Antenor Pereira Bonfim Neto

O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal DODAC na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e
da Hemostasia.
Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto
Maria

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO
2018

Antenor Pereira Bonfim Neto

O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal DODAC na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama

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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bonfim Neto, Antenor Pereira

O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal DODAC na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama / Antenor Pereira Bonfim Neto. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Apoptose 3.Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais 4.Neoplasias 5.Morte celular 6.Ciclo celular 7.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-243/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“O PAPEL PRÓ-APOPTÓTICO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA NA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DODAC NA VIA ENVOLVIDA NA QUIMIORESISTÊNCIA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA”**, registrada com o nº **011/17**, sob a responsabilidade de **Durvanei Augusto Maria e Antenor Pereira Bonfim Neto**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 15.02.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-02-2017 Término: 13-02-2019
Espécie/linhagem/raça	Células
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 15 de Fevereiro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BONFIM NETO, Antenor Pereira

Titulo: O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal DODAC na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À todos que de alguma forma torceram pelo
sucesso dessa pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrada minha sincera gratidão.

Agradeço a CAPES pela bolsa fornecida durante todo este período, que foi essencial para desenvolvimento desta tese.

Agradeço ao meu orientador Dr. Durvaneí Augusto Maria, não só pela paciência, orientação, aprendizagem e contribuição em meu desenvolvimento profissional, mas principalmente pela confiança depositada e oportunidade oferecida desde o início do doutorado, principalmente quando me ausentei para seguir na carreira docente.

Aos meus queridos companheiros e ex-companheiros de laboratório, com os quais acabei passando mais tempo que com minha própria família e que alguns acabaram se tornando verdadeiros amigos. Cada qual com seu jeito peculiar com os quais sempre tive o que aprender. Agradeço pelo convívio, pelas risadas e momentos de descontração, pelos apuros, sofrimentos, preocupações, apoio científico e emocional.

A Pós-Graduação em Ciências médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter disponibilizado a oportunidade de participar como aluno, desenvolvendo meu projeto com todo apoio.

A todos os meus amigos que fiz dentro da pós-graduação, que ouviram desabaços, compartilharam risadas e participaram dessa jornada, especialmente à Manu e a Larissa, que fizeram essa etapa da minha vida mais leve, com muitas risadas até quando estava tudo dando errado, obrigado meninas. Manu, você me salvou!

Aos meus inúmeros outros amigos, pelo enorme apoio ao ver meu esforço, me incentivando a sempre continuar nesse caminho.

A toda minha família pelo incentivo e apoio nessa etapa da minha vida. Vocês são muito importantes para mim.

*“A mão queimada ensina melhor. Depois disso o
conselho sobre o fogo chega ao coração.”*

J.R.R. Tolkien

RESUMO

Bonfim Neto AP. *O papel pró-apoptótico da fosfoetanolamina sintética na formulação lipossomal dodac na via envolvida na quimioresistência de células de câncer de mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A Fosfoetanolamina sintética (FOS) é uma molécula análoga aos fosfolípidios de membrana celular com propriedades antitumorais, antiinflamatórias e antiproliferativas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu diversos estudos com a FOS mostrando resultados satisfatórios quanto à sua eficácia antitumoral. Neste estudo foram avaliados os efeitos antitumorais in vitro da Fosfoetanolamina e da formulação lipossomal DODAC/FOS em linhagem de carcinoma de mama murino (4T1). Os efeitos da citotoxicidade da FOS na linhagem tumoral 4T1 foi avaliado pela determinação da viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT e os valores obtidos da IC50% foram de 40mM e 20mM nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente. Com o tratamento com o lipossoma DODAC vazio nas células 4T1 a IC50% foi de 0,5 mM e 0,09 nos períodos de 6 e 12 horas, respectivamente e com o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/Pho-s a IC50% de 0,78mM em 6 horas e 0,17mM em 12 horas de tratamento. A produção de radicais livres lipoperoxidados foi avaliada pela formação do TBARS em células 4T1, tratadas por 24 horas com Pho-s, mostrando diferença significativa a partir de 30mM e 1,6mM com o lipossoma DODAC vazio, não havendo diferença estatística no grupo DODAC/FOS. As alterações nas distribuições das populações celulares nas fases do ciclo celular avaliadas por citometria de fluxo mostraram um aumento do DNA fragmentado após 12 e 24 horas e diminuição nas outras fases do ciclo. As alterações nos arranjos celulares foram avaliadas por meio da marcação com os fluorocromos acridine-orange e rodamina 123 por microscopia confocal a laser, no qual foi observada a mudança na morfologia, fragmentação de membranas e perdas da projeção de prolongamentos citoplasmáticos. A indução de células em senescência foi avaliada pela atividade enzimática com a enzima β -galactosidase, mostrando células senescente apenas na concentração de 20mM. A atividade apoptótica das células tumorais de mama foi avaliada pela Anexina V/PI, mostrando um aumento, principalmente, da apoptose tardia em todos os tratamentos. Diversos marcadores de controle e progressão do ciclo celular, stress, angiogênese e receptores hormonais e o potencial mitocondrial foram avaliados por citometria de fluxo. Os resultados mostraram um aumento na expressão das proteínas ligadas com a apoptose e morte celular e diminuição geral das proteínas que participam dos processos de progressão do ciclo celular e proliferação celular, além das proteínas anti-apoptóticas, o que demonstra o seu potencial antitumoral.

Descritores: neoplasias da mama; apoptose; ensaios de seleção de medicamentos antitumorais; neoplasias; morte celular; ciclo celular; citometria de fluxo.

ABSTRACT

Bonfim Neto AP. *The pro-apoptotic role of synthetic phosphoethanolamine in the liposomal dodac formulation in the pathway involved in the chemoresistance of breast cancer cells* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Synthetic Phosphoethanolamine (FOS) is a analogous molecule to cell membrane phospholipids with antitumoral, anti-inflammatory and antiproliferative properties. Our research group has developed several studies with FOS showing satisfactory results regarding its antitumor efficacy. In this study we evaluated the in vitro antitumor effects of Fosteoethanolamine and the DODAC/FOS liposomal formulation in murine breast carcinoma (4T1) line. The effects of the FOS cytotoxicity on the 4T1 tumor line were evaluated by the cell viability test MTT, and the IC 50% values were 40mM and 20mM in the 24 and 48 hour, respectively. With the empty DODAC treatment in the 4T1 cells the IC 50% was 0.5 mM and 0.09 at the 6 and 12 hour respectively and with the treatment of DODAC/FOS at IC50% of 0.78 mM at 6 hours and 0.17 mM in 12 hours of treatment. The production of lipoperoxidized free radicals was evaluated by the formation of TBARS in 4T1 cells, treated for 24 hours with Pho-s, showing a significant difference from 30mM and 1.6mM with empty DODAC, with no statistical difference in the DODAC/FOS group . Changes in the cell population distributions in the cell cycle phases evaluated by flow cytometry showed an increase in fragmented DNA after 12 and 24 hours and decrease in the other phases of the cycle. Alterations in the cellular arrangements were evaluated by means of the labeling with the fluorochromes acridine-orange and rhodamine 123 by laser confocal microscopy, in which the change in morphology, membrane fragmentation and loss of the projection of cytoplasmic prolongations were observed. The induction of senescence cells was evaluated by enzymatic activity with β -galactosidase enzyme, showing senescent cells only at the concentration of 20 mM. The apoptotic activity of breast tumor cells was evaluated by Annexin V / PI, showing an increase, mainly, of late apoptosis in all treatments. Several control markers and cell cycle progression, stress, angiogenesis and hormone receptors and mitochondrial potential were evaluated by flow cytometry. The results showed an increase in the expression of the proteins bound with apoptosis and cell death and general decrease of the proteins that participate in the processes of cell cycle progression and cell proliferation, in addition to the anti-apoptotic proteins, which demonstrates its antitumoral potential.

Descriptors: breast neoplasms; apoptosis; drug screening assays, antitumor; neoplasms; cell death; cell cycle; flow cytometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Câncer	15
1.2. Câncer de mama	18
1.3. Fosfolipídios Antitumorais	21
1.4. Mecanismo de ação dos Fosfolipídios Antitumorais	23
1.5. Fosfoetanolamina sintética.....	25
1.6. Formulação lipossomal de Cloreto de dioctadecildimetilamonio (DODAC)	27
2. OBJETIVOS GERAIS.....	29
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Formulação lipossomal FOS / DODAC	30
3.1.1. Formulação da FOS	30
3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC.....	31
3.1.3. Preparação dos lipossomas de DODAC/FOS	31
3.2. Cultura Celular	31
3.3 Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	32
3.4 Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados	33
3.5. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de fluxo	33
3.6. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase	34
3.7. Análise das alterações morfológicas do citoesqueleto por microscopia confocal a laser.....	34
3.7.1. Marcação com fluorocromo Faloidina-FITC.....	34
3.7.2. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo rodamina-123	35
3.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI	35
3.9. Avaliação da expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo	36
3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	37
3.11. Extração de RNA total	38
3.12. Quantificação do RNA celular total.....	38

3.13. Transcrição reversa.....	39
3.14. Extração de proteínas totais para Western Blotting.....	40
3.15. Western Blotting	41
3.16. Análises estatísticas	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Atividade citotóxica da FOS pelo método colorimétrico MTT	43
4.2. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase ...	53
4.3. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados	54
4.4. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	55
4.5. Potencial elétrico da membrana mitocondrial	57
4.6. Análise da atividade mitocondrial através do fluorocromo rodamina 123 por microscopia confocal a laser	59
4.7. Avaliação da organização do citoesqueleto pela marcação com fluorocromo Faloidina FITC/PI.....	63
4.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI por citometria de fluxo.....	66
4.9. Análise da expressão dos marcadores de apoptose, ciclo celular e proliferação celular por citometria de fluxo.....	69
4.10. Análise da expressão gênica da CASP3, BCL-2, CASP9 e BAX por RT-PCR.....	77
4.11. Expressão quantitativa de Caspase 3, Caspase 8, BAX e BCL-2 em células de carcinoma mamário murino 4T1 por Western Blotting.	79
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÃO	90
7.REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é a definição dada para mais de 100 tipos de doenças que apresentam em comum a capacidade das células proliferarem de forma desordenada, invadindo órgãos e tecidos com a possibilidade de se disseminarem para distintas regiões do organismo, mediante um processo denominado de metástase (Inca, 2014).

Atualmente, já há um consenso de que o câncer pode ser considerado uma doença genética, em que o acúmulo de mutações nas células somáticas pode ser a base para o seu desenvolvimento. Avanços na área das biociências permitiram um novo desenho para os mapas genômicos da taxonomia tumoral, que transitou da histologia para os níveis genéticos. Além disso, avanços nos tratamentos, com desenvolvimento de novos fármacos e marcadores moleculares para determinados tipos de tumores, trouxeram progressos na área da oncologia. No entanto, muito ainda resta ser compreendido acerca da biologia tumoral devido à heterogeneidade da doença, responsável por, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 8,2 milhões de mortes no mundo no ano de 2012. São esperados mais de 20 milhões de novos casos de câncer para 2025 no mundo (De Oliveira *et al.*, 2015).

A estimativa para 2018 é que ocorram, mais de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Não considerando as neoplasias de pele do tipo não melanoma nos homens, os tumores mais incidentes serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres espera-se, que a incidência maior seja para câncer de mama (28,1%) seguido por intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%). Neste panorama, o perfil epidemiológico brasileiro, assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde o câncer de próstata (61 mil) em homens e de mama (58 mil) nas mulheres serão os mais frequentes (Inca, 2014; De Oliveira *et al.*, 2015).

Hanahan e Weinberg (2011) propuseram a existência de certas características essenciais adquiridas pelas células neoplásicas para obterem sucesso na tumorigênese, a fim de se tornarem invasivas e malignas. Essas condições essenciais incluem: 1) instabilidade genômica e mutações; 2) evasão dos sinais supressores do crescimento; 3) sinalização sustentada para proliferação; 4) capacidade replicativa ilimitada; 5) desregulação energética da célula; 6) resistência à morte celular; 7) capacidade de escape da vigilância do sistema imune; 8) promoção da inflamação; 9) indução de angiogênese e 10) capacidade de invadir e de formar metástase (Hanahan and Weinberg, 2011).

