Manuela Garcia Laveli da Silva

**Efeitos moduladores da atividade mitocondrial do cloridrato de Meclizina,
2-4-dinitrofenol e metil-beta-ciclodextrina, associados com a
fosfoetanolamina sintética em linhagem de câncer de mama triplo
negativo**

Tese apresentado à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora 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

2020

Manuela Garcia Laveli da Silva

**Efeitos moduladores da atividade mitocondrial do cloridrato de Meclizina,
2-4-dinitrofenol e metil-beta-ciclodextrina, associados com a
fosfoetanolamina sintética em linhagem de câncer de mama triplo
negativo**

Tese apresentado à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora 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

2020

Dedico este trabalho a todos os pacientes que estão ou estiveram com câncer, mas em especial para um paciente, dedico ao meu marido que lutou bravamente com a doença no período em que eu realizava esta tese. Sua luta foi vitoriosa, sua coragem e vontade de viver me inspiram. Obrigada por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos. Amo você!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos meus amigos queridos do laboratório Thais, Laerty, Monique por todo carinho e companheirismo nestes últimos anos. Obrigada pelo apoio em todas as horas e que venham mais anos de pesquisa e amizade! Contem sempre comigo.

Aos demais amigos do Laboratório, agradeço pelo apoio e pela amizade de vocês Daniel, Rosely, Rosa, Angelina, Henrique, Júlio, Guilherme, Poliana, Sérgio, José Arthur, Amanda, Suely.

A FAPESP, pelo auxílio na pesquisa, compra de materiais. Obrigada pela bolsa concedida, graças a ela, essa tese foi gerada!

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AEH₂F	Fosfoetanolamina sintética
APAF-1	Fator de ativação 1 da protease apoptótica
APL	Alquilfosfolipídeos
APLs	Alquilfosfolipídeos sintéticos
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BRCA1	do inglês <i>breast cancer 1 gene</i>
BRCA2	do inglês <i>breast cancer 2 gene</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAR	Androstano constitutivo
CD	Ciclodextrinas
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
Chol	Colesterol
CM	Cloridrato de Meclizina
CO₂	Dióxido de carbono
CoQ10	Coenzima Q10
CT	fosfocolina citidililtransferase
°C	Graus centígrados
DNP	2,4- Dinitrofenol
DP	desvio padrão
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
ER +	Receptor de estrógeno positivo
ER -	Receptor de estrógeno negativo
Etn	CDP-etanolamina
FACScalibur	do inglês <i>Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton e Dickinson)</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FLs	Fosfolipídeos
FN1	Linhagem celular de fibroblasto humano normal
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano
HIF1	Fator 1 induzido por hipóxia
HUVEC	Linhagem de células de endoteliais do cordão umbilical humano

IL-1r	Receptor de interleucina 1
IL-6r	Receptor de interleucina 6
IC₅₀	Concentração da toxina que inibe o crescimento de 50% das células
LPO	Lipoperoxidação
MBCD	Metil-B-ciclodextrina
MCF 7	Linhagem celular epitelial de mama humana, derivada de efusão pleural de adenocarcinoma
MDA	malondialdeído
MDA.MB.231	Linhagem celular tumoral triplo negativo de mama humana
MEC	matriz extracelular
mL	mililitro
mM	milimolar
MTT	reagente 3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide])
n	número de amostras analisadas
NAD⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
nM	nanomolar
nm	nanômetro
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
P53	Proteína citoplasmática encargada da manutenção do código genético
PC	Fosfatidilcolina
PCYT2	Citidililtransferase fosfoetanolamina
PI3K	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	fosfatidiletanolamina
PI	Iodeto de propídeo
PHOS	Fosfoetanolamina sintética
PR	Receptor de progesterona
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
ROD 123	Rodamina 123
ROS	Espécies reativas ao oxigênio

rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
T47	Linhagem celular de carcinoma ductal de mama humana
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARs	Substancias reativas ao acido tiobarbitúrico
TCA	Acido tricloroacético
TILs	Tumores infiltrantes
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TNFR1	do inglês <i>Tumor necrosis factor</i> Receptor 1
TRH	Terapia de reposição hormonal
µg	microgramas
µL	microlitros

LISTA DE FIGURA

Figura 01 – Estrutura do parênquima mamário

Figura 02 – Visão geral das vias metabólicas celulares em uma célula tumoral

Figura 03 – Estrutura de um fosfolípídeo de membrana

Figura 04 – Etapas da biossíntese da Fosfatidiletanolamina e Fosfoetanolamina

Figura 05 – Avaliação da Toxicidade do composto Pho-s (2-AEH₂F) em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 06 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 07- Análise quantitativa do número de vacúolos presentes em células tumorais de mama MDA-MB-231

Figura 08 – Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina em células de mama humano MDA-MB-231

Figura 09 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 10 - Avaliação da Toxicidade do composto M β CD em células de mama humano MDA-MB-231

Figura 11 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 12 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol em células de mama humano MDA-MB-231

Figura 13 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 14 - Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina + Pho-s (2-AEH₂F) em células de câncer de mama humano MDA-MB-231

Figura 15 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 16 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 17 - Avaliação da Toxicidade do composto MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) em células de câncer de mama humano MDA-MB-231

Figura 18 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 19 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 20 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F em células de câncer de mama humano MDA-MB-231

Figura 21 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 22 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 23 – Avaliação da Toxicidade do composto 2-AEH₂F (Pho-s) em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 24 – Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de meclizina em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 25 – Avaliação da Toxicidade do composto MβCD em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 26 – Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 27 - Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto humano normal FN1

Figura 28 - Avaliação da Toxicidade do composto MβCD + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto humano normal FN1

Figura 29 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto normal FN1

Figura 30 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 31 – Determinação da citotoxicidade em células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231

Figura 32 - Determinação da citotoxicidade em células de fibroblasto normal FN1

Figura 33 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 34 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 35 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 36 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 37 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 38 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 39 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 40 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 41 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 42 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 43 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 44 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s)

Figura 45 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 46 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 47 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 48– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 49– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 50– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 51– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231

Figura 52 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 53 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 54 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 55 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 56 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 57 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 58 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1

Figura 59 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 60 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 61 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 62 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 63 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 64 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 65 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 66 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 67 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 68 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 69 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 70 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 71 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 72 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 73 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 74 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 75 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 76 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 77 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 78 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 79 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 80 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 81 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 82 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 83 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 84 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 85 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 86 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1

Figura 87 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose

Figura 88 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose

Figura 89 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose

Figura 90 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose

Figura 91 – Percentual da expressão do marcador Bax

Figura 92 – Percentual da expressão do marcador Bad

Figura 93 – Percentual da expressão do marcador Bcl-2

Figura 94 – Percentual da expressão do marcador Caspase 3

Figura 95 – Percentual da expressão do marcador Caspase 8

Figura 96 – Percentual da expressão do marcador Citocromo C

Figura 97 – Percentual da expressão do marcador Ciclina D1

Figura 98 – Percentual da expressão do marcador PCNA

Figura 99 – Percentual da expressão do marcador Caveolina1

Figura 100 – Percentual da expressão do marcador CD36

Figura 101 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 102 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 103 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 104 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 105 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 106 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 107 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 108 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 109 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 110 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 111 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 112 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 113 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 114 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 115 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 116 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 117 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 118 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial

Figura 119 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 120 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 121 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 122 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 123 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 124 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 125 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 126 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 127 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 128 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 129 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 130 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 131 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 132 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 133 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 134 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231

Figura 135 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Figura 136 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Figura 137 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Figura 138 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Sumário

RESUMO.....	18
ABSTRACT	20
1- INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Câncer de mama.....	22
1.2. Tumor de mama triplo negativo.....	25
1.3. Reprogramação metabólica em câncer.....	29
1.3.1.Reprogramação metabólica em câncer de mama	31
1.4. Fosfolípidos antitumorais	34
1.5. Fosfoetanolamina sintética (2-AEH ₂ F)	36
1.6. Energética mitocondrial.....	37
1.7. Cloridrato de Meclizina.....	39
1.8. Metil-B-Ciclodextrina	41
1.9. 2,4-Dinitrofenol.....	42
2- OBJETIVO	43
2.1. Objetivos específicos	43
3- MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Cultura Celular	44
3.2. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT.....	44
3.3. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados	45
3.4. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de fluxo	46
3.5. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI	46
3.6. Avaliação da expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo	47
3.7. Marcação de filamentos de actina por faloidina	48
3.8. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo MitoRed	48
3.9. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo Rodamina 123.....	49
3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	49
3.10.1. Rodamina 123.....	49
3.10.2. Sonda JC-1	50
3.11. Ensaio de proliferação celular por CFSE-DA	50
3.12. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo	51
3.13. Análise SynergyFinder 2.0 de combinações de múltiplos compostos..	51

3.14. Análises estatísticas	53
4- RESULTADOS	54
4.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	54
4.1.1. MDA.MB.231	54
4.1.2. FN1	79
4.2. Análise SynergyFinder 2.0 de combinações de múltiplos compostos...	97
4.2.1. MDA.MB.231	97
4.2.2. FN1	104
4.3. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados ...	110
4.3.1. MDA.MB.231	110
4.3.2. FN1	118
4.4. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	126
4.4.1. MDA.MB.231	126
4.4.2. FN1	141
4.5. Avaliação da atividade apoptótica – Anexina V/PI	156
4.6. Análise dos marcadores por citometria de fluxo.....	161
4.7. Marcação do citoesqueleto por faloidina e das mitocôndrias por MitoRed.....	181
4.8. Marcação mitocondrial com o fluorocromo Rodamina 123	189
4.9. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	197
4.9.1. Rodamina 123.....	197
4.9.2. Sonda JC-1	201
4.10. Ensaio de proliferação celular por CFSE-DA	206
4.10.1. Período de 24 horas.....	206
4.10.2. Período de 48 horas.....	214
4.11. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo	222
5- DISCUSSÃO.....	226
6- CONCLUSÃO	246
REFERENCIAS.....	247

RESUMO

Silva MGL. *Efeitos moduladores da atividade mitocondrial do cloridrato de meclizina, 2,4-dinitrofenol e metil- β -ciclodextrina, associados a fosfoetanolamina sintética em linhagem de câncer de mama triplo negativo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais letal para as mulheres em todo o mundo, apesar das diversas abordagens terapêuticas convencionais como a radioterapia, quimioterapia e hormônio terapia. A resistência das células tumorais à quimioterapia constitui um importante obstáculo clínico para o sucesso do tratamento. Os tumores de mama triplo-negativos são mais agressivos que outros subtipos de câncer de mama, além de serem tumores que apresentam maior disseminação para órgãos sólidos. A Fosfoetanolamina sintética (2-AEH₂F) é um fosfolípídeo fosforilado artificialmente com diversas propriedades antiproliferativas e indutoras de apoptose. Cloridrato de Meclizina (CM) é um anti-histamínico utilizado contra náusea e vertigem, com propriedade anticolinérgica. Metil- β -ciclodextrina (M β CD) pertence à família β -ciclodextrina, capaz de remover o colesterol da membrana plasmática. 2,4-Dinitrofenol (DNP) é um desacoplador químico que age na redução do potencial de membrana mitocondrial, sem modificar a síntese de ATP. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da 2-AEH₂F, CM, M β CD e DNP e suas associações em células tumorais de câncer de mama humano triplo-negativo MDA-MB-231 em comparação com células de fibroblastos normais humanos FN1. Foram obtidas as IC₅₀% pelo método colorimétrico MTT e os valores mostraram uma diminuição da viabilidade celular, com formação de debri em todos os tratamentos. A porcentagem celular na fase G₀/G₁ do ciclo celular diminui significativamente em todas as concentrações e houve aumento na porcentagem de células com DNA fragmentado. A proliferação celular diminui significativamente, quando comparada ao grupo controle nos tempos de 24 e 48 horas. Todos os tratamentos causaram retração do citoesqueleto, alterações nas mitocôndrias e aumento na fragmentação nuclear. O potencial elétrico mitocondrial das células tumorais diminui após os tratamentos. Contudo, a produção de ROS aumentou após a exposição com a 2-AEH₂F,

CM, M β CD e DNP e suas associações em células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. A associação da 2-AEH₂F com o CM nas células tumorais mostrou uma ação sinérgica, contudo as demais associações mostraram ter uma ação aditiva. Nas células normais FN1, todas as associações mostraram ter ação aditiva.

Palavras chave: Neoplasias de mama triplo negativas, Fosfoetanolamina sintética, Cloridrato de Meclizina, Metil-beta-Ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol, Atividade mitocondrial.

ABSTRACT

Silva MGL. *Modulating effects of mitochondrial activity of meclizine hydrochloride, 2,4-dinitrophenol and methyl- β -cyclodextrin associated with synthetic phosphoethanolamine in triple-negative breast cancer.* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Breast cancer is the second most lethal type of cancer for women worldwide, despite several conventional therapeutic approaches such as radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy. The resistance of tumor cells to chemotherapy is an important clinical obstacle to successful treatment. Triple-negative breast tumors are more aggressive than other breast cancer subtypes, in addition to being tumors that have greater spread to solid organs. Synthetic phosphoethanolamine (2-AEH₂F) is artificially phosphorylated phospholipid with several antiproliferative and apoptosis-inducing properties. Meclizine Chloridrate (MC) is antihistamine used against nausea and vertigo, with anticholinergic properties. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) belongs to the β -cyclodextrin family, capable of removing cholesterol from the plasma membrane. 2,4-Dinitrophenol (DNP) is chemical decoupler that acts in reducing the mitochondrial membrane potential, without modifying the ATP synthesis. In this work, the effects of 2-AEH₂F, MC, M β CD and DNP and their associations in MDA-MB-231 triple-negative human breast cancer tumor cells were evaluated in comparison with normal human FN1 fibroblast cells. IC₅₀% were obtained by the MTT colorimetric method and the values showed a decrease in cell viability, with debris formation in all treatments. The cell percentage in the G₀/G₁ phase of the cell cycle decreased significantly at all concentrations and there was an increase in the percentage of cells with fragmented DNA. Cell proliferation decreases significantly when compared to the control group at 24 and 48 hours. All treatments caused cytoskeletal retraction, changes in mitochondria and increased nuclear fragmentation. The mitochondrial electrical potential of tumor cells decreases after treatments. However, ROS production increased after exposure to 2-AEH₂F, CM, M β CD and DNP and their associations in triple-negative breast cancer tumor cells MDA-MB-231. The

association of 2-AEH2F with MC in tumor cells showed a synergistic action, however the other associations showed to have an additive action. In normal FN1 cells, all associations were shown to have additive action.

Keywords: Triple-negative breast neoplasms, synthetic phosphoethanolamine, Meclizine Chloridrate, Methyl-beta-Cyclodextrin, 2,4-Dinitrophenol, Mitochondrial activity.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

A anatomia da mama inclui pele, tecido de gordura, tecido mamário fibroglandular (ductos, lóbulos e tecido fibroso de suporte), estruturas neurovasculares. A pele sobre a mama se conecta ao tecido mamário subjacente através de uma camada facial anterior, bem como através de extensões fibrosas superficiais dos ligamentos de Cooper (ligamento suspensório) (JESINGER, R. A., 2014) (Figura 01).

Figura 01 – Estrutura do parênquima mamário.

Fonte: ELSEVIER, INC. NETTERIMAGES.COM

A cada ano, o câncer provoca cerca de 8 milhões de mortes no mundo. Estima-se que um terço dessas mortes poderia ter sido evitado com mais prevenção, detecção precoce e acesso aos tratamentos existentes. O INCA estima cerca de 600 mil casos novos da doença para 2019, o qual deve estar relacionado ao aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização

(INCA, 2019). De todos os casos de tumores, são fatores comuns em cerca de 85% os fatores ambientais, o estilo de vida, o hábito de fumar, a ingestão de álcool, exposição excessiva ao sol e alguns vírus. Os tumores são tecidos complexos constituídos por vários tipos de células distintas, que participam das interações heterotípicas umas com as outras (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Estatísticas de sobrevivência e recorrência da doença são um sinal de complexidade envolvida na compreensão da patogênese tumoral e potencial estratégico-terapêutico. Sabe-se que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas e o câncer tem várias características, como: vantagem proliferativa seletiva, resposta ao estresse alterada, vascularização, invasão e metástase, remodelagem da progressão metabólica, modulação imunológica e um microambiente de cumplicidade em vários tipos celulares. A instabilidade genética e o metabolismo alterado são um padrão comumente encontrado em células tumorais, a epigenética desempenha um papel importante na conexão da membrana celular, na sinalização externa para a expressão do gene e também parece estar ligada ao metabolismo (LIU et al., 2016).

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

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, correspondendo cerca de 25% dos novos casos a cada ano. O câncer de mama também acomete homens, porém é mais

raro, representando apenas 1% do total de casos da doença. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, para o ano de 2019, o INCA estima cerca de 59.700 novos casos da doença (INCA, 2019). O aumento das taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama está associado a diferentes fatores de risco. A interação de fatores genéticos como o estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente estão envolvidos em seu desenvolvimento. Os principais fatores de risco do câncer de mama em mulheres são a idade, infertilidade, idade da primeira gravidez, menopausa tardia, uma mutação herdada no gene BRCA1/BRCA2 e uso de hormônios (estrogênio e progesterona) em fase pós-menopausa (DINEPUDI et al., 2015).

Os BRCA1 e BRCA2, quando mutados, aumentam o risco de câncer de mama. BRCA1 e BRCA2 estão localizados nos cromossomos 17q21 e 13q12, respectivamente. A deficiência de BRCA1 leva à desregulação do ponto de checagem do ciclo celular, à duplicação anormal do centrôssomo, à instabilidade genética e à apoptose. Mutações no BRCA1/2 são herdadas de maneira autossômica dominante, embora o segundo alelo seja normal. No total, cerca de 20-25% dos cânceres de mama hereditários e 5-10% de todos os cânceres de mama são causados por mutações BRCA1/2 (DINE; DENG, 2013).

O sexo é um fator de risco no câncer de mama, pois cerca de 98% dos pacientes com a doença são mulheres. Além do sexo, o envelhecimento é um dos mais importantes fatores de risco do câncer de mama, pois a incidência de câncer de mama está altamente relacionada ao aumento da idade. Em 2016, aproximadamente 99,3% e 71,2% de todas as mortes associadas ao câncer de mama nos Estados Unidos foram relatadas em mulheres com mais de 40 e 60 anos, respectivamente (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Fatores reprodutivos como menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia na primeira gestação e baixa paridade podem aumentar o risco de câncer de mama. Cada atraso de 1 ano na menopausa aumenta o risco de câncer de mama em 3%. Cada atraso de 1 ano na menarca ou em cada parto adicional diminui o risco de câncer de mama em 5% ou 10%, respectivamente. Um recente estudo de coorte norueguês mostrou que uma taxa de risco (HR) é de 1,54 entre a idade tardia (≥ 35 anos) e precoce (< 20 anos) no primeiro

parto. Fatores reprodutivos estão fortemente associados com o status ER, com diferenças nas razões de chances (OR) entre ER + (receptor de estrógeno positivo) e ER - (receptor de estrógeno negativo) câncer de mama para paridade (OR: 0,7 versus 0,9 para ≥ 3 nascimentos vs. nulíparas) e idade ao primeiro parto (OR: 1,6 vs. 1,2 para idade ≥ 30 vs. < 25 anos) (HORM; VATTEN, 2017).

Tanto os estrógenos endógenos quanto os exógenos estão associados ao risco de câncer de mama. O estrógeno endógeno é geralmente produzido pelo ovário, além de outras fontes andrógenas produzidas na supra renal, em mulheres na pré-menopausa e a ovariectomia pode reduzir o risco de câncer de mama. As principais fontes de estrogênio exógeno são os contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal (TRH). A TRH envolve a administração de estrogênio exógeno ou outros hormônios para as mulheres menopausadas ou pós-menopausadas. Uma série de estudos mostrou que o uso de TRH pode aumentar o risco de câncer de mama (SUN et al., 2017). Estilos de vida modernos, como o consumo excessivo de álcool e o consumo excessivo de gordura na dieta, também podem aumentar o risco de câncer de mama. O consumo de álcool pode elevar o nível de hormônios relacionados ao estrogênio no sangue e desencadear as vias do receptor de estrogênio (JUNG; WANG; ANDERSON, 2016).

O estudo do câncer mamário, assim como de outros tipos de cânceres, tem mostrado que esta patologia possui alta heterogeneidade nos diferentes tipos celulares e suas origens no interior dos tecidos. Essa diversidade se estende à desregulação de várias vias que governam fundamentalmente processos como morte, proliferação e diferenciação (KREEGER, 2010). Isto exige cada vez mais o desenvolvimento de diferentes frentes de pesquisas, as quais visam trazer à luz maiores informações sobre esta doença. A classificação do câncer de mama de acordo com os subtipos moleculares é altamente relevante e pode fornecer informações prognósticas significativas relacionadas ao desfecho do paciente.

1.2. Tumor de mama triplo negativo

Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC) é um subtipo de câncer de mama que, baseado na marcação por imunohistoquímica, é negativo para o

receptor de estrogênio (ER), negativo em receptor de progesterona (PR) e negativo para o fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O TNBC é caracterizado por seu perfil molecular único, natureza agressiva, padrões metastáticos distintos e falta de terapias direcionadas específicas e com baixa resposta terapêutica (O'TOOLE et al., 2013).

Os tumores de mama são tipicamente classificados em sete subtipos: luminal A (positivo e histológico de baixo grau), luminoso B (positivo e histológico de alto grau), HER2 superexpressivo, basal (BL), imunomodulador (IM), mesenquimais (M), mesenquimais (MSL) e tumores normais semelhantes a mamas. A maioria do fenótipo TNBC pertence ao subtipo molecular BL. De fato, os tumores TNBC e BL têm muitas semelhanças biológicas, incluindo instabilidade genômica, prevalência de alto grau, tumores altamente proliferativos, expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), alta frequência de mutações na linha germinativa BRCA1 (gBRCA), com uma prevalência extraordinária de mutações na p53 (> 80%) (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003; AZIM et al., 2019). No entanto, os tumores TNBC e BL intrínseco não são termos sinônimos, onde 25% a 30% de todo o TNBC definido por imuno-histoquímica (IHC) não possui as características genômicas dos cânceres de mama com BL. Os cânceres de mama tipo basal são caracterizados por uma alta expressão de CK5, CK14, caveolina-1, caix, p63, EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)/HER1, que reflete sobre a glândula mamária basal/componente celular mioepitelial (RAKHA; REIS-FILHO; ELIS, 2008).

