Avaliação farmacológica sinérgica do composto monofosfoester 2-AEH₂F associado com fármacos envolvidos no metabolismo tumoral no modelo de carcinomatose de mama de Ehrlich

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo 2022

Avaliação farmacológica sinérgica do composto monofosfoester 2-AEH₂F associado com fármacos envolvidos no metabolismo tumoral no modelo de carcinomatose de mama de Ehrlich

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Monique Gonçalves

Avaliação farmacológica sinérgica do composto monofosfoester 2-AEH2F associado com fármacos envolvidos no metabolismo tumoral no modelo de carcinomatose de mama de Ehrlich / Monique Gonçalves Alves. -- São Paulo, 2022. Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia. Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1. Neoplasias da mama 2.2-AEH₂F fosfolipideo 3.Apoptose 4.DNA fragmentado 5.Progressão do ciclo celular.

USP/FM/DBD-170/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho, a minha mãe que sempre me incentivou em busca dos meus sonhos. Também dedico a meu avô, meu tio e a todos que infelizmente foram acometidos ou sofreram perdas por consequências do câncer

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Nossa Senhora e a toda a espiritualidade que me acompanha, protege e intui nos meus momentos de indecisão ou aflição. Agradeço a possibilidade de estar construindo esse futuro que desejo e acredito, considerando tantas pessoas que desejam, que são excelentes profissionais e que não tiveram as mesmas oportunidades que tive e tenho.

Agradeço imensamente a minha família, que é a minha base, minha raiz e o meu estímulo em busca do melhor que posso conseguir. Especialmente, a minha Mãe Gilvanda e meu Pai Inácio, que mesmo distantes estão presentes em todos os meus momentos. Agradeço por acreditarem nos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto, que admiro e tenho como amigo. Desde cedo me acolhendo, ensinando, desafiando e me impulsionando para crescer como profissional e ser humano. A todos meus amigos do laboratório que estiveram presentes nesta trajetória, obrigada pelas colaborações, conversas e relações sinceras: Thalles, Amanda, Thais, Rosa, Manuela, Daniel, Sergio, Mercedes, Luana, Alvaro, Lucas, Guilherme, Roselly e Julio. Vocês contribuíram significativamente em algum momento durante esta trajetória. Também ao Prof. Dr. Artur Luna, que me ofereceu a primeira oportunidade de aprender sobre esta área a qual me apaixono cada dia mais.

Ao Laertty, meu irmão de caminhada na profissão e na vida, durante estes 8 longos anos. Aos amigos que a vida me trouxe, aqueles que assim como os que até então foram citados, apoiaram e contribuíram com essa caminhada, aconselhando e deixando-a mais leve e alegre, podendo citar o Yuri, Thiago, Denise, Kurt, Rafael, Guilherme, Leonardo, Felipe, Jessica, Érika, Isabela, Ingryd e Anne.

Ao programa de pós-graduação, Angélica e Rose sempre tão solícitas e facilitadoras quando precisei resolver qualquer eventualidade. Assim como todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan.

A Prof. Dr.Juliana Pereira e Herbert que colaboram com o andamento do meu trabalho e a todos os professores que ajudaram na minha formação como profissional, em especial, Lupércio Silva, Mailson Rêgo, Abrãao Ribeiro, Naysa Flávia, Ângela Albino, David Holanda, Wilson Xavier, Carlos Brito e Jarbas Bauer.

Por fim, agradeço às pessoas e colegas que em algum momento contribuíram nesta construção constante da pessoa que sou e que quero me tornar no âmbito profissional e como ser humano.

"' Seja um debatedor de ideias. Lute pelo o que você ama."

- Augusto Cury

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	12
RESUMO	15
ABSTRACT	16
Introdução 1.1. Neoplasia 1.2. Microambiente tumoral 1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich 1.4. Fosfolipídios antineoplásicos (AFTs) 1.5. 2-aminoetil dihidrogênio fosfato (2-AEH2F) 1.6. Terapia metabólica	17 18 20 21 22 24 25
Objetivos 2.1. Objetivo Geral 2.2. Objetivos Específicos	28 29 29
 Materiais e Métodos 3.1. Animais 3.2. Cultura Celular 3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT 3.4. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por citometria de Fluxo 3.5. Análise do perfil de combinação de medicamentos 3.6. Avaliação da expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo 3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial 3.8. Análises Estatísticas 	 30 31 31 31 33 34 34 35 35
 Resultados 4.1. Determinação da atividade citotóxica 4.2. Perfil de distribuição das células do Tumor de Ehrlich e Fibroblastos L929 nas fases do ciclo celular 4.3. Análise do perfil farmacológico sinérgico 4.4. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial (ΔΨm) por citomet de fluxo 4.5. Expressão dos marcadores envolvidos nos mecanismos de inflamação e morte celular para as células do tumor ascítico de Ehrlich 	36 37 45 56 tria 63 66
Discussão	73
Conclusão	81
REFERÊNCIAS	83

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único

LD: Desequilíbrio de ligação

TME: Microambiente tumoral

VEGF: Fator de crescimento endotelial

HIF: Fatores induzíveis de hipóxia

NK: Natural killer

MDCs: Células supressoras de mielóides

ROS: Espécies reativas de oxigênio

OxPhos: Fosforilação oxidativa

MHC: Complexo de histocompatibilidade

EAT: Tumor ascítico de Ehrlich

ER-: Ausência de receptor de estrogênio

HSP70: Proteína Chaperona molecular e catalisadora

AFTs: Fosfolipídios antineoplásicos

2-AEH2F: 2-aminoetil dihidrogênio fosfato

PE: Fosfatidiletanolamina

HMG-CoA: 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A

AMPK: Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

CDK: Quinase dependente de ciclina

ΔΨM: Potencial elétrico mitocondrial

GM-CSF: Estimulador de colônia de macrófagos e neutrófilos

M1: Macrófagos pró-inflamatórios

IC50: Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

PI: lodeto de propídio

TNF: Fator de necrose tumoral

IL: Interleucina

DC: Células dendríticas

HNSCC: Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

PCYT2: Enzima fosfoetanolamina citidiltransferase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT. A) 2,4-Dinitrofenol(100mM-0.19mM), 2,4-Dinitrofenol (100mM-0.19mM) +2AEH₂F (22.82mM); B) Metformina (5mM-50mM), Metformina (5mM-50mM) + 2AEH₂F (22.82mM); C) Ác. Lipóico (0.01mM-6mM), Ac. Lipóico (0.01mM-6mM)+ 2AEH₂F (22.82mM);
- Figura 2: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT tratadas com 2-AEH₂F.
- Figura 3: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT. A) GM-CSF (7.5nM-75 nM), GM-CSF (7.5nM-75nM) + 2AEH2F (22.8mM); B) Sinvastatina (3.7µM-37.5µM) , Sinvastatina (3.7µM-37.5µM) + 2AEH2F (22.8mM); C) Paclitaxel (0.5µM-17.5µM), Paclitaxel (0.5µM -17.5µM) + 2AEH2F(22.8mM); D) Cloridrato de Meclizina(0.04mM-24mM), Cloridrato de Meclizina (0.04mM-24mM) + 2AEH2F(22.8mM); E) Coenzima Q10 (0.02mM-2.8mM), Coenzima Q10 (0.02mM-2.8mM) + 2AEH2F (22.8mM).
- Figura 4: Análise das fases do ciclo celular em células normais de fibroblasto murino L929 e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) tratadas com o monofosfoester 2-AEH₂F. As células foram tratadas por 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA, gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística, ns= não significativo ***p<0.001.
- Figura 5: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: GM-CSF (144.1nM) e GM-CSF (16nM)+ 2-AEH2F (22.8mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>
- Figura 6: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Sinvastatina(9.7 μM) e Sinvastatina (10.2 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05 e ***p<0.001.</p>
- Figura 7: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Paclitaxel (8.9 μM) e Paclitaxel (6.2 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo e ***p<0.001.</p>
- Figura 8: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Cloridrato de Meclizina (1.4 mM) e Cloridrato de Meclizina (2.1 mM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>
- Figura 9: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Coenzima Q10 (5.5 μM) e Coenzima Q10 (5.9 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>
- Figura 10: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com GM-CSF, 2-AEH2F e associação GM-CSF + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.

Figura 11: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino

L929; **B)** Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com Sinvastatina, 2-AEH2F e associação Sinvastatina + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.

- Figura 12: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com Coenzima Q10, 2-AEH2F e associação Coenzima Q10 + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.
- Figura 13: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas em concentrações variadas, com Cloridrato de Meclizina, 2-AEH₂F e associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.
- Figura 14: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas em concentrações variadas, com Paclitaxel, 2-AEH₂F e associação Paclitaxel + 2-AEH₂F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.
- **Figura 15: Gráfico do potencial elétrico mitocondrial. A)** Células normais de fibroblasto murino L929; **B)** Células do tumor ascítico de Ehrlich. Gráfico de barra mostrando a correlação do efeito dos tratamentos na mitocôndria expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, ***p<0.001.
- Figura 16: Gráfico da expressão dos marcadores em células do tumor ascítico de Ehrlich. A) BCl2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53; E) TNF; F)IL-1;G) IL-6; H) IL-2. Expressão dos marcadores dependendo dos tratamentos, quantificado por citometria de fluxo, 24h após os tratamentos nos valores de IC_{50%}. Valores expressos como média ± DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey -Kramer. ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001
- Tabela 1: Representantes fosfolipídios antitumorais e alguns dos seus efeitos descritos na literatura.
- Tabela 2: Valores das concentrações de inibição celular de 50% (IC 50%) dos tratamentos 2,4- Dinitrofenol, Metformina e Ácido Lipóico e suas associações com o 2-AEH₂F para as células normais de fibroblasto murino (L929) e células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT).
- Tabela 3: Concentrações de inibição celular de 50% (IC_{50%}) dos tratamentos GM-CSF, Sinvastatina, Paclitaxel, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10 e suas associações com o 2-AEH₂F para as células normais de fibroblasto murino (L929) e células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT).
- Tabela 4: valores do potencial elétrico mitocondrial. Células normais de fibroblasto murino L929 e Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas com 2-AEH₂F, GM-CSF, Sinvastatina, paclitaxel, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10 e associadas também ao 2-AEH₂F, por um período de 24h. Tabela representativa mostrando o efeito dos fármacos no potencial elétrico da mitocôndria expresso em média ± DP de três experimentos independentes.
- Tabela 5: Indicadores da expressão dos marcadores nas células tumorais de Ehrlich. GM-CSF e GM-CSF + 2-AEH₂F; Sinvastatina e sinvastatina + 2-AEH₂F; Paclitaxel e Paclitaxel + 2-AEH₂F; Cloridrato de meclizina e Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F; Coenzima Q10 e Coenzima Q10 + 2-AEH₂F e 2-AEH₂F.

RESUMO

O fosfolipídio sintético 2-aminoetil dihidrogênio fosfato (2-AEH₂F) é um precursor lipídico, éster fosfórico amino-etil, que em estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram um potencial citotóxico em diversas linhagens tumorais: células de melanoma murino B16F10, células de câncer de mama MCF-7 e células leucêmicas humanas K562, sem afetar a viabilidade e a capacidade proliferativa das células normais. Fármacos utilizados na prática clínica são candidatos viáveis para a terapia combinada devido às suas interações inibitórias ou moduladoras sobre o metabolismo tumoral, ou mesmo diretamente potencializando a atividade tumoral de outras drogas combinadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo, sinérgico, antitumoral e pró- apoptótico das associações entre o composto 2-AEH₂F e os seguintes fármacos: Sinvastatina, Metformina, GM-CSF, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10, Paclitaxel, Ácido Lipóico e 2,4-Dinitrofenol, no modelo in vitro de carcinomatose mamária ascítica de Ehrlich. Foram realizados neste estudo a determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico de MTT; a análise das fases do ciclo celular; do potencial elétrico mitocondrial, de checagem do ciclo celular e apoptose, em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) em comparação às células de fibroblasto murino L929. Bem como a expressão de marcadores nas células. Os resultados mostraram que o composto 2-AEH₂F associado aos fármacos GM-CSF, Sinvastatina e Coenzima Q10 apresentaram efeitos sinérgico e aditivo, respectivamente, que foram capazes de aumentar a quantidade de DNA fragmentado, modular a progressão das fases do ciclo celular e potencializar os efeitos citotóxicos contra as células tumorais. Além disso, o tratamento 2-AEH₂F em combinação com o quimioterápico Paclitaxel apresentou a maior redução do potencial elétrico mitocondrial em células tumorais (EAT). O 2-AEH₂F foi capaz de modular a expressão dos marcadores para um perfil de resposta pró-inflamatória isoladamente ou em associação com os outros fármacos, demonstrando o seu potencial no controle da proliferação celular *in vitro* no modelo do tumor ascítico de Ehrlich.

Palavras chaves: Câncer de mama, 2-AEH₂F, fosfolipídio, apoptose, DNA fragmentado, progressão do ciclo celular.

ABSTRACT

The antineoplastic phospholipid 2-aminoethyl dihydrogen phosphate (2-AEH₂F) is a lipid precursor, amino-ethyl phosphoric ester, which in previous studies has shown to have cytotoxic potential against B16F10 murine melanoma cells, MCF-7 breast cancer cells, leukemic cells and capable of altering macrophage metabolism and inhibiting tumor growth by inducing apoptosis. In addition, some conventional drugs used in clinical practice are considered viable candidates for combination therapies due to their inhibitory and modulating activities of cellular metabolism or antitumor. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antiproliferative, antitumor and pro-apoptotic potential of the association between the compound 2-AEH₂F and the drugs Metformin, GM-CSF, Meclizine Hydrochloride, Coenzyme Q10, Simvastatin, Paclitaxel, Lipoic Acid and 2,4-Dinitrophenol in the in vitro model of Ehrlich's ascitic mammary carcinomatosis. For this, the tests for Determination of cytotoxic activity by the MTT method, the analysis of the phases of the cell cycle, fragmented DNA, the pharmacological effects of the associations and the mitochondrial electrical potential were evaluated in normal murine fibroblast cells (L929) and in tumor cells. Ehrlich ascites (EAT), the expression of markers in tumor cells was subsequently evaluated. The results indicate that the compound 2-AEH₂F associated with the drugs GM-CSF, Simvastatin and Coenzyme Q10 showed synergistic and additive effects, respectively, there was also an increase in fragmented DNA, ability to modulate the progression of cell cycle phases and increased effects antiproliferative and cytotoxic against Ehrlich ascites tumor cells. Furthermore, the 2-AEH₂F + Paclitaxel(12h) group showed the greatest reduction in mitochondrial electrical potential in tumor cells and we observed that 2-AEH₂F modulates the expression of markers for a pro-inflammatory response both alone and co-administered with other drugs.