Ao longo da progressão tumoral, as células sofrem alterações no seu genoma, apresentando defeitos no sistema de reparo do DNA e promovendo a expansão e perpetuação de clones mutados que vão continuar realizando o ciclo celular. Pode-se dizer que os genes tumorais, dividem-se em oncogenes, os quais liberam os freios da proliferação celular e genes supressores de tumor, que seriam em condições normais os “guardiões do genoma”. É possível afirmar, que o sucesso da progressão tumoral é obtido através de expansões clonais desencadeadas por genótipos mutantes. Todavia, também é preciso mencionar a importância dos fenótipos hereditários, como a inativação dos genes supressores de tumor, adquiridos por meio de mecanismos epigenéticos como modificações nas histonas e metilação do DNA, que afetam a regulação da expressão gênica, através de expansões clonais que não necessariamente são resultantes de mudanças provenientes de mutações (Curtin and Cotter, 2003; Wiechmann and Kuerer, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

Outra característica importante adquirida pelas células tumorais é a sua capacidade de promover a proliferação celular sustentada, através de variados mecanismos. Células tumorais podem produzir seus próprios ligantes de fator de crescimento ou dentro do tumor associado ao estroma, podem estimular células normais a suprir o tumor com fatores de crescimento. Também possuem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas receptoras, tornando-se hiper-responsivas a quantidades limitantes de fatores de crescimento. Os tumores podem, ainda, alterar a estrutura de moléculas receptoras, permitindo ativação mitogênica independente do ligante. Células

tumorais também conseguem driblar os sinais supressores do crescimento, principalmente, devido à perda de função de genes supressores de tumor, como o gene P53 e Rb, os quais controlariam os circuitos de proliferação, senescência e apoptose, o que perpetua a proliferação celular desordenada (Budihardjo *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2009; Hanahan and Weinberg, 2011).

Após sucessivos ciclos de crescimento e divisão celular, normalmente, as células são encaminhadas para a senescência, estado considerado irreversível, em que apesar da viabilidade não há mais replicação celular. Outra possibilidade é a de que, as células que conseguirem evadir da senescência, entrem em um estado de crise, sendo então encaminhadas à morte. Entretanto, em algumas ocasiões as células podem superar esses destinos e exibir um potencial replicativo ilimitado sem evidências de senescência ou crise, em um fenômeno denominado imortalização. Há evidências, de que células tumorais sejam imortais por manter a expressão funcional da telomerase, uma transcriptase reversa, que adiciona segmentos repetidos de telômeros ao fim do DNA telomérico. Sendo assim, muitas células neoplásicas também adquirem a capacidade de evadir mais uma barreira natural ao desenvolvimento de tumores, ampliando seu potencial de replicação (PATEL *et al.*, 2013; ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Adicionalmente, em meio à replicação desordenada observada nos tumores há um ajuste no metabolismo energético, necessário ao crescimento e divisão das células tumorais, em que mesmo na presença de oxigênio estas reprogramam sua produção de energia, limitando seu metabolismo energético, em grande parte para a glicólise, o que resulta em um estado chamado de “glicólise aeróbica”. Isso é possível, pela regulação positiva de transportadores de glicose como o GLUT1, que aumentam a importação de glicose para o citoplasma e via abastecimento desta via glicolítica, através de oncogenes como Ras e Myc, assim como genes supressores de tumor como a P53. Outra condição que favorece este estado é a hipóxia, comum aos tumores, que colabora com a regulação positiva dos transportadores de glicose e muitas enzimas da via glicolítica. Juntas a via Ras e a hipóxia, aumentam os níveis de fatores de transcrição como HIF1 α e HIF2 α , que estimulam a glicólise. De

acordo com algumas hipóteses o aumento da glicólise, permite o desvio dos intermediários glicolíticos em várias vias biossintéticas como as que geram aminoácidos e nucleosídeos, facilitando assim a síntese de macromoléculas e organelas necessárias à geração de novas células (LUO et al., 2009; NEGRINI et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Todavia, além da proliferação celular desordenada e de mudanças metabólicas que favoreçam o tumor, as células tumorais também adquirem a capacidade de driblar importantes mecanismos de morte celular por apoptose que seriam uma das frentes de impedimento da progressão de tumores.

1.2. Câncer de mama

Os tumores malignos determinam altas taxas de morbimortalidade, afetando pessoas de todas as idades e em diferentes proporções. A mortalidade por estes tumores varia muito entre os países e eleva-se gradualmente, à medida que a industrialização e o controle de doenças infecto-parasitárias aumentam (Paap *et al.*, 2014). Apesar de o câncer ser conhecido há muitos séculos, somente nas últimas décadas do século passado configurou-se como evidente problema de saúde pública mundial, pois a sua prevalência tem aumentado no contexto das doenças crônicas não-transmissíveis. Diversos fatores têm contribuído para o aumento da incidência de câncer na população, como: o intenso processo de urbanização, além de avanços tecnológicos no setor da saúde, ações de promoção e recuperação da saúde que proporcionaram aumento na longevidade da população (Sulik, 2013).

O câncer de mama pode ser definido como um conjunto de várias doenças, que apresentam ampla variabilidade clínica em relação aos seus distintos comportamentos biológicos, morfologia e composição celular (Curigliano and Criscitiello, 2014; Ataollahi *et al.*, 2015). A OMS estima que por ano ocorram mais de 1.050.000 novos casos no mundo, o que faz este tipo de neoplasia ser considerado o mais comum entre as mulheres. No Brasil, foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama, para o ano de 2018 (Inca, 2014; De Oliveira *et al.*, 2015).

Atualmente, no Brasil, o câncer de mama é considerado o tumor que mais mata a população feminina e apesar da taxa de sobrevivência ter aumentado nas nações desenvolvidas, a neoplasia da mama ainda é apontada como a segunda causa de morte por tumores estando atrás somente, do câncer de pulmão (De Oliveira *et al.*, 2015).

Estima-se que mais de 80% dos tumores de mama tenham o sítio de origem primária localizado nos epitélios dos ductos mamários e assim, as primeiras lesões evidentes são as denominadas hiperplasias intraductais *in situ*, quando as células neoplásicas estão delimitadas por uma membrana basal íntegra, ou invasivos, quando as células tumorais ultrapassam a membrana basal e entram em contato com o estroma mamário, podendo invadir órgãos e tecidos (Barsotti Santos *et al.*, 2014; Bell, 2014).

O exame clínico das mamas (ECM) e a mamografia são os métodos de rastreamento de rotina da atenção integral à saúde da mulher. É preconizado que o ECM seja realizado anualmente, a partir dos 40 anos de idade para todas as mulheres, e que além do ECM na faixa dos 50 e 69 anos, a mamografia seja feita, a cada dois anos. A recomendação para as mulheres de 40 a 49 anos é a realização do exame clínico e a mamografia, apenas em caso de alterações no ECM, pois segundo muitos estudos e a OMS, a sensibilidade da mamografia em mulheres jovens, pré-menopausa, é menor devido a maior densidade mamária (Inca, 2014; De Oliveira *et al.*, 2015; Šašková and Pavlišta, 2016).

Para as mulheres brasileiras, as neoplasias malignas da mama continuam sendo o tumor mais incidente, quando não considerado os tumores de pele não melanoma. As causas do câncer de mama permanecem desconhecidas até hoje, e não se dispõe ainda medidas específicas de prevenção primária a serem aplicadas à população. Entretanto estudos epidemiológicos e pesquisas básicas têm identificado diversas condições que, predispõem à mulher ao câncer de mama. Entre os fatores de risco estudados destacam-se: as mulheres de melhor nível socioeconômico e elevada escolaridade, que em geral apresentam idade mais tardia da primeira gestação e menor número de filhos, além de menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade, uso de anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal,

idade (as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos) e mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Barsotti Santos *et al.*, 2014; Bell, 2014; Curigliano and Criscitiello, 2014)

Além destes, aspectos relacionados ao ambiente têm sido investigados como fatores promotores do câncer de mama, dentre os quais podemos citar o tabagismo, o alcoolismo, a obesidade e o sedentarismo. Assim, o câncer de mama tem sua importância fundada em diversos fatores: alta incidência, elevado índice de mortalidade e dificuldade de um diagnóstico precoce, e apesar dos avanços sobre diagnóstico e tratamento, ocorridos nos últimos anos, ainda não é possível o reconhecimento de lesões precursoras do carcinoma, como nos casos do câncer de colo de útero, endométrio e vulva. (Ekmektzoglou *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 2014; Schmitt, 2014)

Muitos compostos têm sido usados no tratamento do câncer. Atualmente são empregadas para o tratamento oncológico, cerca de 50 agentes quimioterápicos. Entretanto, pesquisadores estão sempre investigando, não somente com o intuito de descobrir novos compostos, mas principalmente, de planejar técnicas mais eficientes e com menor toxicidade dos compostos já conhecidos. A quimioterapia antineoplásica, ou a utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação, com o objetivo de tratar tumores malignos, tem sido uma das principais modalidades de tratamento para esta doença. Da mesma forma que as outras modalidades a quimioterapia têm como base, indicadores obtidos no estadiamento da doença. Um aspecto importante é a cinética tumoral que permite conhecer o processo de proliferação celular do tumor, determinando sua maior ou menor sensibilidade à terapêutica (Wiechmann and Kuerer, 2008; Schmitt, 2014).

Os agentes antineoplásicos agem, sistemicamente, em nível celular, mais especificamente em células que estão em processo de divisão celular ativa, interferindo no processo de crescimento e divisão das células (Brandao *et al.*, 2013). Os agentes utilizados no tratamento do câncer em geral, afetam tanto as células normais quanto as neoplásicas, porém acarretam maiores danos a células malignas devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos destes dois tipos celulares (Aceves *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010).

Dentre os agentes quimioterápicos, os mais utilizados no tratamento adjuvante do câncer de mama são os agentes alquilantes, principalmente, a ciclofosfamida (C); os antimetabólicos, como o 5-fluorouracil (F) e o metotrexate (M); os antracíclicos, como a epirrubicina (E) e doxorubicina (A), e, mais recentemente, os taxanos, como o paclitaxel e docetaxel (T) (Roché *et al.*, 2006).

Uma abordagem promissora para o tratamento do câncer de mama seria aproveitar a susceptibilidade destas células para drogas que induzem a apoptose. É então necessário identificar compostos novos e mais específicos. Novos medicamentos destinados a induzir a morte celular podem representar opções terapêuticas mais eficazes para o tratamento tumoral (De La Vega *et al.*, 2012). Atualmente, os análogos de alquilo lisofosfolípido (ALPs) representam uma nova classe de lipídios com atividade antitumoral. Têm sido relatado que ALPs são potentes indutores de apoptose em tumores malignos. Diferentemente da maioria dos agentes quimioterápicos, os ALPs não agem no DNA, mas que atuam ao nível da membrana celular, inibindo o “turnover” da membrana, interferindo na sinalização lipídica que, por sua vez, pode desencadear a morte celular por apoptose (Na and Surh, 2008; Gajate *et al.*, 2012).

1.3. Fosfolipídios Antitumorais

Membranas biológicas são compostas basicamente por três componentes fundamentais: os fosfolipídios (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolipídios de membrana são estruturas formadas por cadeias hidrofóbicas no interior da bicamada lipídica e com cabeça polar situada no espaço citoplásmico aquoso. Os FLs de membrana podem formar ligações não covalentes com proteínas periféricas de membrana, muitas vezes por atrações eletrostáticas, estabelecendo o modelo conhecido de mosaico fluído. Os FLs exercem diversas funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma ampla variedade de processos catalíticos e atuando como doadores para a síntese de macromoléculas. Além de ativamente influenciar na comunicação entre o meio intra e extracelular pela

transdução de sinal celular e a interação lipídeo/proteína (Van Meer *et al.*, 2008).

Os FLs participam de processos que influenciam as propriedades das proteínas associadas à membrana e servem como precursores de importantes segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. Há evidências de que a distribuição de diferentes FLs na bicamada membranar não é aleatória, e que as consequências físicas da sua redistribuição pode ser importantes na estrutura e na sinalização celular. Com base nesta abordagem, um grupo de pesquisadores no final da década de 1960, Eibl, Arnold, Weltzien e Westphal em busca de novas moléculas imunomoduladoras, proveniente dos FLs, identificaram o primeiro análogo metabolicamente estável da Lisofosfatidilcolina (LisoFC). Desde então, a utilização dos lisofosfolipídios (LSs) como fonte de novos compostos bioativos tem sido baseada na conhecida atividade biológica, atuando como reguladores de diversas atividades enzimáticas celulares, tais como a ativação de macrófagos peritoneais e ao aumento da resposta imunológica (Berkovic, 1998).