A quimioterapia adjuvante não apenas prolonga a sobrevida livre de doença em pacientes, mas também a sobrevida global como um todo; no entanto, o TNBC não possui os receptores direcionados típicos encontrados na doença luminal ou HER-2 e, portanto, não pode ser tratado com agentes hormonais, como SERMS, inibidores de aromatase ou antagonistas de HER2. Para combater esta questão, vários estudos neoadjuvantes foram realizados, o que acentuou a relação entre quimio-sensibilidade e desfecho, revelando uma sensibilidade proporcionalmente maior à antraciclina ou à quimioterapia baseada em antraciclina/taxano, como Doxorrubicina e Ciclofosfamida. Embora a doença triplo-negativa seja altamente responsiva ao tratamento de quimioterapia com antraciclina/taxano, um alto risco de recaída ainda

permanece se o tumor não for completamente erradicado (AYOUB; AL-SHAMI; YAGHAN, 2019).

Neste sentido várias estratégias de incremento neste campo têm avançado, mas as tendências na prática clínica mostram aumentar o número de casos e a morte por câncer. Além das baixas respostas terapêuticas aos protocolos que utilizam esquemas adjuvantes e neoadjuvantes. Não há terapia direcionada para o TNBC que constitua de 15 a 20% dos casos de câncer de mama e, portanto, a quimioterapia citostática convencional permanece como a única opção terapêutica. Estatísticas de sobrevivência e recorrência da doença são um sinal de complexidade envolvida na compreensão da patogênese tumoral e potenciais terapêuticas. Sabe-se que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas e o câncer tem várias características: vantagem proliferativa seletiva, resposta ao estresse alterada, vascularização, invasão e metástase, vias metabólicas, modulação imunológica e as alterações no microambiente. A instabilidade genética e metabolismo alterado é um padrão comumente encontrado em células cancerígenas, epigenética desempenham um papel importante na ligação da membrana celular e sinalização externa para a expressão gênica dentro do núcleo e também parece estar ligada ao metabolismo (LIU et al., 2016).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com alto grau de diversidade entre os tumores. O perfil abrangente de expressão gênica classifica os tumores de mama em três subtipos moleculares principais: luminal, receptor de EGF humano 2 (HER2) positivo e tumores do tipo basal. Recentemente, evidências crescentes estão apoiando o potencial imunogênico de subtipos específicos do câncer de mama. A natureza imunogênica do câncer de mama foi evidenciada pela presença de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs). A análise de amostras de tumor de mama demonstrou um nível alto de TILs entre pacientes portadores de câncer de mama HER2 positivo e triplo negativo do que subtipos dependentes de hormônio (MILLER et al., 2016; AYOUB; AL-SHAMI; YAGHAN, 2019). Câncer de mama triplo-negativo (TNBC) aplica-se a todos os tumores que não possuem a expressão de ER, PR e HER2, os quais são alvos moleculares de agentes terapêuticos. No entanto, a quimioterapia continua a ser a primeira opção de tratamento para os pacientes

em estágio inicial e pacientes com estágio avançado de TNBC (BIANCHINI et al., 2016).

O avanço e a aplicação generalizada de tecnologias como genômica, epigenômica, transcriptômica ou proteômica, entre outras, forneceram diversas e novos conhecimentos da complexidade molecular desta doença (CURTIS et al., 2012). Apesar desta complexidade, as decisões clínicas ainda dependem principalmente da avaliação de três marcadores: a expressão de os receptores do sistema endócrino para estrogênio e progesterona (ER e PR, respectivamente) e a expressão de HER2 (BIANCHINI et al., 2016).

O TNBC representa aproximadamente de 15 a 20% de todos os casos de câncer de mama sendo, geralmente, considerado como o subgrupo mais grave da doença. Os pacientes diagnosticados com TNBC são amplamente incapazes de responder às terapias direcionadas atualmente disponíveis, como Tamoxifen e Trastuzumab, além de apresentar um risco maior de recaída e uma maior taxa de mortalidade em comparação com outros subtipos de câncer de mama (KAPLAN; MALMGREN, 2008; CAO et al., 2014). Além disso, possuem um pior resultado quando comparado a resultados de pacientes com outros subtipos de câncer de mama, devido a um comportamento clínico mais agressivo e a falta de alvos moleculares conhecidos para a terapia. O diagnóstico de TNBC depende das precisas avaliações dos níveis de expressão de proteínas de ER e PR pela imunohistoquímica (IHC) e de HER2 por IHC e/ou hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (KEEGAN et al., 2012).

É mais provável o TNBC recorrente em pacientes do que os outros 2 subtipos de câncer de mama, com sobrevida de 85% para tumores triplo-negativos de estágio I versus 94% a 99% de sobrevida para os tumores com receptor de hormônio positivo e HER2 positivo. A terapia sistêmica para o câncer de mama não-metastático é determinada pelo subtipo: pacientes com tumores positivos para receptores hormonais recebem terapia endócrina, e uma minoria também recebe quimioterapia; pacientes com tumores HER2-positivo recebem anticorpo anti-HER2 direcionado ou terapia inibidora de pequenas moléculas combinada com a quimioterapia; e pacientes com tumores triplo-negativos recebem quimioterapia isoladamente. A terapia local para todos os pacientes com câncer de mama não metastático consiste em ressecção cirúrgica, considerando-se a radiação pós-operatória e a mastectomia, caso

seja necessária. De acordo com o subtipo, com objetivos de prolongar a vida e atenuar os sintomas. A sobrevida global mediana para o câncer de mama metastático triplo negativo é de aproximadamente 1 ano versus aproximadamente 5 anos para os outros 2 subtipos (CAO et al., 2014). Por isso, é necessário identificar alvos moleculares para o tratamento do TNBC e para melhorar a sobrevivência de pacientes com este subgrupo de câncer de mama.

1.3. Reprogramação metabólica em câncer

A reprogramação metabólica tem sido sugerida como uma característica fundamental da progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; WARD; THOMPSON, 2012). As células tumorais sofrem uma alteração no metabolismo energético, a fim de satisfazer as necessidades bioenergéticas e biossintéticas de rápida proliferação celular, bem como de se adaptar ao microambiente tumoral. Para isso, elas alteram seu metabolismo energético para um modo glicolítico para geração rápida de energia, conhecido como efeito Warburg (WARD; THOMPSON, 2012). Assim, as células tumorais obtêm a maior parte de sua energia através do alto consumo de glicose e sua conversão em ácido láctico por glicólise, em oposição à fosforilação oxidativa mitocondrial nas células normais (Figura 02). A mudança para a glicólise é desencadeada por vários mecanismos revisados em outros lugares, como mecanismo de sobrevivência do tumor em microambiente hipóxico (CAIRNS et al., 2011; WARD; THOMPSON, 2012). Por exemplo, a sinalização do fator de crescimento ativa a fosfoinositol 3-cinase (PI3K) - AKT, que induz a expressão de transportadores de glicose (por exemplo, GLUT1) e a ativação de enzimas glicolíticas (como HK2, PFKFB3). A sinalização PI3K-AKT ativa o alvo da rapamicina (mTOR), que por sua vez ativa o fator de transcrição, fator 1 induzido por hipóxia (HIF1). O HIF1 coopera com outros fatores de transcrição ou oncogenes, como c-Myc, p53 e OCT1 para induzir a expressão de genes glicolíticos incluindo GLUT1, HK2, PFKFB3, LDHA e supressores do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) tais como PDK (CAIRNS et al., 2011; WARD; THOMPSON, 2012). Além disso, mutações nas enzimas do ciclo TCA, como succinato desidrogenase (SDH) ou fumarato hidratase (FH), também contribuem para a inibição dessa via, promovendo a glicólise através da

ativação do HIF1. Coletivamente, esses eventos culminam na reprogramação metabólica das células tumorais para um modo predominantemente glicolítico do metabolismo energético (BISWAS, 2015) (Figura 02).

Figura 02 – Visão geral das vias metabólicas celulares em uma célula tumoral. Este diagrama descreve algumas importantes vias metabólicas celulares e seus componentes. As setas em negrito indicam a glicólise e a via do ciclo do TCA. FA, ácido graxo; FAS, síntese do ácido graxo; PDH, piruvato desidrogenase. A inserção (painel inferior direito) mostra uma visão geral das principais vias metabólicas e suas moléculas associadas nas células cancerígenas. As fontes azul, preto e cinza indicam componentes metabólicos regulados, mantidos e inibidos, respectivamente. SDH, FH e p53 se referem às suas versões mutadas. Linhas cinzas representam um caminho desregulado.

Fonte: BISWAS, 2015.

As células tumorais requerem altas concentrações de glutamina, necessárias para a proliferação celular. Por isso, por meio do processo de glutaminólise, a glutamina é convertida em glutamato pela glutaminase (GLS) e

depois em α -cetoglutarato (α -KG), que entra no ciclo do TCA para contribuir com a biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (Figura 01). Sendo assim, o c-Myc desempenha um papel importante na promoção da glutaminólise nessas células (GAO et al., 2009, WISE et al., 2008). Além disso, a glutamina também pode ser convertida em glutatona e, assim, contribuir para o estado redox. Células tumorais sofrem alterações no metabolismo lipídico adquirindo um fenótipo lipogênico. A enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) é altamente expressa em células tumorais, onde regula uma rede lipídica pró-tumorigênica que suporta o crescimento tumoral (NORUMA et al., 2010; BISWAS, 2015).

O papel do microambiente tumoral na alteração do metabolismo das células tumorais pode ser explicado pelo seguinte exemplo clássico. À medida que os tumores proliferam rapidamente, eles superam o suprimento de oxigênio, levando a um ambiente hipóxico. Isso, por sua vez, leva à estabilização do HIF-1 α , que inicia a transcrição de várias enzimas envolvidas na glicólise, ao mesmo tempo em que diminui a expressão das enzimas envolvidas no ciclo TCA. A mudança da respiração aeróbica para a glicólise aliviaria em parte o estresse hipóxico. No entanto, este exemplo explica apenas uma parte do quadro geral, pois outros mecanismos moleculares desempenham um papel importante na determinação da religação metabólica (PAPANDREOU et al., 2006; KAMARAJUGADA et al., 2012; GANDHI e DAS, 2019). A hipóxia, acidose e matriz extracelular geram aspectos do fenótipo metastático e invasivo das células cancerígenas.

1.3.1. Reprogramação metabólica em câncer de mama

A alteração do metabolismo é uma característica do câncer de mama. As opções de tratamento atuais para os tumores de mama dependem da ampla classificação do câncer de mama em (i) receptor de estrogênio α -ER α) positivo, receptor de progesterona (PR) positivo; (ii) receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) enriquecido e (iii) câncer de mama triplo negativo (TNBC) que não expressa nenhum desses três receptores (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003; AZIM et al., 2019). Cerca de 70% dos casos de câncer de mama se apresentam como ER α + e são tratados com terapia hormonal (HAMMOND et al., 2010). Os tumores de mama HER2-positivo

ocorrem em 25 a 30% dos casos e são frequentemente tratados com Trastuzumabe. Não existe terapia direcionada para o TNBC que constitui 15 a 20% dos casos de câncer de mama e, portanto, a quimioterapia citostática convencional permanece a única opção terapêutica. A falha do tratamento em todos esses tipos de câncer de mama ocorre como consequência da resistência inerente ou adquirida. Uma das maneiras pelas quais as células se tornam resistentes à terapia é reconectando seu metabolismo; portanto, essas alterações metabólicas podem ser potencialmente exploradas para intervenção terapêutica (GANDHI e DAS, 2019).

Vários fatores contribuem para impulsionar a reprogramação metabólica nas células cancerígenas. Estes podem ser amplamente classificados em sinais intrínsecos e extrínsecos às células. Os sinais intrínsecos incluem oncogenes e genes supressores de tumores que regulam as vias metabólicas em vários níveis em diferentes compartimentos celulares. Existem vários reguladores do metabolismo do câncer de mama, como fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI3K), MYC, ER, gene 1 de suscetibilidade ao câncer de mama (BRCA1) e p53. Além disso, há interação funcional entre MYC, ER α , BRCA e p53. Entretanto, os sinais extrínsecos às células compreendem a disponibilidade de nutrientes, hipóxia, acidose e a interação do tumor com componentes de seu microambiente (TME), incluindo vasos sanguíneos, células imunes, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea, linfócitos e matriz extracelular. Esses fatores geram uma pressão nas células tumorais, onde apenas as células que sofrem uma transformação metabólica favorável sobrevivem (GANDHI e DAS, 2019).

O subtipo triplo negativo/tipo basal do câncer de mama possui um fenótipo inerentemente agressivo, o TNBC geralmente apresenta um pior prognóstico em comparação com os outros subtipos. O TNBC tem um fenótipo glicolítico maior quando comparado ao câncer de mama luminal com base em sua alta taxa de acidificação extra celular (PELICANO et al., 2014). Outros estudos relataram aumento da glicólise no TNBC via sinalização de EGF e que o c-MYC impulsiona o metabolismo da glicose, suprimindo a proteína que interage com a tioredoxina (TXNIP) - um inibidor da glicólise (EDWARDS et al., 2017).

Uma característica das células tumorais com maior potencial metastático, como por exemplo, as TNBC, é a plasticidade metabólica. Isso significa que as células cancerígenas metastáticas não utilizam uma única via metabólica, como glicólise ou fosforilação oxidativa (OXPHOS), para atender às suas necessidades metabólicas. Essas células geralmente executam várias vias metabólicas em paralelo, regulando a utilização das várias vias com base em suas necessidades de adaptação, conforme regidas por sinais extrínsecos e intrínsecos às células. Um estudo que investigou diferenças na via metabólica entre células tumorais primárias, circulantes e metastáticas em um fundo isogênico de tumores mamários relatou a importância do aumento da biogênese mitocondrial e da OXPHOS para que as células tumorais metastatizem. LeBleu e colaboradores descobriram que vários processos envolvidos na cascata metastática, como invasão e migração, favoreceram a respiração mitocondrial e a geração de ATP em comparação às vias anabólicas (LEBLEU et al., 2014)

Ilustrando a plasticidade metabólica das células TNBC, dois estudos recentes destacam a importância da OXPHOS no TNBC através de uma maior suscetibilidade aos inibidores da oxidação de ácidos graxos. Em um estudo, os autores mostraram que os tumores que expressam altos níveis de MYC eram suscetíveis à oxidação de ácidos graxos, enquanto em outro estudo os autores mostraram que o TNBC exibia níveis elevados de oxidação de ácidos graxos (CAMARDA et al., 2016; PARK et al., 2016). O perfil metabólico de diferentes subtipos de TNBC revelou suscetibilidade diferencial a moduladores metabólicos (LANNING et al., 2017). Em termos de metabolitos, o TNBC mostrou uma diminuição na glutamina e um aumento nos níveis de colina e glutamato em comparação com o câncer de mama triplo positivo (TPBC). Outro estudo em tumores de mulheres afro-americanas relatou um aumento semelhante na glutaminólise no TNBC em comparação aos tumores ER +. Eles também relataram um aumento no succinato, fumarato e isoleucina, indicando aumento potencial na atividade do TCA no TNBC em comparação com os tumores ER + (KANAAAN et al., 2014). Esses estudos, destacando a plasticidade metabólica no TNBC, também sugerem múltiplos alvos terapêuticos adjuvantes potenciais.

1.4. Fosfolipídeos antitumorais

As membranas biológicas são compostas por três componentes fundamentais: os fosfolipídios (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolipídios de membrana são estruturas formadas por cadeias hidrofóbicas no interior da bicamada lipídica e com cabeça polar situada no espaço citoplásmico aquoso (Figura 03).

Figura 03 – Estrutura de um fosfolipídeo de membrana. As caudas apolares (cadeias carbônicas) ligam-se a dois átomos de carbono do glicerol, enquanto que o terceiro carbono do glicerol liga-se a um grupo fosfato e à colina, formando a porção hidrofílica da molécula. Note a presença de uma dupla ligação em uma das caudas carbônicas, ocasionando um dobramento da molécula. **Fonte: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. - Molecular Biology of the Cell. 5th Edition, New York, Garland, 2008.**

Os FLs de membrana podem formar ligações não-covalentes com proteínas periféricas de membrana, muitas vezes por atrações eletrostáticas, estabelecendo o modelo conhecido de mosaico fluído. Os FLs exercem várias funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma grande variedade de processos catalíticos e atuando como doadores

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

Os alquilfosfolipídeos sintéticos (APLs) são novos fármacos antineoplásicos com propriedades antiproliferativas, quimicamente divididos em duas classes principais: alquil-lisofosfolipídeos e alquilfosfocolinas. O grupo de lipídeos antitumorais também inclui os lipídeos éter antitumorais glicosilados e os fosfolipídios glicosilados. Propõe-se que esses agentes interfiram na homeostase lipídica devido à sua semelhança com os fosfolipídios endógenos, visando os *lipid rafts* da membrana e alterando a sinalização ligada aos lipídeos, levando a apoptose (VAN BLITTERSWJIK, VERHEIJ, 2008; VAN BLITTERSWJIK, VERHEIJ, 2013). Os *lipid rafts* são microdomínios da membrana enriquecidos em esteróis e esfingolipídeos, que desempenham um papel importante para o correto funcionamento de várias vias de sinalização de sobrevivência celular, assim como de transportadores e canais iônicos (MOLLINEDO; GAJATE, 2015).

A edelfosina é um alquilfosfolipídeo (APL) com propriedades imunomoduladoras e atividade inibitória na proliferação de células tumorais. No entanto, sua aplicação clínica tem sido limitada, pois principalmente à sua instabilidade metabólica, falta de sensibilidade, alto potencial hemolítico e toxicidade gastrointestinal. Assim, o tratamento intravenoso e oral com edelfosina tem sido usado apenas em pacientes com leucemia aguda (PACHIONI et al., 2013; RÍOS-MARCO et al., 2017).

Miltefosina, um APL análogo sem o glicerol, foi o primeiro lipídeo antitumoral a ser usado clinicamente, em particular para o tratamento local de metástases cutâneas do câncer de mama (CRUL et al., 2002). Durante o desenvolvimento da droga miltefosina, vários estudos surgiram para descrever os mecanismos gerais de captação e ação celular do APL. No entanto, este composto mostrou ser altamente hemolítico quando administrado por via parenteral, e sua aplicação oral foi associada à toxicidade gastrointestinal. Esses efeitos colaterais graves limitaram sua dose diária máxima tolerada, impedindo a observação de efeitos antiproliferativos *in vivo* e seu uso como agente sistêmico. De fato, estudos clínicos para avaliar a atividade antitumoral da miltefosina foram interrompidos no estudo de fase II, uma vez que as doses

orais necessárias para os efeitos sistêmicos eram tóxicas para o trato gastrointestinal. Consequentemente, o uso clínico da miltefosina foi limitado principalmente ao tratamento tópico de metástase cutânea no câncer de mama. Entretanto, os análogos promissores, relacionados com a miltefosina, foram desenvolvidos com melhor atividade e perfis toxicológicos, que provaram ser eficazes como alternativas menos tóxicas (RÍOS-MARCO et al., 2017).

No início dos anos 90, Detmar e colaboradores (DETMAR et al., 1994) mostraram que a miltefosina é um agente antiproliferativo de queratinócitos malignos, sugerindo que essa ação está relacionada à inibição dose-dependente de miltefosina na biossíntese de fosfatidilcolina (PC) mediada pela inativação da enzima CTP: fosfocolina citidililtransferase (CT), causada pela translocação da enzima das membranas para o citosol, onde a enzima é inativa. Portanto, a miltefosina foi proposta como uma droga útil para doenças hiperproliferativas da pele. Posteriormente, esse composto foi proposto isoladamente ou em conjunto com outras terapias para as metástases cutâneas do câncer de mama (EUE, 2001).

1.5. Fosfoetanolamina sintética (2-AEH₂F)

Nosso grupo de pesquisa tem estudo a fosfoetanolamina sintética (2-AEH₂F) como um centro precursor na biossíntese de fosfolipídios, capaz de reduzir significativamente a expressão de moléculas pró-apoptóticas Bad/Bax em células tumorais de melanoma B16F10, o que leva ao aumento da atividade da caspase-3, desencadeando a apoptose e bloqueando o ciclo celular na fase de síntese ou na fase G2/M, dependendo da concentração do fármaco. O tratamento de camundongos portadores de melanoma B16F10 com a 2-AEH₂F resultou na inibição de crescimento tumoral, aumento da sobrevivência e redução de metástases (FERREIRA et al., 2012). Entretanto, quando testada em fibroblastos e células endoteliais humanas normais, a 2-AEH₂F não foi capaz de alterar a viabilidade das células normais (FERREIRA et al., 2011). 2-AEH₂F também resultou na inibição de ascite neoplásica e evitou aumento do nível sérico de marcadores bioquímicos, pois a análise bioquímica dos camundongos BALB/c não tratados revelaram aumento na dosagem de transaminases hepáticas. Pode-se sugerir que a inibição da ascite neoplásica pela 2-AEH₂F impede insuficiência hepática (FERREIRA et al., 2012).

2-AEH₂F é citotóxico para células tumorais de mama MCF-7, diminuindo a viabilidade celular, acompanhada por alterações morfológicas e descolamento as células a partir da cultura de monocamada. Além disso, células não tratadas mostraram distribuição intracelular, peri-nuclear normal da mitocôndria, enquanto que em células MCF-7 tratadas com 2-AEH₂F, apresentaram profundas mudanças na morfologia mitocondrial e as mitocôndrias foram agregadas no citoplasma (FERREIRA et al., 2013).

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

1.6. Energética mitocondrial

As mitocôndrias são a força motriz das células onde a maior parte da energia metabólica é gerada para uso celular por várias vias metabólicas, incluindo ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa (OXPHOS), oxidação de ácidos graxos, cetogênese, vias relacionadas ao ciclo da ureia, heme síntese ou gliconeogênese. As funções e o conteúdo do DNA mitocondrial (mtDNA) variam de acordo com um grande número de fatores e alterações fisiopatológicas. As mitocôndrias executam a OXPHOS, que gera energia, para a formação de ATP, pelos complexos da cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna. Os complexos I, II, III e IV constituem o transporte de elétrons, do qual o complexo V é a ATP síntese (ROTIG, 2014; JIAPEI, MADHAY, XIANGDONG, 2017).