Keywords: Breast cancer, 2-AEH₂F, metabolic therapy, therapeutic association.

Introdução

1.1. Neoplasia

Apesar dos avanços significativos na compreensão dos processos de tumorigênese, medicina preventiva, métodos de diagnósticos precoces e disponibilização de novos tratamentos, o câncer continua sendo considerado como uma das mais relevantes causas de morte a nível mundial. De acordo com a Globocan (2020), estima-se que em 2020 houve uma incidência de 19,3 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes, com previsão que em 2040, a incidência alcance 30,2 milhões de pessoas, com uma taxa de mortalidade de 16,3 milhões¹. No Brasil, comparando a taxa de incidência e mortalidade do ano de 2020 para o ano de 2040, é previsto um aumento de novos casos e 80,9% de mortes¹.

De modo gera, câncer é um nome genérico para mais de 100 tipos de doenças que exibem uma capacidade de proliferação desordenada, que invadem e comprometem as relações estruturais e funcionais entre os órgãos e tecidos, impactando a homeostase de todo o organismo, através de um processo de metástase, muitas vezes causando a morte do paciente afetado ^{2,3}.

Para isso, a medida que as células normais evoluem para um estado neoplásico, assim como proposto por Hanahan e Weinberg (2000), elas adquirem diversas características marcantes que incluem a sustentação da sinalização proliferativa, bloqueio dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, angiogênese e ativação da invasão e metástases⁴. Posteriormente, mais duas características emergentes foram acrescidas, a reprogramação do metabolismo energético e a capacidade de escape da vigilância do sistema imune⁵. Há um consenso que essas etapas são consequências de uma instabilidade genômica no qual o sistema de reparo do DNA apresenta defeitos que vão prosseguir durante as fases do ciclo celular ⁶.

Nas últimas décadas, a epigenética, que descreve estados de expressão genética mitótica e meioticamente hereditários que não estão relacionados a alterações na sequência de DNA, surgiu como um dos principais contribuintes para a carcinogênese⁷. O estilo de vida, alimentação, condições básicas de saúde e moradia, entre outros, estão relacionadas diretamente com o início e progressão do câncer.

Modificações como a hipometilação aberrante no DNA causa a expressão de oncogêneses, enquanto a sua hipermetilação causa a inibição de genes supressores de tumor, podendo iniciar a doença e, da mesma forma, ser preditoras dos resultados

clínicos⁸. Essas mudanças epigenéticas, em particular a hipermetilação aberrante do promotor que está associada ao silenciamento gênico inadequado, afetam todas as etapas da progressão do tumor, podendo resultar no silenciamento permanente dos genes e uma vantagem seletiva as células neoplásicas, assim como as mutações⁹.

Por sua vez, as instabilidades genômicas associadas a linhagem germinativa são analisadas sistematicamente nos últimos anos, através de estudos sobre associação em todo o genoma (GWAS), buscando rastrear até milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e outras variantes de vários genes com base no desequilíbrio de ligação (LD)¹⁰.

Por exemplo, identificou-se 26 genes, dos quais sete regiões estão relacionadas com todos os riscos de câncer de mama e quatro ao câncer de mama negativo para o receptor de estrogênio¹¹. Além do gene TAGLN (rs74949440) no cromossomo 11q23 e o gene RPS6KC1 (rs17020562) no cromossomo 1q32.3 estarem significativamente associados com o risco de câncer de mama em crianças que apresentaram câncer infantil¹². Indiscutivelmente, o câncer é uma doença multigênica, consequência de mutações, sinalizações celular complexas e alterações epigenéticas.

Dentro desta perspectiva, uma característica necessária para as células tumorais é a sustentação da proliferação crônica, para isso, elas produzem ligantes do fator de crescimento que resulta na estimulação proliferativa autócrina, além da estimulação das células normais do estroma associado ao tumor, que fornecer vários fatores de crescimento^{13,14}. Frequentemente esses sinais também influenciam outras propriedades biológicas celulares, por exemplo, a sobrevivência celular e o metabolismo energético⁵.

Por sua vez, a supressão dos mecanismos apoptóticos não está relacionada apenas com o desenvolvimento da tumorigênese e a manutenção do fenótipo maligno, mas também com a resistência a drogas ^{15, 16, 17, 18, 19}. Os tratamentos tradicionais podem reduzir inicialmente a massa tumoral, porém a longo prazo sucedem na seleção de clones mais resistentes que persistem e dão margem para a recidiva, a rádio e a quimioterapia provoca efeitos deletérios sistêmicos e, além disso, podem induzir danos ao DNA e mutações genéticas que levam a tumores secundários ^{20, 21}.

No que lhe diz respeito, a terapia molecular direcionada com anticorpos específicos, inibidores da quinase e, mais recente, a imunoterapia CAR-T^{22, 23, 24}

19

trazem a ideia de serem mais efetivos para o tratamento do câncer, mas com efeitos colaterais que ainda serão determinados futuramente³.

1.2. Microambiente tumoral

O microambiente tumoral (TME) inclui células tumorais, células do estroma, vasos sanguíneos, fibras nervosas, matriz extracelular, componentes intercelulares e metabólitos localizados dentro, na margem ou nas proximidades da lesão tumoral²⁵. É válido afirmar que é através dele que o câncer se relaciona com todo o organismo de tal forma que, atualmente, estudos classificam o TME em seis microambientes especializados: nicho hipóxico, microambiente imunológico, microambiente de metabolismo, nicho ácido, nicho inervado e microambiente mecânico²⁵.

O nicho hipóxico é uma marca registrada do câncer, essencial para a reprogramação da biologia do câncer, incluindo a progressão, estamparia, dormência, adaptação, comunicação intercelular e a resistência terapêutica^{26, 27}. Está associado ao aumento da carga mutacional, alterações de oncogenes, como o MYC e supressores de tumor como TP53 e PTEN ^{28, 29}. A ativação de fator de crescimento endotelial (VEGF), relacionado ao aumento dos fatores induzíveis de hipóxia (HIF), estimulam o aumento da angiogênese excessiva, além de afetar a dinâmica do TME e a eficácia terapêutica^{30, 31}. Ocupam quase todo o tumor e o microambiente externo²⁵. Além disso, o nicho hipópxico reprograma outros microambientes especializados, sendo capaz de iniciar uma cascata induzida por hipóxia, afetando principalmente os microambientes de metabolismo, o imunológico e o ácido ²⁵.

O microambiente imunológico abrange macrófagos associados ao tumor (TAMs), células tumorais, células T e B, natural killer (NK), células supressoras de mieloides (MDSCs), granulócitos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos associados ao tumor, adipócitos, fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais vasculares e pericitos^{32, 33.} A infiltração de células imunes no TME relaciona-se profundamente com o prognóstico do câncer e a sua metastização. No qual, células T reguladoras CD4+, CD25+, FOXP3+ (T reg), neutrófilos Ly6G+, macrófagos e MDSCs ajudam a construir um nicho pré-metastático e imunossupressor, na medida que células T CD4+ ou CD8+Th1 e neutrófilos Ly6G tem funções opostas^{34.}

Por sua vez, o aumento do metabolismo de glicose, lipídios, aminoácidos, acúmulo de lactato e dependência de ROS caracteriza a reprogramação do metabolismo^{35, 36, 37,38}. Evidenciando o lactato, espécies reativas de oxigênio (ROS) e lipídios, podemos inferir que a reprogramação metabólica tem uma relação direta para suprir os demais nichos do TME. Diferente das células normais, as tumorais metabolizam glicose e metabolismo do lactato elevado mesmo em condições normais (efeito Warburg), ao invés da fosforilação oxidativa (OxPhos)²⁵.

Além da produção de energia, o efeito Warburg permite que o lactato provindo dos substratos de glicose e glutamina promova a polarização de macrófagos para um fenótipo pró-tumor (eixo hipóxia-lactato), na mesma medida que induz sobrevivência de células hipóxicas, angiogênese e um microambiente ácido^{39.} Além disso, alta concentração de lactato modula a expressão de FOXP3 e suprime Myc e a glicólise em células Treg, responsáveis por promover a supressão do microambiente de suporte para as células tumorais⁴⁰.

1.3. Tumor Ascítico de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é considerado uma neoplasia transplantável que tem origem epitelial maligna, que corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas ⁴¹, ⁴². Caracteriza-se como um modelo que prolifera rapidamente possuindo células pleomórficas e anaplásicas as quais apresentam relação núcleo citoplasma, nucléolos múltiplos e proeminentes, além do núcleo com a cromatina frouxa ⁴³.

Em sua forma ascítica, o tumor de Ehrlich desenvolve neutrofilia, trombocitopenia, esplenomegalia, hematopoiese esplênica e também o aumento de macrófagos, crescendo em várias linhagens murinas pela ausência de antígenos do complexo de histocompatibilidade (MHC) ^{44, 45, 46, 47}. Além disso, o tumor ascítico de Ehrlich (EAT) é definido como agressivo e resistente à morte, associado à uma superexpressão de HSP70 e a ausência de receptor de estrogênio (ER-)⁴⁸. Portanto, com um prognóstico mais agressivo.

É um modelo translacional de câncer envolvido na formação de carcinomatose abdominal em humanos, o EAT assemelha-se aos tumores humanos mais sensíveis, indiferenciados e com crescimento rápido⁴⁹. Portanto, sendo uma das formas mais estudada na oncologia experimental, por facilitar a compreensão de mecanismo de ação consequentes de potenciais substâncias terapêuticas, para o reconhecimento de processos imunológicos e moleculares, embora tenha as suas limitações em retratar com precisão as respostas imunológicas desenvolvidas por tumores humanos⁵⁰.

1.4. Fosfolipídios antineoplásicos (AFTs)

As membranas biológicas são formadas principalmente por fosfolipídios (FLs), colesterol e proteínas. Por sua vez, os FLs exercem diversas funções, influenciando em processos catalíticos, atuando na síntese de macromoléculas, estabelecendo uma barreira de permeabilidade e influenciando de modo ativo na comunicação entre o meio intra e extracelular através da transdução de sinalização celular e a interação lipídio/proteína ^{51, 52}. Os análogos AFTs são uma classe de lipídios que apresentam atividade antitumoral como potentes indutores de apoptose, atuando no nível da membrana celular, por interferir na sinalização de lipídeos e, consequentemente, inibir a sua renovação^{53, 54}. Diferente da maioria dos quimioterápicos usados, os AFTs tem suas ações relacionadas com a modificação do turnover na membrana celular ⁵⁵. Embora seu mecanismo não seja totalmente compreendido, afetam a geração do ácido fosfatídico, diacilglicerol e fosfoinositídeo, modificam a propriedade física da membrana ocasionando um estresse celular e, consequentemente, a ativação do mecanismo de morte celular por apoptose ⁵⁵.

Principalmente compostos por uma longa cadeia de hidrocarbonetos apolares, são inseridos na bicamada lipídica com facilidade. Para isso, como os principais representantes dessa classe de agentes antitumorais, podemos elencar: Edelfosina, miltefosina, perifosina e a eurofosina⁵²(Tabela1). Além disso, os AFTs podem ser divididos em dois grandes grupos, os alquil éter fosfolipídeos, também conhecidos como éter lipídeos antitumorais ou análogos alquil fosfolipídeos antitumorais e o grupo alquilfosfocolina (AFC), que não apresentam glicerol na sua estrutura⁵².

AGENTE ANTITUMORAL TRATAMENTO E EFEITOS

Miltefosina ou MILTEX®	Usado para tratamento de câncer de mama com lesões cutâneas e pode ser usado concomitantemente com tratamento endócrino ou quimioterapia ^{56,57,58} . Apresenta atividade anti-leishmania ⁵⁹ . Mostrou toxicidade no trato gastrointestinal <i>in vivo</i> e atividade antitumoral limitada ^{60,61} .
Perifosina ou KRX-0401	Usado em ensaios clínicos para mieloma múltiplo ⁶² , câncer colorretal ⁶³ , leucemia linfocítica crônica ⁶⁴ , entre outros. Apresenta maior biodisponibilidade oral e menor toxicidade quando comparado a mitelfosina ⁶⁵ , demonstrou alterações na função mitocondrial desregulando a homeostasia da mitocôndria e aumento da produção de ROS em testes <i>in vitro</i> ⁶⁶ , porém não apresenta uma melhora adicional quando comparado aos tratamentos já comercializados ⁶⁷
Edelfosina (EDLF)	Alquil-lisofosfolipídeo sintético (ALP), mostrou alta atividade antitumoral em diferentes modelos de tumores <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de modo seletivo ⁶⁷⁻⁶⁹ .Baixa toxicidade por administração oral ⁷⁰ , entretanto, sua administração intravenosa revelou toxicidade hemolítica, permitindo a aplicação terapêutica apenas em pacientes com leucemia aguda ⁷¹ .

Erufosina (ErPC3)	Considerado um lipídio antitumoral de 2º geração, tem
	como objetivo o tratamento sistêmico do câncer 72.
	Modificações químicas em sua estrutura indicam uma
	menor toxicidade hemolítica e administração
	intravenosa ⁷³ . Lipoplexos preparados a partir de um pró-
	fármaco de erufosina e um DNA de plasmídeo que
	codifica uma proteína pró-apoptótica (TRAIL),
	forneceram evidências de citotoxicidade seletiva para
	diversas linhagens tumorais enquanto as células não
	tumorais eram resistentes ⁷⁴ .

 Tabela 1: Representantes fosfolipídios antitumorais e alguns dos seus efeitos descritos na literatura.

1.5. 2-aminoetil dihidrogênio fosfato (2-AEH2F)

I

O fosfolipídio antineoplásico 2-aminoetil dihidrogênio fosfato (2-AEH₂F) é classificado como um precursor lipídico, éster fosfórico amino-etil que, assim como seu análogo natural, fosfatidiletanolamina (PE), é um substrato central na biossíntese de fosfolipídios das membranas celulares, especialmente a fosfatidilcolina^{75, 52}.