Porém, como os LSs são instáveis metabolicamente e rapidamente metabolizados na membrana celular, esforços foram realizados na tentativa de aumentar a estabilidade química destes compostos, potencializando a capacidade imunomoduladora. Modificações estruturais na LisoFC, como a substituição da ligação éster por éter na região que conecta o glicerol a cadeia de hidrocarbonetos foram realizadas, tornando as estruturas análogas metabolicamente resistentes à acetiltransferases e as isofosfolipases, responsáveis pelo metabolismo dos fosfolipídios (Eibl *et al.*, 1967). No decurso do desenvolvimento, Munder e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que entre alguns destes análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquil-derivados, apresentavam efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais (Munder and Modolell, 1973; Andreesen *et al.*, 1978). Atualmente, estes éteres derivados da LisoFC pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade citostática. Em contraste, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os AFTs não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto celular, e sim,

seus efeitos tumorais estão relacionados com a modificação do *turnover* na membrana celular (Jiménez-López *et al.*, 2010).

Os lipídios antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes subtipos: O primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolipídios, coletivamente chamados de éter lipídios antitumorais ou análogos alquilfosfolípideos antitumorais (AFTs). O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina (AFC), que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formado por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (HefC; Miltefosina) (Busto *et al.*, 2008; Mollinedo *et al.*, 2010).

Dos lipídios antitumorais mais comuns estão a Edelfosina e a Mitelfosina. A Edelfosina destaca-se na prática clínica sendo eficaz no tratamento de leucemia aguda, capaz de induzir apoptose o que permitiu tornar-se o protótipo para a elaboração de novos éteres-derivados. A Miltefosina apresenta potente atividade antitumoral *in vitro*, entretanto, tem sua utilização clínica limitada à aplicação tópica e oral, devido ao alto grau de hemólise. Atualmente, tem sido utilizada na clínica para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo, sendo também amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose tropical (Dummer *et al.*, 1993; Khademvatan *et al.*, 2011).

1.4. Mecanismo de ação dos Fosfolipídios Antitumorais

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

éter gliceril, envolvida no metabolismo do éter lipídico (Taguchi and Armarego, 1998).

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

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

O desenvolvimento de novas drogas anti-tumorais com amplo espectro e ação terapêutica permanece sendo o maior obstáculo da medicina moderna no tratamento contra o câncer. Em contraste aos clássicos agentes quimioterápicos que exercem seus efeitos terapêuticos promovendo danos ao DNA, os fosfolipídeos antineoplásicos como, a Miltefosina, Edelfosina e

Perifosine, são um grupo de AFTs estruturalmente semelhantes, que atuam sobre a membrana das células tumorais. Considerando que os fosfolipídios como a Edelfosina, apresentam na sua estrutura o grupo químico éter, esses formam ligações estáveis com a membrana celular bloqueando o *turnover* de membrana interrompendo vias sinalização dependente de lipídios, e induzindo a morte celular (Van Der Luit *et al.*, 2007).

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

1.5. Fosfoetanolamina sintética

A importância bioquímica de ésteres fosfóricos em tecidos normais foi assunto no encontro *Annual Reviews of Biochemistry*, que ocorreu em 1935 na Alemanha. Outhouse chamou atenção em especial para a presença dos ésteres fosfóricos em tumores malignos. Ele relatou a presença de um éster fosfórico chamado de amino etil-éster-fosfórico (AEF) ou fosfoetanolamina, encontrado em abundância em tecidos malignos tumorais. Em continuidade ao seu estudo, a próxima questão levantada por ele seria se os AEF estão predominantes em tumores malignos ou também eram peculiares em tecidos normais (Outhouse, 1936).

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

Com base nestes estudos realizados por Outhouse, foi sintetizada a fosfoetanolamina sintética (FS), que corresponde a uma estrutura química simples formada por uma região de cabeça de fosfocolina polar, seguido de uma cadeia etílica e uma amina terminal. Como um fosfomonoéster, os átomos de hidrogênio são ionizáveis em solução aquosa, os ésteres existem na forma de ânion, a qual a extensão da ionização depende da acidez do meio, força iônica e outros fatores físico químicos, contrário o grupo 12 amina que se comporta como uma substância íon dipolar zwitteriônica (Al-asfour, 2008).

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

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

Em estudo realizado por Luna, 2015, foram investigados os efeitos antitumorais e citotóxicos da FS em fibroblastos, células endoteliais humanas normais e no melanoma murino B16F10. Os resultados demonstraram que nas concentrações em que a FS induz citotoxicidade para as células tumorais, não é capaz de alterar a viabilidade das células normais. Os efeitos no ciclo celular observados neste estudo, como redução da capacidade de síntese de DNA, além de inibição da proliferação celular com redução das células em mitose G2/M, estão relacionados com os efeitos apoptóticos, que reflete no aumento do pico apoptótico Sub-G1, bem como, a ativação da caspase-3.

Os estudos comparativos *in vivo* entre a FS e o agente quimioterápico Taxol no modelo experimental de melanoma B16F10, suportam a utilização da FS como um novo agente no tratamento de tumores malignos, uma vez que os efeitos terapêuticos obtidos da redução do volume tumoral e da disseminação metastática foram superiores ao Taxol (Ferreira et al., 2011).

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

1.6. Formulação lipossomal de Cloreto de dioctadecildimetilamonio (DODAC)

Várias abordagens genéticas promissoras para a terapia de tumores têm sido desenvolvidos, incluindo: (a) a modificação de células tumorais com genes de citocinas para aumentar a sua imunogenicidade, (b) transferência de genes supressores de tumores em células malignas para reduzir a sua tumorigenicidade, e (c) introdução de "genes suicidas" em células cancerosas que convertem pró-drogas não tóxicas aos anti- metabólitos tóxicos. Em todos os casos, não existe prova de que o sistema imune inato desempenha um papel importante na atividade anti-tumoral (Karp *et al.*, 1993; Tahara *et al.*, 1995; Egilmez *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1998; Shiratori *et al.*, 1998). Portanto, seria vantajosa a utilização de um veículo de entrega de genes e/ou fármacos que possam ativar a imunidade inata e melhorar as estratégias de terapia gênica e controle tumoral.

A injeção direta de DNA complexado com lipossomas catiônicos (lipoplexos) em nódulos tumorais em crescimento tem sido usada com sucesso em modelos de tumores de murinos, e estas estratégias já foram prorrogadas em fase I de ensaios clínicos. Há cada vez mais evidências de que a administração direta de lipoplexos em tumores estabelecidos poderia inibir o crescimento na ausência de um transgene terapêutico (Egilmez *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1996; Blezinger *et al.*, 1999). Esta atividade antitumoral pode ser relacionada com a inflamação lipoplex-induzida, trabalhos anteriores descreveram uma resposta inflamatória que ocorre após a administração lipoplex ao pulmão (Scheule *et al.*, 1997; Freimark *et al.*, 1998). No entanto, não ficou claro a partir desses estudos se esta resposta é geral para todos os lipídios catiônicos ou como a inflamação pode afetar os mecanismos antitumorais efetores. Porém em outros estudos também mostram que a injeção intraperitoneal de lipossomas catiônicos pode suprir a inflamação em ratos (Filion and Phillips, 1997).

Os estudos aqui descritos em relação aos perfis de transfecção e inflamação contêm três formulações diferentes lipoplex catiônicos que são: N, N-dioleil-N, N-dimetilamônio (DODAC), N-(1-[2,3-dioleiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), ou N-(1-[2,3-dioleiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA). Todas as três formulações produzem inflamação após injeção intraperitoneal, embora a duração e magnitude da resposta gerada utilizando os lipoplexos DODAC e DOTMA foi maior do que a resposta gerada usando lipoplexos DOTAP. A inflamação induzida por lipoplex foi associada a um aumento local no interferon- γ (IFN- γ) e expressão natural killer (NK), a atividade, indicando um papel para lipoplexos como adjuvantes para a terapia genética do tumor (Bramson *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a eficácia da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC com a fosfoetanolamina na via pró-apoptótica das células de carcinoma de mama murino, 4T1.
- Todo o delineamento experimental avaliado neste projeto foi comparado entre a formulação DODAC/FS, carreador vazio DODAC e FS. Esse experimento tem como finalidade avaliar a eficácia do composto lipossomal DODAC/FS na atividade antiproliferativa, partindo da hipótese de existir resistência para este modelo experimental.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a formulação lipossomal DODAC/FS com estabilidade físico-química
- Determinar os efeitos exercidos pela fosfoetanolamina sintética nas células tumorais da linhagem 4T1 especialmente aqueles relacionados à proliferação e diferenciação celular, angiogênese e apoptose.
- Determinar a ação do lipossoma DODAC isolado, e em conjunto com a fosfoetanolamina sintética sob as células tumorais da linhagem 4T1.
- Avaliar ação da formulação DODAC/FS na via de quimioresistência nas células da linhagem 4T1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, as células da linhagem 4T1 foram cultivadas e divididas nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo controle (meio de cultura)
- Grupo carreador vazio - DODAC
- Grupo Fosfoetanolamina sintética (FS)
- Grupo formulação lipossomal DODAC/FS

As concentrações de fosfoetanolamina sintética e carreador DODAC foram escolhidas a partir do resultado do experimento de dose resposta, e posteriormente foram administradas.

A escolha do quimioterápico taxol foi baseada, pois ele interfere na função normal de crescimento do microtúbulo, impedindo a divisão descontrolada da célula. Isso torna a célula incapaz de usar seu citoesqueleto de maneira flexível. O grupo já possui dados em vários estudos demonstrando a ação específica deste composto.

Após o cultivo celular, as células foram submetidas aos protocolos para avaliação da citotoxicidade, da relação necrose/apoptose, análise do potencial de membrana e avaliação da atividade da Bcl-Xl, Bcl-2, BAX, citocromo-c, e das caspase 3 e 9 por citometria de fluxo.

3.1. Formulação lipossomal FOS / DODAC

3.1.1. Formulação da FOS

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

3.1.2. Preparação das dispersões de DODAC

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

3.1.3. Preparação dos lipossomas de DODAC/FOS

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

3.2. Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem de carcinoma de mama murino: 4T1 obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC), tendo o respectivo código CRL-2539™, mantida e estocada no banco de células sob responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. biologia molecular, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP)

suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células 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 realizada utilizando o mesmo meio de cultura RPMI 1640 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 Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.3 Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

As células tumorais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 10⁵ células/mL e tratadas com: FOS (10 a 100mM) durante 24 e 48 horas; Paclitaxel (0,0013 a 0,7mM), durante 24 e 48 horas; FOS e Paclitaxel (0,0013 a 0,7mM de Paclitaxel com a IC₅₀ da FOS por 24 e 48 horas; DODAC vazio e DODAC/FOS (0,15 a 2mM) por 6 a 12 horas, como grupo controle foi utilizado o meio de cultura e o veículo para a diluição da solução estoque da FOS. Após os tempos de tratamento o sobrenadante foi coletado em outra placa e adiciona-se 100 µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, e as células incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescentado 100 µL de DMSO 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 após os diferentes tempos de tratamento nas concentrações para avaliação do efeito dose-resposta. A citotoxicidade de cada tratamento foi expressa pela porcentagem de morte celular, calculada em relação aos controles negativos.

3.4 Determinação da produção de lipídios 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 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.

3.5. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de fluxo

As células foram submetidas ao tratamento com FOS, DODAC vazio e DODAC FOS por período de 24 horas. As células tratadas e do grupo controle foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400 rpm por 10 min. Em seguida, o “pellet” foi ressuspensão 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 FACScalibur (BD) na intensidade de fluorescência FL2H e os histogramas adquiridos pelo programa Cell-Quest - BD e analisados no programa ModFit .

3.6. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase

As células foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C por 24 h e em seguida, tratados com FOS no tempo de 24 h. As células foram fixadas com formaldeído a 2%, 0,2% de glutaraldeído em PBS à temperatura ambiente durante 3-5 min. Após lavagem em PBS, as células foram encubadas com solução de coloração contendo 1 mg/mL de β -galactosidase (Cell Signaling Technology, Danvers-MA) durante 16 h. Após a fixação, as células foram colocadas em glicerol 70%. A contagem das células foi realizada em microscópio de luz em dez campos selecionados aleatoriamente (aproximadamente 200 cel/campo) (1 mm²) e capturados para a detecção da taxa de senescência expressa em (%).