Os átomos de hidrogênio produzidos a partir de diferentes vias catabólicas se ligam ao dinucleotídeo de flavina adenina e ao dinucleotídeo de

nicotinamida adenina (NAD⁺) para produzir FADH₂ e NADH, respectivamente. O NADH é oxidado pela NADH desidrogenase (complexo I), enquanto os elétrons são transferidos através de múltiplos centros de ferro-enzofre (Fe-S) e mononucleotídeos de flavina no complexo I até serem transferidos para a coenzima Q10 (CoQ10). CoQ10 recebe átomos de hidrogênio de FADH₂ produzido por oxidação β e a enzima do ácido tricarboxílico succinato desidrogenase (complexo II). Os elétrons são subsequentemente transportados do CoQ10 para o complexo bc1 (complexo III), dentro do qual os elétrons se movem através dos componentes Fe-S, citocromo b e citocromo c1. Os são transferidos para o citocromo c oxidase (complexo IV) então transportados do complexo III para o citocromo c (THORBURN, 2004; JIAPEI, MADHAY, XIANGDONG, 2017).

A energia dos elétrons é liberada durante a sua transferência e bombeia prótons de dentro da matriz mitocondrial através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar por meio dos complexos I, III e IV. O gradiente eletroquímico resultante impele os prótons a voltarem através de um canal de prótons na ATP sintase (complexo V), que usa essa energia na composição do ATP (THORBURN, 2004; JIAPEI, MADHAY, XIANGDONG, 2017).

A disfunção mitocondrial leva ao desequilíbrio da gordura e à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos hepatócitos. As ROS induzem lesão de hepatócitos relacionada à doença hepática gordurosa não alcoólica. O estresse oxidativo pode quebrar a homeostase no nível celular, como morte celular por apoptose, degeneração e necrose celular, peroxidação lipídica da membrana, superprodução de citocinas pró-inflamatórias, ativação das células estreladas hepáticas ou fibrogênese. Diferentes tipos de danos ao mtDNA podem causar mutações e deleções pontuais, aumentar o nível de 8-hidroxi-desoxiguanosina e o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (WU et al., 2016; LIU et al., 2017).

A expressão de enzimas no metabolismo lipídico é regulada negativamente, incluindo os genes CPT1 e acil-CoA sintetase na translocação de ácidos graxos de cadeia longa ou outras enzimas envolvidas na β -oxidação, levando ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa no plasma. A β -oxidação

defeituosa é provavelmente responsável pela depleção do dNTP e perda gradual do mtDNA do fígado (ZHOU et al., 2013).

1.7. Cloridrato de Meclizina

O Cloridrato de Meclizina é o primeiro da classe piperazina de anti-histamínico H1 que tem sido usado há décadas contra a náusea e vertigem. Como muitos anti-histamínicos H1, a Meclizina tem atividade anticolinérgica, além de ser mostrada como alvo do receptor androstano constitutivo (CAR) (GOHIL et al., 2013).

O receptor de androstano constitutivo do receptor nuclear é um membro da superfamília de receptores de hormônios esteroides e hormônios tireoidianos, sendo um fator de transcrição que está envolvido na regulação de genes xenobióticos e intermediários do metabolismo. O CAR tem sido reconhecido como um receptor nuclear sensível a xenobióticos que transcricionalmente regula a expressão de enzimas de desintoxicação e transportadores envolvidos no metabolismo e eliminação de substâncias endógenas e exógenas tais como bilirrubina, esteróides e xenobióticos (DI MASI et al., 2009). Recentemente, surgiu a prova do importante papel do CAR na regulação do metabolismo de lipídios, glicose e ácidos biliares (YAN et al., 2015). O CAR humano exibe propriedades únicas em comparação com outros receptores nucleares ou com seus ortólogos de roedores, incluindo alta atividade constitutiva, tanto direta como dependente de domínio de ligação do ligante (LBD) e ativação independente de LBD, e localização nuclear espontânea em linhagens de células tumorais (CARAZO et al., 2018).

A inibição da respiração pelo cloridrato de Meclizina foi relatada, e ao contrário dos inibidores respiratórios clássicos (antimicina e rotenona), a meclizina não inibe a respiração em mitocôndrias isoladas, mas sim em células intactas. Foi relatado anteriormente que este efeito é independente do seu comportamento anti-histaminérgico e atividade anticolinérgica. (GOHIL et al., 2010).

Para entender o mecanismo de ação do Cloridrato de Meclizina, estudo realizado por GOHIL e colaboradores, mostraram o perfil metabólico global do tratamento com a meclizina em células para detectar alterações nos metabólitos intracelulares do metabolismo intermediário. O perfil metabólico

revelou um acentuado aumento nos níveis intracelulares de fosfoetanolamina (PETN), que é um intermediário no CDP-etanolamina (Etn) da biossíntese da fosfatidiletanolamina (PE) da via de Kennedy. Os experimentos bioquímicos confirmaram a inibição direta da CTP: citidililtransferase fosfoetanolamina (PCYT2), uma enzima limitante da velocidade da CDPEtn da via de Kennedy (Figura 04). A inibição da PCYT2 resulta em a acumulação do seu substrato, PETN, que por sua vez inibe diretamente a respiração mitocondrial. Esse trabalho identificou um novo alvo molecular de meclizina e liga a CDP-Etn da via de Kennedy com a respiração mitocondrial (GOHIL, et al., 2013).

Figura 04 – Etapas da biossíntese da Fosfatidiletanolamina e Fosfoetanolamina. A fosforilação da quinase de etanolamina por etanolamina (EK) para produzir fosfoetanolamina (P-Etn) é seguido pelo CTP: fosfoetanolamina citidililtransferase (Pcyt2) produção mediada pela CDP-etanolamina. A reação final desta via é executada por CDP-etanolamina: 1,2-diacylglicerol etanolamina fosfotransferase (HPT) para produzir PE. As enzimas análogas de CDP-colina da via de Kennedy incluem, colina quinase (CK), CTP: colina citidililtransferase (Pt1, CCT) e CDP-colina: 1,2-diacylglicerol fosfotransferase de colina (CPT). No fígado fosfatidiletanolamina (PE) é transformado em fosfatidilcolina (PC) pela ação de fosfatidiletanolamina N-metiltransferase (TMEP). PE pode ser produzido na mitocôndria por descarboxilação de fosfatidilserina (PS) por PS descarboxilase (PSD). Mamíferos não

sintetizam PS de novo; PS é produzido através da troca da cabeça do grupo de PE (PS sintase-2, PSS2) ou PC (PS sintase-1, PSS1). Além disso, o PE pode ser feito por ácido gordo (FA) esterificação de liso-PE com o liso-PE aciltransferase (LPEAT). Fonte: PAVLOVIC, 2014.

1.8. Metil- β -ciclodextrina

As ciclodextrinas (CD) são oligômeros macrocíclicos da α -D-glicose, com um exterior hidrofílico e uma cavidade central lipofílica. O interior da cavidade da ciclodextrina pode abrigar uma droga pouco solúvel em água, enquanto o exterior hidrofílico aumenta a sua solubilidade. CDs são nomeadas de acordo com o número de unidades de glicose presentes na sua estrutura: α , β ou γ -CD se eles contêm seis, sete ou oito anéis de sacarose, respectivamente (RUDRANGI et al., 2015). As β -CD e seus derivados, metil- β -CD (MBCD) e 2-hidroxipropil- β -CD são utilizados principalmente em estudos sobre a manipulação do colesterol (Chol) em membranas. Metil- β -ciclodextrinas (MBCDs) são moléculas que são amplamente utilizadas para remover e para carregar Chol a partir de membranas artificiais e naturais.

Garofalo e colaboradores relataram que MBCD induz ruptura dos microdomínios *raft-like* em mitocôndrias isoladas de células de linfoblastos humanos CEM impedido a despolarização das mitocôndrias e a liberação do citocromo C após o tratamento com disialoganglioside (GD3) ou t-Bid, proteína pró-apoptótica (GAROFALO et al., 2005). Além disso, em outro estudo foi observado um efeito inibitório da MBCD na abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP) induzida por rBAX. MBCD diminuiu o teor do colesterol e gangliosídeo na mitocôndria do córtex do rim de rato. Uma resistência semelhante na abertura do mPTP induzida por BAX, foi observado nas mitocôndrias do córtex do rim de ratos com hipotireóide que foram caracterizadas por ter menor teor de colesterol e gangliosídeo. Em geral, estes dados sugerem que a composição lipídica dos microdomínios *lipid raft* da membrana mitocondrial podem desempenhar um papel importante na regulação de fases iniciais de apoptose. Portanto, há uma hipótese de que o rompimento de microdomínios *raft-like* mitocondriais por remoção do colesterol poderia afetar a estrutura mitocondrial e do metabolismo energético (MARTINEZ-ABUNDIS et al., 2007).

1.9. 2,4-Dinitrofenol

2,4-dinitrofenol (DNP) é um sólido amarelo cristalino que foi utilizado para a produção de munições na França durante a primeira guerra mundial. Diversos sintomas de envenenamento (como náuseas, suores, dores de cabeça) e uma redução de peso corporal foram observados nos operários. Assim, surgiu a ideia de usar o DNP como uma droga anti-obesidade. DNP é um desacoplador artificial da fosforilação oxidativa e que bloqueia a criação de fosfatos ricos em energia (ATP). Na década de 1930, foram observados efeitos colaterais graves em pacientes tratadas com DNP, a Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) revogou a aprovação para o DNP contendo drogas até os dias atuais. Na Alemanha, a distribuição do DNP como um produto farmacêutico ou produto dietético também foi proibido (ZACK et al., 2016).

O 2,4-dinitrofenol é um composto que, por meio de facilitação do fluxo prótons da matriz mitocondrial, é capaz de reduzir o potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$ M) e desacopla a fosforilação oxidativa da produção de ATP. Embora desacoplamento crônico e completo, o que provoca o colapso do $\Delta\Psi$ M e reduz os depósitos de energia e, por causa da grande gradiente de prótons que persiste por meio da membrana mitocondrial interna, não tem nenhuma efeito sobre os níveis de ATP. Com base na relação entre $\Delta\Psi$ M, à produção de ROS mitocondrial e a absorção de Ca^{2+} , por isso Korde e colaboradores acreditam na hipótese de que o desacoplamento pode ser neuroprotetor (KORDE, 2005).

2- OBJETIVO

Avaliar os efeitos mitocondriais dos compostos Cloridrato de Meclizina, 2,4-Dinitrofenol e Metil- β -ciclodextrina associados à fosfoetanolamina sintética em linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humana triplo negativo, MDA-MB-231.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliação da viabilidade celular das células tumorais após os tratamentos e suas associações para determinar os valores da IC50% e seus efeitos adrenérgicos ou agonistas;
- Determinação da formação dos produtos da peroxidação de lipídios polissaturados;
- Análise das fases do ciclo celular das células tumorais por citometria de fluxo;
- Avaliação da atividade apoptótica das células tumorais por Anexina V/PI;
- Avaliação da expressão dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular e do stress oxidativo por citometria de fluxo;
- Avaliação por microscopia confocal a laser as alterações morfológicas de toxicidade e da autofagia;
- Avaliação do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo;
- Realização dos ensaios de proliferação por CFSE-DA analisados por citometria de fluxo;
- Quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de mama humana: MDA-MB-231 originária da ATCC, tendo o respectivo código HTB-26TM, mantida e estocada no banco de células pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Laboratório de Desenvolvimento e Inovação - Divisão de desenvolvimento e inovação industrial, Instituto Butantan). Como controle foi utilizado a linhagem de fibroblasto normal (FN1). A linhagem FN1 faz parte do banco de células normais do laboratório obtidas pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria. Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura Leibovitz (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células dispostas em monocamada foram submetidas à dissociação enzimática com solução de tripsina 0,2% + EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 0,02%, para que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi feita utilizando o mesmo meio de cultura RPMI contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripan, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.2. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células tumorais MDA-MB-231 e as células normais FN1 foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 1x10⁵ células/mL durante 24 h e tratadas com os grupos descritos abaixo, em diversas concentrações. Após 24 h de tratamento o sobrenadante foi coletado em outra placa e adicionou-se 100 µL de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, as células foram incubadas no escuro por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescentou-se 100 µL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que

induz toxicidade em 50% das células (IC50) foi determinada no tratamento após 24 h em diferentes concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

Foram avaliados os seguintes grupos experimentais:

Tabela 1 – Grupos de tratamento.

Grupo I	Controle negativo – veículo/meio
Grupo II	Fosfoetanolamina sintética (2-AEH ₂ F)
Grupo III	Cloridrato de Meclizina (CM)
Grupo IV	2,4-Dinitrofenol (DNP)
Grupo V	Metil-β-Ciclodextrina (MβCD)
Grupo VI	Fosfoetanolamina sintética + Cloridrato de Meclizina
Grupo VII	Fosfoetanolamina sintética + 2,4-Dinitrofenol
Grupo VIII	Fosfoetanolamina sintética + Metil-β-Ciclodextrina

3.3. Determinação da produção de lipídeos peroxidados polissaturados

A quantificação da peroxidação de lipídeos é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica que é medida espectrofotometricamente. Os sobrenadantes das culturas celulares tumorais e normais utilizadas para a metodologia do MTT foram recolhidos antes do teste de citotoxicidade MTT e mantidos sob-refrigeração de -20°C. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em microtubo foi adicionado 50 µL da amostra e adicionados com 250 µL de ácido tricloroacético - TCA 20% (Sigma-Aldrich) em outro microtubo, 50 µL da mesma amostra foi adicionada com 250 µL de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86% (Sigma-Aldrich, Cat.: T550-0). Os microtubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 20 min, seguido de resfriamento a 0°C por 20 min, centrifugação a 8000 rpm por 4 min e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

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

As células tumorais e normais foram submetidas aos tratamentos com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, por período de 24 h. As células tratadas e do grupo controle foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400 rpm por 10 min. Em seguida, o “pellet” foi ressuspense em solução de álcool 70° e álcool RNase e armazenado no freezer -20°C por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e ressuspensas em 200 µL de tampão Fac’s, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACScanto II (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.5. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI

A finalidade desta análise é determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V (Kit Insitu Cell Death Detection, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolipídio com atividade anticoagulante vascular que é encontrada pela maior parte na face citosólica das membranas celulares. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolipídios negativamente carregados. Após confluência na placa de 6 orifícios as células foram tratadas com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII por período de 24 h e foram lavadas 2 vezes em PBS, resuspensas em 100 µL de PBS e incubadas por 30 min com 1 µg de anexina V-FITC diluído em tampão e 18 µg/mL de solução de iodeto de propídio. A leitura da quantidade da expressão de Anexina V (apoptose) e do PI (necrose) foi realizada em citômetro de fluxo – FACScanto II (BD) em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

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

Alíquotas de 100 µL das suspensões de células tumorais (10^6 células/mL) dos grupos tratados com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e os grupos controles foram incubadas por 1 h a 4°C, com 1 µg de anticorpo específico caspase 3 ativa (Santa Cruz, Biotechnology) conjugado com ficoeritrina-PE, anticorpo específico caspase 9 ativa (Santa Cruz, Biotechnology) e anticorpo específico caspase 8 ativa (Santa Cruz, Biotechnology) conjugado com ficoeritrina-PE na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH. Foram utilizados diversos marcadores envolvidos na morte celular, reguladores da progressão do ciclo celular, adesão e stress oxidativo, (conforme tabela abaixo). Após este período as células foram centrifugadas a 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 200 µL de Tampão Fac’s contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores celulares das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto II (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

Tabela 2 – Marcadores utilizados.

Marcadores	Função	Fabricante
Caspase 3 ativa	Via intrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Caspase 8 ativa	Via extrínseca da apoptose	(Santa Cruz, Biotechnology)
Citocromo-C	Indutor de apoptose	Abcam ®
Bax	Promotor da apoptose	Abcam ®
Bad	Promove a morte celular	Abcam ®
Bcl-2	Inibidor da apoptose	Abcam ®
Ciclina D1	Progressão do ciclo celular	Abcam ®
Caveolina 1	Detecta níveis da proteína caveolina 1	Cell signaling technology ®
CD36	Transportador de ácidos graxos, envolvido com o receptor lipid rafts	Abcam ®
PCNA	Proliferação celular	(Santa Cruz, Biotechnonology)

3.7. Marcação de filamentos de actina por faloidina

A faloidina é uma micotoxina pertencente à família das falotoxinas, caracterizadas por possuírem uma elevada afinidade para a actina F dos microfilamentos do citoesqueleto. As linhagens celulares mantidas em cultura tratadas com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII foram fixadas em solução de 4 % paraformaldeído (PFA) em tampão citrato de sódio (pH 6.1), por 15 minutos. Após a fixação a placa foi lavada com PBS e permeabilizada com 0,5 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 15 min. Para bloquear os locais de reações inespecíficas será realizada a incubação com solução de diluição RNase (Abcam, EUA) por 30 min. Em seguida, incubadas com 29,9 U/mL de faloidina (Alexa flúor - 488, Abcam, EUA) em solução de diluição por 1 h no escuro. Após lavagem com PBS contendo 0,1 % Triton X-100. Logo após, as células passaram por uma lavagem com PBS e montagem com Vectashield (Vector Laboratories Berlingame, CA, EUA) entre lâmina e lamínula. A observação será realizada no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview TM 300), considerando-se o arranjo do citoesqueleto e a morfologia nuclear.

3.8. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo MitoRed

As alíquotas das culturas tumorais de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura Leibovitz a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos tratados com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII passaram por um processo de remoção do meio de cultura e foram lavadas com PBS 1X. Em seguidas foram marcadas com 100 uL de MitoRed a 20 nM por 1 hora a 37° no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS 1X. . As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview TM 300) e as imagens foto documentadas e analisadas.

3.9. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo rodamina-123

As alíquotas das culturas tumorais de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura DMEM a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos tratados com os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII passaram por um processo de remoção do meio de cultura e foram lavadas com próprio meio de cultura Leibovitz. Em seguida, foi acrescentado 10 µL de rodamina-123 (Molecular Probes, USA), durante 15 min no escuro a 37°C. Após a incubação, o excesso de rodamina-123 foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview™ 300) e as imagens foto documentadas e analisadas.

3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

3.10.1. Rodamina-123

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorescendo em verde. Alterações ao nível da integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON, 1980). As amostras das células tumorais dos grupos tratados os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII foram centrifugados a 1800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 5 µL de Rh-123 (5 mg/mL-1 diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 100 µL de tampão Fac's Flow. A leitura e análise da marcação da Rh-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto II (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.10.2. Sonda JC-1

O iodeto de 5,5', 6,6' tetracoloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um tipo especial de carbocianina, capaz de identificar a diferença de potencial mitocondrial. Essa sonda fluorescente é metacromática: mitocôndrias com baixo potencial da membrana mitocondrial emitem fluorescência verde devido à formação de monômeros de carbocianinas, enquanto em alto potencial, esses monômeros se agregam, formando multímeros, também chamados de J-agregados, que emitem fluorescência vermelha. As amostras das células tumorais dos grupos tratados os grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII foram centrifugados a 1800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 10 µL de JC-1 (5 mg/mL-1 diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão em 100 µL de tampão Fac's Flow. A leitura e análise da marcação do JC-1 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto II (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.11. Ensaio de proliferação celular por CFSE-DA

Para caracterizar a atividade proliferativa da célula tumoral de mama MDA-MB-231, tratadas e não tratadas com os grupos I, II, III, V, VI, VIII foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE – Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester) nos períodos de 24 e 48 h. O CFSE-DA (Molecular Probes – EUA), diluído em PBS 0,1% albumina humana em diferentes concentrações, foi adicionado ao meio com as células dos grupos tratados e controles para a marcação. O tempo de marcação foi de 15 min a 37° C. Durante a marcação foram adicionados cinco vezes o volume de meio DMEM 10% de SFB e incubados por 5 min em gelo e no escuro. As células foram lavadas três vezes com 20 mL de DMEM 10% de SFB e ressuspensas em 1 mL de DMEM 10% de SFB para a contagem. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE-DA no dia da marcação (dia zero) em citômetro de fluxo e analisado pelo programa FlowJo. O programa FlowJo forneceu os índices utilizados para avaliação da proliferação espontânea das células marcadas com CFSE, sendo

porcentagem de células divididas e índice de divisão celular os índices utilizados neste estudo. A porcentagem de células divididas é a porcentagem de células da amostra original que dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura. O índice de divisão celular é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram.

3.12. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo

A liberação das espécies reativas de oxigênio (ROS) em cultura de células foi quantificada utilizando uma sonda fluorescente sensível à oxidação (H₂DCF-DA, Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Germany). Os resultados foram obtidos por meio da atividade intracelular na formação do 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), um composto não fluorescente o qual emite fluorescência quando é oxidado para 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA). As células foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo 50 000 células por poço, cultivadas em estufa de CO₂ por 48 h. Após este período, as células dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII foram mantidas em cultivo por 24 h. Em seguida, foi acrescentado 2 uL de DCFH em cada poço e as células incubadas por 30 min. Após, foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas e ressuspensas em 1,5 ml de PBS gelado e centrifugadas em tubos de ensaio a 600 rpm por 5 minutos. O pellet foi lavado e centrifugado duas vezes com PBS gelado. As células foram ressuspensas em 250 µL de PBS. Imediatamente após a ressuspensão, a fluorescência do DCF-DA foi determinada por citometria de fluxo FACScanto II (BD) com excitação do comprimento de onda de 495 nm e emissão do comprimento de onda de 530 nm (FL-1).