A PE compõe cerca de 25% dos fosfolipídios de mamíferos, no cérebro este conteúdo chega a ser por volta de 45% do total de fosfolipídios⁷⁵. Ademais, as membranas internas das mitocôndrias são enriquecidas com PE em comparação com outras membranas, de tal forma que a sua diminuição altera profundamente a morfologia mitocondrial ⁷⁶. Além de contribuir para a estrutura da membrana, a PE participa de múltiplas facetas do metabolismo e da biologia celular, como a regulação mestre da homeostase do colesterol⁷⁷ e a doação da porção etanolamina que modifica covalentemente várias proteínas, como por exemplo а glicosilfosfatidilinositol na membrana plasmática 77.

Curiosamente, seu análogo sintético 2-amino-etil-dihidrogenofosfato (2-AEH₂F), em estudos in vivo apresentou a capacidade de alterar o metabolismo dos macrófagos⁷⁸, inibição do crescimento tumoral por indução de apoptose⁷⁵, potencial citotóxico contra células tumorais através de vários mecanismos⁵², capacidade inibitória em células de melanoma murino B16F10⁷⁹, inibição do crescimento tumoral por indução de apoptose e bloqueio do ciclo celular em células de câncer de mama MCF-7⁸⁰, capacidade citotóxica contra células leucêmicas⁸¹, capacidade antiangiogênica e anti-metastática⁸². O 2-AEH₂F se mostrou capaz de alterar o potencial da membrana mitocondrial, modular a atividade da caspase-3, além de aumentar a expressão de p53 e suprimir a expressão de ciclina D1 e Bcl-2⁸³.

Consistente com esses resultados, a formulação lipossomal DODAC/ 2- AEH₂F testada *in vitro* em células de câncer de mama MCF-7 apresentou alterações nos arranjos celulares, como mudança morfológica, fragmentos de membranas e perda de prolongamentos citoplasmáticos, diminuição das células senescentes avaliado pela atividade da enzima β-galactosidase, atividade apoptótica avaliado pela Anexina V/PI e diminuição significativa da capacidade de proliferação celular⁸³. Da mesma forma, quando também associado a Cloridrato de Meclizina e metil-β-ciclodextrina, a viabilidade celular demonstrou uma diminuição significativa, com redução na produção de radicais livre e aumento do fragmento de DNA, bem como diminuição de células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 na fase do ciclo celular G0/G1⁸⁴.

1.6. Terapia metabólica

Nos últimos anos, a pesquisa e o tratamento do câncer mudaram de um modelo centrado nas células tumorais para um com foco no TME, considerando a sua crescente importância para a carcinogênese e metástase tumoraL²⁵. Para isso, medicamentos convencionais como por exemplo, aspirina, celecoxibe, estatinas, entre outros estão sendo considerados como candidatos viáveis para uma terapia combinada, graças às suas atividades antitumoral e ao amplo uso na prática clínica²⁵.

As estatinas, são os medicamentos mais prescritos em todo o mundo e vem chamando atenção devido a diversos estudos in vitro que apontam efeitos pró apoptóticoS. Conhecidas por agir na síntese do colesterol, são inibidoras da redutase 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), impedindo a síntese do mevalonato, que tem diversos metabólitos finais implicados em vários processos da carcinogênese ^{85, 86}.

A metformina, é um antidiabético da classe das biguanidas que se mostrou promissor⁸⁷. Reduz glicemia plasmática, porcentagem de hemoglobina glicada e ativa intracelular a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), uma

vez ativada, a AMPK regula a homeostasia energética através do metabolismo da glicose e dos lipídios, bem como, a expressão gênica e síntese proteica, já que é uma sensibilizadora do balanço energético celular ^{88, 89, 90}.

O cloridrato de Meclizina, é um antagonista H1 da histamina que tem se destacado por ser capaz de inibir a respiração celular ⁸⁴. Em estudo realizado por Gohil et. al, a inibição da enzima através da Cloridrato de Meclizina resultou no acúmulo de seu substrato, fosfoetanolamina que em grandes quantidades, inibiu diretamente a respiração mitocondrial⁹¹. Nas células de câncer de cólon humano (COLO 205 e HT 29), causou parada na fase G0/G1 do ciclo celular e induziu o aumento dos níveis de proteínas p53 e p21 relacionadas ao ciclo celular, bem como inibiu as atividades de quinase 2 dependentes de ciclina (CDK2) e CDK4 ⁹². Nas células de câncer de mama MCF-7, quando associadas ao 2-AEH₂F, também apresentou efeitos citotóxicos com um aumento significativo de DNA fragmentado⁸⁴.

No que se refere às espécies reativas de oxigênio, sob hipóxia, diversos estudos indicam que a Coenzima Q10 possui benefícios devido seus efeitos antioxidantes em paciente portadoras de câncer de mama, capaz de reduzir a produção de ROS através do par de Coenzima Q mitocondrial em células normais, ao mesmo tempo que aumenta o estresse oxidativo nas células tumorais ⁹³⁻¹⁰¹. Da mesma forma, o Ácido Lipóico também é descrito na literatura como um poderoso antioxidante, específico na eliminação de radicais livres e indução da expressão de genes importantes na defesa antioxidante ¹⁰².

Por sua vez, o 2,4-dinitrofenol facilita o fluxo de prótons na matriz mitocondrial e reduz o potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$ M), portanto é considerado como um desacoplador artificial da fosforilação oxidativa e inibidor da criação de fosfatos ricos em energia ¹⁰³. Apesar de ser considerado tóxico em alta concentração, estudos em áreas distintas indicam propriedades benéficas de seu uso em baixas concentrações, apresentando ações neuroprotetoras e, além disso, efeitos antitumorais como quando associado ao monoalquil fosfato em células tumorais de mama humano triplo negativo MDA-MB 231 ^{104, 105}.

Além disso, a ideia de que o sistema imunológico tem a capacidade de reconhecer e eliminar células tumorais portadoras de antígenos é conhecido como imunovigilância do câncer e tem sido o principal foco da imunoterapia ^{106, 107}. Apesar de recentes estudos que questiona a real ação do estimulador de colônia de macrófagos e neutrófilos (GM-CSF) dentro do microambiente tumoral, dados pré-

clínicos confirmam que o GM-CSF é um alvo potencial em muitas condições inflamatórias, normalmente polarizando os macrófagos para o perfil M1^{108, 109, 110}. Essa estimulação da resposta inflamatória pode aumentar a apresentação de antígenos do tumor, consequentemente a ativação do sistema imunológico específico ^{109, 111}.

Para tanto, uma estratégia terapêutica que inclua o caráter multifacetado e o microambiente no desenvolvimento e progressão do tumor, é uma opção promissora porque inclui como medidas terapêuticas compostos que agem além de uma única característica maligna, como proposto neste projeto.

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antiproliferativo, antitumoral e pró- apoptótico da associação farmacológica entre o composto 2-AEH2F e os fármacos Sinvastatina, Metformina, GM-CSF, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10, Paclitaxel, Ácido Lipóico e 2,4-Dinitrofenol no modelo in vitro da carcinomatose mamária ascítico de Ehrlich.

2.2. Objetivos Específicos

• Estabelecer as concentrações dos fármacos 2-AEH2F, Sinvastatina, Metformina, GM-CSF, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10, Paclitaxel, Ácido Lipóico e 2,4-Dinitrofenol e suas associações in vitro no modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

 Avaliar a viabilidade celular das células tumorais e normais após os tratamentos e suas associações para a determinação da concentração inibitória 50% (IC_{50%}) pelo método colorimétrico MTT;

 Analisar a distribuição das populações de células tumorais e normais nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo;

 Analisar os fatores preditivos farmacológicos sinérgicos, aditivos ou antagônicos das associações pelo SynergyFinder;

- Avaliar o potencial elétrico mitocondrial das células tumorais e normais tratadas no valor da concentração inibitória 50%;
- Analisar os marcadores de morte celular, inflamação e promoção do câncer.

Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c (fêmeas, pesando entre 22 e 30g), fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos com livre acesso a água e ração, seguindo os protocolos experimentais que aprovados pela Comissão de Ética do Instituto Butantan - CEUAIB (Protocolo nº 2806060919). Uma alíquota de células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) foi descongelada e sua concentração ajustada em 2x10⁶ células/ml. Para a realização dos testes in vitro, as alíquotas das células tumorais do adenocarcinoma de Ehrlich foram coletadas após 14 dias da inoculação.

3.2. Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem de células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) e fibroblasto murino normal (L929), originária da ATCC (código CCL-1[™]), presentes no banco de células do Lab. de Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan. As células foram descongeladas, transferidas para garrafa de cultura células (25 cm²), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO2 à 37°C. Quando dispostas em monocamadas, foram submetidas a dissociação enzimática com solução de tripsina 0,2% + EDTA 0,02%, para que ocorresse o seu desprendimento e neutralizado pela adição do meio de cultura RPMI contendo 10% SFB. As células tumorais de Ehrlich foram mantidas no meio de cultura RPMI contendo 10% SFB e contadas na câmara de Neubauer antes da realização dos experimentos. O teste de azul de tripan foi realizado para determinar se tinha a viabilidade celular ideal (superior a 94%) para a execução dos experimentos.

3.3. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) e fibroblasto murino normal (L929) foram incubadas em placas de 96 poços, a uma concentração de 1×10^5 células/poço durante 24h e tratadas com os grupos descritos abaixo. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi coletado e adicionado 100μ L de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, as células foram incubadas, por 3h em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescentado 100 μ L de álcool metílico para dissolver os cristais de

formazan precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em um leitor de ELISA em comprimento de onda de 540nm. Foi determinada após 24h em diferentes concentrações dos fármacos, a concentração que induz toxicidade em 50% das células (IC_{50%}), para avaliação do efeito dose-resposta. O controle foi estabelecido com células tumorais de Ehrlich e células normais de fibroblasto murino L929 contendo apenas meio RPMI. Quando realizado a etapa dos tratamentos associados com o 2-AEH₂F, foi estabelecido que o 2-AEH₂F estaria numa concentração fixa da metade do valor isolado de sua IC_{50%}. Além disso, nesta etapa dos tratamentos associados associados, os demais fármacos foram acrescentados com 3h de antecedência do 2-AEH₂F, em diferentes concentrações por diluição seriada, com intuito de sensibilizar as células tumorais e normais.

	Tratamentos
Grupo I	2-AEH2F
Grupo II	Paclitaxel
Grupo III	GM-CSF
Grupo IV	Sinvastatina
Grupo V	Metformina
Grupo VI	Cloridrato de Meclizina
Grupo VII	Coenzima Q10
Grupo VIII	Ácido Lipóico
Grupo IX	2,4- Dinitrofenol
Grupo X	Paclitaxel + 2-AEH2F
Grupo XI	GM-CSF + 2-AEH2F
Grupo XII	Sinvastatina + 2-AEH2F
Grupo XIII	Metformina + 2-AEH2F
Grupo XIV	Cloridrato de Meclizina + 2-AEH2F
Grupo XV	Coenzima Q10 + 2-AEH2F
Grupo XVI	Ácido Lipóico + 2-AEH2F
Grupo XVII	2,4- Dinitrofenol + 2-AEH2F

3.4. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por citometria de Fluxo

As células normais e tumorais foram submetidas aos tratamentos por um período 24 h. As células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 min.

Em seguida, o pellet foi ressuspenso em solução de álcool 70º e álcool RNAse e armazenado no freezer -20ºC por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e ressuspensas em 200 µL de tampão Fac's, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), foram mantidas por 30 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACS calibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.5. Análise do perfil de combinação de medicamentos

Para determinar o potencial efeito sinérgico das drogas, as células L929 e do tumor ascítico de Ehrlich (EAT), foram submetidas aos tratamentos como descrito no item 3.3.. O Software Synergy Finder 2.0 quantificou o grau de sinergia sobre o efeito multiplicativo de medicamentos únicos de forma independente pelo modelo Bliss. para quantificar a sinergia de combinação de drogas (S) em relação ao efeito de combinação de múltiplas drogas, as seguintes formulações, medido entre 2 drogas:

$$S_{BLISS} = E_{A,B} - (E_A + E_B)$$

$$SynergyScore = \frac{-\log(p)}{\log(0.05)} x \frac{t}{|t|}$$

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

As células tumorais quando associadas foram sensibilizadas por um período de 3h e 12h da mesma maneira como descrito no tópico 3.3. Após os tratamentos foram utilizados diversos marcadores envolvidos com a promoção do câncer, inflamação e morte celular (BCL-2, Caspase 3, Citocromo C, p53, TNF- α, II-1, IL-6, IL-2). As células foram centrifugadas a 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 200µL de tampão FAcs Flow contendo 0,1% de paraformaldeído. Em citômetro de fluxo FACScanto(BD) foi realizado a leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais, na intensidade de fluorescência FL-1, os histogramas foram

adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest -BD.

3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial

O Mitored é um fluorocromo específico para marcar mitocôndrias ativas. As amostras das células tumorais e normais tratadas e os grupos controle foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100µL de meio RPMI+ Mitored 0,1% (Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufas 5% CO₂ a 37°C por 1h. Após este período, foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 100µL de tampão Facs Flow . A leitura e análise da marcação do Mitored foi realizado em citômetro de fluxo Facscanto (BD) em intensidade de fluorescência FLH-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest- BD.

3.8. Análises Estatísticas

Os valores obtidos foram expressos em média ± desvio médio de três experimentos independentes e posterior a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular, os resultados foram tabulados e analisados no programa Graphpad, Version 7.0 e Instat Pad Prism Version 5.0. A análise dos dados foi realizada por comparação de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando a análise de variância (ANOVA), também foi feito o teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER em seguida,o nível crítico considerado para significância são valores de p≤ 0.05.

Resultados
4.1. Determinação da atividade citotóxica

Quando analisado pelo ensaio colorimétrico de MTT o efeito citotóxico dos compostos 2,4-Dinitrofenol (Figura 1A), Metformina (Figura 1B), Ácido Lipóico (Figura 1C). Bem como, suas associações com o monofosfoéser 2-AEH₂F (22,82mM), foi observado que há uma maior citotoxicidade para as células normais L929, quando comparada às células tumorais de Ehrlich. Indicando que para essa linhagem de tumor, esses tratamentos não apresentam uma citotoxicidade seletiva (Tabela 2). Vale salientar que, quando associado aos demais compostos que serão apresentados, o monofosfoéster foi testado na concentração de 22.8mM, para avaliar a eficiência da farmacologia sinérgica da associação.