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

3.7.1. Marcação com fluorocromo Faloidina-FITC

A análise das alterações morfológicas do citoesqueleto por microscopia confocal a laser foi realizada utilizando a Faloidina-FITC para marcação dos filamentos de actina e os núcleos das células marcados com PI. As células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 10⁵ por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FOS nas concentrações 20 e 40 mM, DODAC/FOS e DODAC 0,3 mM por 24 horas. Após o período de tratamento o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes, por 5 minutos cada. A membrana das células foi permeabilizada com Triton X-100 0,1% em temperatura ambiente por 15 minutos. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi feito com PBS+BSA 1%+ RNase (100ug/mL), por 40 minutos à 37°C. Após o bloqueio as células foram incubadas com

Faloidina conjugada com FITC (2ug/mL) (Sigma Aldrich Cód. P5282) por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes, por 5 minutos cada e incubadas com PI (20ug/mL) por 5 minutos. Após a marcação as células foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada com PBS.

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

3.7.2. Marcação das mitocôndrias com o fluorocromo rodamina-123

As alíquotas das culturas de carcinoma de mama murino: 4T1 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. As amostras dos grupos tratados com FOS e controles passaram por um processo de remoção do meio de cultura e lavadas com próprio meio de cultura RPMI. 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.

3.8. 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 In situ Cell Death Detection, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolípido 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 fosfolípidos negativamente carregados. Após confluência na placa de 6

orifícios as células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com FOS, DODAC vazio e DODAC/FOS, 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 – FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

3.9. 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 FOS, e o grupo 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 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, stress oxidativo, angiogênese e reguladores hormonais (conforme tabela abaixo). Após este período as células foram centrifugadas a 1500 rpm e lavadas com PBS gelado e 0,2% de BSA por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 200 µL de Tampão Fac’s contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados na citometria de fluxo

Anticorpos primários	Fabricante
Anti-caspase-3	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA
Anti-caspase-8	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA
Anti-Citocromo-C	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-Bax	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-Bad	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-Bcl-2	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-p53	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-TNF-DR4	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA
Anti-VEGF-R2	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-VEGF-R1	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-CD90	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-Ciclina D1	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
PCNA	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA
Anti-Ki-67	Abcam, Cambridge, MA, United States, EUA

3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorecendo em verde. Alterações ao nível da integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON, 1980). As amostras das células tumorais dos grupos tratados com FOS, DODAC vazio e DODAC/FOS e os grupos controles foram centrifugadas 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% CO₂ a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi 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 FACScalibur (BD) em

intensidade de fluorescência FLH- 1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.11. Extração de RNA total

Para a extração utilizou-se o reagente TRIzol®, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™ Corporation, EUA). Em tubos livres de RNase foi adicionado TRIzol® (1 ml), onde cada amostra passou por processo de homogeneização em Polytron em velocidade máxima de três bursts, cada tubo foi homogeneizado vigorosamente em vortex por 10 segundos e centrifugados por 10 minutos (12.000 g) a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril (de 1,5 ml) contendo 200 µl de clorofórmio (200µl para cada 1 ml de Trizol), os tubos foram agitados vigorosamente por aproximadamente 30 segundos e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 12.000g a 4°C. Em seguida, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500 µl álcool isopropílico, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos (12.000 g) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de etanol 75% diluído em água ultrapura. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 9.000 g 4 °C, todo o conteúdo do eppendorf foi descartado, com exceção do precipitado (RNA Total). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e então o precipitado solubilizado em 10 µl de água ultrapura. Uma alíquota foi removida para quantificação e análise da qualidade, e o restante da solução armazenada imediatamente em freezer – 80°C até sua utilização.

3.12. Quantificação do RNA celular total

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção 1:50, ou seja, em 49 µl de H₂O ultrapura foram adicionados 1 µl do RNA total. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf 22331,

Hamburgo - Germany) a 260/280nm. Foi utilizada água ultrapura para calibração do equipamento.

3.13. Transcrição reversa

Para eliminar o DNA genômico, o RNA extraído foi tratado com DNase I (Kit SuperScript III, Invitrogen®, Carlsband, USA), de modo que a solução final contivesse 1 µg de RNA total. A esta solução foram adicionados: 1 µl de tampão DNase, 1 µl de DNase I e água ultrapura, completando-se para o volume de 9 µl. Para inativar a atividade da DNase I, foi adicionado 1 µl de EDTA. Após incubação por 10 minutos a 65°C, foram adicionados os iniciadores da reação, Oligo (dt - (Invitrogen®) e dNTP (Invitrogen®) 10µM (1µl cada), incubou-se por 5 minutos a 65°C e por 1 minuto e 30 segundos em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µl de tampão, 1 µl de DTT (0,1M), 1 µl de inibidor RNase (RNase OUT Inhibitor - Invitrogen®) e 1 µl da enzima SuperScript III. Tubos estéreis de 0,5 ml contendo o RNA e os compostos para a síntese de cDNA foram colocados no termociclador, onde permaneceram por 50 minutos a 50°C, para ocorrer a transcrição do RNA em cDNA e, posteriormente, por 15 minutos a 70°C e 2 minutos a 4°C para inativação da enzima. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

As reações de PCR foram realizadas em um fluorometro automatizado (ABI PRISM™ 7500, Applied Biosystems, Foster, USA), usando placas ópticas de 96 poços. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Primeiramente, os cDNAs foram diluídos em água ultrapura autoclavada na proporção de 1:8, mantidos em gelo. Em seguida, foi preparado um mix para cada gene estudado contendo: 6,25 µl de TaqMan® qPCR MasterMix, 3,25 µl de água ultrapura autoclavada e 0,5 µl de primer/sonda, totalizando 10 µl para cada amostra. Este mix foi pipetado na placa e recebeu imediatamente 2,5 µl da respectiva amostra de cDNA. Após pipetar todas as amostras nos poços, a placa foi vedada com um parafilme óptico próprio, submetida à centrifugação rápida (menos de 1 minuto) e levada ao aparelho de PCR.

Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABI Prism 7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação foi feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. Neste experimento as condições padronizadas de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C – ativação da UNG ([Uracil N-Glicosilase](#)), que degrada resíduos de RNA caso as amostras não tenham sido tratadas com RNase ao final da RT, evitando contaminações, 10 minutos a 95°C ativação da polimerase (Amplitaq Gold®), 40 ciclos por 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto, 15 segundos a 95°C desnaturação para abertura da fita de cDNA. Aproximadamente a 70°C ocorre o anelamento da sonda do TaqMan. Aproximadamente a 60°C os primers se anelam e promovem a extensão da fita de DNA. Neste momento, a sonda Taqman é liberada e a fluorescência é emitida.

A quantificação relativa foi realizada normalizando-se os sinais desses genes com o sinal da ciclofilina A (como controle endógeno), através do programa LinRegPCR® versão 7.0 (Ramakers *et al.*, 2003), seguido do método matemático de Pfaffl (Pfaffl, 2001) e análise estatística dos dados.

3.14. Extração de proteínas totais para Western Blotting

Para determinação das proteínas BAX, Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9, amostras de células de carcinoma de mama 4T1 foram coletadas após os tratamentos e imediatamente armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido e posteriormente em -80°C até a extração de proteínas.

Em seguida, no tubo para homogeneização (Falcon), foi colocado em solução tampão de lise (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250 nM e Água ultrapura pH 7.4), na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais

como benzamida (20µg/ml), pepstatina (1µg/ml), leupeptina (0.5µg/ml), apoproteína (0.1µg/ml) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100µg/ml), em uma proporção adequada (ex. 0, 0881g – 500ul (tampão) Xg (peso tecido)-Xul), sempre conservado em gelo. Foi homogeneizado em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA com Polytron em velocidade máxima por no máximo 3 bursts de 10 segundos para dissociar e romper a célula. Após homogeneização, o material extraído foi colocado em eppendorfs mantidos no gelo para transporte e posterior centrifugação, a 1000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi separado o sobrenadante. O pellet foi resuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido ao vortex, posteriormente à centrifugação por 1000g, 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante então foi desprezado e o sedimento resuspenso novamente em tampão de homogeneização. O produto foi estocado a -20°C até a realização do experimento western blotting.

A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (Bradford, 1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

3.15. Western Blotting

Para a realização do western blotting foi utilizado 20ug das amostras de células da linhagem 4T1. As amostras foram separadas em um mini gel SDS-poliacrilamida (Mini Protean II System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA), com densidade de 15% que foi utilizado para todas as proteínas estudadas. A eletroforese foi realizada a 100V durante 2 horas (ou até que as proteínas completassem a corrida por todo o gel). Após a separação em gel, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (immunoblot Bio-Rad Laboratories, Inc.), sob corrente de 120ma, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação de transferência utilizando TTBS (Tween 20 0,1% em tampão Tris: 100 mM Tris, cloreto de

sódio 0,9%, pH 7.5) acrescido de leite desnatado em pó (5%) por 1 hora à temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana foi lavada três vezes em TTBS, com intervalos de cinco minutos e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína testada (tabela 2) overnight a 4°C.

Anticorpo	Isotipo	Diluição	Fornecedor (nº ordem)
Caspase 3	Rabbit	1 : 1500	IMGENEX (IMG-5703)
Caspase 8	Rabbit	1 : 1500	IMGENEX (IMG-5705)
BCL-2	Rabbit	1 : 1500	IMGENEX (IMG-5700)
BAX	Rabbit	1 : 1500	IMGENEX (IMG-5684)

Tabela 2 - Identificação dos anticorpos primários utilizados no Western blotting

No dia seguinte, foram realizadas três lavagens em TTBS e incubação de 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anticorpo conjugado à peroxidase IgG anti-mouse ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA) na titulação de 1:10000, diluído em solução de 2,5% de leite desnatado. Após este processo, cada membrana correspondente a cada proteína foi lavada três vezes em TTBS durante 5 minutos. O sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce), por 5 minutos, o qual produz uma reação de luminescência no local da ligação do segundo anticorpo. As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Hyperfilm - Amersham), a temperatura ambiente, durante 10 minutos, revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira).

3.16. Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à homogeneidade e normalidade, e apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados que mostram distribuições irregulares foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Todas as análises

estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Atividade citotóxica da FOS pelo método colorimétrico MTT

Após 24 horas de adesão, em placa de 96 orifícios, as células de carcinoma de mama murino 4T1 foram incubadas com a FOS nas concentrações de 10 a 100 mM nos tempos de 24 e 48 horas.

Após o tratamento de 24 horas (Figura 1A), nas células tumorais 4T1, foram observados aspectos morfológicos de lise e a formação de debri celular no sobrenadante, a partir da concentração de 30 mM, com a obtenção da IC50% no valor de 40 mM (Figura 1). Já o tratamento por 48 horas foi observado uma citotoxicidade maior com IC50% de 19,47mM e formação de debri a partir de 10mM (Figura 1B).

Figura 1 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma de mama murino pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células 4T1 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais 4T1 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). Grau de significância estatística $*p < 0,05$ obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$.

Figura 02 - Fotomicrografias dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da FOS após 24 h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Controle (A), 20 mM (B), 30 mM (C), 40 mM (D), 50 mM (E) e 60 mM (E). Escala 50 µM. No controle é possível observar a morfologia celular fusiforme. Nas células tratadas ocorre diminuição da densidade celular, presença de debri celular e perda da morfologia fusiforme.

O tratamento com Paclitaxel em 24 horas mostrou IC50% em 5,826 μ m (Figura 3A) e IC50% de 7,642 μ m em 48 horas (Figura 3B). Demonstrando, como no tratamento com a FOS um efeito do tempo na citotoxicidade. Quando tratamos as células de carcinoma de mama murino 4T1 com o Paclitaxel junto com a FOS (na IC50% de 40mM) obtemos uma IC50% de 0,8106 μ m em 24 horas (Figura 4A), e IC50% < 0,01 μ m em 48horas (Figura 4B).

Figura 03 – Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma de mama murino pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células 4T1 após 24 horas de tratamento com Paclitaxel; (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais 4T1 após 48 horas de tratamento com Paclitaxel. Grau de significância estatística $*p < 0,05$ obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$.

Figura 04 – Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma de mama murino pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células 4T1 após 24 horas de tratamento com Paclitaxel associado a FOS; (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais 4T1 após 48 horas de tratamento com Paclitaxel associado a FOS. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$.

As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com DODAC vazio e DODAC/FOS nas concentrações de 0,15 a 2mM por 12 e 24 horas.