3.13. Análise SynergyFinder 2.0 de combinações de múltiplos compostos

Para determinar a sinergia potencial da droga, um estudo de matriz foi realizado com os compostos 2-AEH₂F, CM, MBCD e DNP. A matriz de combinação foi testada em duas linhagens celulares: câncer de mama triplo negativo MDA MB-231 e fibroblasto normal FN1. O software SynergyFinder 2.0

quantificou o grau de sinergia como o excesso sobre o efeito multiplicativo de medicamentos únicos como se agissem de forma independente (Bliss), as seguintes formulações de ordem superior foram usadas para quantificar a sinergia de combinação de drogas (S) para o efeito de combinação de múltiplas drogas medido entre 2 drogas:

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

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

$$\frac{x_1}{f_1^{-1}(y_{LOEWE})} + \frac{x_2}{f_2^{-1}(y_{LOEWE})} = 1$$

Os escores de sinergia sumária podem ser interpretados como a resposta média em excesso devido às interações medicamentosas (ou seja, o escore de sinergia de 15 corresponde a 15% de resposta além da expectativa). Não há nenhuma posição específica para definir uma boa pontuação de sinergia. No entanto, com base em nossa experiência, a sinergia fica perto de 0 dá confiança limitada sobre sinergia ou antagonismo. Então, quando a sinergia marcar:

- Menos de -10: a interação entre duas drogas é provável que seja antagônica;
- De -10 a 10: a interação entre duas drogas é provável que seja aditiva;
- Maior que 10: a interação entre duas drogas é provável que seja sinérgica.

Os mapas de sinergia 2D e 3D destacam regiões de dose sinérgica e antagônica nas cores vermelho e verde, respectivamente.

3.14. Análises estatísticas

Todos os valores obtidos das linhagens celular (MDA-MB-231 e FN1) foram expressos em média $\pm$ desvio médio e após a obtenção dos valores individuais das células tratadas e controle, os resultados foram tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 5.0 e InStatPad Prism Version 5.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER considerando como nível crítico para significância valores de $p < 0.05$.

4- RESULTADOS

4.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

4.1.1. Células de câncer de mama triplo negativo – MDA-MB-231

As células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 foram incubadas com a 2-AEH₂F nas concentrações de 10 a 100 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células tumorais foram observadas no microscópio de luz invertido e foram analisadas mudanças morfológicas com o aspecto de lise e a formação de debri celular no sobrenadante, a partir da concentração de 10 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 20,44 mM (Figura 05).

Figura 05 – Avaliação da Toxicidade do composto Pho-s (2-AEH₂F) em células de mama humana MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com a 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As demais concentrações de tratamento com a 2-AEH₂F mostraram efeitos citotóxicos significativos, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática, perda da progressão e projeção dos prolongamentos citoplasmáticos e foram visualizados formação de vacúolos no citoplasma celular nas concentrações de 10 e 20 mM (Figura 06).

Figura 06 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos das modificações celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Pho-s (2-AEH₂F), após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos em vermelho destacam os vacúolos intracitoplasmáticos, nota-se que a partir da concentração de 20 mM há uma redução expressiva na densidade celular.

A presença de vacúolos intracitoplasmáticos presentes significativamente nas células tumorais MDA-MB-231 tratadas com as concentrações de 10 e 20 mM, foram contadas e comparadas entre os demais grupos de tratamento (Figura 07). A contagem foi realizada em 5 campos obtidos nas fotomicrografias e calculada a porcentagem média/célula positiva dos vacúolos entre os grupos de tratamento.

Figura 07- Análise quantitativa do número de vacúolos presentes em células tumorais de mama MDA-MB-231. Gráfico de barras das médias e $\pm$ dp do número de vacúolos/células. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratado ($***p < 0.001$) e entre as diferentes concentrações de Pho-s (2-AEH₂F) ($###p < 0.001$), obtidos pelo teste de Variância de Anova, seguido pelo pós-teste de Tukey-Kremer. Destacam-se no conto superior as estruturas vacuolizadas presentes no citoplasma das células tumorais tratadas com 10 e 20 mM de 2-AEH₂F. As setas em vermelho indicam as formas de vacúolos presentes, após o tratamento.

O tratamento com o composto Cloridrato de Meclizina nas células de câncer de mama humano triplo negativo – MDA-MB-231 mostrou precipitado do composto na maior concentração e aspectos morfológicos de lise e formação de debris celular, a partir da concentração de 0,390 mM, bem como redução significativa da densidade celular. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 6,0 mM (Figura 08).

Figura 08 – Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina em células de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com o Cloridrato de Meclizina em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As demais concentrações de tratamento com o Cloridrato de Meclizina mostraram efeitos citotóxicos, como o aumento percentual da mortalidade celular, fragmentação da membrana citoplasmática, perda da progressão e projeção dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de precipitado do composto na maior concentração de 50 mM (Figura 09).

Figura 09 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos das modificações celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações do Cloridrato de Meclizina, após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos em vermelho destacam o precipitado do composto, nota-se há uma redução expressiva na densidade celular nas maiores concentrações.

O tratamento com o composto Metil- β -ciclodextrina – M β CD, após 24 horas, nas células de câncer de mama humano triplo negativo – MDA-MB-231 resultou em aspectos morfológicos de lise, perda dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de debri celular, a partir da concentração de 0,781 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 1,5 mM (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da Toxicidade do composto MβCD em células de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com a MβCD em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As concentrações de tratamento com a M β CD mostraram efeitos citotóxicos, como o aumento percentual da mortalidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos e debris celular a partir da concentração de 0,781 mM (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da M β CD após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam a perda dos prolongamentos citoplasmáticos, nota-se que há uma redução expressiva na densidade celular nas maiores concentrações.

O tratamento com o composto 2,4-Dinitrofenol, após 24 horas, nas células de câncer de mama humano triplo negativo – MDA-MB-231, resultou em perda dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição da densidade celular, a partir da concentração de 6,25 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 25 mM (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol em células de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As concentrações de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol mostraram efeitos citotóxicos, como o aumento percentual da mortalidade celular, diminuindo a densidade celular e perda dos prolongamentos citoplasmáticos a partir da concentração de 6,25 mM (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações do 2,4-Dinitrofenol após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam a perda dos prolongamentos citoplasmáticos, nota-se que há uma redução na densidade celular nas maiores concentrações.

Após os tratamentos com os compostos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a MBCD e o 2,4-Dinitrofenol e obtidas às respectivas IC50%, as células de câncer de mama humano triplo negativo – MDA-MB-231 foram tratadas com o Cloridrato de Meclizina associado a 2-AEH₂F, com a MBCD associada a 2-AEH₂F e o 2,4-Dinitrofenol associado a 2-AEH₂F. As células foram tratadas com a Meclizina/MβCD/2,4-Dinitrofenol a partir da concentração de 50 mM e após 2 horas de tratamento foi adicionada a 2-AEH₂F na concentração de 10 mM por 24 horas.

Com o tratamento da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, as células MDA-MB-231 mostraram precipitado do composto nas maiores concentrações, aspectos morfológicos de lise, perda dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de debri celular, a partir da concentração de 0,390 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 0,6 mM (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina + Pho-s (2-AEH₂F) em células de câncer de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC₅₀%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As concentrações de tratamento com o Cloridrato de Meclizina foram fotomicrografadas com 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F, na maior concentração pode-se observar a formação de precipitado do composto e alterações na morfologia celular nas concentrações 12,5 e 3,125 mM (Figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações do Cloridrato de Meclizina após 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F. As fotos foram obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam o precipitado do composto na maior concentração.

As concentrações de tratamento com o Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F mostraram efeitos citotóxicos significativos, como o aumento percentual da mortalidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos, debris celular a partir da concentração de 0,390 mM do cloridrato de Meclizina + 10 mM de 2-AEH₂F. Observa-se precipitado do composto nas maiores concentrações do composto (Figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da Meclizina + (Pho-s) 2-AEH₂F após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam o precipitado do composto, nota-se que há uma redução expressiva na densidade celular em todas as concentrações.

Com o tratamento M β CD + 2-AEH₂F, as células MDA-MB-231 mostraram aspectos morfológicos de lise, perda dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de debri celular, a partir da concentração de 0,390 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 2,5 mM (Figura 17).

Figura 17 - Avaliação da Toxicidade do composto MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) em células de câncer de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com a MBCD + 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC₅₀%.

Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As concentrações de tratamento com a M β CD foram fotomicrografadas com 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F, na maior concentração pode-se observar que as células sofreram mudanças na sua morfologia, perdendo seus prolongamentos citoplasmáticos (Figura 18).

Figura 18 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da M β CD após 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F. As fotos foram obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam as células com perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos.

As concentrações de tratamento com a M β CD + 2-AEH₂F mostraram efeitos citotóxicos significativos, como o aumento percentual da mortalidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos, debris celular a partir da concentração de 0,781 mM (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da MBCD + Pho-s (2-AEH₂F) após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam a perda dos prolongamentos citoplasmáticos.

Com o tratamento 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F, as células MDA-MB-231 mostraram perda dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição da densidade celular, a partir da concentração de 6,12 mM. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 27 mM (Figura 20).

Figura 20 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F em células de câncer de mama humano MDA-MB-231. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + Pho-s (2-AEH₂F) em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC₅₀%.

Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As concentrações de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol foram fotomicrografadas com 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F, na maior concentração pode-se observar que as células sofreram mudanças na sua morfologia, perdendo seus prolongamentos citoplasmáticos (Figura 21).

Figura 21 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações do 2,4-Dinitrofenol após 2 horas de tratamento, antes de ser adicionado a 2-AEH₂F. As fotos foram obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam as células com perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos.

As concentrações de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F mostraram efeitos citotóxicos significativos, como o aumento percentual da mortalidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos, debris celular a partir da concentração de 6,12 mM (Figura 22).

Figura 22 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações do 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Os círculos indicam a perda dos prolongamentos citoplasmáticos.

4.1.2. Células de fibroblastos humanos normais – FN1

As células de fibroblastos humanos normais FN1 foram incubadas com a 2-AEH₂F nas concentrações de 10 a 100 mM no tempo de 24 horas de tratamento como grupo controle em comparação as células tumorais. As células normais FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e das comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 81,8 mM (Figura 23).

Figura 23 – Avaliação da Toxicidade do composto 2-AEH₂F (Pho-s) em células de fibroblastos humanos normais FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos humanos normais, após 24 horas de tratamento com a 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As células normais FN1 foram incubadas com o Cloridrato de Meclizina nas concentrações de 50 a 0,097 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células normais FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 27 mM (Figura 24).

Figura 24 – Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de meclizina em células de fibroblastos humanos normais FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com o cloridrato de meclizina em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As células normais FN1 foram incubadas com a M β CD concentrações de 50 a 0,097 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células normais FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas programa no GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 80 mM (Figura 25).

Figura 25 – Avaliação da Toxicidade do composto MβCD em células de fibroblastos humanos normais FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com a MβCD em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As células normais FN1 foram incubadas com o 2,4-Dinitrofenol concentrações de 50 a 0,097 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 31 mM (Figura 26).

Figura 26 – Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol em células de fibroblastos humanos normais FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

Após os tratamentos com os compostos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, MβCD e 2,4-Dinitrofenol foram obtidas às respectivas IC50%, as células de fibroblastos humanos normais – FN1 foram tratadas com o Cloridrato de Meclizina associado a 2-AEH₂F, com a MβCD associada a 2-AEH₂F e o 2,4-Dinitrofenol associado a 2-AEH₂F. As células plaqueadas em placa de cultura 96 orifícios foram tratadas com o Cloridrato de Meclizina/MβCD/2,4-Dinitrofenol a partir da concentração de 50 mM e após 2 horas foi adicionada a 2-AEH₂F na concentração de 40 mM por 24 horas de tratamento.

Com o tratamento Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, as células normais FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 31 mM (Figura 27).

Figura 27 - Avaliação da Toxicidade do composto Cloridrato de Meclizina + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto humano normal FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As células normais FN1 foram incubadas com a M β CD + 2-AEH₂F concentrações de 50 a 0,097 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células FN1 foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC50% de 70 mM (Figura 28).

Figura 28 - Avaliação da Toxicidade do composto MβCD + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto humano normal FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média ± dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com MβCD + 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC50%. Experimentos realizados n=5, em octuplicadas.

As células FN1 foram incubadas com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F nas concentrações de 50 a 0,097 mM no tempo de 24 horas de tratamento. As células normais foram observadas no microscópio de luz invertido e sua morfologia foi avaliada e fotodocumentada. Após as análises para a obtenção da equação da reta e comparações estatísticas no programa GraphPad Prism 5 foi obtido o valor da IC₅₀% de 7,4 mM (Figura 29).

Figura 29 - Avaliação da Toxicidade do composto 2,4-Dinitrofenol + Pho-s (2-AEH₂F) em células de fibroblasto normal FN1. Gráfico de dispersão dos valores da média $\pm$ dp da viabilidade da célula de fibroblastos normais, após 24 horas de tratamento com 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F em diferentes concentrações, obtido pelo programa GraphPad Prism 5. (A) Dados dos valores obtidos da densidade óptica; (B) Valores da densidade óptica transformada em Log10/concentração; (C) Curva de regressão linear para o cálculo da IC₅₀%. Experimentos realizados n=5, em octuplicada.

Os aspectos morfológicos das modificações celulares e os danos provocados em fibroblastos humanos normais, tratados com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, M β CD, 2,4- dinitrofenol e de suas associações foram fotomicrografos. Em todos os tratamentos foi observada diminuição da densidade celular e perda dos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 30).

Figura 30 - Fotomicrografia dos aspectos celulares das células de fibroblastos humanos normais FN1. Aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as IC₅₀% da 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, M β CD, 2,4-Dinitrofenol e associações após 24 h de tratamento, obtidas em Microscópio Óptico de Luz Invertido.

Após a determinação de todos os valores das IC50%, foi gerado um heatmap com a correlação destes valores na célula tumoral de mama triplo negativo MDA-MB-231 (Figura 31).

Figura 31 – Determinação da citotoxicidade em células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231. Os heatmap mostram a correlação dos valores das IC50% dos tratamentos com 2-AEH₂F, MC, MBCD, DNF e suas associações na linhagem tumoral de mama triplo negativo, com média ± dp, obtido pelo programa GraphPad Prism 7.

A partir da determinação de todos os valores das IC50%, foi gerado um heatmap com a correlação destes valores na célula de fibroblasto normal FN1 (Figura 32).

Figura 32 - Determinação da citotoxicidade em células de fibroblasto normal FN1. Os heatmap mostram a correlação dos valores das IC50% dos tratamentos com 2-AEH₂F, MC, MBCD, DNF e suas associações na linhagem de fibroblasto normal, com média ± dp, obtido pelo programa GraphPad Prism 7.

A tabela a seguir (Tabela 3) mostra os valores de R^2 e as IC50% obtidos com os tratamentos com 2-AEH₂F, MC, MBCD, DNF e suas associações nas linhagens tumoral e normal.

Tabela 3 – Valores das IC50%

Célula	Tratamento	IC50% (mM)	R²
MDA-MB-231	2-AEH ₂ F	20,4	0,96
	Meclizina	6,0	0,99
	MBCD	1,5	0,95
	DNF	25,0	0,96
	2-AEH ₂ F + Meclizina	0,6	0,96
	2-AEH ₂ F + MBCD	2,5	0,82
	2-AEH ₂ F + DNF	27,0	0,96
FN1	2-AEH ₂ F	81,8	0,94
	Meclizina	27,0	0,94
	MBCD	80,0	0,90
	DNF	31,0	0,98
	2-AEH ₂ F + Meclizina	31,0	0,91
	2-AEH ₂ F + MBCD	70,0	0,94
	2-AEH ₂ F + DNF	7,4	0,98

4.2. Análise SynergyFinder 2.0 de combinações de múltiplos medicamentos

4.2.1. Célula tumoral de mama – MDA.MB.231

O SynergyFinder é um aplicativo web que permite aos pesquisadores pré-processar, analisar e visualizar combinações de medicamentos em pares de forma interativa. SynergyFinder pontua sinergia de combinação de drogas com base na seleção do usuário entre os vários modelos de referência, e a ferramenta web suporta exploração interativa e comparação dos resultados de sinergia. Além de quantificar as sinergias globais, o SynergyFinder destaca as faixas de dose com a mais forte sinergia ou antagonismo para análises mais detalhadas e interpretação sobre a viabilidade clínica do tratamento combinado.

A partir dos resultados obtidos do teste de viabilidade MTT com os compostos 2-AEH₂F e o Cloridrato de Meclizina nas células tumorais de mama MDA.MB.231, foi realizada a análise destes resultados pelo programa SynergyFinder 2.0. Os dados mostraram que os compostos, quando tratados nas células tumorais, possuem atividade sinérgica (score 13,388) conforme as figuras a seguir (Figuras 33 e 34).

Meclizina & Phophoethanolamine

Figura 33 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 34 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Os compostos 2-AEH₂F e a MBCD foram analisados, contudo, mostraram ter atividade aditiva (score 0,562) conforme as figuras a seguir (Figuras 35 e 36).

MBCD & Phophoethanolamine

Figura 35 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 36 – Determinação da sinergia entre os compostos MBDC e 2-AEH₂F (Pho-s).
 Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas.
 Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Os compostos 2-AEH₂F e o DNP foram analisados e, assim como a MBCD, mostraram ter atividade aditiva (score – 0,772) conforme as figuras a seguir (Figuras 37e 38).

2,4-Dinitrofenol & Phophoethanolamine

Figura 37 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 38 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s).
 Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas.
 Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

4.2.2. Célula de fibroblasto normal – FN1

A partir dos resultados obtidos do teste de viabilidade MTT com os compostos 2-AEH₂F e o Cloridrato de Meclizina nas células de fibroblastos normais FN1, foi realizada a análise destes resultados pelo programa SynergyFinder 2.0. Os dados mostraram que os compostos, quando tratados nas células normais, possuem atividade aditiva (score 0,06) conforme as figuras a seguir (Figuras 39 e 40).

Meclizina & Phophoethanolamine

Figura 39 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 40 – Determinação da sinergia entre os compostos Cloridrato de Meclizina e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Os compostos 2-AEH₂F e a MBCD foram analisados e também mostraram ter atividade aditiva (score -0,747) conforme as figuras a seguir (Figuras 41 e 42).

Figura 41 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 42 – Determinação da sinergia entre os compostos MBCD e 2-AEH₂F (Pho-s).
 Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas.
 Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Os compostos 2-AEH₂F e a DNP foram analisados e também mostraram ter atividade aditiva (score 9,265) conforme as figuras a seguir (Figuras 43 e 44).

Figura 43 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s). Visualização da matriz dose-resposta e dos plots de respostas fenotípicas das drogas. Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

Figura 44 – Determinação da sinergia entre os compostos DNP e 2-AEH₂F (Pho-s).
 Visualização dos mapas com os cálculos de sinergia 2D e 3D da comparação das drogas.
 Dados obtidos pelo programa SynergyFinder 2.0.

4.3. Determinação da produção de lipídeos peroxidados polissaturados

4.3.1. Células de tumor de mama triplo negativo – MDA-MB-231

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

O tratamento com a 2-AEH₂F resultou em diferença significativa na formação de radicais peroxidados lipídicos da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.

Após o tratamento de 24 horas houve diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com a 2-AEH₂F a partir da concentração de 20 mM (Figura 45A). As relações entre a viabilidade celular e a produção de lipoperoxidos em células de mama MDA-MB-231 mostraram correlação positiva significativa entre a diminuição da viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 45B).

Figura 45 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células tumorais de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com a 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o Cloridrato de Meclizina após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MDA-MB-231 tratadas em relação ao grupo controle não tratado. Entretanto, na menor concentração não houve diferença estatística significativa (Figura 46A). Não foi encontrada correlação positiva significativa, entre a diminuição da viabilidade e os níveis de produção de lipoperoxidos (Figura 46B).

Figura 46 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com o Cloridrato de Meclizina. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

Por outro lado, o tratamento das células MDA-MB-231 com a M β CD após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais em todas as concentrações (Figura 47A). Não há correlação significativa positiva entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 47B).

Figura 47 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com a M β CD. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento das células MDA-MB-231 com o 2,4-Dinitrofenol após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais nas concentrações (Figura 48A). Não há correlação significativa positiva entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 48B).

Figura 48– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MDA-MB-231 em todas as concentrações (Figura 49A). Não há correlação significativa positiva entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 49B).

Figura 49– Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com a Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com a M β CD + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MDA-MB-231 em todas as concentrações (Figura 50A). Não há correlação significativa positiva entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 50B).

Figura 50 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com a M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células tumorais MDA-MB-231 nas concentrações (Figura 51A). Não há correlação significativa positiva entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 51B).

Figura 51 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de mama humana MDA-MB-231. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer.

Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

4.3.2. Células de fibroblastos humanos normais – FN1

O sobrenadante das culturas celulares de fibroblastos humanos normais FN1 foram analisados após o teste colorimétrico MTT para determinar a produção lipídeos peroxidados polissaturados.

Após o tratamento de 24 horas houve diminuição significativa da produção de lipídeos peroxidados polissaturados nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 tratadas com a 2-AEH₂F a partir da concentração de 40 mM (Figura 52A). Não houve correlação positiva significativa entre as concentrações acima de 40 mM e a produção de lipoperoxidos (Figura 52B).

Figura 52 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com a 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o Cloridrato de Meclizina após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 tratadas com as maiores concentrações do Cloridrato de Meclizina (Figura 53A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 53B).

Figura 53 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com o Cloridrato de Meclizina. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer.

Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

Entretanto, o tratamento com a M β CD após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 tratadas apenas na maior concentração (Figura 54A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 54B).

Figura 54 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com a M β CD. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o 2,4-Dinitrofenol após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 apenas nas maiores concentrações (Figura 55A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 55B).

Figura 55 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol. (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 apenas nas maiores concentrações (Figura 56A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 56B).

Figura 56 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com o Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer.

Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com a M β CD + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 apenas na concentração de 50 mM (Figura 57A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 57B).

Figura 57 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com a M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***} < 0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer.

Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

O tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F após 24 horas mostrou diminuição significativa da produção de radicais peroxidados lipídicos nos sobrenadantes das culturas celulares das células normais FN1 nas concentrações de 50 a 0,78 mM (Figura 58A). Não houve correlação positiva significativa entre a viabilidade e a produção de lipoperoxidos (Figura 58B).

Figura 58 – Produção de lipídeos peroxidados polissaturados em células de fibroblastos humanos normais FN1. (A) Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de lipídeos peroxidados polissaturados após 24 horas de tratamento com o 2,4-Dinitrofenol + 2-AEH₂F (Pho-s). (B) Gráfico de dispersão da correlação positiva da produção de radicais livres lipoperoxidados com a viabilidade celular obtida no teste do MTT. Valores de significância com $p^{***}<0.01$ e ns obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer.