Α



С



Figura 1: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT. A) 2,4-Dinitrofenol(100mM-0.19mM), 2,4-Dinitrofenol (100mM-0.19mM) +2AEH₂F (22.82mM); B) Metformina (5mM-50mM), Metformina (5mM-50mM) + 2AEH₂F (22.82mM); C) Ác. Lipóico (0.01mM-6mM), Ac. Lipóico (0.01mM-6mM)+ 2AEH₂F (22.82mM);

IC50%						
	Ľ	929	EAT			
Compostos	Isolado	Associado+2AEH2F	Isolado	Associado+2AEH2F		
2,4-dinitrofenol	16.87 mM	16.24 mM	Sem citotoxicidade	Sem citotoxicidade		
Metformina	9.95 μM	37.95 mM	33.06 mM	67.94 mM		
Ac. Lipóico	6.88 mM	5.12 mM	Sem citotoxicidade	44.49 mM		

Tabela 2: Valores das concentrações de inibição celular de 50% (IC_{50%}) dos tratamentos 2,4- Dinitrofenol, Metformina e Ácido Lipóico e suas associações com o 2-AEH₂F para as células normais de fibroblasto murino (L929) e células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT).

Por sua vez, o monofosfoéster 2-AEH₂F na linhagem de fibroblasto murino L929, entre as concentrações de 0.23 a 7.5 mM exibiu uma indução da proliferação celular, só sendo possível observar efeito citotóxico a partir da concentração de 15

mM, quando tem uma redução em média de 4.52±3.86% da viabilidade celular, seu IC_{50%} foi de 54.9 mM.

Considerando que são apontados como antineoplásicos, composto que são mais seletivos ou tóxicos para as células tumorais, foi observado que as células do tumor ascítico de Ehrlich (Figura 2), já apresentaram sensibilidade ao monofosfoéster 2-AEH₂F desde a concentração mais baixa de 0.23mM, que reduziu em média 19.02±9.78% na viabilidade celular, quando comparado ao seu controle, seu valor da concentração inibitória celular de 50% (IC_{50%}) foi de 45.6mM.



Figura 2: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT tratadas com 2-AEH₂F.

Nos tratamentos com GM-CSF (Figura 3A), em nenhuma das concentrações testadas foi observado citotoxicidade para as células normais, nem mesmo quando associado ao monosfosfoéster 2-AEH₂F. As células tumorais apresentaram um valor calculado de IC₅₀ de 144nM (Tabela 3), exibindo desde as concentrações mais baixas uma redução da viabilidade de 22.61± 8.13%. Porém, seu efeito citotóxico quando associado com o 2-AEH₂F, mostrou-se extremamente eficiente, apresentando um IC₅₀ de 16nM, altamente significativo.

A Sinvastatina (Figura 3B), também apresentou citotoxicidade para as células

do tumor ascítico de Ehrlich. O IC₅₀ (Tabela 3) para as células normais de fibroblasto murino L929 foi de 109.9 μ M e quando associado ao 2-AEH₂F foi de 63.0 μ M. Os mesmos tratamentos para as células do tumor ascítico de Ehrlich tiveram os valores obtidos de IC₅₀ de 9.7 μ M e 10.1 μ M, respectivamente.

O quimioterápico Paclitaxel (Figura 3C), para as células normais L929, teve o IC_{50} com valores médios de 20.7 µM e de 1.4 µM, quando tratado isolado e associado ao 2-AEH₂F, respectivamente. Para as células do tumor ascítico de Ehrlich, quando tratado apenas com Paclitaxel o IC_{50} foi de 8.9 µM, já a sua associação não mostrou efeito citotóxico, quando comparado ao mesmo tratamento nas células normais, exibindo um IC_{50} de 6.2 µM, mantendo o mesmo potencial inibitório.

O Cloridrato de Meclizina (Figura 3D), revelou resultados interessantes. O tratamento isolado foi citotóxico inicialmente para as células normais de fibroblasto murino L929 do que para as células do tumor ascítico de Ehrlich, com IC₅₀ para ambas linhagens de 2.1mM e 1.4mM (Tabela 3). Quando associada ao 2-AEH2F, foi observado que na medida em que as concentrações foram aumentando, as células normais de fibroblasto murino L929 exibiram uma maior viabilidade quando comparada ao tratado apenas Cloridrato de Meclizina ou às células do tumor ascítico de Ehrlich submetidas ao mesmo tratamento de associação. Os valores de IC₅₀ para ambas linhagens foram respectivamente de 6.1mM e 2.0mM conforme apresentados na Tabela 3.

Dos compostos que agem diminuindo a quantidade de espécies reativas de oxigênio, a Coenzima Q10 (Figura 3E) foi a única que apresentou citotoxicidade significativa para as células tumorais. Para as células normais L929 sua IC₅₀ foi 2.8mM enquanto que sua associação com o 2-AEH₂F não exibiu citotoxicidade em nenhuma concentração. Por outro lado, as células tumorais de Ehrlich desde a menor concentração, isolado e associado ao 2-AEH₂F , apresentou citotoxicidade, com valores respectivos de IC₅₀ de 5.6 μ M e 5.9 μ M.





Α



С



D



Figura 3: Determinação da citotoxicidade em células normais de fibroblasto murino (L929) e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) pelo método colorimétrico de MTT. A) GM-CSF (7.5nM-75 nM), GM-CSF (7.5nM-75nM) + 2AEH2F (22.8mM); B) Sinvastatina (3.7 μM -37.5 μM), Sinvastatina (3.7 μM -37.5 μM) + 2AEH2F (22.8mM); C) Paclitaxel (0.5μM-17.5 μM), Paclitaxel (0.5 μM -17.5 μM) + 2AEH2F(22.8mM); D) Cloridrato de Meclizina(0.04mM-24mM), Cloridrato de Meclizina (0.04mM-24mM) + 2AEH2F(22.8mM); E) Coenzima Q10 (0.02mM-2.8mM), Coenzima Q10 (0.02mM-2.8mM) + 2AEH2F (22.8mM).

Ε

IC50%							
	L9	29	EAT				
Compostos	Isolado	Associado+2AEH2F	Isolado	Associado+2AEH2F			
GM-CSF	Sem citotoxicidade	Sem citotoxicidade	144.1 nM	16 nM			
Sinvastatina	109.9 μM	63.0 μM	9.6 µM	10.1 µM			
Paclitaxel	20.7 μM	1.4 μM	8.9 μM	6.2 μM			
Cloridrato de Meclizina	2.1 mM	6.1 mM	1.3 mM	2.0 mM			
Coenzima Q10	2.8 mM	Sem citotoxicidade	5.5 μM	5.8 μM			

Tabela 3: Concentrações de inibição celular de 50% (IC50%) dos tratamentos GM-CSF, Sinvastatina, Paclitaxel, Cloridrato de
Meclizina, Coenzima Q10 e suas associações com o 2-AEH2F para as células normais de fibroblasto murino (L929)
e células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT).

4.2. Perfil de distribuição das células do Tumor de Ehrlich e Fibroblastos L929 nas fases do ciclo celular

Em relação à capacidade de remodelar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular, as células normais de fibroblasto murino L929 e as células do tumor ascítico de Ehrlich foram tratadas com base no resultado da determinação da atividade citotóxica obtidos para as células tumorais.

As células L929 apresentadas na Figura 4 foram tratadas com o 2-AEH₂F na concentração de 45.65 mM. Foi observado que quando comparado ao controle, não exibiu diferença significativa na modulação do ciclo celular.

Em contrapartida, as células do tumor ascítico de Ehrlich (Figura 4) tratadas com o $2-AEH_2F$ apresentaram um aumento de $9.01\pm2.2\%$ para o fragmento de DNA, quando comparado ao controle. Além disso, foi observado a redução da população celular na fase G2/M e o aumento de células na fase S, com percentuais de 13.5±3.2% e 65.2±2.9%. O grupo controle para a fase G2/M e S tiveram percentuais respectivos de 45.3±2.3% e 24.3±3.3%.



Figura 4: Análise das fases do ciclo celular em células normais de fibroblasto murino L929 e em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) tratadas com o monofosfoester 2-AEH₂F. As células foram tratadas por 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e

fragmento de DNA, gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística, ns= não significativo ***p<0.001.

O tratamento com GM-CSF indicou que, na concentração de 144.1 nM, as células normais L929 (Figura 5A), apresentaram aumento de DNA fragmentado de 9.1±1.5%, quando comparado este tratamento para as células tumorais de Ehrlich (Figura 5B), também observamos a presença de DNA fragmentado, porém em uma proporção significativa. Da mesma forma, avaliando-se em relação ao grupo controle, a quantidade de células tumorais na fase G0/G1 e S aumentaram e na fase G2/M foi notada uma redução significativa para 25.5±0.9%.

Quando avaliado o tratamento associado de GM-CSF+2-AEH₂F (Figura 5A) nas concentrações respectivas de 16nM e 22.mM. As células L929 reduziram a quantidade de DNA fragmentado para $0.69\pm1.3\%$, a fase G0/G1 teve um aumento significativo para $30.1\pm2.3\%$, por consequência redução da fase S para $36.9\pm1.6\%$, enquanto que a fase G2/M teve um aumento para $33.05\pm2.3\%$.

Para as células do tumor ascítico de Ehrlich a associação GM-CSF+2-AEH₂F (Figura 5B) exibiu um aumento significativo de DNA fragmentado quando comparado ao seu controle, no valor de 35.5±3.4%. Da mesma forma, foi observado um aumento nas fases G0/G1 e S, com um percentual respectivo de 38.8±1.7% e 43±2%, também foi induzido a redução de células na fase G2/M para 18.2±2.6%.



Figura 5: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: GM-CSF (144.1nM) e GM-CSF (16nM)+ 2-AEH2F (22.8mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>

As células normais L929 quando tratadas com Sinvastatina (9.7 μ M) não apresentaram mudanças na fase G0/G1, ou presença de DNA fragmentado quando comparado ao grupo controle. Apenas foi notado uma diminuição da população celular na fase S e um aumento na fase G2/M, com valores respectivos de 68.3±1.8% e 26.7±1.67% (Figura 6A).

Nas mesmas condições de tratamento para as células do tumor ascítico de Ehrlich (Figura 6B), ocorreu aumento percentual de DNA fragmentado com valor de 33.4±4%. Também foi observado um aumento nas fases G0/G1 e S, com valores de 54.3±3.6% e 31.3±1.09%, respectivamente. A fase G2/M do ciclo, comparado ao grupo controle, teve uma diminuição significativa com um percentual de 14.3±1.6%.

O tratamento da associação Sinvastatina (10.2µM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), para as células normais L929 também não promoveu aumento no percentual de fragmento de DNA, quando comparado ao grupo controle (Figura 6A). Em contrapartida, houve um aumento da população celular na fase G0/G1 para 19.2±1.4% e na fase G2/M para 35.4±4.3%, enquanto a fase S, reduziu significativamente.

Entretanto, as células tumorais de Ehrlich submetidas a este tratamento apresentaram um valor significativo de 26.7±2.2% de DNA fragmentado comparado ao mesmo tratamento nas células normais L929. A fase G0/G1 também aumentou seu percentual para 33.3±2.6%, enquanto que a fase S reduziu para 20.6±1.2% (Figura 6B).

O tratamento com o quimioterápico Paclitaxel na concentração de 8.9 µM não apresentou alteração para as células normais L929 (Figura 7A), entretanto para as células tumorais de Ehrlich (Figura 7B), já foi possível observar alterações como o aumento de DNA fragmentado parada na fase G0/G1, com percentuais respectivos de 21.9±2.7% e 43.3±1.9%, e redução da população celular na fase S com 23.5±1.5%, além de uma diminuição significativa de células na fase G2/M no valor de 10.±1.3%, quando comparado ao grupo controle.

O Paclitaxel (8.99 μ M) + 2-AEH₂F (22.8 mM) nas células normais L929 (Figura 7A) teve o aumento da população celular na G0/G1 e G2/M nos valores seguidos de 6.5±2.9% e 7.9±1.5%, a fase S apresentou redução significativa. Da mesma forma, foi possível observar alterações nas células tumorais de Ehrlich submetidas a esse tratamento, diferente do que foi observado no tratamento apenas com o quimioterápico, não foi observado aumento de DNA fragmentado, mas houve parada de células na fase G0/G1, aumento na fase S e por consequência uma redução na fase G2/M, apresentando os valores médios 37.42±3.35%, 52.56±1.09% e 10±1.2%, respectivamente (Figura 7B).



Figura 6: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Sinvastatina (9.7 μM) e Sinvastatina (10.2 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05 e ***p<0.001.</p>



Figura 7: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Paclitaxel (8.9 μM) e Paclitaxel (6.2 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo e ***p<0.001.</p>

As células do tumor ascítico de Ehrlich (Figura 8B) e as células normais de fibroblasto murino L929 (Figura 8A) para os dois tratamentos: Cloridrato de Meclizina (1.4 mM) e Cloridrato de Meclizina (2.1 mM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), apresentaram alterações no ciclo celular quando comparado ao grupo controle de ambas linhagens

celulares.

Os fibroblastos normais L929 tratados com Cloridrato de Meclizina , exibiram um aumento de DNA fragmentado para $2.8\pm1.72\%$, a quantidade de células na fase S do ciclo celular diminuiu e a fase G2/M teve seu percentual elevado para 14.1 $\pm2.84\%$. A associação também apresentou um aumento significativo no percentual de DNA fragmentado no valor de 7.1 $\pm0.5\%$ e nas fases G0/G1 e G2/M, por sua vez, a fase S reduziu, os valores respectivos foram de 27.5 $\pm1.5\%$, 44.4 $\pm2.2\%$ e 28.0 $\pm1.7\%$.

As células tumorais de Ehrlich tratadas com Cloridrato de Meclizina também apresentaram aumento na quantidade de DNA fragmentado para 53.8±1.4%. Houve parada da população celular na fase G0/G1 no valor de 64.1±3.9%, quando comparado ao controle e diminuição de células na fase S e G2/M para 15.1±1.1% e 20.8±1.5%. A avaliação da associação não exibiu alteração na proporção de DNA fragmentado (Figura 8B). O percentual de células na fase G0/G1 também aumentou para 67.9±1.9%, da mesma maneira a fase S para 31.4±1.0%.Por consequência, a fase G2/M, comparado com os demais tratamentos ou ao grupo controle, teve uma redução significativa (Figura 8B).