A IC50% no tratamento com o carreador DODAC vazio foi de 0,6 mM em 6 horas (Figura 5A) e 0,09 mM em 12 horas (Figura 5B). Foi observada formação de debri celular, lise da membrana e formação de precipitado no sobrenadante (Figura 6). Contudo o tratamento com a formulação lipossomal

DODAC/FOS, a IC₅₀ obtida foi de 0,78mM em 12 horas (Figura 7A) e 0,17 mM em 24 horas (Figura 7B) de tratamento. Também foi observada a formação de debri celular e lise da membrana, entretanto, o aspecto morfológico das células tumorais e sua densidade apresentaram um índice molar menor do que com o carreador DODAC vazio (Figura 8).

Figura 5 - Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma de mama murino pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células 4T1 após 12 horas de tratamento com o carreador DODAC (0,15 – 2mM) (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais 4T1 após 24 horas de tratamento com o carreador DODAC (0,15 – 2mM). Grau de significância estatística * $p < 0,05$ obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$.

Figura 6 – Fotomicrografias dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da formulação DODAC após 12h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Controle (A), 0,15 mM (B), 0,3 mM (C), 0,6 mM (D), 1 mM (E) e 2 mM (E). Escala 50 μ M.

Figura 07 – Determinação da citotoxicidade em células de carcinoma de mama murino pelo método colorimétrico MTT. (A) Média $\pm$ DP da viabilidade das células 4T1 após 12 horas de tratamento com a formulação DODAC/FOS (0,15 – 2mM) (B) Média $\pm$ DP da viabilidade das células tumorais 4T1 após 24 horas de tratamento com a formulação DODAC/FOS (0,15 – 2mM). Grau de significância estatística $*p < 0,05$ obtido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$

Figura 8 - Fotomicrografias dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da formulação DODAC/FOS após 12h de tratamento, obtidas em Microscopia Invertida de Luz. Controle (A), 0,15 mM (B), 0,3 mM (C), 0,6 mM (D), 1 mM (E) e 2 mM (E). Escala 50 μ M. No controle é possível observar a morfologia celular fusiforme. Nas células tratadas ocorre diminuição da densidade celular, presença de debris celular e perda da morfologia fusiforme.

4.2. Avaliação da senescência celular pela atividade enzimática β -galactosidase

Após 24 horas de adesão, as células tumorais de mama 4T1 foram incubadas com a FOS nas concentrações de 20, 40 e 60 mM por 24 horas. Após o tratamento, as células tumorais foram submetidas à ação enzimática da β -galactosidase. As células foram observadas e as fotos foram capturadas em microscópio de luz (Figura 9).

Apenas na concentração de 20Mm (Figura 9A) foi observado um efeito da enzima β -galactosidase nas células de carcinoma de mama murino. Nas concentrações de 40mM (Figura 9C) e 60mM (Figura 9D) não houve senescência aparente por esta técnica enzimática.

Figura 9 – Fotomicrografias dos aspectos celulares dos grupos controle e tratado com a FOS e submetidas a atividades enzimática da β -galactosidase. As setas indicam as células senescentes pela ação enzimática, após 24 horas de tratamento com a FOS em células tumorais 4T1. Escala 50 μ M.

4.3. Determinação da produção de lipídios peroxidados polissaturados

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 FOS (Figura 10A) resultou em uma diferença significativa na formação de radicais peroxidados lipídicos da linhagem tumoral de mama 4T1, a partir de 30Mm apresentando danos oxidativos significativos a partir desta concentração.

Figura 10 – (A) Gráficos de barra dos valores da média $\pm$ dp da produção de radicais peroxidados lipídicos no tratamento com a FOS por 24 horas. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$). Experimentos realizados $n=05$, em octuplicada (ns = não significativo). (B) Gráfico de dispersão da correlação da produção de radicais peroxidados lipídicos e da viabilidade celular no tratamento com a FOS por 24 horas.

4.4. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A FOS foi testada para avaliar a sua capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com a FOS nas concentrações de 20 e 40 mM no tempo de 12 e 24 horas. Estas concentrações foram escolhidas a partir do cálculo da IC50%. As porcentagens de células 4T1 nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas após os tratamentos.

No tratamento de 12 horas com a FOS, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações quando comparado ao grupo controle (Figura 11A). A

população de células na fase S e G2/M diminuiu significativamente, enquanto é observado um aumento no debris celular tanto na concentração de 20mM(Figura 11B) quanto em 40mM (Figura 11 C).

As fases do ciclo celular também sofreram alteração com o tratamento com FOS por 24 horas, tendo uma diminuição abrupta na fase G2/M no tratamento com 40mM acompanhando o aumento do debris.

Figura 11 – Gráficos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de tumor de mama murino 4T1 dos grupos tratados com a FOS em 12 e 24 horas. Controle 12 horas (A), FOS 20mM em 12 horas (B), FOS 40mM em 12 horas (C), Controle 24 horas (D), FOS 20mM em 24 horas (E), FOS 40mM em 24 horas. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com o DODAC vazio e DODAC/FOS. Ambos os tratamentos levaram a diminuição significativa das células na fase G2/M, S e G0/G1 em comparação com o

controle. Foi observado também que tanto o carreador DODAC vazio quanto o DODAC/FOS aumentaram o DNA fragmentado (debri) nas concentrações de 0,3mM e 0,6 mM. Entretanto é nítido que na concentração de 0,3mM a formulação lipossomal DODAC/FOS teve esse aumento de debri menor que no DODAC vazio.

Figura 12 – Gráficos das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular da célula de tumor de mama murino 4T1 dos grupos tratados com a DODAC e DODAC/FOS em 6 horas. Controle DODAC (A), DODAC 0,3mM (B), DODAC 0,6mM (C), Controle DODAC/FOS (D), DODAC/FOS 0,3mM (E), DODAC/FOS 0,6mM. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

4.5. Potencial elétrico da membrana mitocondrial

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 FOS em 20, 40 e 60mM diminuíram significativamente o potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle (Figura 13).

Figura 13 - Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células 4T1 por citometria de fluxo. As células tumorais 4T1 foram tratadas por 24 horas com FOS, em diferentes concentrações (20, 40 e 60mM). O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

O tratamento com DODAC vazio aumentou a porcentagem de mitocôndrias inativas na concentração de 0,3 mM, com a média de ativas/inativas próximo a 50%, entretanto na concentração de 0,6mM o número de mitocôndrias inativas foi bem maior que das ativas. (Figura 14). Já o tratamento com a formulação liposomal DODAC/FOS a diferença entre ativas e inativas na maior concentração (0,6mM) não foi tão abrupta como no DODAC vazio.

Figura 14 - Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células 4T1 por citometria de fluxo. As células tumorais 4T1 foram tratadas por 12 horas com o carreador DODAC e a formulação DODAC/FOS, em diferentes concentrações (0,3 e 0,6mM). O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

4.6. Análise da atividade mitocondrial através do fluorocromo rodamina 123 por microscopia confocal a laser

A rodamina 123 é conhecida por inibir a função do potencial elétrico das mitocôndrias. Rodamina 123 liga-se às membranas da mitocôndria e inibe processos de transporte, especialmente o transporte de elétrons, retardando a respiração celular interna.

Após 24 horas de tratamento com a FOS, as células 4T1 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 com as diferentes concentrações da FOS, as mitocôndrias não estão íntegras e modificam a sua distribuição, passando preferencialmente do núcleo para o citoplasma (Figura 15). Destaca-se que nas concentrações superiores de 20 mM da FOS há uma redução significativa na densidade celular.

Já as células tratadas com o carreador DODAC vazio e com a formulação lipossomal DODAC/FOS na concentração de 0,3mM exibiram uma leve atenuação da fluorescência se comparada com o grupo controle, entretanto na concentração de 0,6mM, conseguimos observar uma diminuição significativa da densidade das mitocôndrias tanto com o DODAC como com a formulação lipossomal DODAC/FOS (Figura 16).

Figura 15 – Fotomicrografias dos aspectos celulares dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da FOS após 24 horas e marcadas com a sonda rodamina 123, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas indicam a marcação das mitocôndrias. Barra em 20µM.

Figura 16 – Fotomicrografia dos aspectos celulares em células tumorais 4T1 dos grupos controle e tratados com as diferentes concentrações da DODAC e DODAC/FOS (0,3mM e 0,6mM) após 12 horas e marcadas com a sonda rodamina 123, analisadas em Microscopia Confocal a Laser. As setas indicam a marcação das mitocôndrias. Barra em 20μM.

4.7. Avaliação da organização do citoesqueleto pela marcação com fluorocromo Faloidina FITC/PI

As análises das alterações morfológicas realizadas pela da marcação dos filamentos de actina com Faloidina FITC (verde) e do núcleo com PI (vermelho), permitiram a observação da reorganização citoplasmática dos filamentos de actina nas células de carcinoma de mama murino 4T1 após 24 horas de tratamento com FOS nas concentrações de 20 e 40 mM, com a formulação lipossomal DODAC/FOS (0,3 mM e 0,6mM) e com o carreador DODAC (0,3 mM e 0,6mM). As células do grupo controle apresentaram morfologias semelhantes, com filamentos de actina organizados de forma regular, são mononucleadas e fusiformes. O tratamento com FOS 20 mM causou alteração na morfologia celular pela perda dos prolongamentos citoplasmáticos. A FOS 60 mM afetou ainda mais a morfologia, induzindo ampla retração citoplasmática e significativa redução na densidade celular (Figura 17). As células se tornaram esféricas devido à modificação do citoesqueleto celular e apresentaram fragmentação nuclear, características de células em processo de apoptose (Figura 18). A formulação lipossomal DODAC/FOS também demonstrou alterações morfológicas semelhantes às encontradas no tratamento com FOS, apresentando perda dos prolongamentos citoplasmáticos causada pela retração citoplasmática. As alterações provocadas pelo carreador DODAC vazio modificaram parcialmente a distribuição do citoesqueleto, porém não foi observada a presença de fragmentação nuclear.

Figura 17 – Fotomicrografias das células tumorais 4T1 com filamentos de actina marcados com Faloidina FITC e núcleo marcado com PI e analisadas por microscopia confocal a laser. As células 4T1 foram tratadas nas concentrações 20, 40 e 60 mM de FOS por 24 horas e marcadas com Faloidina FITC (verde) e PI (vermelho). Barra em 20µM.

Figura 18 – Fotomicrografias das células tumorais 4T1 com filamentos de actina marcados com Faloidina FITC e núcleo marcado com PI e analisadas por microscopia confocal a laser. As células 4T1 foram tratadas nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM do carreador DODAC vazio e da formulação lipossomal DODAC/FOS por 12 horas e marcadas com Faloidina FITC (verde) e PI (vermelho). Barra em 20 μ M.

4.8. Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V/PI por citometria de fluxo

A finalidade desta análise foi determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). Anexina V é um fosfolípido 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 fosfolípidos negativamente carregados. As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com FOS por 24 horas nas concentrações de 20, 40 e 60 mM, carreador vazio DODAC vazio e formulação DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM.

Houve diminuição significativa do número de células viáveis em todos os grupos de tratamento em relação aos grupos controle. O tratamento com a FOS nas maiores concentrações aumentou a população de células em apoptose tardia, sendo observado que a porcentagem dessa população celular ultrapassou a de células viáveis a partir da concentração de 40mM (Figura 19). Por outro lado, as células tratadas com DODAC vazio, tiveram um aumento significativo da população de células em processo de necrose, tanto na concentração de 0,3 como de 0,6mM (Figura 20). As células de carcinoma murino 4T1 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS tiveram um aumento na população de células em apoptose tardia, entretanto, esse aumento foi significativo ($P < 0,5$) apenas na concentração de 0,6mM (Figura 21).

Figura 19 – Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com FOS nas concentrações de 20 e 40 mM por um período de 24 horas. O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 20 - Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com o carreador vazio DODAC nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 21 - Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V/PI. As células de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6 mM por um período de 12 horas. O gráfico de barras mostra a porcentagem de células viáveis, em estágio de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Valores expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

4.9. Análise da expressão dos marcadores de apoptose, ciclo celular e proliferação celular por citometria de fluxo

As células de linhagem tumoral de carcinoma de mama murino 4T1 foram tratadas com FOS nas concentrações de 20 e 40mM por um período de 24 horas, carreador DODAC e com a formulação lipossomal DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6mM por 12 horas, e analisadas quanto à ativação do receptor de morte celular DR4, da caspases 3 e 8 ativas, liberação o citocromo

c, da expressão do KI67, PCNA, Ciclina D1, CD90, BCL-2, BAD, BAX, P53, dos receptores VEGF-R1 e VEGF-R2.