Experimentos realizados independentes $n=5$, em octuplicadas.

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

4.4.1. Células de câncer de mama triplo negativo – MDA-MB-231

Os compostos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a M β CD e o 2,4-Dinitrofenol (DNP) e suas associações foram testadas para avaliar as suas capacidades de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular.

As concentrações avaliadas para a determinação das populações nas diferentes fases do ciclo celular foram definidas a partir dos cálculos das concentrações inibitórias IC₅₀% obtidas nos testes de citotoxicidade – MTT. As células tumorais de mama humana triplo-negativo MDA-MB-231 tratadas com a 2-AEH₂F nas concentrações de 10 e 20 mM no tempo de 24 horas. O composto Cloridrato de Meclizina foi utilizado nas concentrações de 3,12 e 6,25 mM. Entretanto, sua associação com a 2-AEH₂F foi utilizada na concentração de 0,39 e 0,78 mM. O composto M β CD foi utilizado nas concentrações 0,75 e 1,5 mM e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 1,25 e 2,5 mM. O composto DNP foi utilizado nas concentrações de 14 e 27 mM e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 15 e 31 mM. As porcentagens das células tumorais MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas após os tratamentos.

Com o tratamento de 24 horas com 10 mM de 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 59). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 59 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 10 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Além disso, com o tratamento de 24 horas com 20 mM de 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 60). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 60 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{\#} < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 3,12 mM de Cloridrato de Meclizina apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 61). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 61 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 3,12 mM de Cloridrato de Meclizina (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 6,25 mM de Cloridrato de Meclizina apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 62). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 62 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 6,25 mM de Cloridrato de Meclizina (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 0,75 mM de M β CD apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 63). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 63 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 0,75 mM de M β CD (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 1,5 mM de M β CD apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 64). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 64 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 1,5 mM de M β CD (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 14 mM de 2,4-Dinitrofenol (DNP) apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 65). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado e da fase S.

Figura 65 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 14 mM do DNP (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$, $p^{###} < 0.01$, $p^+ < 0.05$ e $p^{+++} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 27 mM de 2,4-Dinitrofenol (DNP) apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 66). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 66 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 27 mM do DNP (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 0,39 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 67). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 67 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 0,39 mM do Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 0,78 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 68). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 68 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 0,78 mM do Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{\#} < 0.05$ e $p^{\#\#\#} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 1,25 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 69). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 69 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 1,25 mM da M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 2,5 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 70). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 70 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 2,5 mM da M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 15 mM da associação DNP + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 71). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 71 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 15 mM do DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

O tratamento de 24 horas com 31 mM da associação DNP + 2-AEH₂F apresentou mudanças significativas na porcentagem de células nas fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Figura 72). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 72 – Distribuição das fases do ciclo celular das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 dos grupos controle (A) e tratados com 31 mM do DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

4.4.2. Células de fibroblastos humanos normais – FN1

Os compostos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a MβCD e o 2,4-Dinitrofenol e suas associações também foram testadas nas células de fibroblasto normal humano FN1 para avaliar as suas capacidades de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular.

As concentrações avaliadas para a determinação das populações nas diferentes fases do ciclo celular foram definidas a partir dos cálculos das concentrações inibitórias IC₅₀% obtidas nos testes de citotoxicidade – MTT. As células normais FN1 tratadas com a 2-AEH₂F nas concentrações de 40 e 80 mM no tempo de 24 horas. O composto Cloridrato de Meclizina foi utilizado nas concentrações de 13 e 27 mM. Entretanto, sua associação com a 2-AEH₂F foi utilizada na concentração de 15 e 31 mM. O composto MβCD foi utilizado nas concentrações 40 e 80 mM e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 40 e 80 mM. O composto DNP foi utilizado nas concentrações 15 e 31 mM e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 3,25 e 6,5 mM. As porcentagens das células normais FN1 nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas após os tratamentos.

Com o tratamento de 24 horas com 40 mM de 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 73). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 73 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 40 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 80 mM de 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 74). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento e da fase S.

Figura 74 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 80 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 13 mM do Cloridrato de Meclizina, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 75). As fases G0/G1, G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 75 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 13 mM do Cloridrato de Meclizina (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 27 mM do Cloridrato de Meclizina, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 76). As fases G0/G1, G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 76 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 27 mM do Cloridrato de Meclizina (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 40 mM da M β CD, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 77). As fases G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 77 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 40 mM da M β CD (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 80 mM da M β CD, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 78). As fases G0/G1, G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 78 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 80 mM da M β CD (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{\#\#} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 15 mM do DNP, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 79). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento e da fase S.

Figura 79 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 15 mM do DNP (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 31 mM do DNP, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 80). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento e da fase S.

Figura 80 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 31 mM do DNP (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{\#} < 0.05$ e $p^{\#\#} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; # = G0/G1; - = G2/M; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 15 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 81). As fases G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 81 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 15 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 31 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 82). As fases G0/G1, G2/M e fase S diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmento.

Figura 82 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 31 mM da associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{####} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 40 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 83). A fase G2/M diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 83 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 40 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{\#} < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 80 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 84). As fases G0/G1 e G2/M diminuíram significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 84 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 80 mM da associação M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{\#} < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 3,25 mM da associação DNP + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 85). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 85 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 3,25 mM da associação DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

Com o tratamento de 24 horas com 6,5 mM da associação DNP + 2-AEH₂F, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações, quando comparado ao grupo controle (Figura 86). A fase G0/G1 diminuiu significativamente, enquanto houve um aumento significativo do DNA fragmentado.

Figura 86 – Distribuição das fases do ciclo celular das células de fibroblastos normais humanos FN1. Gráficos representativos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de fibroblastos normais humanos dos grupos controle (A) e tratados com 6,25 mM da associação DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (B). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^\# < 0.05$ e $p^{###} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste Turkey-Kremer. $n=3$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado. (* = DNA fragmentado; - = G2/M; + = Fase S; ns = não significativo; comparados ao grupo controle).

4.5. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI

As células tumorais de mama humana triplo negativo MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F foram marcados com a anexina V/FITC e com iodeto de propídeo (PI) para diferenciação dos tipos de morte por apoptose e necrose.

Após 24 horas de tratamento com a 2-AEH₂F nas concentrações de 10 e 20 mM, foi observada uma diminuição significativa da porcentagem de células viáveis em ambas as concentrações, quando comparadas ao grupo controle. Na maior concentração, há um aumento significativo na morte por apoptose inicial e tardia (Figura 87).

Figura 87 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose. Dot plots com a distribuição de células viáveis e células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose do grupo controle (A), tratadas com 10 mM 2-AEH₂F (Pho-s) (B) e 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da população celular tratada com Pho-s nas concentrações de 10 e 20 mM (D). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Após os tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observada uma diminuição significativa da porcentagem de células viáveis e um aumento da porcentagem de células em apoptose inicial e tardia em todas as concentrações, quando comparadas ao grupo controle (Figura 88).

Figura 88 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose. Dot plots com a distribuição de células viáveis e células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose do grupo controle (A), tratadas com 20 mM 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 6,25 mM de MC (C) e 0,78 mM de MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média ± dp da porcentagem da população celular tratada com 2-AEH₂F (Pho-s), MC e MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com p* < 0.05 e p*** < 0.01, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados n=3, em triplicata.

Com os tratamentos com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observada uma diminuição significativa da porcentagem de células viáveis e um aumento da porcentagem de células em apoptose inicial em todas as concentrações, quando comparadas ao grupo controle. Não houve alteração significativa nas células em apoptose tardia e em necrose (Figura 89).

Figura 89 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose. Dot plots com a distribuição de células viáveis e células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose do grupo controle (A), tratadas com 20 mM 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 1,5 mM de MBCD (C) e 2,5 mM de MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da população celular tratada com 2-AEH₂F (Pho-s), MBCD e MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Após os tratamentos com 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observada uma diminuição significativa da porcentagem de células viáveis e um aumento da porcentagem de células em apoptose inicial e tardia, quando comparadas ao grupo controle. Houve alteração significativa nas células em necrose apenas no tratamento com o 2,4-Dinitrofenol (Figura 90).

Figura 90 – Porcentagem das células tumorais de mama em apoptose e necrose. Dot plots com a distribuição de células viáveis e células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose do grupo controle (A), tratadas com 20 mM 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 1,5 mM de MBCD (C) e 2,5 mM de MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da população celular tratada com 2-AEH₂F (Pho-s), MBCD e MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

4.6. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo

Foram analisadas as expressões dos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, stress e proliferação celular nas células tumorais de mama triplo negativo, MDA-MB-231, por citometria de fluxo. Foram comparadas as porcentagens da expressão dos marcadores nos grupos tratados com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F em relação ao grupo controle, a partir dos dados e dot plot adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II e analisados pelo programa WinMDI versão 2.9, e apresentados em gráfico de barras das médias $\pm$ desvio padrão. Foram definidos os padrões de expressão a partir da definição os quadrantes (Gates) dos gráficos adquiridos pelo programa (dot plot), e da positividade das células marcadas no quadrante superior em função da intensidade de fluorescência.

A expressão de Bax, membro da família das proteínas pró-apoptóticas, aumentou significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto no tratamento com a menor concentração do Cloridrato de Meclizina (Figura 91).

Figura 91 – Percentual da expressão do marcador Bax. Dot plots representando a expressão do marcador Bax no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Bax. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Bad, membro da família das proteínas pró-apoptóticas, aumentou significativamente nas maiores concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações (Figura 92).

Figura 92 – Percentual da expressão do marcador Bad. Dot plots representando a expressão do marcador Bad no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Bad. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Bcl-2, membro da família das proteínas anti-apoptóticas, diminuiu significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto na menor concentração do Metil-β-ciclodextrina (Figura 93).

Figura 93 – Percentual da expressão do marcador Bcl-2. Dot plots representando a expressão do marcador Bcl-2 no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Bcl-2. Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Caspase 3, membro da via intrínseca da apoptose, aumentou significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações (Figura 94).

Figura 94 – Percentual da expressão do marcador Caspase 3. Dot plots representando a expressão do marcador Caspase 3 no grupo controle e nas IC50 dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Caspase 3. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Caspase 8, membro da via extrínseca da apoptose, aumentou significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto nas menores concentrações de Cloridrato de Meclizina e Metil-β-ciclodextrina associados com a 2-AEH₂F (Figura 95).

Figura 95 – Percentual da expressão do marcador Caspase 8. Dot plots representando a expressão do marcador Caspase 8 no grupo controle e nas IC50 dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Caspase 8. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Citocromo C, membro da via intrínseca da apoptose, aumentou significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto na menor concentração do Cloridrato de Meclizina (Figura 96).

Figura 96 – Percentual da expressão do marcador Citocromo C. Dot plots representando a expressão do marcador Citocromo C no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na apoptose Citocromo C. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de Ciclina D1, proteína envolvida na progressão do ciclo celular, diminuiu significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto na menor concentração do 2,4-Dinitrofenol (Figura 97).

Figura 97 – Percentual da expressão do marcador Ciclina D1. Dot plots representando a expressão do marcador Ciclina D1 no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na progressão do ciclo celular Ciclina D1. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão de PCNA, marcador da atividade proliferativa, diminuiu significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto na menor concentração do 2,4-Dinitrofenol associado à 2-AEH₂F (Figura 98).

Figura 98 – Percentual da expressão do marcador PCNA. Dot plots representando a expressão do marcador PCNA no grupo controle e nos valores de IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na atividade proliferativa PCNA. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão da Caveolina 1, proteína essencial para a formação de cavéolas, diminuiu significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto na menor concentração do Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F e na menor concentração da Metil-β-ciclodextrina (Figura 99).

Figura 99 – Percentual da expressão do marcador Caveolina1. Dot plots representando a expressão do marcador Caveolina 1 no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na formação das cavéolas, Caveolina 1. Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

A expressão da CD36, que atua na captação de ácidos graxos de cadeia longa, diminuiu significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações (Figura 100).

Figura 100 – Percentual da expressão do marcador CD36. Dot plots representando a expressão do marcador CD36 no grupo controle e nas IC50% dos grupos tratados. Gráfico de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem da expressão do marcador envolvido na captação de ácidos graxos de cadeia longa, CD36. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n = 3$, em triplicata. (ns = não significativo).

4.7. Marcação do citoesqueleto por Faloidina e das mitocôndrias por MitoRed

As células tumorais de mama humana triplo negativo, MDA-MB-231, do grupo controle e dos grupos tratados com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F foram marcadas com os fluorocromo Faloidina, para avaliação da morfologia e do citoesqueleto e com o MitoRed, para avaliação das alterações morfológicas na mitocôndria (Figura 101).

Figura 101 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupo controle marcado com Faloidina e MitoRed (A); Grupo controle marcado com Faloidina (B); Grupo controle marcado com MitoRed (C), analisadas em Microscopia Confocal a Laser.

As células tumorais MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F apresentaram alteração na morfologia celular, como retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, aumento nuclear e houve diminuição na densidade celular (Figura 102). As mitocôndrias após o tratamento com 2-AEH₂F especificamente demonstrou aumento da capacidade oxidativa, distribuindo-se ao longo dos filamentos do citoesqueleto, principalmente na concentração de 10 mM, provavelmente um evento precoce da ativação das vias intrínsecas da apoptose inicial, esses dados corroboram com os dados quantitativos da Anexina V/PI.

Figura 102 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupo controle marcado com Faloidina e MitoRed (A) (B) (C); Grupo tratado com 10 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed (D) (E) (F); Grupo tratado com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed (G) (H) (I), analisadas em Microscopia Confocal a Laser.

Figura 103 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. Em destaque nas setas, presença de vacúolos, nas concentrações de 10 e 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s).

As células MDA-MB-231 tratadas com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F apresentaram alteração na morfologia celular, como retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos e houve significativa diminuição na densidade celular nas maiores concentrações (Figura 104).

Figura 104 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com Cloridrato de Meclizina e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed, analisadas em Microscopia Confocal a Laser.

As células MDA-MB-231 tratadas com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com a 2-AEH₂F apresentaram alteração na morfologia celular, como retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, fragmentação nuclear e houve significativa diminuição na densidade celular em todas as concentrações (Figura 105).

Figura 105 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com MBCD e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed. O círculo vermelho mostra a fragmentação nuclear, analisadas em Microscopia Confocal a Laser.

As células MDA-MB-231 tratadas com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F apresentaram alteração na morfologia celular, como retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, fragmentação nuclear e houve significativa diminuição na densidade celular em todas as concentrações, além das alterações na reorganização dos filamentos do citoesqueleto (Figura 106).

Figura 106 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcado com Faloidina e MitoRed, analisadas em Microscopia Confocal a Laser.

4.8. Marcação mitocondrial com o fluorocromo Rodamina 123

Para a avaliação do potencial elétrico das mitocôndrias, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas da mitocôndria e inibir processos de transporte, especialmente o transporte de elétrons, retardando a respiração celular interna.

Após o tratamento com 10 mM e 20 mM de 2-AEH₂F, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram fotomicrografadas em microscópio Confocal a laser, observa-se na fotomicrografia do grupo controle a marcação das mitocôndrias mais delimitadas e estruturadas ao redor do núcleo. Contudo, nos grupos tratados, as mitocôndrias não aparecem bem delimitadas, há formação de vacúolos citoplasmáticos. Estes dados corroboram com os dados do teste de citotoxicidade - MTT. O núcleo das células tumorais foi marcado com o Iodeto de Propídeo (PI), quando comparados ao grupo controle, é possível observar os núcleos celulares dos grupos tratados aumentados e fragmentados (Figura 107).

Figura 107 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com a 2-AEH₂F (Pho-s) nas concentrações de 10 e 20 mM marcados com Rodamina 123 e Iodeto de propídeo, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas amarelas indicam a presença de núcleos aumentados e fragmentados.

Com o tratamento com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram fotomicrografadas em microscópio Confocal a laser, observa-se na fotomicrografia do grupo controle a marcação das mitocôndrias mais delimitadas e estruturadas ao redor do núcleo. Contudo, nos grupos tratados, observamos uma diminuição significativa da densidade celular e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, as células estão aumentadas e com núcleos maiores e fragmentados. As mitocôndrias apresentaram modificações na sua distribuição e em seu potencial elétrico, decorrentes das alterações fosforilativas (Figura 108).

Figura 108 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcados com Rodamina 123 e Iodeto de propídeo, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas amarelas indicam os núcleos fragmentados e aumentados.

Com o tratamento com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com a 2-AEH₂F, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram fotomicrografadas em microscópio Confocal a laser, observa-se na fotomicrografia do grupo controle a marcação das mitocôndrias mais delimitadas e estruturadas ao redor do núcleo. Contudo, nos grupos tratados, observamos uma diminuição significativa da densidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos. As mitocôndrias se redistribuíram ao redor da estrutura nuclear, com significativa diminuição em seu número e em sua capacidade fosforilativa, acompanhadas pela diminuição da densidade celular (Figura 109).

Figura 109 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcados com Rodamina 123 e Iodeto de propídeo, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas amarelas indicam as células com perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos.

Com o tratamento com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram fotomicrografadas em microscópio Confocal a laser, observa-se na fotomicrografia do grupo controle a marcação das mitocôndrias mais delimitadas e estruturadas ao redor do núcleo. Contudo, nos grupos tratados, observamos uma diminuição significativa da densidade celular, perda dos prolongamentos citoplasmáticos, fragmentação nuclear nas maiores concentrações. As mitocôndrias se modificaram significativamente demonstrando o efeito toxico inespecífico do DNP em células tumorais de mama triplo negativo. Morfologicamente a associação com a 2-AEH₂F induziu diminuição da densidade celular e perda completa do potencial elétrico mitocondrial. (Figura 110).

Figura 110 – Fotomicrografias dos aspectos celulares das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Grupos controle e tratados com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com 2-AEH₂F (Pho-s) marcados com Rodamina 123 e Iodeto de propídeo, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas amarelas indicam as células com perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos.

4.9. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

4.9.1. Rodamina-123

O Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é fundamental para manter a função fisiológica da cadeia respiratória para gerar energia (ATP). A perda significativa do $\Delta\Psi_m$ diminui a produção de energia, com posterior morte celular. As análises realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123 mostraram que o tratamento com a 2-AEH₂F diminuiu significativamente o potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 112).

Figura 111 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 10 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B) e 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Após o tratamento com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F, houve diminuição do $\Delta\Psi_m$ em todas as concentrações das células tumorais (Figura 113).

Figura 112 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 6,25 mM de MC (C) e 0,78 mM de MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MC e MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Após o tratamento com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com a 2-AEH₂F, houve diminuição do $\Delta\Psi_m$ em todas as concentrações das células tumorais (Figura 114).

Figura 113 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 1,5 mM de MBCD (C) e 2,5 mM de MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MBCD e MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F, observou-se diminuição do $\Delta\Psi_m$ em todas as concentrações das células tumorais, principalmente nas maiores concentrações (Figura 115).

Figura 114 – Histogramas e gráficos representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 27 mM de DNP (C) e 31 mM de DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com DNP e DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

4.9.2. Sonda JC-1

Alguns marcadores fluorescentes conseguem avaliar o potencial da membrana mitocondrial, que está relacionado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia livre gerada pelo transporte de elétrons, produzindo um gradiente eletroquímico. O mecanismo de incorporação das sondas fluorescentes ocorre quando esta se difunde livremente pela membrana plasmática até o citosol da célula e se acumula na matriz da mitocôndria metabolicamente ativa, guiada por força motriz de próton gerado por transferência de cadeia de elétron localizada na membrana mitocondrial interna. Para tal, destacam-se a sonda JC-1.

Após o tratamento com a 2-AEH₂F na concentração de 20 mM, houve modificações quantitativas no potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), corroborando com os dados da marcação morfológica e funcional pelo MitoRed, no qual foi demonstrado as modificação na distribuição e potencial de ativação mitocondrial (Figura 116).

Figura 115 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F (Pho-s) (A). Histogramas dos grupos controle (B), tratados com 10 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C) e 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observado aumento no índice das mitocôndrias que apresentaram baixo potencial elétrico em todas as concentrações (Figura 117).

Figura 116 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MC e MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (A). Histogramas dos grupos controle (B), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C), 6,25 mM de MC (D) e 0,78 mM de MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com a Metil- β -ciclodextrina e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observado aumento no índice das mitocôndrias que apresentaram baixo potencial elétrico significativa apenas com a Metil- β -ciclodextrina (Figura 118).

Figura 117 – Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MBCD e MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (A). Histogramas dos grupos controle (B), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C), 1,5 mM de MBCD (D) e 2,5 mM de MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com o 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F, foi observado aumento no índice das mitocôndrias que apresentaram baixo potencial elétrico significativa em todas as concentrações, exceto na menor concentração do 2,4-Dinitrofenol (Figura 119).

Figura 118– Gráficos e histogramas representativos da porcentagem do potencial elétrico mitocondrial. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da porcentagem do potencial mitocondrial das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com DNP e DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (A). Histogramas dos grupos controle (B), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C), 27 mM de DNP (D) e 31 mM de DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

4.10. Ensaio de proliferação CFSE-DA

4.10.1. Período de 24 horas

Para caracterizar a atividade proliferativa das células tumorais de mama humana MDA-MB-231, grupos controle e tratadas com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, M β CD e suas associações, foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE-DA), por citometria de fluxo.

As células tumorais foram tratadas com 2-AEH₂F nas concentrações de 10 e 20 mM no período de 24 horas. Em ambas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação, quando comparada ao grupo controle não tratado (Figura 120 e 121).

Figura 119 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231.

Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com a 2-AEH₂F (Pho-s) nas concentrações de 10 e 20 mM. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 120 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos no programa FLOW JO, em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A) e grupo tratados com 10 mM (B) e 20 mM (C) de 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 3,12 e 6,25 mM e 0,39 e 0,78 mM, respectivamente, no período de 24 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 122 e 123).

Figura 121 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 122 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos no programa FlowJo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 3,12 mM (B) e 6,25 mM (C) de Cloridrato de Meclizina e grupo tratado com 0,39 mM (D) e 0,78 mM (E) de Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com a M β CD e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM e 1,25 e 2,5 mM, respectivamente, no período de 24 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 124 e 125).