Por fim, as células de fibroblastos murino L929 tratadas com a Coenzima Q10 (5.56 μ M) (Figura 9A), comparado ao grupo controle, não apresentaram DNA fragmentado, porém apresentaram aumento na fase G0/G1, seguido de uma redução, nas fases S e G2/M, nos valores respectivos de 17.2±2.8%, 78.5±1.6% e 4.2±1.7%.

Quando tratadas com a associação Coenzima Q10 + 2-AEH₂F, as células de fibroblasto murino não apresentaram DNA fragmentado, com um perfil parecido com o grupo tratado com apenas a Coenzima Q10. A fase G0/G1 e G2/M aumentaram seu percentual para 9.78±2.9% e 8.08±1.3% e ocorreu a redução da fase S (82.1±1.1%) (Figura 9A).

Com relação às células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT), o grupo tratado com Coenzima Q10 induziu o aumento de DNA fragmentado para 48.1±3.5%. A fase G0/G1 também aumentou com percentual de 66.9±1.0% da população. Por sua vez, as fases S e G2/M reduziram para 13.7±1.0% e 35.7±1.7% da população celular, respectivamente (Figura 9B).

A associação do tratamento Coenzima Q10 (5.9μ M) +2-AEH₂F (22.8mM) nas células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) (Figura 9B), também indicou efeitos farmacológicos importantes. O DNA fragmentado aumentou para 48.0±3.5%. s células tumorais exibiram uma maior parada da população na fase G0/G1, 30.4±1.0%, e na fase S 29.2±1.2%, reduzindo significativamente sua parada na fase G2/M para 3.8±2.5%.



Figura 8: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Cloridrato de Meclizina (1.4 mM) e Cloridrato de Meclizina (2.1 mM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>



Figura 9: Análise das fases do ciclo celular. A) Células normais de fibroblasto murino (L929); B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Ambas linhagens foram tratadas com: Coenzima Q10 (5.5 μM) e Coenzima Q10 (5.9 μM) + 2-AEH₂F (22.8 mM), por um período de 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular e fragmento de DNA e gráfico de barra mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.</p>

4.3. Análise do perfil farmacológico sinérgico

Fármacos com mecanismos de ação diferentes são usados frequentemente em combinação com o objetivo de obter efeitos sinérgicos aditivos e positivos. Quando existe uma interação positiva entre dois fármacos, é possível que haja o uso de menores concentrações de ambos, e assim, seja reduzido os efeitos adversos dependentes da concentração. Porém, vale salientar que quando os fármacos são combinados, suas ações também podem ser diferentes daqueles obtidos quando cada um era administrado separadamente.

Por tanto, para avaliar as interações dos tratamentos combinados, a partir do modelo de independência Bliss, do programa Synergy Finder, foi calculado o efeito da combinação de duas drogas com base na probabilidade de eventos independentes. Assim sendo, a média global da combinação ou seu synergy score(x) indica que: X<-10 tem efeito antagônico, X \leq 10 ou X \geq -10 efeito aditivo e X>10 um efeito sinérgico.

O cruzamento dos dados dos tratamentos 2-AEH₂F, GM-CSF e GM-CSF + 2-AEH₂F, indicou que para as células normais de fibroblasto murino L929 a interação entre dois fármacos teve uma média global de -10.497 (Figura 10A), apresentando assim um efeito antagônico, tais resultados estão de acordo com os anteriores, onde não foi observado efeito citotóxico dos fármacos combinados. Também de acordo com os resultados de citotoxicidade, quando avaliado os mesmos tratamentos para as células do tumor ascítico de Ehrlich, foi observado uma dinâmica inversa, na qual o efeito sinérgico (superaditivos) ocorreu entre os fármacos, obtendo uma média global de 10.66 (Figura 10B).

Α Bliss synergy score: -10.497 -20 -10 0 10 20 30 -30 1.2e+08-Bliss synergy score: -10.497 -30 -20 -10 0 10 20 30 6e+07-30 54900000 20 2AEH2F (nM) 10 0 5 -10 3e+07 -20--30-1.2e+08 6e+07 1.5e+07 67.5 60 15 GM-CSF (nM) 22.5 34 5e+07 7.5 0ò 7.5 15 675 75 60 GM-CSF (nM) В Bliss synergy score: 10.66 -20 20 0 1.2e+08-Bliss synergy score: 10.66 -10 0 30 40 40 -30 -20 10 20 6e+07 45650000 40 30-20-2AEH2F (nM) 3e+07 8-score 10-0 -10 1.5e+0 -20 -30 -40 6e+07 7500000 45650000 Part Bot 3750000 67 5 60 22.5 7.5 GM-CSF (nM) 375000 0--.... 7.5 22.5 75 1 15 60 67.5

Figura 10: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com GM-CSF, 2-AEH2F e associação GM-CSF + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.

GM-CSF (nM)

As células normais de fibroblasto murino (L929), também apresentaram efeito antagônico, com uma média global menor que -10, para os tratamentos com a Sinvastatina (Figura 11A), Coenzima Q10 (Figura 12A) e Cloridrato de Meclizina (Figura 13A). Estes mesmos tratamentos, para as células do tumor ascítico de Ehrlich apresentaram média global de Bliss de 3.65 (Figura 11B), 0.129 (Figura 12B) e -6.973 (Figura 13B), respectivamente. Portanto, suas combinações com o monofosfoéster 2-AEH₂F revelam um efeito aditivo.

A combinação do quimioterápico Paclitaxel com o 2-AEH₂F, foi observado efeito aditivo, para as células normais de fibroblasto murino L929 (Figura 14A), com média global maior do que o apresentado para as células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) (Figura 14B). Tais dados, quando comparados com os apresentados anteriormente, indicam que a combinação provavelmente não tenha um efeito positivo, quando comparado ao uso isolado de ambos os fármacos.



Figura 11: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com Sinvastatina, 2-AEH2F e associação Sinvastatina + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.



Figura 12: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas, em concentrações variadas, com Coenzima Q10, 2-AEH2F e associação Coenzima Q10 + 2-AEH2F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.



Figura 13: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas em concentrações variadas, com Cloridrato de Meclizina, 2-AEH₂F e associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.



Figura 14: Análise do grau de sinergia entre drogas combinadas. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas em concentrações variadas, com Paclitaxel, 2-AEH₂F e associação Paclitaxel + 2-AEH₂F, por 24h. Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise pelo método Bliss, SynergyFinder. O modelo de independência Bliss calculou o efeito combinatório esperado com base na probabilidade de eventos independentes provocados pelas duas drogas.

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

O potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) é um ensaio que busca avaliar a atividade mitocondrial da célula. As células tumorais de Ehrlich e normais de fibroblasto murino L929 foram tratadas por 24h e, quando associadas ao 2-AEH₂F, foram sensibilizadas com 3h e 12h antes da administração do monofosfoéster, ambas foram tratadas com os valores de IC₅₀ das células do tumor de Ehrlich.

Apenas os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e suas associações com o 2-AEH₂F (3h e 12h) apresentaram alteração significativa no $\Delta\Psi$ m das células normais L929 (Figura 15A). O cloridrato de Meclizina reduziu o potencial para 64.7±0.46%, quando associado e sensibilizando as células por 3h o percentual foi de 42.5±0.8% e por 12h de 19.7±1.0%. Tais resultados indicam que apesar de que no teste de citotoxicidade as células normais tiveram um IC₅₀ maior, a atividade mitocondrial encontra-se reduzida, o que pode implicar em déficit energético.

Para as células do tumor ascítico de Ehrlich foi exibido diminuição significativa do $\Delta\Psi$ m (Figura 15B) em todos os tratamentos que as células foram submetidas (Tabela 4). O monofosfoéster 2-AEH₂F sozinho reduziu o $\Delta\Psi$ m para 29.9 ±1.19%. Os tratamentos isolados que menos reduziram foram a Sinvastatina, seguido pelo GM-CSF, ambos tiveram percentuais respectivos de 62.49±0.3% e 54.7±0.6%.

Com exceção do Paclitaxel + 2-AEH₂F, que no grupo tratado de 3h reduziu menos (26.15±2.3%) do que o tratamento de 12h (12.65±0.4%), e a Coenzima Q10 + 2-AEH₂F que não apresentou diferença significativa, independentemente do tempo de sensibilização, com valores respectivos para 3h e 12h de 21.49±0.7% e 22.41±0.4% . Os demais tratamentos associados exibiram um resultado de maior redução do $\Delta\Psi$ m quando sensibilizaram 3h antes da administração do ao 2-AEH₂F (Tabela 4).

Percentual do Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial (ΔΨm)						
	L929			EAT		
Compostos	Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)	Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)
2-AEH2F	98,96±0.9%			29.92±1.19%		
GM-CSF	99.76±0.25%	99.65±0.45%	99.99±0.87%	54.70±0.62%	20.21±0.7%	48.72±0.47%
Sinvastatina	99.04±0.86%	99.78±0.25%	99.83±0.56%	62.49±0.3%	21.37±0.2%	62.57±0.61%
Paclitaxel	100±0.69%	99.29±0.05%	100±0.42%	13.45±0.56%	26.15±0.23%	12.65±0.48%
Cloridrato de Meclizina	64.71±0.46%	42.57±0.76%	19.71±0.96%	11.78±0.39%	19.32±032%	38.12±0.28%
Coenzima Q10	99.56±0.54%	100±0.2%	100±0.6%	39.85±0.21%	21.49±0.74%	22.41±0.41%

Tabela 4: valores do potencial elétrico mitocondrial. Células normais de fibroblasto murino L929 e Células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Tratadas com 2-AEH₂F, GM-CSF, Sinvastatina, paclitaxel, Cloridrato de Meclizina, Coenzima Q10 e associadas também ao 2-AEH₂F, por um período de 24h. Tabela representativa mostrando o efeito dos fármacos no potencial elétrico da mitocôndria expresso em média ± DP de três experimentos independentes.



Α

В

Figura 15: Gráfico do potencial elétrico mitocondrial. A) Células normais de fibroblasto murino L929; B) Células do tumor ascítico de Ehrlich. Gráfico de barra mostrando a correlação do efeito dos tratamentos na mitocôndria expresso em média ± DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ns= não significativo, ***p<0.001.</p>

4.5. Expressão dos marcadores envolvidos nos mecanismos de inflamação e morte celular para as células do tumor ascítico de Ehrlich

Após o período de tratamento, foi possível observar que a proteína antiapoptótica Bcl-2 (Figura 16A) apresentou redução de sua expressão na maioria dos tratamentos, exceto para as células tratadas com GM-CSF associado ao 2-AEH₂F (3h) e Sinvastatina + 2-AEH₂F (3h e 12) em ambos os intervalos. Quando associado, o tratamento que apresentou maior redução foi o 2-AEH₂F + Coenzima Q10 (12h) (46±0.2%), coincidentemente, o 2-AEH₂F quando tratado sem estar associado apresentou um valor similar (46.2±0.68%). Ambos reduziram a expressão de Bcl-2 em 36%, comparado ao grupo controle. Dentre todos os tratamentos, GM-CSF para este tipo de célula foi mais efetivo na redução da expressão do Bcl-2 (35.5 ±0.48%).

A proteína pró-apoptótica Caspase 3 ativada (Figura 16B) teve aumento da sua expressão em todos os tratamentos, dentre eles o que exibiu uma menor indução foi o Cloridrato de Meclizina (19.47±0.11%), porém, quando associado ao 2-AEH₂F (3h) este tratamento foi o que teve a maior expressão de Caspase 3 (83.59±0.2%). Os tratamentos, 2-AEH₂F (74.59±0.3%), Paclitaxel (74.25±0.05%) e sua associação 2-AEH₂F + Paclitaxel 12h (79.5±0.2%) também foram os que exibiram o maior índice de expressão da proteína pró-apoptótica.

Com exceção do Cloridrato de Meclizina que não apresentou resultados significativos e do GM-CSF, todos apresentaram um aumento significativo da liberação de Citocromo C (Figura 16C). Entretanto, observamos que os tratamentos Paclitaxel (78.3±0.39%), 2-AEH₂F + Paclitaxel (12h) (79.3±0.14%), 2-AEH₂F + Sinvastatina (3h) (67.5±0.39%), exibiram resultados altamente significativos comparado aos demais. O tratamento 2-AEH₂F + Sinvastatina no período de 3h também exibiu um alto índice da proteína P53 (69.3±0.29%), quando comparado ao controle e aos demais tratamentos (Figura 16D).

Quanto a expressão de citocinas dos receptores pró- inflamatórias, TNF-(DR-4) (Figura 16E), IL-1 (Figura 16F), IL-6 (Figura 16G) e IL-2 (Figura 16H), observamos que as células tratadas com o 2-AEH₂F (Tabela 5F) e 2-AEH₂F + Sinvastatina 3h (Tabela 5B), exibiram aumento quando comparado ao demais tratamentos e ao controle. Da mesma maneira, GM-CSF apresentou uma baixa

expressão dos receptores em todas as citocinas avaliadas. Além dele, para a expressão de TNF, a Coenzima Q10, Sinvastatina, Cloridrato de Meclizina e as associações do 2-AEH₂F + Paclictaxel 3h e 12h (Figura 16E) também exibiram uma redução na expressão dos receptores.