A análise do marcador de proliferação celular KI67 (Figura 22A) mostrou uma diminuição no grupo tratado com 40mM de FOS em comparação com o grupo controle, essa mesma resposta molecular também é encontrada nos tratamentos com o carreador DODAC, e com a formulação lipossomal DODAC/FOS, sendo estatisticamente mais relevante ($P < 0,01$) no grupo tratado com DODAC/FOS na concentração de 0,6mM (Figura 27A).

O marcador de proliferação PCNA (Figura 22C), teve uma resposta semelhante ao KI67 no tratamento com a FOS, entretanto nos tratamentos com o carreador DODAC e com a formulação lipossomal DODAC/FOS, apenas o grupo tratado com 0,6mM de DODAC/FOS obteve diferença significativa (Figura 27C).

A proteína Ciclina D1, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos com a fosfoetanolamina sintética (Figura 22B), mas o tratamento com DODAC 0,6mM ($P < 0,5$) e DODAC/FOS 0,6mM ($P < 0,1$) foram capazes de modular de forma negativa a expressão dessa proteína (Figura 27B).

A expressão das Caspases 3 (Figura 23A) e 8 (Figura 23B) ativas aumentaram em comparação com o controle na concentração de 40mM de fosfoetanolamina sintética, mostrando assim uma modulação positiva da FOS sob esses marcadores, situação observada também no tratamento com DODAC/FOS na concentração de 0,6mM (Figura 28 A e B). O receptor de morte DR4 seguiu o mesmo modelo de expressão das caspases, em todos os grupos tratados (Figuras 23 e 28C).

A resposta ao tratamento com FOS das proteínas da família BCL-2 também foi analisada. A proteína antiapoptótica BCL-2 mostrou uma modulação negativa mediada pela FOS na concentração de 40mM (Figura 24A), essa diminuição da expressão também foi observada nos grupos DODAC 0,6mM, DODAC/FOS 0,3mM ($P < 0,5$) e DODAC/FOS 0,6mM ($P < 0,1$) (Figura 29A).

As proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, BAD e BAX, tiveram aumento significativo tanto no tratamento com a fosfoetanolamina sintética na

concentração de 40mM (Figura 24B e C, respectivamente), como no tratamento com DODAC/FOS na concentração de 0,6mM (Figura 29B e C, respectivamente).

A expressão das proteínas P53, Citocromo-C, e CD90, foram analisadas após o tratamento com a FOS, formulação lipossomal DODAC/FOS e o carreador vazio DODAC. Houve um aumento significativo, em comparação com o grupo controle, na expressão da P53 (Figura 25A) e do Citocromo-C (Figura 25B), no tratamento com a FOS na concentração de 40mM, aumento esse observado também no citocromo-C modulado pelo tratamento com DODAC/FOS 0,6mM, (Figura 30B), entretanto não houve diferença significativa na proteína P53 em nenhum grupo tratado com DODAC. A resposta do CD90 ao tratamento com FOS (Figura 25C) foi negativa, tendo uma diminuição na expressão deste marcador na maior concentração, o que também foi observado no tratamento com DODAC/FOS 0,6mM (Figura 30C).

Os receptores R1 e R2 dos fatores de crescimento envolvido na angiogênese foram analisados, o VEGF-R1 (Figura 26A) teve diferença estatística ao tratamento com FOS em comparação com o grupo controle, entretanto a expressão VEGF-R2 (Figura 26B) não foi regulado com diferença estatística ($p < 0,05$) ao tratamento com 20 e 40mM. Os tratamentos com o carreador DODAC e DODAC/FOS, não modificaram a expressão desses marcadores (Figura 31).

Figura 22 – Modulação da expressão de Ki-67 (A), PCNA (B) e da Ciclina D1 (C) pela Fostetanolamina sintética em 24 horas de tratamento nas concentrações de 20mM e 40mM, avaliada por citometria de fluxo. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 23 – Modulação da expressão de Caspase-3 (A), Caspase-8 (B) e TNF-DR4 (C) pela Fostetanolamina sintética em 24 horas de tratamento nas concentrações de 20mM e 40mM, avaliada por citometria de fluxo. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 20 – Modulação da expressão de BCL-2 (A), BAD (B) e BAX (C) pela Fostoetanolamina sintética em 24 horas de tratamento nas concentrações de 20mM e 40mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 24 – Modulação da expressão de P53 (A), Citocromo-c (B) e CD90 (C) pela Fostoetanolamina sintética em 24 horas de tratamento nas concentrações de 20mM e 40mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 25 – Modulação da expressão de VEGF-R1 (A) e VEGF-R2 (B) pela Fostetanolamina sintética em 24 horas de tratamento nas concentrações de 20mM e 40mM, avaliada por citometria de fluxo. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 26 – Modulação da expressão de Ki-67 (A), Ciclina D1 (B) e PCNA (C) pelo tratamento com DODAC e DODAC/FOS em 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,3mM e 0,6mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes $n=03$. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 27 – Modulação da expressão de CASP3 (A), CASP8 (B) e TNF-DR4 (C) pelo tratamento com DODAC e DODAC/FOS em 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,3mM e 0,6mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 28 – Modulação da expressão de BCL-2 (A), BAD (B) e BAX (C) pelo tratamento com DODAC e DODAC/FOS em 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,3mM e 0,6mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 29 – Modulação da expressão de P53 (A), Cytochrome-C (B) e CD90 (C) pelo tratamento com DODAC e DODAC/FOS em 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,3mM e 0,6mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P < 0,05).

Figura 30 – Modulação da expressão de VEGF-R1 (A), VEGF-R2 (B) pelo tratamento com DODAC e DODAC/FOS em 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,3mM e 0,6mM, avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes n=03. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P < 0,05).

4.10. Análise da expressão gênica da CASP3, BCL-2, CASP9 e BAX por RT-PCR.

A expressão do RNAm das caspases (CASP) 3, e 8, Bcl-2 regulador de apoptose (BCL-2) e Bcl2 associado a proteína X (BAX) foram detectadas em todos os tratamentos das células tumorais 4T1. Houve efeito do tratamento com a formulação DODAC/FOS na concentração de 0,6mM na expressão do CASP3, mostrando uma modulação positiva deste tratamento na expressão deste gene (Figura 32A). A expressão relativa do BAX foi analisada em todos os tratamentos, foi observado um aumento significativo no grupo da formulação lipossomal DODAC/FOS em relação aos grupos Controle, FOS 20mM, DODAC 0,3mM e DODAC/FOS 0,3mM. (Figura 32B). A expressão do RNAm da caspase 8 (Figura 32C) teve uma modulação similar a caspase 3, apresentando uma regulação positiva do grupo DODAC/FOS 0,6mM em comparação ao controle. Por outro lado a expressão relativa do gene Bcl-2, não mostrou diferença estatística em nenhum dos grupos tratados (Figura 32D).

Figura 32 – Modulação da expressão relativa do RNAm de CASP3 (A), BAX (B), CASP8 (C) e BCL-2 (D) pelo tratamento com Fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 20 e 40mM, e carreador vazio DODAC e DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6mM em 24 horas de tratamento, avaliada por RT-PCR. Os dados representam a média ± erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

4.11. Expressão quantitativa de Caspase 3, Caspase 8, BAX e BCL-2 em células de carcinoma mamário murino 4T1 por Western Blotting.

As proteínas Caspase 3, Caspase 8, BAX e BCL-2, foram quantificadas pela técnica de Western Blotting. Para a proteína Caspase 3 foi observada uma banda de aproximadamente 32 kDa (figura 33A). Houve um aumento significativo na expressão dessa caspase apenas no grupo tratado com DODAC/FOS na concentração de 0,6mM ($P < 0,5$). Entretanto não houve diferença estatística na quantificação da caspase 8 entre nenhum dos grupos (Figura 33B). Uma banda de aproximadamente 21 kDa correspondente ao BAX (Figura 33C) foi observada. A modulação dessa proteína, seguiu o modelo da expressão de caspase 3, apresentando um aumento estatístico ($P < 0,5$) apenas na concentração de 0,6mM de DODAC/FOS. Já a proteína BCL-2, não apresentou diferença estatística entre nenhum dos grupos estudados (Figura 33D).

Figura 33 - Expressão das proteínas Caspase 3 (A), Caspase 8 (B), BAX (C) e BCL-2 (D) em células de carcinoma murino tratadas com fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 20 e 40mM e DODAC vazio e DODAC/FOS nas concentrações de 0,3 e 0,6mM. Blots ilustrativos e gráficos representam]do o conteúdo expresso pela densidade relativa em relação à β -actina. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizado um monofosfoéster artificialmente fosforilado análogo aos fosfolípidos de membrana, a fosfoetanolamina sintética (FOS), que se difere dos fosfolípidos utilizados na clínica médica por não causar efeitos colaterais, como a hemólise, distúrbios da coagulação ou mesmo hemorragias. Entretanto, seu efeito citotóxico e seletividade contra células tumorais poderiam aumentar com o encapsulamento em lipossomas catiônicos, como o cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC), devido a interações eletrostáticas entre estes lipossomas e membranas de células tumorais.

Este é o primeiro relato mostrando a ação citotóxica da FOS e sua associação com o lipossoma DODAC em células de carcinoma de mama murino (4T1). Descrevemos respostas citotóxicas das células tumorais ao tratamento com a FOS em diferentes concentrações e tempos de tratamento, demonstrando seu efeito pro-apoptótico e antiproliferativo. Nosso grupo encapsulou a FOS em lipossomas de DODAC (DODAC/FOS), pois estes lipossomas catiônicos podem interagir com a FOS devido à sua atração eletrostática, em solução aquosa após serem submetidos à temperatura de transição de fase e subsequente a sonicação. A análise físico-química mostrou que esses lipossomas eram estáveis. A formulação lipossomal DODAC/FOS apresenta diâmetro de aproximadamente 60 nm, o que garante especificidade e seletividade (LUNA et al., 2016; LUNA et al., 2018). Neste trabalho também foi demonstrado que os efeitos da formulação lipossomal DODAC/FOS sob estas células e sua eficácia em comparação com o carreador vazio DODAC.

Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostram que as moléculas do carreador DODAC interagem com a FOS em solução aquosa após ser submetida à ultrassom e posterior sonicação, originando uma formulação lipossomal DODAC/FOS. As moléculas nanoestruturadas com a FOS são estáveis e apresentam características biológicas após a sua formulação. As suspensões lipossomais obtidas de DODAC/FOS foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e determinação do teor (%) de fosfato das partículas anteriormente por nosso grupo para sua caracterização físico-química. Os lipossomas com concentração de 2,0 mM de

FOS demonstraram ser estáveis em relação ao tempo de estocagem à temperatura ambiente (LUNA et al., 2016). Como a estabilidade físico-química é um parâmetro importante para biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade seletiva para células tumorais, as concentrações escolhidas para o tratamento com o DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/FOS foram de 0,032 a 2,0 mM.

Os tamanhos dos lipossomas DODAC/FOS, obtidos por meio da microscopia eletrônica de varredura, são entre 60-100 nm de diâmetro, sendo considerados ideais para o tratamento antitumoral, pois o endotélio vascular de tecidos saudáveis é formado por fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, enquanto que os neovasos dos tumores apresentam fenestrações bem maiores (100 a 780 nm) (FANG et al., 2011; TAURIN et al., 2012). Desta forma, as nanopartículas com tamanho médio de 100-200 nm conseguem entrar nas fenestrações com maior diâmetro que dos vasos tumorais, mas não penetram nas fenestrações estreitas do endotélio dos tecidos saudáveis.

O tratamento com a FOS nas células de carcinoma de mama murino 4T1 mostrou-se eficaz na capacidade de inibir a proliferação celular em diferentes tempos. A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas de tratamento com a FOS, levando a uma redução da viabilidade celular tempo-concentração dependente. Após 24 horas as células de carcinoma de mama murino 4T1 apresentaram aspectos de lise e formação de debri celular, a partir da concentração de 20 mM. Entretanto, após 48 horas as células tumorais apresentaram efeitos citotóxicos significativos, a partir da concentração de FOS 10 mM, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão dos prolongamentos citoplasmáticos. Contudo, o tratamento com a FOS nas células de fibroblastos humanos normais FN1 não apresentou o mesmo efeito citotóxico observado nas células de tumorais de mama murino 4T1 e nas células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (LAVELI-SILVA, 2017).