Figura 123 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com a M β CD e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 124 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 0,75 mM (B) e 1,5 mM (C) de M β CD e grupo tratado com 1,25 mM (D) e 2,5 mM (E) de M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1-quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com 14 e 27 mM de 2,4-Dinitrofenol e 15 e 31 mM de 2,4-Dinitrofenol associado com a 2-AEH₂F, no período de 24 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 126 e 127).

Figura 125 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com o DNP e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 126 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 14 mM (B) e 27 mM (C) de DNP e grupo tratado com 15 mM (D) e 31 mM (E) de DNP + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

4.10.2. Período de 48 horas

As células tumorais também foram tratadas com 2-AEH₂F nas concentrações de 10 e 20 mM no período de 48 horas. Em ambas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação, quando comparada ao grupo controle não tratado (Figura 128 e 129).

Figura 127 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com a 2-AEH₂F (Pho-s) nas concentrações de 10 e 20 mM. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 128 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos no programa FLOW JO, em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A) e grupo tratados com 10 mM (B) e 20 mM (C) de 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 3,12 e 6,25 mM e 0,39 e 0,78 mM, respectivamente, no período de 48 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 130 e 131).

Figura 129 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média ± dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com o Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

Figura 130 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos no programa FlowJo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 3,12 mM (B) e 6,25 mM (C) de Cloridrato de Meclizina e grupo tratado com 0,39 mM (D) e 0,78 mM (E) de Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com a M β CD e sua associação com a 2-AEH₂F nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM e 1,25 e 2,5 mM, respectivamente, no período de 48 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 132 e 133).

Figura 131 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com a M β CD e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 132 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 0,75 mM (B) e 1,5 mM (C) de M β CD e grupo tratado com 1,25 mM (D) e 2,5 mM (E) de M β CD + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1-quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com 14 e 27 mM de 2,4-Dinitrofenol e 15 e 31 mM de 2,4-Dinitrofenol associado com a 2-AEH₂F, no período de 48 horas. Em todas as concentrações houve diminuição significativa do índice de proliferação (Figura 134 e 135).

Figura 133 – Índice proliferativo das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp do índice proliferativo das células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com o DNP e sua associação com a 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicatas.

Figura 134 - Histogramas representativos das células tumorais de mama humana MDA-MB-231. Os histogramas foram obtidos em citômetro de fluxo para determinar o índice proliferativo (IP) das células tumorais do grupo controle (A), grupo tratado com 14 mM (B) e 27 mM (C) de DNP e grupo tratado com 15 mM (D) e 31 mM (E) de DNP + 2-AEH₂F (Pho-s). Os dados foram obtidos pelo programa Wisard Proliferation – WinMDI 2.9. R1- quadrante de células obtidas em relação ao volume (FSC) e complexidade celular (SSC). Experimentos realizados n=3, em triplicatas.

4.11. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo

O teste de espécies reativas de oxigênio (ROS) é realizado com reagente e tampão por citometria de fluxo no canal FITC. As espécies reativas de oxigênio são moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio que são geradas como um subproduto natural do metabolismo do oxigênio.

Após o tratamento com as concentrações de 10 e 20 mM de 2-AEH₂F houve um aumento significativo, principalmente na maior concentração, da produção de ROS (Figura 136).

Figura 135 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 10 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B) e 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (C). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de ROS das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F (Pho-s). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com as concentrações de 3,12 e 6,25 mM do Cloridrato de Meclizina e 0,39 e 0,78 mM do Cloridrato de Meclizina associado com a 2-AEH₂F, mostrou um aumento significativo da produção de ROS em todas as concentrações (Figura 137).

Figura 136 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 6,25 mM de MC (C) e 0,78 mM de MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de ROS das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MC e MC + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com as concentrações de 0,75 e 1,5 mM da Metil- β -ciclodextrina e 1,5 e 2,5 mM da Metil- β -ciclodextrina associada com a 2-AEH₂F, mostrou um aumento significativo da produção de ROS em todas as concentrações, exceto na menor concentração de Metil- β -ciclodextrina (Figura 138).

Figura 137 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 1,5 mM de MBCD (C) e 2,5 mM de MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de ROS das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com MBCD e MBCD + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

Com o tratamento com as concentrações de 14 e 27 mM do 2,4-Dinitrofenol e 15 e 31 mM do 2,4-Dinitrofenol associado com a 2-AEH₂F, mostrou um aumento significativo da produção de ROS em todas as concentrações (Figura 139).

Figura 138 – Histogramas e gráficos representativos da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Histogramas dos grupos controle (A), tratados com 20 mM de 2-AEH₂F (Pho-s) (B), 27 mM de DNP (C) e 31 mM de DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (D). Gráficos de barras dos valores da média $\pm$ dp da produção de ROS das células tumorais MDA-MB-231 tratadas com DNP e DNP + 2-AEH₂F (Pho-s) (E). Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $p^{***} < 0.01$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Turkey-Kremer. Experimentos realizados $n=3$, em triplicata.

5- DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido publicados mostrando que, ao contrário dos agentes quimioterapêuticos convencionais, os fosfolipídios antineoplásicos agem em membranas celulares tumorais, interferindo no *turnover* dos fosfolipídios. Essas novas moléculas devido às suas ligações éter estáveis não são metabolizadas e podem interferir na sinalização de lipídios, induzindo apoptose em células de tumores malignos (VANERSWIJK, 2008).

Neste projeto, os tratamentos *in vitro* com a Fosfoetanolamina sintética (2-AEH₂F), o Cloridrato de Meclizina MC, a metil-beta ciclo dextrina MβCD, o 2,4-Dinitrofenol DNP e suas associações farmacológicas mostraram-se eficazes na capacidade de diminuir significativamente a viabilidade das células de tumor de mama humano MDA-MB-231. A viabilidade celular avaliada, pelo método colorimétrico MTT, após 24 horas mostrou a redução da viabilidade celular tempo - concentração dependente. Com o tratamento da 2-AEH₂F, as células tumorais de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 apresentaram aspectos de lise e formação de debris celular, a partir da concentração de 10 mM. Além disso, foi observado um aumento percentual da mortalidade celular nas demais concentrações, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão dos prolongamentos citoplasmáticos. A IC₅₀% obtida foi de 20,44 mM de 2-AEH₂F, após 24 horas de tratamento.

Em estudos anteriores em células de adenocarcinoma de mama humano - MCF7 o tratamento da 2-AEH₂F foi capaz na diminuição na viabilidade celular e inibição da proliferação celular (LAVELI-SILVA, 2017). Neste estudo foi demonstrado que nas células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MCF7, responsiva as terapêuticas hormonais, a 2-AEH₂F se mostrou eficaz na capacidade e de inibir a proliferação celular dos diferentes tempos. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a 2-AEH₂F, levando a uma redução da viabilidade celular tempo-concentração dependente. Após 24 horas as células tumorais MCF7 apresentaram aspectos de lise e formação de debris celular, a partir da concentração de 20 mM. Dados que corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo, no qual o tratamento com 2-AEH₂F mostrou-se citotóxico em células tumorais. As células MDA-MB-231 não apresentaram diferenças entre a sensibilidade dos efeitos de

toxicidade, quando comparada às células tumorais MCF-7. Entretanto, após 48 e 72 horas as células tumorais MCF7 apresentaram efeitos citotóxicos significativos, a partir da concentração de 2-AEH₂F 10 mM, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão dos prolongamentos citoplasmáticos, por isso podemos dizer que há um efeito citotóxico da 2-AEH₂F.

Contudo, o tratamento com a 2-AEH₂F nas células normais de fibroblastos humanos FN1 não apresentou o mesmo efeito citotóxico nas células tumorais de mama humana MDA-MB-231. A viabilidade celular avaliada no tempo de 24 horas, onde o efeito citotóxico significativo foi a partir da concentração de 60 mM, com a obtenção da IC₅₀% de 81 mM, enquanto nas células tumorais de mama MDA-MB-231 a IC₅₀% foi de 20,44 mM.

Fosfoetanolamina (PE) é um metabólito fosfomonoéster do metabolismo dos fosfolípidios. A PE é um fosfolípido essencial presente nos folhetos das membranas celulares e é altamente enriquecido nas membranas mitocondriais. Tem funções sobrepostas com a cardiolipina, um fosfolípido específico das mitocôndrias que é essencial para a respiração. A PE é sintetizada por múltiplas vias bioquímicas, o que inclui a via mitocondrial catalisada pela fosfatidilserina descarboxilase e pela via de Kennedy do CDP-Etalonamina no retículo endoplasmático. A via mitocondrial contribui com a maior parte da PE mitocondrial que é retida nessa organela e contribui para a função mitocondrial (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Além disso, Gohil e colaboradores identificaram um novo alvo molecular do Cloridrato de Meclizina na via de Kennedy (GOHIL, V. M. et al., 2013). Por isso, nosso grupo associou o Cloridrato de Meclizina à 2-AEH₂F no tratamento das células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231.

Com o tratamento do Cloridrato de Meclizina, as células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 apresentaram aspectos de lise, formação de debris celular, perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos e formação de precipitado no sobrenadante do composto nas maiores concentrações. Além disso, foi observado um aumento percentual da mortalidade celular, ou seja, uma diminuição significativa da densidade celular.

A IC50% obtida foi de 6,0 mM de Cloridrato de Meclizina em células de mama humana MDA-MB-231.

O tratamento com a associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F potencializou em 10 vezes o tratamento em células tumorais, quando comparado ao tratamento apenas com o Cloridrato de Meclizina. A IC50% obtida com o tratamento associado foi de 0,6 mM. Entretanto, o tratamento com o Cloridrato de Meclizina nas células normais de fibroblastos não apresentou a mesma citotoxicidade que a encontrada nas células tumorais MDA-MB-231, com a obtenção da IC50% em 27 mM. Além disso, o tratamento com a associação Cloridrato de Meclizina + 2-AEH₂F apresentou a IC50% de 31 mM, demonstrando inespecificidade em seu mecanismo de ação.

O Cloridrato de Meclizina tem atividade anticolinérgica (sua característica é inibir a ação da acetilcolina). São drogas que antagonizam nos receptores muscarínicos, e antinicotínicos por antagonizar a ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos. Os anticolinérgicos interferem na síntese, armazenamento e liberação da acetilcolina. O Cloridrato de Meclizina também atua como alvo do receptor androstano constitutivo (CAR). CAR é um membro da superfamília de receptores nucleares que regulam a expressão de genes cujos produtos atuam nas três fases do metabolismo hepático e transporte incluindo monooxigenação fase I, conjugação de fase II e transportadores de fase III que incluem proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos e polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos. CAR é expresso principalmente no fígado e nos enterócitos intestinais. Um papel cada vez mais importante do CAR como regulador de processos fisiológicos tornou-se aparente, em parte devido à capacidade do receptor de modular a disposição de substâncias endógenas, incluindo ácidos biliares, hormônio tireoidiano, heme e síntese de esteroides (YAN; XIE, 2018).

As células tumorais de mama humana triplo negativo MDA-MB-231 tratadas com o composto MβCD, resultou em mudanças na morfologia das células como, aspectos de lise, formação de debri celular, perda dos seus prolongamentos citoplasmáticos. Além disso, foi observado um aumento percentual da mortalidade celular, ou seja, uma diminuição significativa da densidade celular. A IC50% obtida foi de 1,5 mM de MβCD em células de tumorais mama humana MDA-MB-231. Contudo, o tratamento com a

associação M β CD + 2-AEH₂F não potencializou o resultado obtido com o tratamento isolado apenas com a M β CD. A IC₅₀% obtida foi de 2,5 mM. Entretanto, as células normais FN1 tratadas com a M β CD e sua associação com a 2-AEH₂F não apresentou a mesma citotoxicidade encontrada nas células tumorais, com a obtenção da IC₅₀% em 80 mM para ambos os tratamentos.

As mudanças no nível de colesterol mitocondrial induzidas pelo tratamento com M β CD podem influenciar os componentes do sítio de contato mitocondrial. Os locais de contato mitocondriais e o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) adicional estão implicados na via de apoptose mitocondrial (CROMPTON et al., 2002). Portanto, Ziolkowski e colaboradores hipotetizaram que o rompimento de microdomínios semelhantes aos microdomínios raft-like pelo tratamento com M β CD pode prevenir as alterações observadas nas mitocôndrias durante um estágio inicial de apoptose, como o comprometimento da bioenergética mitocondrial e se inchaço (ZIOLKOWSKI et al., 2010).

Além disso, Martinez-Abundis e colaboradores também estudam uma hipótese de que a M β CD rompe os microdomínios *raft-like* mitocondriais por meio da remoção do colesterol, isso poderia afetar a estrutura mitocondrial e a estrutura do metabolismo energético (MARTINEZ-ABUNDIS, E. et al.; 2007). Por isso, nosso grupo associou Metil- β -Ciclodextrina à 2-AEH₂F no tratamento das células tumorais de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231.

A edelfosina, um alquilfosfolípídeo, foi à primeira droga antitumoral que atua por meio de sua interação com os domínios dos *lipid raft* nas membranas celulares. Os *lipid rafts* são microdomínios enriquecidos em esteróis e esfingolípídeos têm desempenhado um papel importante no funcionamento correto de várias vias de sinalização de sobrevivência celular. Além disso, os *lipid raft* também foram encontrados para mediar a sinalização do receptor de morte favorecendo o desencadeamento da apoptose. Assim, os *lipid raft* são importantes para sobrevivência celular e a promoção da morte celular, destacando seu papel crítico na regulação do destino celular. Foi descoberto que a edelfosina se acumula nos *lipid raft* em diferentes tipos de células tumorais e modula o destino celular por meio do recrutamento de Fas/CD95 e de receptores adicionais de morte em *lipid raft* (JAFFRÈS et al., 2016).

Outro composto avaliado neste trabalho foi o 2,4-Dinitrofenol (DNP) nas células tumorais de mama MDA-MB-231 que apresentaram perda dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição da densidade celular, com a obtenção da IC50% em 25 mM, assim como, o tratamento com sua associação com a 2-AEH₂F resultou no aumento do percentual significativo de morte celular, com a IC50% em 27 mM, não havendo efeitos farmacológicos sinérgicos.

Em células fibroblastos normais FN1, o composto 2,4-Dinitrofenol causou perda dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição da densidade celular, com obtenção da IC50% de 31 mM. Entretanto, quando associado à 2-AEH₂F, mostrou-se tóxico em células normais FN1, com obtenção da IC50% de 7,4 mM, comparado aos demais tratamentos. A 2-AEH₂F se mostrou antagonista dos efeitos de toxicidade do 2,4-Dinitrofenol em células normais, demonstrando seu potencial efeito inibitório.

Em condições mitocondriais normais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é baixa, a produção de ATP é alta, o Ca²⁺ livre é baixo no citosol e o armazenamento de Ca²⁺ na mitocôndria é alto, mas sob controle. Existe um limite para a capacidade de armazenamento do Ca²⁺. Uma célula em estado de disfunção mitocondrial tem um mosaico de capacidade mitocondrial, com disfunção mitocondrial, a produção de ATP pode ser variável e a produção de ROS maior. Quando ROS se formam como um subproduto da respiração em condições normais, o mecanismo antioxidante mantém seguramente em níveis baixos. Quando há uma grande produção de ROS, eles atacam tudo na célula, incluindo proteínas, DNA e lipídios (GEISLER, 2019). Por isso, foi avaliada a produção de radicais lipoperoxidados nas células normais e tumorais com todos os tratamentos.

As células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 e as células de fibroblastos normais humanos FN1 tratadas com a 2-AEH₂F, o Cloridrato de Meclizina, a MβCD, o 2,4-Dinitrofenol e suas associações promoveu a diminuição da formação de radicais peroxidados lipídicos quando comparado ao grupo controle. Isto ocorre, provavelmente, pela diminuição significativa da viabilidade celular após os tratamentos, sendo que ROS são subprodutos do metabolismo celular e no método colorimétrico MTT foi

observado em células tumorais MDA-MB-231 a partir das observações obtidas nos ensaios de citotoxicidade.

O ciclo celular é controlado por uma rede de regulação, as características gerais que são conservadas a partir de levedura para humanos (MORGAN, 2007). Ele prossegue por meio de transições regulamentadas garantindo que os eventos específicos fiquem de uma forma ordenada. A descoberta de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), a elucidação dos mecanismos subjacentes de controle transcricional, a sinalização do ponto de verificação e a caracterização de vias reguladoras ubiquitina ligase revelaram que os princípios reguladores do ciclo celular geral são compartilhados entre diferentes tipos celulares (BERTOLI et. al., 2013).

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

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática. Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, entretanto, foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças causadas pelos compostos utilizados para o tratamento celular (ANAZETTI; MELO, 2007). Nas células tumorais MDA-MB-231 tratadas com 10 e 20 mM de 2-AEH₂F, foi observada a formação de vacúolos citoplasmáticos, característica de morte celular.

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo revelou que as células de tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas com as diferentes concentrações da 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, M β CD e DNP por 24 horas, mostrou que a proporção de células na fase G0/G1 diminuiu com os tratamentos e aumentou o DNA fragmentado, sugerindo que os compostos têm efeito, tanto de induzir apoptose quanto de inibir a progressão do ciclo celular, estes dados corroboram com Ferreira et al e Laveli-Silva e colaboradores que obtiveram um conjunto de efeitos da 2-AEH₂F em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, que causou aumento da proporção de células com DNA fragmentado e parada do ciclo celular em G2/M (FERREIRA et al., 2013; LAVELI-SILVA, 2017). Esses dados sugerem que em células tumorais de mama triplo-negativo, os efeitos da 2-AEH₂F e suas associações exercem funções distintas e específicas no controle da progressão do ciclo celular.

A porcentagem de células que apresentaram DNA fragmentado, após o tratamento com os compostos, aumentou significativamente em todos os tratamentos com a 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a M β CD e DNP e associações. Fato que corrobora com as alterações morfológicas observadas após todos os tratamentos de citotoxicidade, os quais foram capazes de formar agregados celulares, perda de adesão e debris celulares.

As células tumorais de mama humana triplo negativo MDA-MB-231 tratadas com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F foram marcados com a Anexina V/FITC e com iodeto de propídeo (PI) para diferenciação dos tipos de morte por apoptose e necrose. O tratamento com 2-AEH₂F nas concentrações de 10 e 20 mM diminui significativamente a porcentagem de células viáveis em ambas as concentrações, consequentemente, aumentando a morte por apoptose inicial e tardia. Estudos anteriores em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, corroboram os dados da anexina V e PI, no qual as células tumorais MCF7 sofreram uma diminuição da porcentagem de células viáveis e um aumento da porcentagem de células em apoptose tardia (LAVELI-SILVA, 2017).

O Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F diminui significativamente a porcentagem de células viáveis em ambas as concentrações, consequentemente, aumentando a morte por apoptose inicial e

tardia. Entretanto, a Metil- β -ciclodextrina e a associação com a 2-AEH₂F diminui a porcentagem de células viáveis e aumentou a porcentagem de células em apoptose inicial, corroborando com Ziolkowski e colaboradores que observaram alterações nas mitocôndrias durante um estágio inicial de apoptose, como o comprometimento da bioenergética mitocondrial e se inchaço (ZIOLKOWSKI et al., 2010). O 2,4-Dinitrofenol e sua associação com a 2-AEH₂F diminui significativamente a porcentagem de células viáveis em ambas as concentrações, consequentemente, aumentando a morte por apoptose inicial e tardia. Contudo, o tratamento com o 2,4-Dinitrofenol, em ambas as concentrações, aumentou significativamente a porcentagem de células mortas por necrose.

A apoptose é um mecanismo celular normal no desenvolvimento e na homeostase. Ela desempenha um papel na organogênese em desenvolvimento, na regulação precisa dos números de células e no mecanismo de defesa para remover células indesejadas e potencialmente mutadas. Características importantes da morte celular apoptótica são o encolhimento celular, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (JIN et al., 2007). Isto corrobora com os dados do ciclo celular, no qual aumentou DNA fragmentado em todos os tratamentos e com os dados da expressão da Anexina V/PI.

A apoptose é considerada uma das mortes celular programada que envolve a desestruturação controlada dos componentes intracelulares, evitando a inflamação e os danos às células circundantes. As caspases iniciadoras ativam caspases executoras que posteriormente coordenam suas atividades para quebrar as principais proteínas estruturais e ativar outras enzimas. As características morfológicas da apoptose resultam na fragmentação do DNA e da membrana celular. Existem várias vias apoptóticas que podem ser distinguidas pelos adaptadores e caspases iniciadoras envolvidas. A maioria dos programas apoptóticos se enquadra na categoria extrínseca ou intrínseca (MCELLWAIN, BERGER, MAK, 2018).

Vários membros da família Bcl-2 humana de proteínas reguladoras da apoptose foram identificadas, incluindo seis anti-apoptóticas, três proteínas pró-apoptóticas estruturalmente similares e diversas proteínas que interagem como agonistas ou antagonistas. Estas proteínas, por sua vez, são reguladas através

de modificações e interações pós-traducionais com outras proteínas. As proteínas da família Bcl-2 regulam todos os principais tipos de morte celular, incluindo apoptose, necrose e autofagia, operando assim como pontos nodais na convergência de múltiplas vias com grande relevância para oncologia. BCL-2, Bax e Bad são proteínas envolvidas no controle mitocondrial do complexo mecanismo de apoptose. Apresentam ações muito distintas, com efeitos opostos. Bcl-2 apresenta um efeito anti-apoptótico, enquanto, Bax e Bad têm a capacidade de induzir a morte da célula, sendo pró-apoptóticas (VIVIAN et al., 2011).

A expressão de Bax aumentou significativamente em todas as concentrações com os tratamentos 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, Metil-β-ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações, exceto no tratamento com a menor concentração do Cloridrato de Meclizina. Enquanto, a expressão de Bad aumentou apenas nas maiores concentrações de todos os tratamentos. Já a expressão do Bcl-2, diminuiu em todos os tratamentos.