В



Caspase 3

Α



Citocromo C

D



С



TNF

F

Ε







н



Figura 16: Gráfico da expressão dos marcadores em células do tumor ascítico de Ehrlich. A) BCl2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53; E) TNF; F)IL-1;G) IL-6; H) IL-2. Expressão dos marcadores

G

dependendo dos tratamentos, quantificado por citometria de fluxo, 24h após os tratamentos nos valores de IC_{50%}. Valores expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey -Kramer. ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001

	GM-	CSF			Sinva	statina	
EAT				EAT			
Marcadores	Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)	Marcadore	s Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)
BCl2	\checkmark	ns	\checkmark	BCl2	4	ns	ns
Caspase 3	↑	↑	1	Caspase 3	· 1	1	↑
Citocromo C	\checkmark	↑	1	Citocromo	C 1	1	↑
P53	\checkmark	↑	1	P53	↓	1	1
TNF-α	\rightarrow	1	1	TNF-α	↓	1	1
IL-1	\rightarrow	1	1	IL-1	↓	1	1
IL-6	\rightarrow	1	1	IL-6	↓	1	1
IL-2	↓	↑	1	IL-2	↓	1	↑
Paclitaxel				Cloridrato de Meclizina			
EAT				EAT			
Marcadores	Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)	Marcadore	s Isolado	+ 2-AEH2F (3h)	+ 2-AEH2F (12h)
BCl2	\checkmark	↓	\checkmark	BCl2	4	↓	\checkmark
Caspase 3	^	↑	1	Caspase 3	<u>۲</u>	1	↑
Citocromo C	^	↑	1	Citocromo	C ns	1	↑
P53	↑	↑	1	P53	1	1	↑
TNF-α	^	↓	\checkmark	TNF-α	1	1	1
IL-1	^	1	1	IL-1	1	1	ns
IL-6	↑	↑	\checkmark	IL-6	1	1	1
IL-2	1	1	1	IL-2	↓	1	^
Cloridrato de Meclizina			2-A	EH2F			
EAT			E	AT			
Marcadores	Iarcadores Isolado + 2-AEH2F (3h)+ 2-AEH2F (12h)		Marcadores				
BCl2	\checkmark	→	\checkmark	BCl2	\checkmark		
Caspase 3	^	1	1	Caspase 3	↑		
Citocromo C	ns	1	1	Citocromo C	↑		
P53	1	1	1	P53	1		
TNF-α	1	1	1	ΤΝΓ-α	1		
IL-1	1	1	ns	IL-1	1		

Tabela 5: Indicadores da expressão dos marcadores nas células tumorais de Ehrlich. GM-CSF e GM-CSF + 2-AEH₂F; Sinvastatina e sinvastatina + 2-AEH₂F; Paclitaxel e Paclitaxel + 2-AEH₂F; Cloridrato de meclizina e Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F; Coenzima Q10 e Coenzima Q10 + 2-AEH₂F e 2-AEH₂F.

↑

IL-6

IL-2

↑

IL-6

IL-2

Ψ

↑
Discussão

Neste estudo, as células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) tratadas com o composto 2-AEH₂F, sofreram efeitos citotóxicos e apresentaram uma proporção significativa de DNA fragmentado que, de acordo com Grivicich (2007), é uma característica marcante da morte celular por apoptose¹¹². Também foi possível observar um aumento na expressão das proteínas p53 e caspase 3 ativada, relacionadas com processos de morte celular. Por sua vez, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 que tem a capacidade de inibir a produção de espécies reativas do oxigênio, a acidificação intracelular e estabilizar o potencial da membrana da mitocôndria¹¹³ teve a sua expressão reduzida, dados que estão consistentes com a redução do potencial elétrico mitocondrial neste estudo.

Os fosfolipídios de membrana celular, como a fosfoetanolamina (PE) possuem funções relevantes em diversos processos celulares, como a fusão da membrana celular, o ciclo celular, a autofagia e a apoptose¹¹⁴. Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, foi observado que o composto 2-AEH₂F em células tumorais de melanoma murino B16F10, foi capaz de modular a expressão pró-apoptótica das proteínas Bad/Bax, aumentando a atividade das caspase 3 fosforilada, iniciando o processo apoptótico e bloqueando o ciclo celular na fase S e G2/M⁷⁹. Em células tumorais de câncer de mama humano MCF-7 (ER-), o composto 2-AEH₂F também foi capaz de induzir para do ciclo celular na fase G0/G1, com aumento significativo dos marcadores ciclina D1, citocromo C e p53 relacionados com o controle da progressão e checagem do ciclo celular ⁸³.

Além disso, a exposição a fosfolipídios não é apenas um indicador de apoptose, mas também está altamente relacionada a certas condições como estresse oxidativo, citocinas ativadoras e vasculatura tumoral estressada¹¹⁵. Um estudo que avaliou plasmalogênios de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina(PE), análogo natural do 2-AEH₂F, em macrófagos humanos carregados de lipídios, indicou que os macrófagos exibiram uma mudança para um padrão de marcador mais semelhante a M1 após o carregamento de lipídios, consistente com a lipidômica que mostrou que o consumo de ácido araquidônico contendo plasmalogênios de PE induziu para um fenótipo pró-inflamatório¹¹⁶.

Embora existam controvérsias em relação ao promoção ou supressão da progressão tumoral mediado pelas citocinas testadas. Um estudo *in vitro* realizado em

células de câncer de mama MCF-7, indicaram que a expressão dos receptores de citocinas IL-1 e a IL-6 atuaram ativamente para inibir o crescimento das células tumorais, de modo isolado, também foi observado esse efeito em ambas citocinas, porém em uma proporção menor¹¹⁷. Outro estudo com a mesma linhagem celular, indicou que a expressão de IL-1 inibiu o crescimento das células em 80% devido inibir a captação de timidina, quando testado para as linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 não foi observado esse efeito, diferença que foi justificada pela presença e ausencia dos receptores de IL-1 nas células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente¹¹⁸.

Além disso, uma análise realizada sobre o efeito crônico das citocinas IL-1, TNF- α e IL-6 no metabolismo hepático de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich indicou que a citocina IL-6 não induziu desvio metabólico significativo do fígado do hospedeiro, entretanto a IL-1 e TNF- α foram indicadas como fortes indutores de desvio metabólico¹¹⁹.

Ao mesmo tempo, TNF- α tem muitos efeitos na regulação do sistema imunológico, podendo ajustar a ativação de macrófagos e resposta imune nos tecidos, bem como regular o desenvolvimento de linfócitos¹²⁰. Outro estudo verificou que 24h após a implantação do tumor ascítico de Ehrlich houve um aumento na capacidade de propagação dos macrófagos peritoneais (75%) e que, à medida que o tumor cresceu, o índice de propagação caiu para níveis de controle (<10%)¹²¹.

Ademais, a presença de IL-1 e IL-2 também estão associadas com a promoção da proliferação de células T e, considerando que a imunidade antitumoral é predominantemente celular, as células T podem ser citotóxicas direta ou indiretamente através das secreção de citocina TNF-α^{122,123}. IL-2 também pode ativar células NK que na ausência de anticorpos podem matar células tumorais *in vivo*, bem como induzir células assassinas ativadas por linfocinas e maturação de células T citotóxicas, que na imunidade antitumoral desempenha um papel importante na regulação da proliferação de linfócitos¹²⁰.

Como apresentado anteriormente, o PE, análogo do 2-AEH₂F, foi relacionado a promoção de um perfil inflamatório, portanto, associamos que os níveis elevados dessas citocinas, relacionadas com o estímulo da inflamação e ativação do sistema imune, pode ser uma consequência do 2-AEH₂F. Vale salientar que, com exceção

dos tratamentos associados ao monofosfoéster: Cloridrato de Meclizina (12h), Paclitaxel (3h e 12), GM-CSF (3h) e Sinvastatina (3h e 12h); que apresentaram diferenças na expressão de alguns marcadores, todos os demais tratamentos apresentaram o mesmo perfil de expressão apresentado pelo 2-AEH₂F isolado, apenas em níveis diferentes, provavelmente indicando uma modulação desse perfil (Tabela 5).

Dentre os diversos esquemas de tratamento associados com o 2-AEH₂F, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), apresentou efeito farmacológico aditivo, onde o grupo tratado associado com o composto 2-AEH₂F (22.8mM) teve sua concentração de IC₅₀ reduzida significativamente para 16 nM, exibindo também um índice maior de DNA fragmentado e redução do potencial elétrico mitocondrial. Apesar de não ter sido significativo a expressão da proteína Bcl-2 para o tratamento associado ao 2-AEH₂F no período de 3h, todas as demais expressões de marcadores tiveram o mesmo perfil quando associado.

Em estudos realizados com camundongos portadores de carcinoma de pulmão de Lewis, a administração de GM-CSF, estimulou a imunidade antitumoral específica e de longa duração, devido a uma estimulação da população das células TCD4+ e CD8+, capaz de reconhecer antígenos circulantes associados aos tumores¹⁰⁸. Para além de suas respostas específicas ao antígeno, foi observado que células tumorais secretoras de GM-CSF estimulam a imunidade antitumoral pelo aumento dos níveis de expressão de moléculas co-estimulatórias B7-1 e CD1d em células dendríticas (DC)^{109.}

Além disso, apesar do efeito independente do sistema imunológico ainda ser pouco compreendido, vários estudos corroboram o efeito antiproliferativo de GM-CSF. Em comum acordo com nossos dados, o tratamento com GM-CSF suprimiu a proliferação de células tumorais de pulmão de células pequenas, bloqueando a progressão do ciclo celular de G0/G1 para fase S¹²⁴. Por sua vez, outro estudo sugere que seu efeito antitumoral independente do sistema imunológico, parece depender da expressão ectópica de subunidades do receptor GM-CSF, no qual a dose de GM-CSF administrado, presença e níveis de expressão de seus receptores, podem estar diretamente relacionados com o motivo de alguns tipos de células tumorais, serem mais sensíveis e sofrem um maior efeito antiproliferativo¹²⁵.

76

Por sua vez, a Sinvastatina, estatina lipofílica que age na inibição da via do mevalonato e reduz principalmente a abundância das moléculas de colesterol, farnesil pirofosfato (FPP) e geranil pirofosfato (GGPP)¹²⁶, no grupo associado ao composto 2-AEH₂F, em células normais de fibroblasto murino L929 não exibiu efeito citotóxico, nem modulou o potencial elétrico mitocondrial, o ciclo celular ou apresentou fragmento de DNA. Entretanto para as células do tumor ascítico de Ehrlich, tais alterações foram notadas. Em relação a mitocôndria das células tumorais, apesar de não ter sido observado uma redução na expressão de Bcl-2 quando comparado ao controle, observamos que existe alteração em sua funcionalidade, logo que existe uma liberação de Citocromo c, possivelmente por outras vias de sinalização celular.

O efeito da Sinvastatina foi observado em camundongos com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) que embora não tenham afetado o crescimento do tumor, induziu uma reprogramação metabólica, reduzindo a produção de lactato e promovendo a sensibilidade ao inibidor de MCT1, que é responsável pelo aumento da fosforilação oxidativa pelas mitocôndrias¹²⁷. Como a proliferação desenfreada é o estado padrão das células tumorais, torna-se uma consequência gradual a substituição energética proveniente da fosforilação oxidativa para uma conversão do piruvato em ácido láctico (metabolismo anaeróbico)¹²⁸.

Em contrapartida, foi observado que em células tumorais, existem também anormalidades no número, estrutura e função mitocondrial¹²⁹. Logo, tais anormalidades comprometem a produção eficiente de energia por meio da fosforilação oxidativa. Por sua vez, o composto 2-AEH₂F, noutras linhagens estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, como em células tumorais de mama humana MCF-7⁸³, em células de melanoma B16-F10⁷⁹, células do tumor ascítico de Ehrlich ¹³⁰, hepatocarcinoma¹³¹, entre outras exibiu o comportamento de modulação da função mitocondrial, com a perda significativa do potencial elétrico da membrana mitocondrial.

De acordo com resultados apresentados neste trabalho, estudos realizados com lovastatina, em células de glioma maligno humano A172 e U87MG também exibiram modulação do crescimento celular e indução da parada do ciclo celular na fase G1, bem como a presença de fragmentos de DNA e atividade apoptótica ¹³².

Semelhante, outros estudos também demonstraram que a Sinvastatina induziu

77

a parada na fase G0/G1. Em células de câncer de bexiga induziu a parada do ciclo celular na fase G1 reduzindo CDk4/6 e ciclina D1¹³³. Da mesma forma, Sinvastatina, Lovastatina e Fluvastatina bloquearam a transição da fase G0/G1 para a fase S por meio da regulação de CDk2/Ciclina, em células de câncer de próstata ¹³⁴.

A Coenzima Q10, além de protetora da membrana, também protege as proteínas e o DNA devido à sua natureza ubíqua, seus múltiplos mecanismos enzimáticos redutivos e sua presença na membrana mitocondrial¹³⁵. Em condições normais, encontra-se em equilíbrio com a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), provenientes da fosforilação oxidativa¹³⁵.

O estresse oxidativo é um evento predominante em células tumorais devido a intensa atividade metabólica e taxa proliferativa. Em ensaio clínico, foi demonstrado uma correlação entre a intensidade da deficiência da Coenzima Q10 e o mau prognóstico em tumores de mama, no qual sua deficiência foi observada em 80 pacientes com carcinomas mamários, estando também reduzida em lesões não malignas apresentadas em outros 120 pacientes ¹³⁶.

Quando associamos a Coenzima Q10 ao composto 2-AEH₂F, observamos um efeito farmacológico aditivo, com aumento do DNA fragmentado, bem como a parada de células tumorais na fase G0/G1 do ciclo celular. Também há uma modulação na expressão de TNF-α (DR-4), quando comparado ao controle e ao tratamento apenas com a Coenzima Q10. O potencial elétrico reduz para menos de 25% e de forma independente do período de sensibilização de 3h ou 12h, indicando estabilidade do seu efeito de potencializar a atividade do monofosfoéster em relação ao tempo.

Recentemente os níveis de ubiquinona foram correlacionados com o câncer de mama metastático, sendo inversamente proporcional os níveis plasmáticos de Coenzima Q10 à expressão de fatores angiogênicos¹³⁷. Um efeito de bom prognóstico e potencialização da eficácia de um tratamento, também foi observado em outro estudo quando associado a Coenzima Q10, a riboflavina e a niacina, em pacientes que tinham câncer de mama tratados com o tamoxifeno¹³⁸. Foi relatado um aumento significativo nos níveis de marcadores anti-angiogênicos que utilizaram o tamoxifeno co-administrado com a Coenzima Q10, indicando uma prevenção de metástase e recidiva¹²⁴.

Outro ensaio também indicou que em pacientes em estágio de câncer terminal, o tratamento com a Coenzima Q10, teve um aumento da sobrevida em 76%, no qual tais efeitos foram relacionados com a redução dos níveis de interleucinas, bem como a modulação do gene supressor de tumor p53¹³⁹.

Tanto o quimioterápico Paclitaxel (3h) quanto o Cloridrato de Meclizina (3h e 12h) apresentaram efeitos antagônicos quando associados ao 2-AEH₂F, esses resultados são corroborados quando avaliado os demais ensaios que indicaram uma menor proporção de DNA fragmentado e citotoxicidade nas células do tumor ascítico de Ehrlich. Surpreendentemente, o Cloridrato de meclizina + 2-AEH₂F para as células normais, no conjunto dos resultados, e independente do tempo de co-administração, mostrou-se como um tratamento desfavorável, sendo a única associação a reduzir o potencial elétrico mitocondrial das células normais.