O tratamento com o carreador vazio DODAC nas células de carcinoma de mama murino 4T1 mostrou formação de debri celular, lise da membrana e formação de precipitado no sobrenadante nos tempos de 24 e 48 horas. As IC50% obtidas foram 0,5 e 0,09 mM, respectivamente. O tratamento com a

formulação lipossomal DODAC/FOS também ocasionou lise da membrana citoplasmática e debris celular nas células 4T1, entretanto, não formou precipitado no sobrenadante, com a obtenção da IC50% em 0,78 e 0,17 mM, nos tempos de 24 e 48 horas respectivamente. O sobrenadante recolhido no experimento colorimétrico MTT foi utilizado para cálculo da formação de radicais livres lipoperoxidados (LPO).

A peroxidação lipídica, induzida pelos radicais livres, é o processo mais amplamente investigado, sendo a membrana celular um dos componentes mais atingidos pela alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados suscetíveis à peroxidação (SODERGREN et al., 2005). O aumento excessivo da formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) induz danos ao DNA, promovendo modificações mutagênicas em nucleotídeos, oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, desempenhando um importante papel na tumorigênese (LI et al., 2006). ROS são constantemente produzidas nas células como subprodutos do metabolismo celular, realizando importantes funções como mediadores de mecanismos de proteção, tais como reações apoptose, fagocitose e desintoxicação (LI et al., 2001). Nos nossos estudos verificamos que a produção de ROS no tratamento com FOS e DODAC teve um aumento significativo em comparação com o grupo controle, entretanto, com a formulação DODAC/FOS essa diferença não foi encontrada.

Estudos recentes têm demonstrado a capacidade da FOS em induzir morte por apoptose em diferentes linhagens de células tumorais, aumentando a expressão das caspases e do receptor de morte DR4, além de ter sido relatada como um composto capaz de formar um complexo com os receptores DR4 e DR5 (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; LUNA, 2015; LAVELI-SILVA, 2017).

Receptores da família TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), estão frequentemente associados à morte por apoptose pela participação dos receptores DR4 e DR5 (NAGANE et al., 2010). Neste trabalho, o receptor de morte celular (DR4) também se mostrou regulado positivamente pela FOS, o que corrobora com dados do nosso grupo em outras linhagens celulares que mostram a mesma regulação desse receptor de morte celular (LUNA, 2015; LAVELI-SILVA, 2017).

Na maioria dos eventos apoptóticos são requeridos à participação das caspases, que são divididas em iniciadoras (8, 9 e 12) e executoras (3, 6 e 7), onde estas últimas são responsáveis pelas alterações morfológicas no núcleo e citoesqueleto (ELMORE, 2007). A FOS aumentou a expressão das proteínas pró-apoptóticas caspases 3 e 8 (caspase efetora e iniciadora, respectivamente). Estudos anteriores mostraram que a FOS induziu a morte celular por apoptose, com aumento da expressão da pró-caspase 3 e a presença do tBid, indicativos de que a via intrínseca foi recrutada em resposta a ativação da caspase 8 (FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013; LUNA, 2015).

A FOS induz uma ruptura no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), agregados posteriores de mitocôndrias no citoplasma e fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, induz apoptose seguida por um aumento na expressão de citocromo C e a caspase-3. Além disso, a FOS é citotóxica para células tumorais MCF-7 de maneira dose-dependente, enquanto é citotóxico para células de mama humana normal MCF-10 somente em concentrações mais altas (FERREIRA *et al.*, 2013; LAVELI-SILVA, 2017).

Sabendo que a cascata de apoptose pode acontecer pela via extrínseca e intrínseca, analisamos a expressão das proteínas envolvidas na permeabilidade da membrana mitocondrial (BAD, BAX e BCL-2), que é alvo das caspases iniciadoras deste processo de morte celular programada. Estas proteínas têm ações muito distintas, com efeitos opostos. A BCL-2 apresenta um efeito anti-apoptótico, enquanto BAX e BAD funcionam como um adversário, com a capacidade de induzir a morte célula, ou seja, proteínas pró-apoptóticas (RUAN *et al.*, 2017). Os resultados revelaram um aumento na expressão de BAD e BAX e nas células tumorais 4T1 após o tratamento com a FOS e uma diminuição na expressão de BCL-2. Este resultado corrobora com os dados descritos na literatura (MOSTAFAPOUR KANDELOUS *et al.*, 2016), onde a FOS aumentou a expressão de BAX e BAD, além de uma regulação negativa na expressão de BCL-2 no adenocarcinoma de pulmão (FERREIRA *et al.*, 2013), hepatocarcinoma humano (LUNA, 2015) e adenocarcinoma de mama (LAVELI-SILVA, 2017).

O FOS demonstrou alta seletividade e especificidade contra a proliferação e disseminação de células tumorais desencadeadas através do aumento da apoptose, da expressão da caspase-3 e da regulação negativa das proteínas BAD e BAX (FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013). Além disso, a indução da apoptose independente do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\psi$) é um mecanismo notável (GALLUZZI; KROEMER, 2011). As mitocôndrias são organelas dinâmicas que desempenham um papel central no processo apoptótico, sendo um gatilho para a morte celular por apoptose e este mecanismo pode ser associado 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) são capazes de modular a fosforilação oxidativa via glicolítica (GULLOTTI; YEO, 2009). Nossos resultados mostram uma diminuição neste potencial mediado pelo tratamento com FOS, o carreador vazio DODAC e pela formulação lipossomal DODAC/FOS por citometria de fluxo e microscopia confocal pela marcação com rodamina-123.

Na apoptose, o rompimento do $\Delta\psi$ é combinado com um aumento dos complexos de poros de transição de permeabilidade e liberação de membros pró-apoptóticos da família BCL-2 que são localizado no espaço intermembranar mitocondrial (HEATH-ENGEL *et al.*, 2008). Em células tumorais 4T1 os resultados indicam que os efeitos apoptóticos de FOS provavelmente envolvem a regulação negativa da expressão da proteína BCL-2 em células de carcinoma murino 4T1, estes dados corroboram com os dados de Ferreira *et al* e Laveli-Silva em células de adenocarcinoma de mama humana MCF-7 (FERREIRA *et al.*, 2013; LAVELI-SILVA, 2017). Assim, pode-se sugerir que a redução de proteínas BCL-2 impede a interação com BAX e BAK. Este achado tem implicações importantes para a compreensão dos efeitos antitumorais da FOS. Existe uma forte relação entre a diminuição da expressão de BCL-2 e a liberação de proteínas apoptóticas da mitocôndria no citoplasma. Entre estas proteínas, o citocromo C induz a formação de uma morte celular complexa, nomeadamente, o apoptossoma (CHEN *et al.*, 2012).

A redução desse potencial elétrico mitocondrial e aumento das proteínas pró-apoptóticas ligadas à permeabilidade da membrana estão relacionadas com a liberação do citocromo C pela mitocôndria (GALLUZZI; KROEMER, 2011). Em nosso estudo, verificamos que o citocromo C teve um aumento de sua expressão com o tratamento com a FOS, avaliado por citometria de fluxo, corroborando com dados do nosso grupo em diferentes linhagens celulares (FERREIRA *et al.*, 2013; LUNA, 2015; HIGASHI-CARVALHO, 2017; LAVELI-SILVA, 2017) e reiterando a hipótese que a FOS tem um papel importante na regulação da via intrínseca da apoptose.

Podemos então sugerir que a FOS tem a capacidade de induzir a morte celular por apoptose e não por necrose, o que foi comprovado pelo ensaio de Anexina/PI, onde a FOS aumentou a porcentagem de células em apoptose tardia em relação ao grupo controle, dado que já foi observado em diversas linhagens de células tumorais (FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013).

A apoptose é caracterizada pela condensação, encolhimento e colapso da célula e citoesqueleto, fragmentação da cromatina e dissolução nuclear (CURTIN; COTTER, 2003). As células tumorais 4T1 marcadas com a faloidina apresentaram o citoesqueleto bem delimitado no grupo controle e na concentração de 20 mM de FOS, porém, a partir da concentração de 40 mM, conseguimos observar uma desorganização no arranjo estrutural celular, mostrando um efeito citotóxico da FOS nas células de carcinoma de mama murino 4T1, modulado pela via de apoptose.

O mecanismo em que a proteína p53 regula a transição S para a fase G2/M envolve a regulação da quinase Cdc2 é essencial para as células entrarem em mitose (TAYLOR; STARK, 2001). Vias independentes da proteína p53 inibem a atividade da Cdc2 em resposta a danos no DNA. Altos níveis da expressão de p53 inibem a transcrição da ciclina B e da quinase Cdc2, reprimindo diretamente seus promotores, o que resulta na redução ou eliminação do complexo Cdc2/ciclina B. Além disso, a proteína p53 ativa a transcrição da p21, da proteína 14-3-3 e GADD45, que inibem a atividade da

Cdc2/ciclina. Os mecanismos de checkpoint dependentes da p53 são mais estáveis do que seus mecanismos independentes da p53 (ZHANG *et al.*, 2010).

Partindo do pressuposto que a FOS induz a apoptose pela via mitocondrial, a p53 está envolvida na recrutação dos mediadores de morte celular por esta via e envolvida na expressão da ciclina D1, consequentemente outras proteínas ligadas à proliferação e regulação do ciclo celular (Ki-67 e PCNA), nós analisamos a expressão destas proteínas por citometria de fluxo.

Nossos resultados mostraram um aumento da expressão da p53 no tratamento com FOS e a diminuição da expressão de Ki-67, PCNA e ciclina D1, corroborando assim com a teoria de que a FOS tem um efeito direto no controle da progressão do ciclo celular nas células de carcinoma de mama murino 4T1. Dados similares foram encontrados em linhagens de tumores espinocelulares da cavidade bucal SCC9 e SCC25 (HIGASHI-CARVALHO, 2017) e nas linhagens tumorais de mama (LAVELI-SILVA, 2017).

Com a diminuição da ciclina D1, e sabendo de sua importância como regulador do ciclo celular da fase G1 para S em diversas linhagens celulares (HERSHKO, 2010), nós analisamos a porcentagem de cada fase do ciclo celular após o tratamento com a FOS, o carreador vazio DODAC e a formulação lipossomal DODAC/FOS, e verificamos que em ambos os tratamentos tivemos um aumento significativo do DNA fragmentado e diminuição significativa de todas as outras fases do ciclo. Entretanto, o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FOS teve um aspecto expressivo, semelhante ao tratamento com a FOS na concentração de 0,3 mM.

Como a senescência celular está diretamente associada aos controles que acontecem na célula durante o ciclo celular, este processo foi analisado pela marcação com a β -galactosidase. Na fase G1 do ciclo, a célula passa por monitoramentos interno e externo que visam garantir as condições apropriadas à divisão. Para garantir que tais condições intra e extracelulares estejam adequadas à correta duplicação do material genético na fase S, existem dois pontos de checagem em G1, chamados ponto de restrição e ponto de controle (XIAOFEI *et. al.*, 2014). As células de carcinoma de mama murino 4T1 tratadas com a FOS e o grupo controle foram analisados quanto à sua atividade

enzimática. Foram observadas células senescentes após o tratamento das células tumorais 4T1 apenas na menor concentração de FOS.

Estudos sugerem que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) está relacionado com o prognóstico em câncer de mama e que pacientes com altos níveis deste fator tem uma doença biologicamente mais agressiva, com metástases mais precoces. A expressão do receptor VEGF em tumores, como no câncer de mama, facilita a migração e a proliferação das células endoteliais, resultado da angiogênese (BOUDREAU; MYERS, 2003). Neste trabalho o VEGF-R1 e VEGF-R2 foram avaliados nas células de carcinoma de mama murino 4T1 tratadas com FOS. Houve diferença estatística no receptor 1 do VEGF no tratamento com 40 mM, entretanto, o mesmo parâmetro não foi observado no VEGF-R2. Dados da literatura mostram a regulação deste receptor de fator de crescimento endotelial vascular pela proteína p53 em câncer de mama (ZHU; ZHOU, 2015), onde o aumento da p53 pode significar a ativação do VEGF-R2, dessa forma podemos aferir que a ação de regulação da FOS sob a p53 acaba regulando a expressão do VEGF-R2, mas não do VEGF-R1.

A expressão do RNAm de caspases (CASP) 3 e 8, BCL-2 regulador de apoptose (BCL-2) e BCL2 associado a proteína X (BAX) foi detectada em todos os tratamentos com a FOS, o carreador vazio DODAC e a formulação lipossomal DODAC/FOS.