As caspases são uma família de cisteína-proteases importantes para a manutenção da homeostase através de regulação da morte celular e inflamação. As caspases são endoproteases que clivam ligações peptídicas numa reação que depende de resíduos de cisteína catalítica no sítio ativo da caspase. Embora o processamento das caspases mediada por inativação pode resultar no substrato, pode também gerar moléculas de sinalização ativas que participam de processos, tais como apoptose e inflamação. Assim, as caspases têm sido amplamente classificados pelas suas funções conhecidas na apoptose. As caspases envolvidas na apoptose foram subclassificados pelo seu mecanismo de ação: caspases iniciadoras (caspase-8 e -9) ou caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) (MCELLWAIN et al., 2013; MCELLWAIN, BERGER, MAK, 2018). A ativação inadequada das caspases executoras -3, -6 e -7 é impedida por sua produção como dímeros de pro-caspases inativos que devem ser clivados pelas caspases iniciadoras. Essa clivagem entre as subunidades grandes e pequenas permite uma alteração conformacional que reúne os dois locais ativos do dímero das caspases executoras e cria uma protease madura funcional (RIEDL, SHI, 2004). Muitos estudos analisaram se alterações no gene CASP3 que codifica o executor crucial caspase-3 podem promover a tumorigênese humana (MCELLWAIN, BERGER, MAK, 2018).

Neste trabalho foram avaliadas as caspases 3 e 8 ativadas. Em todos os tratamentos houve aumento significativo da expressão da Caspase 3. Contudo, a expressão da Caspase 8 aumentou em como os tratamentos, exceto nas menores concentrações do Cloridrato de Meclizina e da Metil- β -ciclodextrina, ambas associadas com a 2-AEH₂F. A caspase-3 tem sido um dos marcadores tumorais mais estudados na pesquisa dos mecanismos apoptóticos pela sua localização na cascata das proteases, representando tanto a via intrínseca como a via extrínseca. Quando comparado ao grupo controle, as células tumorais de mama humana triplo negativa tratadas com 2-AEH₂F tiveram um aumento significativo da caspase 3. Fato que difere do tratamento com a 2-AEH₂F em adenocarcinoma de mama humana MCF7, no qual não há a expressão da Caspase 3 (FERREIRA et al., 2013; LAVELI-SILVA, 2017).

O citocromo c é uma pequena hemeproteína solúvel em transportador de elétrons, localizada em grandes quantidades na membrana mitocondrial interna. Ao transferir elétrons do complexo III para o complexo IV, o citocromo c facilita a produção de energia celular (KUHLBRANDT, 2015). Embora não seja codificado pelo mtDNA, mas por um gene localizado no braço curto do cromossomo 7, a manutenção do citocromo c no interior da mitocôndria é imperativa, uma vez que sua liberação no citosol resulta em apoptose celular. Durante a apoptose celular o citocromo c é liberado no citoplasma, onde se liga e ativa o fator de ativação 1 da protease apoptótica (Apaf-1), permitindo sua ligação ao ATP e a formação do apoptossomo em forma de anel. O apoptossomo através do seu domínio de recrutamento de caspase liga, proteoliza e ativa a procaspase-9. Em seguida, a caspase-9 ativa proteoliticamente as caspases efetoras 3, 6 e 7, atores-chave na fase de execução da apoptose celular (HILLIER et al., 2013; THEODOROS et al., 2016). A expressão do Citocromo C aumentou em todos os tratamentos, exceto na menor concentração do Cloridrato de Meclizina. Dados que corroboram para a ativação da apoptose pela via intrínseca, demonstrado pela expressão da Anexina V.

As ciclinas D, incluindo as ciclinas D1, D2 e D3, formam complexos ativos com CDK4 ou CDK6, que, por sua vez, fosforilam a proteína retinoblastoma (Rb) e direcionam a progressão da fase G1 para S. As ciclinas

D coordenam a progressão do ciclo celular com a estimulação extracelular (por exemplo, disponibilidade de fator de crescimento, disponibilidade de nutrientes e sinalização de adesão integrada). Dado o papel das ciclinas D na mediação de pistas extracelulares com a proliferação celular, não é surpreendente que a superexpressão de ciclinas D ou a hiperativação de suas CDKs cognatas contribuam diretamente para o crescimento neoplásico. Mais especificamente, a ciclina D1 atraiu ampla atenção devido à prevalência de sua desregulação em cânceres humanos. A expressão da Ciclina D1 foi avaliada em todos os tratamentos e foi observada uma diminuição da sua expressão, exceto na menor concentração do 2,4-Dinitrofenol.

O antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA) é um centro celular no metabolismo do DNA e um potencial alvo da droga (PRESTEL, et al., 2019). PCNA é uma proteína encontrada em todas as células das espécies eucarióticas com funções associadas não só com a replicação do DNA, mas também com outros processos celulares vitais, tais como a remodelação da cromatina, o reparo do DNA, a coesão de cromátide irmã e o controle do ciclo celular. PCNA foi originalmente descrito como um antígeno para a doença autoimune em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, detectada apenas nas populações de células em proliferação. Posteriormente, mostrou-se que os níveis de expressão de PCNA durante o ciclo celular são um diferencial associado com a proliferação. Nos anos seguintes, muito tem sido feito para descobrir o papel de PCNA na replicação do DNA, e uma das primeiras funções atribuídas era sua associação a DNA polimerase. O envolvimento crucial do PCNA na proliferação celular e sua associação com a transformação do câncer resultou no uso frequente do PCNA como um marcador do ciclo celular (STOIMENOV, et al., 2009; BOEHM et al., 2016). A expressão do PCNA diminuiu em todos os tratamentos, exceto na menor concentração do 2,4-Dinitrofenol associado com a 2-AEH₂F. Estes dados corroboram com os resultados do ensaio de proliferação, o qual mostrou diminuição do índice proliferativo nos tempos de 24 e 48 horas.

A caveolina-1 (CAV1) é o principal componente estrutural das caveolas, microdomínios especializados em membranas plasmáticas enriquecidas com colesterol e esfingolípides, formando invaginações em forma de frasco envolvidas na sinalização e transporte de células. O CAV1 também pode ser

encontrado nas vesículas secretoras, Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Em geral, vários fatores de crescimento, bem como estresse mecânico ou oxidativo, demonstraram iniciar endocitose mediada por caveolas e, assim, regulam numerosos processos celulares, transmitindo sinais extracelulares por vias intracelulares. A transdução de sinal CAV1 dependente regula o ciclo celular, a senescência celular, a proliferação e invasão, morte celular, assim como a composição da membrana, metabolismo lipídico e homeostase (CHIDLOW, SESSA, 2010; FERNANDEZ-ROJO et al., 2013).

A CAV1 facilita o transporte do ácido graxo e do colesterol em uma lipoproteína do complexo chaperona. A caveolina-1 também medeia o transporte da albumina e do LDL por meio da via de transcitose. A secreção da insulina é mediada pela caveolina-1 através do canal de potássio dependente de ATP e da interação com o receptor acoplado a proteína G localizada na caveola. Além disso, a caveolina-1 (CAV-1) se liga a várias proteínas envolvidas na proliferação celular, tais como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), os membros da família de proteínas de SCR, H-Ras, a proteína quinase C e Her2/Neu. CAV-1 desempenha um papel vital na iniciação e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o de mama. Além disso, a CVA-1 regula o transporte do colesterol intracelular e da organização da membrana, como um componente integral específico das membranas associadas à mitocôndria (MAMs). Devido à relevância da CAV-1 para o funcionamento mitocondrial, lipidostase e homeostase metabólica e para o controle de várias vias de sinalização integrado as MAMs (ZOU et al., 2017; KETTELER, KLEIN, 2018).

O CAV1 desempenha um papel importante na carcinogênese porque demonstrou estar superexpresso ou mutado em vários tumores humanos sólidos. No entanto, o papel do CAV1 epitelial na tumorigênese permanece controverso. A expressão regulada de CAV1 suprime o crescimento primário do tumor, bem como a proliferação e a invasão de células de câncer de mama. Além disso, níveis reduzidos de CAV1 e a re-expressão resultaram em inibição do crescimento e redução na formação de colônias (ZOU et al., 2017; KETTELER, KLEIN, 2018). A expressão da CAV 1 diminuiu em todos os tratamentos, exceto na menor concentração do Cloridrato de Meclizina e sua associação com a 2-AEH₂F e na menor concentração da Metil-β-ciclodextrina.

Além da CAV1, o CD36 também pode co-polimerizar nas caveolas. O CD36 pode ser transportado para as organelas e membranas celulares por vesículas intracelulares e extracelulares e pode regular a captação de ácidos graxos e o equilíbrio do metabolismo energético. O transporte de CD36 para a membrana celular pode ser facilitado por vários estímulos fisiológicos, dos quais os mais potentes são a insulina e a contração muscular. A contração muscular induz a localização de CD36 na membrana celular ativando a proteína quinase ativada por adenosina 5'-monofosfato (AMPK), enquanto a insulina produz esse efeito ativando o eixo de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT. Além disso, a inflamação promove a transcrição, tradução e translocação do receptor CD36 para a superfície celular (WANG, LI, 2019).

O CD36 também está presente nos endossomos, no retículo endoplasmático (ER) e nas mitocôndrias. No ER, o CD36 sofre modificação e maturação, bem como inativação mediada por ubiquidade. Além disso, o CD36 desempenha um papel crítico na oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias do músculo esquelético (WANG, LI, 2019). A expressão do CD36 foi analisada neste trabalho e observou-se diminuição significativa em todos os tratamentos.

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que mudam constantemente seu arranjo e forma em correlação com a necessidade da célula. A razão de fusão/fissão e a localização da rede mitocondrial mudam dependendo do estágio em que a célula entrou. O posicionamento das proteínas citoesqueléticas é vital na divisão celular e na distribuição das mitocôndrias. As mitocôndrias estão constantemente em contato com outras organelas, em particular retículo endoplasmático (ER) e membrana plasmática, o que ajuda a célula a manter o equilíbrio do índice de massa celular e das mitocôndrias. As mitocôndrias migram constantemente e seus movimentos dependem fortemente das proteínas, filamentos de actina e microtúbulos. As migrações no citoesqueleto causam osculação e fusão mitocondrial, necessária para o movimento mitocondrial (HORBAY, BILYY, 2016).

Neste trabalho foi analisada a morfologia mitocondrial pelo MitoRed e a morfologia do citoesqueleto pela faloidina através da microscopia Confocal a laser. Após o tratamento com 2-AEH₂F, as células tumorais MDA-MB-231 apresentaram alteração na morfologia celular, como retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, aumento nuclear e houve

diminuição na densidade celular. As mitocôndrias apresentaram aumento da capacidade oxidativa, distribuindo-se ao longo dos filamentos do citoesqueleto, principalmente na concentração de 10 mM de 2-AEH₂F, provavelmente um evento precoce da ativação das vias intrínsecas da apoptose inicial, esses dados corroboram com os dados quantitativos na expressão da Anexina V/PI. Estes dados também corroboram com os dados do tratamento com a 2-AEH₂F em células de adenocarcinoma de mama MCF7 (LAVELI-SILVA, 2017).

Nos tratamentos com o Cloridrato de Meclizina, Metil- β -ciclodextrina e 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F, houve retração citoplasmática e perda dos prolongamentos citoplasmáticos, fragmentação nuclear, além de significativa diminuição na densidade celular em todas as concentrações, também foi observado alterações na reorganização dos filamentos do citoesqueleto.

As mitocôndrias desempenham um papel central na indução e na desestruturação do DNA no processo apoptótico. A redução funcional do potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é conhecida como um gatilho para a morte celular por apoptose e este mecanismo pode ser associada com a via de sinalização apoptótica intrínseca (GALLUZZI et al., 2011). O desenvolvimento de novas moléculas alvo específicas à mitocôndria, como por exemplo, a rotenona (inibidor da cadeia respiratória) e o atractilósido (inibidor da permutação ADP/ATP). Estes compostos são capazes de modular a fosforilação oxidativa via glicolítica (GULLOTTI; YEO, 2009). Nosso grupo de pesquisa realizou um estudo com células de tumor de mama de Ehrlich, no qual a análise do $\Delta\Psi_m$ mostrou que os efeitos antitumorais da 2-AEH₂F são atribuídos à sua capacidade de induzir apoptose através de uma redução do $\Delta\Psi_m$ (FERREIRA et al., 2012). Além disso, outro estudo com a 2-AEH₂F induziu o mesmo mecanismo em células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, indicando redução no $\Delta\Psi_m$ (LAVELI-SILVA, 2017), estes dados corroboram com os achados neste trabalho, no qual foi observada a diminuição do potencial elétrico mitocondrial em todos os tratamentos marcados com a Rodomina 123 e analisado por microscopia Confocal a laser e por citometria de fluxo.

JC-1((5,5',6,6'-tetracloro1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), é sonda composta por um multímero de carbocianina que permite distinguir diferentes potenciais de membrana por meio do espectro de emissão de

fluorescência. Neste estudo a sonda JC-1 também foi utilizada para a avaliação do $\Delta\Psi_m$, a marcação resultou em células com alto e baixo potencial elétrico. Todos os tratamentos apresentaram um aumento no índice de células com baixo potencial elétrico, sendo mais significativo no tratamento com 20 mM de 2-AEH₂F e nos tratamentos com o Cloridrato de Meclizina e sua associação farmacológica.

CFSE-DA é um traçador fluorescente de membrana permeável que pode marcar células por ligação covalente a moléculas intracelulares. O método de marcação das células com CFSE-DA é um simples processo que elimina o uso de materiais radioativos e resulta num sinal fluorescente brilhante, que é facilmente detectado pelo citômetro de fluxo. As células marcadas que morrem durante o período de cultura permanecem detectáveis até desintegrarem. Estas células em apoptose e fragmentos celulares podem causar aumento geral e sinais de incorporação ou distribuição do CFSE-DA com menor definição que podem afetar artificialmente os resultados (TOLEDO-PIZA et al., 2013).

A partir dos resultados obtidos no teste de citotoxicidade MTT foram escolhidas as concentrações utilizadas para o ensaio de proliferação. As células tumorais de mama MDA-MB-231 foram tratadas com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a M β CD, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F nos tempos de 24 e 48 horas. Em todos os tratamentos ocorreu diminuição significativa da proliferação celular. Dados que corroboram os achados no teste colorimétrico MTT.

O estresse oxidativo refere-se a níveis intracelulares elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos aos lipídios, proteínas e DNA. O estresse oxidativo tem sido associado a uma infinidade de doença. Sabe-se que os radicais livres de oxigênio e outras espécies reativas de oxigênio são formados em todos os organismos aeróbicos e desempenham uma infinidade de papéis úteis. No entanto, alguns deles têm o potencial de causar danos às biomoléculas, o que se pensa contribuir para o desenvolvimento e progressão de certas doenças (GUTTERIDAE, HALLIWELL, 2018). A produção de ROS foi analisada após 24 horas de tratamento com 2-AEH₂F, Cloridrato de Meclizina, a Metil- β -Ciclodextrina, 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F, em todas as concentrações e tratamentos foram observadas um aumento da produção de ROS.

Nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados significativos com o tratamento da 2-AEH₂F em diversas linhagens tumorais e normais. Por isso, estudos com a sua associação a compostos que inibem a respiração mitocondrial, afetam o metabolismo energético e a produção de ROS, que são de grande relevância para a compreensão das possíveis vias reguladas pela atividade da 2-AEH₂F. Assim como, neste trabalho foi obtido os valores de IC₅₀% com os tratamentos com a 2-AEH₂F, o Cloridrato de Meclizina, a M β CD, o 2,4-Dinitrofenol e suas associações, as alterações morfológicas após o tratamento e visualizadas em microscópio de Luz e na microscopia Confocal a Laser, as alterações nas porcentagens celulares das fases do ciclo celular e a diminuição do índice proliferativo sugerem o uso destes compostos como agentes antitumorais capazes de induzir morte celular.

Os resultados mostram a capacidade da 2-AEH₂F de novas associações terapêuticas, notoriamente com o Cloridrato de Meclizina, que possam contribuir para impulsionar a reprogramação metabólica em células tumorais de câncer de mama triplo negativa, que na prática clínica desenvolvem mecanismos de resistência terapêutica. As respostas podem modificar ser em mecanismos intrínsecos e extrínsecos. Os sinais intrínsecos incluem oncogenes e genes supressores de tumor que regulam as vias metabólicas em múltiplos níveis em diferentes compartimentos celulares. Existem vários reguladores do metabolismo do câncer de mama, como fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI3K), MYC, ER, BRCA1 e p53. O metabolismo energético alterado é uma nova característica emergente do câncer. Evidências crescentes sugerem que alterações no metabolismo do câncer, especialmente o fosfolípido da colina e o metabolismo de aminoácidos, podem fornecer alvos potenciais para o tratamento do câncer de mama (CUI et al., 2016; CAMARDA, 2017).

O desenvolvimento da neoplasia mamária e seu prognóstico durante o tratamento vêm sendo relacionados ao excesso de peso mensurado mediante o IMC. Como consequência do peso excedente, a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, fatores chave na gênese tumoral (GU et al., 2011). Estudiosos afirmam que a medida do peso e a concentração abdominal da gordura podem estar relacionadas tanto ao desenvolvimento do câncer de

mama quanto ao agravo do prognóstico da doença. Em adição, a relação entre adiposidade corporal e câncer de mama vem sendo observada, pois o aumento da gordura abdominal se correlaciona com maior probabilidade de recidiva e menor tempo de sobrevida das pacientes portadoras desse tipo de neoplasia. Assim, a medida da circunferência da cintura é importante porque avalia a adiposidade central e tem a finalidade de estimar um risco adicional para as doenças crônicas não-transmissíveis (BERGMANN et al., 2012). O perfil lipídico parece influenciar no risco para o câncer de mama na presença de um IMC elevado. Estudos prévios que taxas aumentadas de colesterol total e frações e triglicérides podem estar relacionadas ao aumento do risco de câncer de mama. O resultado obtido neste estudo mostrou excesso de peso no grupo experimental, sugerindo conexão entre o acúmulo de gordura e incidência de câncer de mama em fase pré-menopausa (MARTINS et al., 2012).

Existe uma hipótese de que as alterações nas concentrações de lipídios séricos neste tipo de neoplasia podem ser resultado do aumento da produção do fator de necrose tumoral (TNF), citocina pró-inflamatória liberada pelo tumor, que é ativada por macrófagos e tem ação de estimular a lipólise, inibir a liberação de insulina, promover resistência à insulina e ainda inibir a lipoproteína lipase (LPL), que é o regulador mais importante para a deposição dos triglicerídeos. A LPL, através do estímulo da insulina, é responsável pela hidrólise de triglicérides das lipoproteínas de muito baixa densidade, agindo como um “adipostato”. Uma característica determinante das neoplasias é a proliferação celular rápida e excessiva que exige cada vez mais a biogênese de membranas e manutenção da integridade celular. Portanto, como os lipídios são os principais constituintes das membranas, as células proliferativas preenchem as suas elevadas exigências de lipídios, buscando-os na circulação ou pela síntese de novos lipídios, ou pela degradação de lipoproteínas. As alterações lipídicas e a susceptibilidade das lipoproteínas à oxidação são fatores que contribuem para o estresse oxidativo, pois com a peroxidação lipídica, há uma maior utilização de lipídios, incluindo colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas para a síntese de membranas (NASCIMENTO et al., 2016).

Os estímulos extrínsecos às células compreendem a disponibilidade de nutrientes, hipóxia, acidose e a interação do tumor com componentes do seu

microambiente, incluindo vasos sanguíneos adjacentes, células imunes, fibroblastos, células inflamatórias, linfócitos e a matriz extracelular. Esses fatores criam uma pressão seletiva sobre as células tumorais, onde sobrevivem apenas as células que passam por uma transformação metabólica favorável. As alterações nas vias / fluxos metabólicos induzidas por fatores extrínsecos ou intrínsecos frequentemente colidem umas com as outras, fornecendo caminhos para vários ciclos de *feed forward* e *feedback*. Estudos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a ressonância magnética de prótons mostraram que o receptor de estrógeno E2 induz a glicólise, enquanto o Tamoxifeno (modulador seletivo do receptor de estrógeno oral, antagonista do receptor de estrogênio), reduz a glicose. Esta regulação foi mediada via receptor de glicose GLUT1 que foi transcricionalmente regulada por E2 (RIVENZON-SEGAL, 2003).

O receptor E2 induz a ativação rápida iniciada pela membrana da via PI3K-Akt, bem como a regulação positiva transcricional da 6-fosfofruto-2-quinase (PFKFB3). Esses estudos revelam alvos terapêuticos adicionais a serem usados em conjunto com a terapia hormonal, por exemplo, dos fosfolipídeos e de inibidores da cadeia respiratória. Baseado nos níveis de expressão do receptor hormonal; os tumores ER + apresentaram níveis mais baixos de glicina, colina, lactato e glutamato (glutamina alta) em comparação aos tumores ER -. O baixo índice de glutamato para glutamina está correlacionado com os níveis mais baixos de glutaminólise observados nos tumores ER + em comparação com o TNBC (KO et al., 2010; CAO et al., 2014).

O metabolismo alterado como uma vulnerabilidade terapêutica é tão promissor quanto desafiador. A plasticidade metabólica não precisa ser inerente, mas pode ser adaptativa, associada ao estágio de progressão do tumor, da presença de metástases e no tipo de tratamento administrado. Outro aspecto abordado neste projeto foi à complexidade das interações dos estímulos extrínsecos, como a disponibilidade de nutrientes; hipóxia e níveis de pH extracelular que frequentemente coordenam o programa metabólico de uma célula tumoral. O microambiente tumoral é frequentemente modificado pelas células tumorais para auxiliar na reprogramação metabólica, facilitando seu crescimento e proliferação de maneira simbiótica. As informações dessas áreas ativas de pesquisa devem ajudar a descobrir novas estratégias terapêuticas e

reutilizar as drogas existentes para uma intervenção eficaz, como a associação da fosfoetanolamina sintética e o Cloridrato de Meclizina, supostamente haverá uma contribuição positiva para pacientes portadoras desse tipo de tumores.

Os resultados de nosso estudo demonstraram que o MC associado ao tratamento com 2-AEH₂F mostrou especificidade para células de adenocarcinoma de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 quando comparado à citotoxicidade obtida em células de fibroblastos normais humanos (FN1) (IC50% ~ 30 vezes). Entretanto, o 2,4-Dinitrofenol associado a 2-AEH₂F mostrou-se 5 vezes mais citotóxico em células normais FN1, quando comparado ao composto isolado. Estes dados levantam a hipótese de que a associação farmacológica poderá modular os efeitos proliferativos induzidos pelo estroma tumoral, uma vez que a transformação de miofibroblastos está envolvida na transformação da glândula mamária normal.