Contrário aos resultados descritos anteriormente, o quimioterápico Paclitaxel associado ao 2-AEH₂F quando administrado com 12h antes ao monofosfoéster, obteve ótimos resultados. A diferença entre ambos os resultados em relação ao tempo, pode estar relacionada com a ação do quimioterápico na célula, logo que este composto tem a característica de agir no ciclo celular, quando a célula está em divisão celular.

O Paclitaxel agrega os microtúbulos estabilizando-os, não permitindo sua despolimerização e consequentemente ocorre a inibição da reorganização da rede de microtúbulos, necessária para proliferação celular e transportes intracelulares dependente de tubulina^{140,141}. Portanto, é possível que haja uma interferência entre os fármacos quando o quimioterápico não age por este período antecedente, devido seus mecanismos de ação distintos.

O Cloridrato de Meclizina é um anti-histamínico que age inibindo a enzima fosfoetanolamina citidiltransferase (PCYT2), enzima chave para a formação de fosfolipídios de membrana, como também a na produção de seus componentes, como por exemplo, a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilcolina, entre outras¹⁴². Por tanto, apesar de estar relacionada com a morte celular por disfunção da cadeia respiratória celular, é provável que ela seja antagonista ao composto 2-AEH₂,F, possivelmente por interferir no remodelamento e na síntese enzimática ou que sua

citotoxicidade esteja relacionada com o acúmulo e saturação de 2-AEH₂F nas células de modo não seletivo para ambas linhagens de células.

Conclusões

O 2-AEH₂F associado com os fármacos GM-CSF, Sinvastatina e Coenzima Q10 foram os mais efetivos em sua atividade citotóxica e no controle da parada nas fases do ciclo celular. Apresentaram efeitos antiproliferativos e citotóxicos seletivos para as células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT), quando comparado aos demais fármacos e associações farmacológicas.

A distribuição das populações de células na fase do ciclo celular, apresentou que o composto 2-AEH₂F, em células normais de fibroblasto murino (L929), não modulou o perfil da distribuição celular, em contrapartida nas células do tumor ascítico de Ehrlich (EAT) foi observado a presença de DNA fragmentado, bem como modulação do perfil do ciclo celular. As células tumorais tratadas com o composto 2-AEH₂F associado com o GM-CSF, a Sinvastatina e a Coenzima Q10 foram os que exibiram uma maior quantidade de DNA fragmentado, indicando um possível aumento dos efeitos dos fármacos quando associados.

A análise farmacológica corroborou com essa hipótese indicando que, as células tumorais tratadas com GM-CSF + 2-AEH₂F teve um efeito sinérgico, bem como os grupos de células tumorais tratados com a Coenzima Q10 e a sinvastatina associados com o 2-AEH₂F apresentaram efeitos aditivos.

Apesar do grupo 2-AEH₂F + Paclitaxel, tratado por 3h, exibir um efeito antagônico na avaliação sinérgica, quando as células foram sensibilizadas por 12h com o quimioterápico, observamos a maior redução do potencial elétrico mitocondrial das associações testadas nas células tumorais de Ehrlich, sem qualquer efeito para as células normais.

O conjunto dos dados obtidos nos tratamentos com o Cloridrato de Meclizina, qualifica-o como um tratamento desfavorável para este modelo de carcinomatose mamária, considerando sua atividade citotóxica para as células normais tanto quanto para as células tumorais.

Foi possível observar a modulação da expressão dos marcadores quando o 2-AEH₂F foi associado aos demais fármacos testados, indicando uma predominância de seu efeito co-administrado para promover uma resposta pró-inflamatória.

REFERÊNCIAS

1. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, 2018. Última visita: 06/04/21

2. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional Do Câncer – INCA., 2014. Última visita: 06/04/21

3. VIDONI, Chiara et al. Epigenetic targeting of autophagy for cancer prevention and treatment by natural compounds. In: Seminars in cancer biology. Academic Press, 2020. p. 34-44. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.04.006

4. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. cell, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

5. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

6. CURTIN, James F.; COTTER, Thomas G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. Cellular signalling, v. 15, n. 11, p. 983-992, 2003. https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00093-7

7. BIRD, Adrian. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & development, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002. https://doi.org/10.1101/gad.947102

8. FARDI, Masoumeh; SOLALI, Saeed; HAGH, Majid Farshdousti. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. Genes & diseases, v. 5, n. 4, p. 304-311, 2018. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.003

9. JONES, Peter A.; BAYLIN, Stephen B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature reviews genetics, v. 3, n. 6, p. 415-428, 2002. https://doi.org/10.1038/nrg816

10. LIANG, Baiqiang et al. GWAS in cancer: progress and challenges. Molecular Genetics and Genomics, v. 295, n. 3, p. 537-561, 2020. https://doi.org/10.1007/s00438-020-01647-z

11. FERREIRA, Manuel A. et al. Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. Nature communications, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2019. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08053-5

12. MORTON, Lindsay M. et al. Genome-wide association study to identify susceptibility loci that modify radiation-related risk for breast cancer after childhood cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, v. 109, n. 11, p. djx058, 2017. https://doi.org/10.1093/jnci/djx058

13. CHENG, Nikki et al. Transforming growth factor-β signaling–deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. Molecular Cancer Research, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, 2008. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203

14. BHOWMICK, Neil A.; NEILSON, Eric G.; MOSES, Harold L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature, v. 432, n. 7015, p. 332-337, 2004. https://doi.org/10.1038/nature03096

15. FULDA, Simone et al. Cellular stress responses: cell survival and cell death. International journal of cell biology, v. 2010, 2010. https://doi.org/10.1155/2010/214074

16. HOUSMAN, Genevieve et al. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014. https://doi.org/10.3390/cancers6031769

17. BAGULEY, Bruce C. The paradox of cancer cell apoptosis. Front Biosci, v. 16, p. 1759-1767, 2011.

18. OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell proliferation, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x

19. PORTT, Liam et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1813, n. 1, p. 238-259, 2011. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010

20. WANG, Ying et al. Radiation- induced glioblastoma with rhabdoid characteristics following treatment for medulloblastoma: A case report and review of the literature. Molecular and Clinical Oncology, v. 9, n. 4, p. 415-418, 2018. https://doi.org/10.3892/mco.2018.1703

21. MORTON, Lindsay M. et al. Association of chemotherapy for solid tumors with development of therapy-related myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia in the modern era. JAMA oncology, v. 5, n. 3, p. 318-325, 2019. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5625

22. LEE, Yeuan Ting; TAN, Yi Jer; OON, Chern Ein. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. European journal of pharmacology, v. 834, p. 188-196, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034

23. CORTES, Jorge; REA, Delphine; LIPTON, Jeffrey H. Treatment-free remission with firstand second-generation tyrosine kinase inhibitors. American journal of hematology, v. 94, n. 3, p. 346-357, 2019. https://doi.org/10.1002/ajh.25342

24. DAI, Xiaofeng et al. Standardizing CAR-T therapy: Getting it scaled up. Biotechnology advances, v. 37, n. 1, p. 239-245, 2019. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.002

25. JIN, Ming-Zhu; JIN, Wei-Lin. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2020. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x

26. ABOU KHOUZAM, Raefa et al. Integrating tumor hypoxic stress in novel and more adaptable strategies for cancer immunotherapy. In: Seminars in Cancer Biology. Academic Press, 2020. p. 140-154. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.01.003

27. ACKERMAN, Daniel; SIMON, M. Celeste. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. Trends in cell biology, v. 24, n. 8, p. 472-478, 2014.

28. BHANDARI, Vinayak et al. Divergent mutational processes distinguish hypoxic and normoxic tumours. Nature communications, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14052-x

29. BHANDARI, Vinayak et al. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. Nature genetics, v. 51, n. 2, p. 308-318, 2019. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0318-2

30. SCHITO, Luana; SEMENZA, Gregg L. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. Trends in cancer, v. 2, n. 12, p. 758-770, 2016. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.016

31. FUKUMURA, Dai et al. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. Cancer research, v. 61, n. 16, p. 6020-6024, 2001.

32. BALKWILL, Frances R.; CAPASSO, Melania; HAGEMANN, Thorsten. The tumor microenvironment at a glance. Journal of cell science, v. 125, n. 23, p. 5591-5596, 2012. https://doi.org/10.1242/jcs.116392

33. FRIDMAN, Wolf Herman et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nature Reviews Cancer, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012. https://doi.org/10.1038/nrc3245.

34. LÓPEZ-SOTO, Alejandro et al. Control of metastasis by NK cells. Cancer cell, v. 32, n. 2, p. 135-154, 2017. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.009

35. MAO, Xiao-Yuan et al. Live or let die: Neuroprotective and anti-cancer effects of nutraceutical antioxidants. Pharmacology & Therapeutics, v. 183, p. 137-151, 2018. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.012

36. PARKS, Scott K.; MUELLER-KLIESER, Wolfgang; POUYSSÉGUR, Jacques. Lactate and acidity in the cancer microenvironment. Annual Review of Cancer Biology, v. 4, p. 141-158, 2020. https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033556

37. PECK, Barrie; SCHULZE, Almut. Lipid metabolism at the nexus of diet and tumor microenvironment. Trends in Cancer, v. 5, n. 11, p. 693-703, 2019. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.09.007

38. VAUPEL, Peter; KALLINOWSKI, Friedrich; OKUNIEFF, Paul. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer research, v. 49, n. 23, p. 6449-6465, 1989.

39. IVASHKIV, Lionel B. The hypoxia–lactate axis tempers inflammation. Nature Reviews Immunology, v. 20, n. 2, p. 85-86, 2020. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0259-8

40. ANGELIN, Alessia et al. Foxp3 reprograms T cell metabolism to function in low-glucose, high-lactate environments. Cell metabolism, v. 25, n. 6, p. 1282-1293. e7, 2017. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.018

41. CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. Nature, v. 225, n. 5234, p. 734-735, 1970. https://doi.org/10.1038/225734a0

42. KALISH, Sergey et al. C57BL/6N mice are more resistant to ehrlich ascites tumors than C57BL/6J mice: the role of macrophage nitric oxide. Medical science monitor basic research, v. 21, p. 235, 2015. https://doi.org/10.12659/MSMBR.895555

43. SEGURA, Juan A. et al. Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase mRNA lose their capacity to evade the mouse immune system. International journal of cancer, v. 91, n. 3, p. 379-384, 2001. https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-IJC1046>3.0.CO;2-L

44. J. SEGURA, Juan A.; BARBERO, Laura G.; MÁRQUEZ, Javier. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. Immunology letters, v. 74, n. 2, p. 111-115, 2000. https://doi.org/10.1016/S0165-2478(00)00208-X

45. FECCHIO, Denise et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. Inflammation, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990. https://doi.org/10.1007/BF00914035

46. DE MORALES, José Ruiz; VÉLEZ, Desireé; SUBIZA, José Luis. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. Experimental Hematology, v. 27, n. 12, p. 1757-1767, 1999. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(99)00119-8

47. IBRAHIM, Hany M. et al. Antitumor and immune-modulatory efficacy of dual-treatment based on levamisole and/or taurine in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 106, p. 43-49, 2018. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.113

48 GABAI, Vladimir L. et al. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins. FEBS letters, v. 375, n. 1-2, p. 21-26, 1995. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01152-5

49. OZASLAN, Mehmet et al. Ehrlich ascites carcinoma. African journal of Biotechnology, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011. https://doi.org/10.5897/AJBx10.017

50. FEITOSA, Ivan Brito et al. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form?. Life Sciences, v. 264, p. 118578, 2021. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118578

51. VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R.; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nature reviews Molecular cell biology, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008. https://doi.org/10.1038/nrm2330

52. FERREIRA, Adilson Kleber. Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios da membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

53. NA, Hye-Kyung; SURH, Young-Joon. The antitumor ether lipid edelfosine (ET-18-O-CH 3) induces apoptosis in H-ras transformed human breast epithelial cells: by blocking ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases as potential targets. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, v. 17, 2008.

54. GAJATE, Consuelo et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. Oncogene, v. 31, n. 21, p. 2627-2639, 2012. https://doi.org/10.1038/onc.2011.446

55. JIMÉNEZ-LÓPEZ, José M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. Lipids in health and disease, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2010. https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-33

56. BURK, Konrad et al. Overview on the clinical development of miltefosine solution (Miltex (r)) for the treatment of cutaneous breast cancer. Drugs of Today, v. 30, p. 59-72, 1994.

57. SINDERMANN, H.; JUNGE, K.; BURK, K. Miltefosine Solution: Prognostic Factors for the Outcome of Topical Treatment of Skin Meta-static Breast Cancer. Oncology Research and Treatment, v. 17, n. 1, p. 21-26, 1994. https://doi.org/10.1159/000218377

58. WANDT, H.; GALLMEIER, W. M. A new treatment option in patients with cutaneous lesions from breast cancer: Topical administration of Miltefosine. Oncology Research and Treatment, v. 17, n. 1, p. 16-19, 1994. https://doi.org/10.1159/000218376

59. CROFT, Simon L.; ENGEL, Juergen. Miltefosine—discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 100, n. Supplement_1, p. S4-S8, 2006. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.009

60. VERWEIJ, J. et al. Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult—an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. European Journal of Cancer, v. 29, n. 2, p. 208-209, 1993. https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90177-H

61. PLANTING, A. S. T.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. European Journal of Cancer, v. 29, n. 4, p. 518-519, 1993. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(05)80142-X

62. JAKUBOWIAK, Andrzej J. et al. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. British journal of hematology, v. 158, n. 4, p. 472-480, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09173.x

63 BENDELL, Johanna C. et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second-or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol, v. 29, n. 33, p. 4394-4400, 2011. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.1980

64. FRIEDMAN, Daphne R. et al. Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and in vitro studies. Leukemia & lymphoma, v. 55, n. 5, p. 1067-1075, 2014. https://doi.org/10.3109/10428194.2013.824080

65. RIOS-MARCO, Pablo et al. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1859, n. 9, p. 1657-1667, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.016

66. COLLADO SOLÉ, Alejandro. Mitochondrial functionality is regulated by alkylphosphocholines in human colon cancer cells. 2018.

