 42(7): 848-851, 2007.

SPRONG H.; VAN DER SLUIS P.; VAN MEER G. **How proteins move lipids and lipids move proteins.** Natarue Reviews Molecular Cell Biology 2(7):504–513, 2001.

THAKUR A. et al. **Proapoptotic miltefosine nanovesicles show synergism with paclitaxel: implications for glioblastoma multiforme therapy.** Cancer Lett. 334(2):274–283, 2013.

TOWER J. **Programmed cell death in aging.** Ageing Research Reviews 23 90–100, 2015.

ULRICH A.S. **Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles.** Bioscience Reports 22(2):129-150, 2002.

UNGER C.; PEUKERT M.; SINDERMAN H.; HILGARD P.; NAGEL G.; EIBL H.J. **Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients.** Cancer Treat. Rev. 17:243-246, 1990.

VAN BLITTERSWIJK W.J.; VERHEIJ M. **Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects.** Current Pharmaceutical Design 14: 2061-2074, 2008.

VAN DER LUIT A.H.; VINK S.R.; KLARENBECK J.B.; PERRISSOUD D.; SOLARY E.; VERHEIJ M.; VAN BLITTERSWIJK W.J. **A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells.** Mol Cancer Ther 6 (8): 2337-45, 2007.

VAN MEERLOO J.; KASPERS G.J.; CLOOS J. **Cell sensitivity assays: the MTT assay.** Methods Mol Biol. 731:237-45, 2011.

VERHEIJ M.; MOOLENAAR W.H.; VAN BLITTERSWIJK W.J. **Combining Anti-tumor Alkyl-Phospholipid Analogs and Radiotherapy: Rationale and Clinical Outlook.** Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 14:618-628, 2014.

VINK S.R et al. **Radiosensitization of Squamous Cell Carcinoma by the Alkylphospholipid Perifosine in Cell Culture and Xenografts.** Clin Cancer Res 1;12(5):1615-22, 2006.

YANG Y.; FENG LI; WENLU LI. **Factors that affect the quality of life of patients with oral cancer who have had their defects reconstructed immediately after excision of the tumour.** Br J Oral Maxillofac Surg 54(4):410-4, 2016.

YANG R.S. et al. **Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin.** Toxicon 45: 661–669, 2005.

YU H.; KORTYLEWSKI M.; PARDOLL D. **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** Nat Rev Immunol 7(1): 41–51, 2007.

WANG Y. et al. **Decrease of autophagy activity promotes malignant progression of tongue squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med. 42: 557–564, 2013.

WANG Y.F.; CHANG S.Y.; TAI S.K.; LI W.Y.; WANG L.S. **Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma.** Head Neck. 24(9):850-8, 2002.

WESTPHAL, D.; KLUCK, R.M.; DEWSON, G. **Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis.** Cell Death Differ. 21, 196–205, 2014.

WU S.Y. et al. **Ionizing radiation induces autophagy in human oral squamous cell carcinoma.** J BUON: Official J Balkan Union Oncol. 19:137–44, 2014.

ZHANG, L. et al. **Dual induction of apoptotic and autophagic cell death by targeting survivin in head neck squamous cell carcinoma.** Cell Death and Disease. 6, e1771, 2015.

ZUCKERMAN, V.; WOLYNIEC, K.; SIONOV, R.V.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. **Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence.** J. Pathol. 219, 3–15, 2009.