O aplicativo web SynergyFinder facilita a visualização e análise de dados de combinação de medicamentos a partir de ensaios de matriz de alta taxa de dose-resposta. O uso de múltiplos modelos de referência na matriz de dose-resposta completa deve fornecer uma maneira imparcial e direta de avaliar a significância pré-clínica das combinações medicamentosas para aplicações clínicas emocionantes (IANEVSKI, 2020). A partir disso, neste aplicativo os compostos CM, MBCD e DNP foram analisados em comparação com a 2-AEH₂F para avaliar a sinergia entre os compostos.

A comparação do Cloridrato de Meclizina e a 2-AEH₂F mostrou efeito sinérgico, ou seja, o efeito citotóxico nas células tumorais de mama MDA.MB.231 foi potencializado quando tratado com a associação do CM com a 2-AEH₂F. Estes dados corroboram com os resultados obtidos no teste colorimétrico MTT. Contudo, a comparação dos demais compostos em comparação com a 2-AEH₂F nas células tumorais mostrou efeito aditivo.

Nas células de fibroblastos normais FN1, todos os compostos em comparação com a 2-AEH₂F mostraram ter efeito aditivo.

As combinações de medicamentos tornaram-se uma terapia padrão para várias doenças complexas, como a maioria dos cânceres avançados. Isso porque tratamentos multidirecionados podem levar a benefícios terapêuticos tanto por aumentar a eficácia do tratamento quanto por evitar a aquisição de resistência à monoterapia. Combinações de medicamentos que mostram a

maior sinergia entre todas as combinações examinadas são então selecionadas para desenvolvimento e testes adicionais em direção a opções de tratamento seguras e eficazes. Assim, ferramentas fáceis de usar que permitem a identificação imparcial de combinações sinérgicas a partir de dados experimentais de alto rendimento são altamente necessárias para um processo de descoberta sistemático e reprodutível.

6- CONCLUSÃO

- ❖ A fosfoetanolamina sintética (2-AEH₂F) apresentou atividade citotóxica em células de tumores de mama humana triplo negativo MDA.MB.231. As concentrações inibitórias IC50% obtidas mostraram que os tratamentos com a 2-AEH₂F apresentaram citotoxicidade significativa na linhagem de câncer de mama humana triplo negativo.
- ❖ Os compostos Cloridrato de Meclizina, Metil-B-ciclodextrina e 2,4-Dinitrofenol e suas associações com a 2-AEH₂F apresentaram citotoxicidade nas células MDA.MB.231.
- ❖ A associação da 2-AEH₂F com o Cloridrato de Meclizina mostrou atividade citotóxica 10 vezes mais quando comparado apenas ao tratamento com o Cloridrato de Meclizina nas células tumorais. Essa associação possui efeito sinérgico, segundo o software SynergyFinder 2.0.
- ❖ Todos os tratamentos apresentaram diminuição do índice proliferativo nos tempos de 24 e 48 horas. Os resultados da diminuição da expressão do marcador PCNA, corroboram com os dados obtidos no ensaio de proliferação.
- ❖ O potencial elétrico mitocondrial diminui nas células MDA.MB.231 quando tratadas com a 2-AEH₂F, o CM, a MBCD e o DNP e suas associações, conforme mostrado nos resultados com marcação da Rodamina 123 e da sonda JC-1.
- ❖ A produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentou em todos os tratamentos com a 2-AEH₂F, o CM, a MBCD e o DNP e suas associações na linhagem tumoral de mama humana triplo negativa.
- ❖ Com as análises por microscopia confocal a laser, foi observado formação de vacúolos com o tratamento com a 2-AEH₂F em células tumorais MDA.MB.231.

REFERÊNCIAS

Anazetti, M. C.; Melo, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**. 2007.

Ayoub, N. M.; Al-Shami, K. M.; Yaghan, R. J. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches. **Breast Cancer**, 11:53-69, 2019.

Bakovic, M.; Fullerton, M. D.; Michel, V. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Biochem. Cell Biol**, 85: 283-200, 2007.

Bergmann, R. B.; Vicari, I. A.; Gonçalves, C.; Duval, P. A.; Abib, R. T. Estado nutricional e obesidade abdominal de mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico. **XIV Enpos**. Pelotas, RS, Brasil. 2012.

Bertoli, C.; Skotheim J. M.; Bruin, R. A. M. Controle da transcrição do ciclo celular durante as fases G1 e S. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v. 14, p.518 – 528, 2013.

Bianchini, G.; Balko, J. M.; Mayer, I. A.; Sanders, M. E.; Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature reviews**. 2016.

Biswas, S. K. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. **IMMUNITY**. 43: 435-449, 2015.

Boehm E. M.; Gildenberg, M. S.; Washington, M. T. Os muitos papéis do PCNA na replicação do DNA eucariótico. **Enzimas**. 39: 231–254. doi: 10.1016 / bs.enz.2016.03.003. 2016.

Cairns, R.A.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Regulation of cancer cell metabolismo. **Nat. Rev. Cancer**. 11: 85-95, 2011.

Camarda, R.; Williams, J.; Goga, A. *In vivo* Reprogramming of Cancer Metabolism by MYC. **Front. Cell Dev. Biol.**, 5, 35. 2017.

Camarda, R.; Zhou, AY; Kohnz, RA; Balakrishnan, S.; Mahieu, C.; Anderton, B.; Eyob, H.; Kajimura, S.; Tward, A.; Krings, G.; et al. Inibição da oxidação de ácidos graxos como terapia para o câncer de mama tri-negativo com superexpressão de MYC. **Nat. Med.** 22 , 427-432. 2016.

Cao, M. D.; Lamichhane, S.; Lundgren, S.; Bofin, A.; Fjosne, H.; Giskeodegard, G.F.; Bathen, T.F. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. **BMC Cancer**, 14, 941. 2014.

Carazo, A.; Dusek, J.; Holas, O.; Skoda, J.; Hyrsova, L.; Smutny, T.; Soukup, T.; Dosedel, M.; Pávek, P. Teriflunomide Is an Indirect Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activator Interacting With Epidermal Growth Factor (EGF) **Signaling. Pharmacol.** 2018.

Chidlow JH, Jr., Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. **Cardiovasc Res**; 86: 219– 25, 2010.

Crompton, M.; Barksby, E.; Johnson, N.; Capano, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. **Biochimie.** 84: 143–152, 2002.

Crul, M.; Rosing, H.; Klerk, G. H.; Dubbelman, R.; Traiser, M.; Reichert, S.; Knebel, N. G.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; Bokkel-Huinink, W. W. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. **Eur. J. Cancer** 38: 1615–1621, 2002.

Curtis, C., et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature.** 486: 346-352, 2012.

Cuyas, E.; Fernandez-Arroyo, S.; Alarcon, T.; Lupu, R.; Joven, J.; Menendez, J.A. Germline BRCA1 mutation reprograms breast epithelial cell metabolism towards mitochondrial-dependent biosynthesis: Evidence for metformin-based "starvation" strategies in BRCA1 carriers. **Oncotarget.** 7: 52974–52992. 2016.

Di Masi, A.; De Marinis, E.; Ascenzi, P.; Marino, M. Nuclear receptors CAR and PXR: molecular, functional, and biomedical aspects. **Mol. Aspects Med.** 30: 297–343, 2009.

Dine, J.; Deng, C. X. Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research. **Cancer Metastasis Rev.** 32: 25-37, 2018.

Detmar, M.; Geilen, C.C.; Wieder, T.; Orfanos, C.E.; Reutter, W.J. Phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis of human epidermal keratinocytes *in vitro*. **Invest. Dermatol.** 102: 490–494 1994.

Donepudi, M. S.; Kondapalli, K.; Amos, S. J.; Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. **Journal of Cancer Research and Therapeutics.** v. 10, 2015.

Eue, I. Growth inhibition of human mammary carcinoma by liposomal hexadecylphosphocholine: participation of activated macrophages in the antitumor mechanism. **Int. J. Cancer** 2: 426–433, 2001.

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

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

Ferreira, A. K.; Meneguelo, R.; Pereira, A.; Filho, O. M. R.; Chierice, G. O.; Maria, D. A. Anticancer effects of synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Research.** 32: 95-104, 2012.

Ferreira, A. K.; Meneguelo, R.; Pereira, A.; Mendonça, O. R. F.; Chierice, G. O.; Maria, D. A. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 67: 481–487, 2013.

Fernandez-Rojo MA, Gongora M, Fitzsimmons RL, et al. Caveolin-1 is necessary for hepatic oxidative lipid metabolism: evidence for crosstalk between caveolin-1 and bile acid signaling. **Cell Rep.** 4; 238– 47. 2013.

Gao, P.; Tchernyshyov, I.; Chang, T. C.; Lee, Y. S.; Kita, K.; Ochi, T.; Zeller, K. I.; De Marzo, A. M.; Van Eyk, J. M.; Mendell, J. T.; Dang, C V. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. **Nature**. 458: 762-765, 2009.

Garofalo, T. Lipid microdomains contribute to apoptosis associated modifications of mitochondria in T cells. **Cell Death Differ**. v. 12, p. 1378–1389, 2005.

Geisler, J. G. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. **Cells**. 8: 280, 2019.

Gohil, V. M.; Sheth, S. A.; Nilsson, R.; Wojtovich, A. P.; Lee, J. H.; Perocchi, F.; Chen, W.; Clish, C. B.; Ayata, C.; Brookes, P. S.; Mootha, V. K. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nat. Biotechnol**, v. 28, p. 249–255, 2010.

Gohil, V. M.; Zhu, L.; Baker, C. D.; Cracan, V.; Yaseen, A.; Jain, M.; Clish, C. B.; Brookes, P. B.; Bakovic, M.; Mootha, V. K. Meclizine Inhibits Mitochondrial Respiration through Direct Targeting of Cytosolic Phosphoethanolamine Metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 35387–35395, 2013.

Gu, J. W.; Young, E.; Patterson, S. G.; Makey, K. L.; Wells, J.; Huang, M. et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. **Cancer Biol Ther**. 11(10):910-7, 2011.

Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications** 502: 183-186, 2018.

Hammond, M.E.; Hayes, D.F.; Dowsett, M.; Allred, D.C.; Hagerty, K.L.; Badve, S.; Fitzgibbons, P.L.; Francis, G.; Goldstein, N.S.; Hayes, M.; et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol*. **2010**, 28, 2784–2795.

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

Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C, et al. The DNA sequence of human chromosome 7. **Nature**. 424(6945):157–64. doi:10.1038/nature01782. 2003.

Horbay, R.; Bilyy, R. Mitochondrial dynamics during cell cycling. **Apoptosis** 21:1327–1335, 2016.

Horn, J.; Vatten, L. J. Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. **International journal of women's health**. 9:265-272, 2017.

Ianevski A.; Giri A. K.; Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. **Nucleic Acids Res**. 2;48: 488-493, 2020.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

Jaffrès et al. Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics** 165: 114–131, 2016.

Jesinger, R. A. Breast Anatomy for the Interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**. 17: 3-9, 2014.

Johnson, L. V.; Walsh, M. C.; Chen, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine-123. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 77: 990-994, 1980.

Jung, S.; Wang, M.; Anderson, K.; et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. **International journal of epidemiology**. 45:916-928, 2016.

Kamarajugadda, S.; Stemboroski, L.; Cai, Q.; Simpson, N. E; Nayak, S.; Tan, M.; Lu, J. A oxidação da glicose modula anoikis e metástase de tumor. **Mol. Célula. Biol**. 32 , 1893–1907. 2012.

Kaplan, H. G.; Malmgren, J. A. Impacto do fenótipo triplo negativo no prognóstico do câncer de mama. **Breast J**. 14: 456-463, 2008.

Keegan, T. H. M.; DeRouen, M. C.; Press, D. J.; Kurian, A. W.; Clarke, C. A. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. **Breast Cancer Research**. 14:55, 2012.

Ketteler, J.; Klein, D. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. **International journal of cancer** 143: 2092-2104, 2018.

Kreeger, P. K.; Lauffenburger, D. A. Cancer systems biology: a network modelin perspective. **Carcinogenesis**. 31: 2-8, 2010.

Ko, B.H.; Paik, J.Y.; Jung, K.H.; Lee, K.H. 17beta-estradiol augments 18F-FDG uptake and glycolysis of T47D breast cancer cells via membrane-initiated rapid PI3K-Akt activation. **J. Nucl. Med.**, 51, 1740–1747. 2010.

Koobotse, M.; Holly, J.; Perks, C. Elucidando a nova função BRCA1 como uma restrição metabólica não genômica em linhas de células de câncer de mama ER-positivas. **Oncotarget** . 9: 33562-33576, 2018.

Korde, A. S.; Creed, P. L.; Craddock, S. D.; Maragos, W. F. The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. **Journal of Neurochemistry**. v.94, n. 1676-1684, 2005.

Kuhlbrandt W. Estrutura e função dos complexos de proteínas da membrana mitocondrial. **BMC Biol** 13:89. doi: 10.1186 / s12915-015-0201-x. 2015.

Lanning, NJ; Castle, JP; Singh, SJ; Leon, AN; Tovar, EA; Sanghera, A .; MacKeigan, JP; Filipp, FV; Graveel, CR O perfil metabólico de células com câncer de mama triplo negativo revela vulnerabilidades metabólicas. **Cancer Metab**. 5 , 6, 2017.

Laveli-Silva, M. G. Antitumor evaluation of synthetic phosphoethanolamine and liposomal formulation DODAC/synthetic phosphoethanolamine in human breast tumor cells. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2017. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-11052017-142120/pt-br.php>.

LeBleu, VS; O'Connell, JT; Gonzalez Herrera, KN; Wikman, H .; Pantel, K .; Haigis, MC; de Carvalho, FM; Damascena, A .; Domingos Chinen, LT; Rocha, RM; et al. O

PGC-1 α medeia a biogênese mitocondrial e a fosforilação oxidativa em células cancerígenas para promover metástases. **Nat. Cell Biol.** 16 , 992–1003. 2014.

Lien, C. E.; Lyssiotis, C. A.; Cantley, L. C. Reprogramação metabólica pela via PI3K-Akt-mTOR no câncer. **Cancer Res.** 207: 39-72, 2016.

Lin, J. C. et al. Induction of apoptosis and cell-cycle arrest in human colon cancer cells by meclizine. **Food and Chemical Toxicology.** 45: 935-944, 2007.

Liu F, et al. Beyond transcription factors: how oncogenic signalling reshapes the epigenetic landscape. **Nat Rev Cancer.** 2016.

Liu T, Liu WH, Zhao JS, Meng FZ, Wang H. Lutein protects against beta-amyloid peptide-induced oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells through modulation of Nrf-2 and NF-kappaB. **Cell Biol Toxicol.** 33:57–67. 2017.

Lu, P.; Weaver, V. M.; Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol,** 196: 395-406, 2012.

Martins, K. A.; Freitas-Junior, R.; Monego, E. T.; Paulinelli, R. R. Antropometria e perfil lipídico em mulheres com câncer de mama: um estudo caso-controle. **Rev Col Bras Cir.** 39(5):358-63, 2012.

Miller, L. D.; Chou, J. A.; Black, M. A. et al. Subtipos imunogênicos de câncer de mama delineados por classificadores de genes de resposta imune. **Cancer Immunol Res.** 4 (7): 600–610, 2016.

Mollinedo, F.; Gajate, C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. **Adv Biol Regul.** 57: 130–146, 2015.

Moscona, A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 43: 184-94, 1957.

Nascimento, A. P. S.; Freitas, B. S. A.; Marreiro, D. N.; Araújo, C. G. B.; Brito, A. K. S. Estado nutricional e avaliação do perfil lipídico em mulheres com câncer de mama

(Nutritional status and evaluation of lipid profile in women with breast cancer). **Rev Bras Nutr Clin.** 31 (1): 49-54, 2016.

Nishant, G.; Das, G. M. Review Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications . **Cells.** 8(2): 89, 2019.

Nomura, D. K.; Long, J. Z.; Niessen, S.; Hoover, H. S.; Ng, S. W.; Cravatt, B F.. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. **Cell**, 140: 49-61, 2010.

O'Toole, S. A.; Beith, J. M.; Millar, E. K.; West, R.; McLean, A.; et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. **J Clin Pathol.** 2013

Outhouse, E. L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J.** 30: 197-201, 1963.

Papandreou, I.; Cairns, R. A.; Fontana, L.; Lim, A. L.; Denko, N. C. HIF-1 medeia a adaptação à hipóxia através da regulação negativa do consumo de oxigênio mitocondrial. **Cell Metab.** 3: 187–197, 2006.

Park, JH; Vithayathil, S .; Kumar, S .; Sung, PL; Dobrolecki, LE; Putluri, V .; Bhat, VB; Bhowmik, SK; Gupta, V .; Arora, K .; et al. Src controlado por oxidação com ácidos graxos vincula a reprogramação da energia mitocondrial e propriedades oncogênicas no câncer de mama triplo-negativo. **Cell Rep.** 14, 2154-2165. 2016.

Pavlovic, Z.; Bakovic, M. Regulation of phosphatidylethanolamine homeostasis—the critical role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Int. J. Mol. Sci.** 14, 2529–2550, 2013.

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

Pelicano, H.; Zhang, W.; Liu, J.; Hammoudi, N.; Dai, J .; Xu, RH; Pusztai, L .; Huang, P. Disfunção mitocondrial em algumas linhas celulares triplo-negativas de câncer de mama: papel da via mTOR e potencial terapêutico. **Res.** 16 , 434. 2014.

Peoru, C. M.; Sorlie, T. Eisen, M. B.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 406 (6797): 747- 752. 2000.

Pereira, B.; Chin, S. F.; Rueda, O. M.; Vollan, H. K.; Provenzano, E.; Bardwell, H. A.; Pugh, M.; Jones, L.; Russell, R.; Sammut, S. J.; et al. O perfil de mutações somáticas de 2.433 cânceres de mama refina suas paisagens genômicas e transcriptômicas. **Nat. Comum**. 7: 11479, 2016 .

Perry, T. L.; Berry, K.; Hansen, S.; Diamond, S.; Monk, C. Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. **J Neurochem**. 18: 513-519, 1971.

Prestel, A., Wichmann, N., Martins, JM et al. Os motivos de interação do PCNA revisitados: pensando fora da caixa PIP. **Célula. Mol. Life Sci**. 76, 4923–4943 (2019).

Rakha, E. A.; Reis-Filho, J. S.; Ellis, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Oncol**. 26:2568–2581. 2008.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5: 897–907, 2004.

Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Gálvez, X.; Jiménez-López, J. M.; Carrasco M. P. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta** 1657–1667, 2017.

Rivenzon-Segal, D.; Boldin-Adamsky, S.; Seger, D.; Seger, R.; Degani, H. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. **Int. J. Cancer**. 107, 177–182. 2003.

Rotig A. Genetics of mitochondrial respiratory chain deficiencies. **Rev Neurol**. 70:309–22. 2014.

Rudrangi, S.; R.; S.; Bhomia, R.; Trivedi, V.; Vine, G. J.; Mitchell, J. C.; Alexander, B. C. Stephen Richard Wicks Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 381-390, 2015.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A.. **Cancer Statistics, CA Cancer J Clin.** 67 : 7-30, 2017.

Sørbye, T.; Tibshirani, R.; Parker, J.; et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **PNAS.** 100 (14): 8418- 8423. 2003.

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

Sun, Y.; Zhao, Z.; Yang, Z. N.; Xu, F.; Lu, H.; Zhu, Z.; Shi, W. Jiang, J.; Yao, P. **Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci.** 13:1387-1397, 2017.

Theodoros, E.; Georgios, P.; Vassilios, L. Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage. **Frontiers in Immunology** 2016.

Toledo-Piza, A. R.; Nakano, E.; Rici, E. E. G.; Maria, D. A. Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. **Cell Prolif.** v. 46, p. 97-108, 2013.

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

Van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim. Biofísica Acta** , 1831: 663 – 674, 2013.

Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 9: 112-24, 2008.

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

Wang J, Li Y. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. **Theranostics** 9(17):4893-4908, 2019.

Ward, P.S.; Thompson, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. **Cancer Cell**, 21: 297-308, 2012.

Wickramasekera, N. T.; Supressor de tumor GM p53 e receptores de estrogênio na comunicação nuclear-mitochondrial. **Mitocôndria**. 16 : 26–37, 2014.

Wise, D.R.; DeBerardinis, R. J.; Mancuso, A.; Sayed, N.; Zhang, X. Y.; Pfeiffer, H. K.; Nissim, I.; Daikhin, E.; Yudkoff, M.; McMahon, S. B.; Thompson, C. B. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 105: 18782-18787, 2008.

Wu Y, Geng XC, Wang JF, Miao YF, YL L, Li B. The HepaRG cell line, a superior in vitro model to L-02, HepG2 and hiHeps cell lines for assessing drug-induced liver injury. **Cell Biol Toxicol**. 32:37–59. 2016.

Xu, J.; Chen, Y.; Olopade, O. I. MYC e câncer de mama. **Genes Cancer**. 1 , 629-640, 2010.

Yang, P.; Tseng, H.; Peng, H.; Chen, W.; Chiu, S. Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. **International Journal of Oncology**. 2011.

Yan, J.; Chen, B.; Lu, J.; Xie, W. Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism. **Acta Pharmacol. Sin**. 36, 62–70, 2015.

Yan, J.; Xie, W. Constitutive androstane receptor. **Comprehensive Toxicology**. 8: 148-160, 2018.

Zack, F.; Blaas, V.; Goos, V.; Rentsch, D.; Büttner, A. Death within 44 days of 2,4-dinitrophenol intake. **Int J Legal Med**, 2016.

Zhou X, Kannisto K, Curbo S, von Döbeln U, Hulténby K, Isetun S, et al. Thymidine kinase 2 deficiency-induced mtDNA depletion in mouse liver leads to defect beta-oxidation. **PLoS One**. 2013.

Ziolkowski, W.; Szkatula, M.; Nurczyk, A.; Wakabayashi, T.; Kaczor, J.; Olek, R. A.; et al. Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics. **FEBS Letters** 584: 4606–4610, 2010.

Zou, M., Li, Y., Xia, S., Chu, Q., Xiao, X., Qiu, H., Yu, S. Knockdown of CAVEOLIN-1 Sensitizes Human Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer Cells to Radiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 778–791. doi:10.1159/000485291. 2017.