67. MOLLINEDO, Faustino et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. Oncogene, v. 29, n. 26, p. 3748-3757, 2010. https://doi.org/10.1038/onc.2010.131

68. GAJATE, Consuelo et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. Oncogene, v. 31, n. 21, p. 2627-2639, 2012. https://doi.org/10.1038/onc.2011.446

69. MOLLINEDO, Faustino et al. In vitro and in vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. Clinical Cancer Research, v. 16, n. 7, p. 2046-2054, 2010. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2456

70. MOLLINEDO, Faustino et al. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 329, n. 2, p. 439-449, 2009. https://doi.org/10.1124/jpet.108.148254

71. FELLER, Nicole et al. Purging of peripheral blood stem cell transplants in AML: a predictive model based on minimal residual disease burden. Experimental hematology, v. 33, n. 1, p. 120-130, 2005. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.10.007

72. GAJATE, Consuelo; MOLLINEDO, Faustino. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH3 (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. Current drug metabolism, v. 3, n. 5, p. 491-525, 2002. https://doi.org/10.2174/1389200023337225

73HENKE, Guido et al. Pharmacokinetics and biodistribution of Erufosine in nude miceimplications for combination with radiotherapy. Radiation Oncology, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009. https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-46

74. GAILLARD, Boris et al. Synthesis and evaluation of antitumor alkylphospholipid prodrugs. Pharmaceutical Research, v. 37, n. 6, p. 1-12, 2020. https://doi.org/10.1007/s11095-020-02830-y

75. FERREIRA, Adilson Kleber et al. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes CellCycle in Melanoma. Journal of Cancer Science & Therapy, p. 53-59, 2011.

76. STEENBERGEN, Rineke et al. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 48, p. 40032-40040, 2005. ttps://doi.org/10.1074/jbc.M506510200

77. MENON, A. K.; STEVENS, V. L. Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. Journal of Biological Chemistry, v. 267, n. 22, p. 15277-15280, 1992. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49529-X

78. ARRUDA, Maria Sueli Parreira de et al. The effect of phosphoethanolamine intake on mortality and macrophage activity in mice with solid Ehrlich tumors. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, n. 6, p. 1203-1210, 2011.

79. FERREIRA, Adilson Kleber 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, v. 66, n. 7, p. 541-548, 2012. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2012.04.008Get

80. FERREIRA, Adilson Kleber et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 67, n. 6, p. 481-487, 2013. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.01.012

81. FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo antileukemia effects. British journal of cancer, v. 109, n. 11, p. 2819-2828, 2013. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.510

82. FERREIRA, Adilson Kleber et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. PLoS One, v. 8, n. 3, p. e57937, 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057937

83. LAVELI-SILVA, M. G. Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana. Diss apresentada à Fac Med da Univ São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-99, 2016.

84. DA SILVA, Manuela Garcia Laveli; KNOP, Luciana Bastianelli; MARIA, Durvanei Augusto. Meclizine Chloridrate and Methyl-β-Cyclodextrin Associated with Monophosphoester Synthetic Phosphoethanolamine Modulating Proliferative Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 7, p. 408-420, 2019. https://doi.org/10.17265/2328-2150/2019.07.006

85. KUBATKA, Peter et al. Statins in oncological research: from experimental studies to clinical practice. Critical reviews in oncology/hematology, v. 92, n. 3, p. 296-311, 2014. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.08.002

86. OSMAK, Maja. Statins and cancer: current and future prospects. Cancer letters, v. 324, n. 1, p. 1-12, 2012. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.011

87. SANTOMAURO JÚN, Augusto Cézar et al. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 52, n. 1, p. 120-125, 2008..

88. DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. New England journal of medicine, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2002. https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512

89. HARDIE, D. Grahame. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinology, v. 144, n. 12, p. 5179-5183, 2003. https://doi.org/10.1210/en.2003-0982

90. CARLING, David. The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control. Trends in biochemical sciences, v. 29, n. 1, p. 18-24, 2004. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005

91. GOHIL, Vishal M. et al. Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 49, p. 35387-35395, 2013. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489237

92. LIN, Jiunn-Chang et al. Induction of apoptosis and cell-cycle arrest in human colon cancer cells by meclizine. Food and chemical toxicology, v. 45, n. 6, p. 935-944, 2007. https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.016

93. SEYFRIED, Thomas N. et al. Press-pulse: a novel therapeutic strategy for the metabolic management of cancer. Nutrition & metabolism, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2017. https://doi.org/10.1186/s12986-017-0178-2

94. ZHOU, Weihua et al. The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. Nutrition & metabolism, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2007. https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-5

95. MULROONEY, Tiernan J. et al. Influence of caloric restriction on constitutive expression of NF-κB in an experimental mouse astrocytoma. PloS one, v. 6, n. 3, p. e18085, 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018085

96. URITS, Ivan et al. Dietary restriction promotes vessel maturation in a mouse astrocytoma. Journal of Oncology, v. 2012, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/264039

97. MUKHERJEE, P. et al. Dietary restriction reduces angiogenesis and growth in an orthotopic mouse brain tumour model. British journal of cancer, v. 86, n. 10, p. 1615-1621, 2002. https://doi.org/1038/sj.bjc.6600298

98. MUKHERJEE, Purna et al. Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. Molecular cancer, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2008. https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-37

99. SHELTON, Laura M. et al. Calorie restriction as an anti-invasive therapy for malignant brain cancer in the VM mouse. ASN neuro, v. 2, n. 3, p. AN20100002, 2010. https://doi.org/10.1042/AN20100002

100. SIMONE, Brittany A. et al. Caloric restriction counteracts chemotherapy-induced inflammation and increases response to therapy in a triple negative breast cancer model. Cell Cycle, v. 17, n. 13, p. 1536-1544, 2018. https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471314

101. WALLACE, Taylor C. et al. Personalized nutrition in disrupting cancer—Proceedings from the 2017 American College of Nutrition Annual Meeting. Journal of the American College of Nutrition, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2019. https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1500499

102. GORĄCA, Anna et al. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. Pharmacological Reports, v. 63, n. 4, p. 849-858, 2011. https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4

103. ZACK, Fred et al. Death within 44 days of 2, 4-dinitrophenol intake. International journal of legal medicine, v. 130, n. 5, p. 1237-1241, 2016. https://doi.org/10.1007/s00414-016-1378-4

104. FERREIRA, Sérgio Teixeira; FELICE, Fernanda Guarino De. Ações neuroprotetoras do 2, 4-dinitrofenol: pró ou contra?. Dementia & Neuropsychologia, v. 1, p. 334-338, 2007. https://doi.org/10.1590/S1980-57642008DN10400002

105. RABELO, Daniel da Conceição et al. Efeitos antitumorais do 2, 4-Finitrofenol associado monoalquilfosfato em células tumorais de mama humana triplo negativo.

106. VESELY, Matthew D. et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annual review of immunology, v. 29, p. 235-271, 2011. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324

107. ZITVOGEL, Laurence; TESNIERE, Antoine; KROEMER, Guido. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nature Reviews Immunology, v. 6, n. 10, p. 715-727, 2006. https://doi.org/10.1038/nri1936.

108. CHU, Yiwei et al. Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma. Journal of immunotherapy, v. 29, n. 4, p. 367-380, 2006. https://doi.org/10.1097/01.cji.0000199198.43587.ba

109. MACH, Nicolas et al. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. Cancer research, v. 60, n. 12, p. 3239-3246, 2000.

110. DOUGAN, Michael; DRANOFF, Glenn. Immune therapy for cancer. Annual review of
immunology, v. 27, p. 83-117, 2009.
https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132544

111. QIN, Zhihai et al. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. The Journal of Immunology, v. 159, n. 2, p. 770-776, 1997.

112. GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. Revista brasileira de cancerologia, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007. https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801

113 VANDER HEIDEN, Matthew G.; THOMPSON, Craig B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. Nature cell biology, v. 1, n. 8, p. E209-E216, 1999. https://doi.org/10.1038/70237

114. PAVLOVIC, Zvezdan. Distinctive Roles and Molecular Regulation of CTP: phosphoethanolamine cytidylyltransferase Alpha and Gamma Splice Variants. 2014. Tese de Doutorado. University of Guelph.

115. LI, Junling et al. Targeting phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine for imaging apoptosis in cancer. Nuclear Medicine and Biology, v. 78, p. 23-30, 2019. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.10.002

116. WALLNER, Stefan et al. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine plasmalogens in lipid loaded human macrophages. PLoS One, v. 13, n. 10, p. e0205706, 2018. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205706

117. DANFORTH, David N.; SGAGIAS, Magdalene K. Interleukin-1 α and interleukin-6 act additively to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells in vitro. Cancer research, v. 53, n. 7, p. 1538-1545, 1993.

118. PACIOTTI, Giulio F.; TAMARKIN, Lawrence. Interleukin-1 directly regulates hormone-dependent human breast cancer cell proliferation in vitro. Molecular Endocrinology, v. 2, n. 5, p. 459-464, 1988. https://doi.org/10.1210/mend-2-5-459

119. KOREKANE, Hiroaki; NISHIKAWA, Atsushi; IMAMURA, Kiichi. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. Archives of biochemistry and biophysics, v. 412, n. 2, p. 216-222, 2003. https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00041-9

120. AIKEMU, Ainiwaer et al. Immunomodulatory and anti-tumor effects of Nigella glandulifera freyn and sint seeds on ehrlich ascites carcinoma in mouse model. Pharmacognosy magazine, v. 9, n. 35, p. 187, 2013. https://doi.org/10.4103/0973-1296.113258

121. FECCHIO, Denise et al. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAFantagonists. International journal of immunopharmacology, v. 12, n. 1, p. 57-65, 1990. https://doi.org/10.1016/0192-0561(90)90068-X

122. PORTER, Karen E. et al. Tumor necrosis factor α induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. Cardiovascular research, v. 64, n. 3, p. 507-515, 2004. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.07.020

123. KIM, Sangmin et al. Berberine suppresses TNF-α-induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Molecules, v. 13, n. 12, p. 2975-2985, 2008. https://doi.org/10.3390/molecules13122975

124. YAMASHITA, Yoko; NARA, Nobuo; AOKI, Nobuo. Antiproliferative and differentiative effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on a variant human small cell lung cancer cell line. Cancer research, v. 49, n. 19, p. 5334-5338, 1989.

125. URDINGUIO, Rocio G. et al. Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. Cancer research, v. 73, n. 1, p. 395-405, 2013. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0806

126. BECKWITT, Colin H. et al. Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. Breast Cancer Research, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2018. https://doi.org/10.1186/s13058-018-1066-z

127. MEHIBEL, Manal et al. Statin-induced metabolic reprogramming in head and neck cancer: a biomarker for targeting monocarboxylate transporters. Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35103-1

128. VANDER HEIDEN, Matthew G.; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. science, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009. https://doi.org/10.1126/science.1160809

129. PUTIGNANI, Lorenza et al. Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria. Breast cancer research and treatment, v. 110, n. 3, p. 439-452, 2008. https://doi.org/10.1007/s10549-007-9738-x

130. FERREIRA, Adilson Kleber et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. Anticancer

research, v. 32, n. 1, p. 95-104, 2012.

131. LUNA, Arthur Cassio de Lima. Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética no modelo de hepatocarcinoma. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

132. JONES, Kimberly D. et al. Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. Biochemical and biophysical research communications, v. 205, n. 3, p. 1681-1687, 1994. https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2861

133. WANG, Gang et al. Simvastatin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of bladder cancer cells via PPAR γ signalling pathway. Scientific reports, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016. https://doi.org/10.1038/srep35783

134. SIVAPRASAD, Umasundari; ABBAS, Tarek; DUTTA, Anindya. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. Molecular cancer therapeutics, v. 5, n. 9, p. 2310-2316, 2006. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0175

135. LITTARRU, Gian Paolo; TIANO, Luca. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. Nutrition, v. 26, n. 3, p. 250-254, 2010. https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.08.008

136. JOLLIET, P. et al. Plasma coenzyme Q10 concentrations in breast cancer: prognosis and therapeutic consequences. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, v. 36, n. 9, p. 506-509, 1998.

137. ABDI, Sheyda et al. Coenzyme Q10 in association with metabolism-related AMPK/PFKFB3 and angiogenic VEGF/VEGFR2 genes in breast cancer patients. Molecular Biology Reports, v. 47, n. 4, p. 2459-2473, 2020. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05310-z

138. PREMKUMAR, Vummidi Giridhar et al. Anti-angiogenic potential of CoenzymeQ10, riboflavin and niacin in breast cancer patients undergoing tamoxifen therapy. Vascular pharmacology, v. 48, n. 4-6, p. 191-201, 2008. https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.02.003

139. HERTZ, N.; LISTER, R. E. Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q10 and other antioxidants: a pilot study. Journal of International Medical Research, v. 37, n. 6, p. 1961-1971, 2009. https://doi.org/10.1177/147323000903700634

140. RANG, HUMPHREY P. et al. . O Sistema Vascular. Rang&Dale Farmacologia, 7º Edição, p. 265-284, 2012.

141. SANTOS, Vitória Wibbelt dos et al. Efeito do tratamento com antioxidantes em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel em camundongos. 2019.

142.TEIXEIRA, Sarah Fernandes. Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP: fosfoetanolamina-citidililtransferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. **ANEXOS**



Histograma da expressão dos marcadores de células do tumor ascítico de Ehrlich: Controle e 2-AEH₂F, respectivamente. A) BCL2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53 E) TNF- □; F) IL-1; G) IL-6; H) IL-2.





Histograma da expressão dos marcadores de células do tumor ascítico de Ehrlich: Controle, Meclizina, 2-AEH2F+ cloridrato de Meclizina (3h) e 2-AEH2F+ cloridrato de Meclizina (12h), tratados respectivamente. A) BCL2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53 E) TNF- \Box ; F) IL-1; G) IL-6; H) IL-2.





Histograma da expressão dos marcadores de células do tumor ascítico de Ehrlich: Controle, Coenzima Q10, 2-AEH2F+ Coenzima Q10 (3h) e 2-AEH2F+ Coenzima Q10 (12h), tratados respectivamente. A) BCL2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53 E) TNF- :; F) IL-1; G) IL-6; H) IL-2.











Histograma da expressão dos marcadores de células do tumor ascítico de Ehrlich: Controle, Paclitaxel, 2-AEH2F+ Paclitaxel (3h) e 2-AEH2F+ Paclitaxel (12h), tratados respectivamente. A) BCL2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53 E) TNF- : F) IL-1; G) IL-6; H) IL-2.



100





Histograma da expressão dos marcadores de células do tumor ascítico de Ehrlich: Controle, Sinvastatina, 2-AEH2F+ Sinvastatina (3h) e 2-AEH2F+ Sinvastatina (12h), tratados respectivamente. A) BCL2; B) Caspase 3; C) Citocromo C; D) P53 E) TNF- []; F) IL-1; G) IL-6; H) IL-2.