Além disso, as proteínas Caspase 3, Caspase 8, BAX e BCL-2 foram quantificadas pela técnica de Western blotting. O Western blotting foi utilizado para separar e identificar as proteínas marcadas com anticorpos específicos para cada proteína de interesse. As proteínas Caspase 3 e BAX sofreram aumento significativo na expressão do grupo tratado com a formulação lipossomal DODAC/FOS na concentração de 0,6 mM. Entretanto, não houve diferença estatística na quantificação das proteínas caspase 8 e BCL-2 entre nenhum dos grupos.

Em suma, as células de carcinoma de mama murino 4T1 mostraram uma regulação positiva com o tratamento com a FOS na expressão das proteínas envolvidas com a via intrínseca de morte celular por apoptose. Além

disso, houve um aumento do número de células em apoptose tardia, modificações estruturais e diminuição da densidade celular. A FOS diminuiu as proteínas reguladoras da proliferação celular, aumentando o DNA fragmentado nestas células e diminuição nas fases do ciclo celular. Entretanto, este efeito dinâmico nesta linhagem precisa ser melhor compreendido, além de ser investigada a ação da FOS carregada por um lipossoma (DODAC/FOS), para assim, compreendermos o mecanismo envolvido neste processo.

6. CONCLUSÃO

- As células de carcinoma de mama murino 4T1 mostraram citotoxicidade à fosfoetanolamina sintética, ao carreador vazio DODAC e a formulação DODAC/FOS, em diferentes concentrações molares.
- A fosfoetanolamina sintética e a formulação lipossomal DODAC/FOS apresentaram um efeito negativo no que concerne a proliferação celular, progressão do ciclo celular e angiogênese
- O lipossoma DODAC vazio e a formulação DODAC/FOS, aumentaram o DNA fragmentado nas células 4T1 e diminuíram as fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular.
- A FOS o carreador DODAC e a formulação lipossomal DODAC/FOS aumentou a porcentagem de expressão das caspases fosforiladas, das proteínas pro-apoptóticas da família BCL-2, do receptor de morte celular DR4, e do citocromo C, além da p53, sendo assim, apresentando uma regulação positiva nas proteínas regulatórias no processo de morte celular, o que também foi verificado na expressão gênica.
- Houve alteração morfológica nas células 4T1 mediadas por FOS e pela formulação DODAC/FOS, com aumento de células em apoptose tardia.

7.REFERÊNCIAS

Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013. 65(1):36-48.

ACEVES, C. et al. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). **Mol Cancer**, v. 8, p. 33, 2009. ISSN 1476-4598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500378> >.

ANDREESEN, R. et al. Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids. **Cancer Res**, v. 38, n. 11 Pt 1, p. 3894-9, Nov 1978. ISSN 0008-5472. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/279399> >.

ATAOLLAHI, M. R. et al. Breast cancer and associated factors: a review. **J Med Life**, v. 8, n. Spec Iss 4, p. 6-11, 2015. ISSN 1844-3117. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316699> >.

Arthur Cássio de Lima Luna, José Roberto de Assis Santos Filho, Henrique Hesse, Salvador Claro Neto, Gilberto Orivaldo Chierice and Durvanei Augusto Maria. Modulation of pro-apoptotic effects and mitochondrial potential on B16F10 cells by DODAC/PHO-S liposomes. **BMC Research Notes** 2018, 11:126

BARSOTTI SANTOS, D. et al. Breast cancer and sexuality: the impacts of breast cancer treatment on the sex lives of women in Brazil. **Cult Health Sex**, Jan 2014. ISSN 1464-5351. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24400791> >.

BELL, K. The breast-cancer-ization of cancer survivorship: Implications for experiences of the disease. **Soc Sci Med**, v. 110C, p. 56-63, Mar 2014. ISSN 1873-5347. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727532> >.

BERKOVIC, D. Cytotoxic etherphospholipid analogues. **Gen Pharmacol**, v. 31, n. 4, p. 511-7, Oct 1998. ISSN 0306-3623. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792208> >.

BLEZINGER, P. et al. Intratracheal administration of interleukin 12 plasmid-cationic lipid complexes inhibits murine lung metastases. **Hum Gene Ther**, v. 10, n. 5, p. 723-31, Mar 1999. ISSN 1043-0342. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10210140> >.

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 3, p. 140-6, 2003. ISSN 1465-542X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12793895> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRAMSON, J. L.; BODNER, C. A.; GRAHAM, R. W. Activation of host antitumoral responses by cationic lipid/DNA complexes. **Cancer Gene Ther**, v. 7, n. 3, p. 353-9, Mar 2000. ISSN 0929-1903. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766341> >.

BRANDAO, E. M. et al. Antineoplastic effect of aqueous extract of plectranthus amboinicus in ehrlich ascites carcinoma. **J Cancer**, v. 4, n. 7, p. 573-6, 2013. ISSN 1837-9664. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23983822> >.

BUDIHardJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-90, 1999. ISSN 1081-0706. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611963> >.

BUSTO, J. V. et al. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. **J Chem Biol**, v. 1, n. 1-4, p. 89-94, Nov 2008. ISSN 1864-6158. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568801> >.

CURIGLIANO, G.; CRISCITIELLO, C. Successes and limitations of targeted cancer therapy in breast cancer. **Prog Tumor Res**, v. 41, p. 15-35, 2014. ISSN 2296-1887. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727984> >.

CURTIN, J. F.; COTTER, T. G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cell Signal**, v. 15, n. 11, p. 983-92, Nov 2003. ISSN 0898-6568. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499341> >.

DE LA VEGA, M.; DÍAZ-CANTÓN, E.; ALVAREZ, R. H. Novel targeted agents for the treatment of advanced breast cancer. **Future Med Chem**, v. 4, n. 7, p. 893-914, May 2012. ISSN 1756-8927. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571614> >.

DE OLIVEIRA, M. M. et al. Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013. **Rev Bras Epidemiol**, v. 18 Suppl 2, p. 146-57, Dec 2015. ISSN 1980-5497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27008610> >.

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

DUARTE, N. et al. Phenolic compounds as selective antineoplastic agents against multidrug-resistant human cancer cells. **Planta Med**, v. 76, n. 10, p. 975-80, Jul 2010. ISSN 1439-0221. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20157880> >.

DUMMER, R. et al. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. **J Am Acad Dermatol**, v. 29, n. 6, p. 963-70, Dec 1993. ISSN 0190-9622. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245262> >.

Dummer R, Krasovec M, Roger J, et al. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with lymphomas: results of a phase I/II study. **J Am Acad Dermatol**. 1993. 29:963-70.

EGILMEZ, N. K. et al. In vivo cytokine gene therapy of human tumor xenografts in SCID mice by liposome-mediated DNA delivery. **Gene Ther**, v. 3, n. 7, p. 607-14, Jul 1996. ISSN 0969-7128. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818648> >.

EIBL, H. et al. [On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs]. **Justus Liebigs Ann Chem**, v. 709, p. 226-30, 1967. ISSN 0075-4617. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5584876> >.

EKMEKTZOGLU, K. A. et al. Breast cancer: from the earliest times through to the end of the 20th century. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 145, n. 1, p. 3-8, Jul 2009. ISSN 1872-7654. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19394749> >.

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

FERREIRA, A. K. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57937, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516420> >.

_____. 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**, v. 66, n. 7, p. 541-8, Oct 2012. ISSN 1950-6007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902646> >.

_____. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomed Pharmacother**, v. 67, n. 6, p. 481-7, Jul 2013. ISSN 1950-6007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23773853> >.

_____. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Res**, v. 32, n. 1, p. 95-104, Jan 2012. ISSN 1791-7530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213293> >.

FILION, M. C.; PHILLIPS, N. C. Anti-inflammatory activity of cationic lipids. **Br J Pharmacol**, v. 122, n. 3, p. 551-7, Oct 1997. ISSN 0007-1188. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351514> >.

FREIMARK, B. D. et al. Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid: cationic lipid complexes. **J Immunol**, v. 160, n. 9, p. 4580-6, May 1998. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574565> >.

GAJATE, C. et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. **Oncogene**, v. 31, n. 21, p. 2627-39, May 2012. ISSN 1476-5594. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056873> >.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis turns TNF lethal. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 849-51, Dec 2011. ISSN 1097-4180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22195740> >.

GIBELLINI, F.; SMITH, T. K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 414-28, Jun 2010. ISSN 1521-6551. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503434> >.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-ŁATKA, P. Effect of edelfosine on tumor and normal cells model membranes--a comparative study. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 366-9, Mar 2010. ISSN 1873-4367. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896813> >.

HALL, S. J. et al. Induction of potent antitumor natural killer cell activity by herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 15, p. 3221-5, Aug 1998. ISSN 0008-5472. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699645> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2011. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. **Oncogene** 2008;27:6419–33.

Chen CR, Xia YH, Yao SY, et al. Virosecurinine induces apoptosis by affecting Bcl-2 and Bax expression in human colon cancer SW480 cells. **Pharmazie** 2012;67:351–4.

HERSHKO, D. D. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic biomarker and potential cancer therapeutic target. **Future Oncol**, v. 6, n. 12, p.

1837-47, Dec 2010. ISSN 1744-8301. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21142858> >.

HIGASHI-CARVALHO, L. **Propriedades antiproliferativas e de indução de apoptose da formulação lipossomal DODAB associado à fosfoetanolamina em células de carcinoma espinocelular de cavidade oral.** São Paulo: Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina de da Universidade de São Paulo: 112 p. 2017.

INCA. **Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro 2014.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 33, 2010. ISSN 1476-511X. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338039> >.

KARP, S. E. et al. Cytokine secretion by genetically modified nonimmunogenic murine fibrosarcoma. Tumor inhibition by IL-2 but not tumor necrosis factor. **J Immunol**, v. 150, n. 3, p. 896-908, Feb 1993. ISSN 0022-1767. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423345> >.

KHADEM VATAN, S. et al. Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains. **Korean J Parasitol**, v. 49, n. 1, p. 17-23, Mar 2011. ISSN 1738-0006. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461264> >.

Kidd P. Phospholipids: versatile nutraceuticals for functional foods. Functional ingredients. 2002.

LI, Q. et al. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 1, p. 173-81, Jan 2006. ISSN 0891-5849. Available at: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337891> >.

LI, Q.; SATO, E. F.; KIRA, Y.; NISHIKAWA, M.; UTSUMI, K.; INOUE, M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. **Free Radic. Biol. Med.** 2001.

LUNA, A. **ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DODAC/FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS** São Paulo: Qualificação - Programa de Pós-Graduação em ciências médicas, Faculdade de Medicina de da Universidade de São Paulo, 2015. 132.

MENDOZA, A. E. H.; CAMPANERO, M. A.; IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Antitumor Alkyl Ether Lipid

Edelfosine: Tissue Distribution and Pharmacokinetic Behavior in Healthy and Tumor-Bearing Immunosuppressed Mice. **Clin Cancer Res.** 2009.

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

MOLLINEDO, F. et al. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 7, p. 2046-54, Apr 2010. ISSN 1078-0432. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233887> >.

MOSTAFAPOUR KANDELOUS, H. et al. Mitochondrial Apoptosis Induced by Chamaemelum Nobile Extract in Breast Cancer Cells. **Iran J Pharm Res**, v. 15, n. Suppl, p. 197-204, 2016. ISSN 1735-0328. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228817> >.

MUNDER, P. G.; MODOLELL, M. Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 45, n. 1, p. 133-5, 1973. ISSN 0020-5915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4353764> >.

NA, H. K.; SURH, Y. J. The antitumor ether lipid edelfosine (ET-18-O-CH₃) induces apoptosis in H-ras transformed human breast epithelial cells: by blocking ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases as potential targets. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17 Suppl 1, p. 204-7, 2008. ISSN 0964-7058. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296338> >.

NAGANE, M. et al. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor 2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 7, p. 687-700, Jul 2010. ISSN 1523-5866. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511188> >.

NGWENYA, B. Z.; FIAVEY, N. P.; MOGASHOA, M. M. Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids. **Eur J Cancer**, v. 28A, n. 10, p. 1637-42, 1992. ISSN 0959-8049. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1389479> >.

OUTHOUSE, E. L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J**, v. 30, n. 2, p. 197-201, Feb 1936. ISSN 0264-6021. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16746003> >.

_____. Further studies of amino-ethyl phosphoric ester-a compound apparently specific to malignant tumours. **Biochem J**, v. 31, n. 9, p. 1459-63, Sep 1937. ISSN 0264-6021. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16746477> >.

PAAP, E. et al. Breast cancer screening halves the risk of breast cancer death: A case-referent study. **Breast**, Apr 2014. ISSN 1532-3080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713277> >.

PAPAZAFIRI, P. et al. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 56, n. 3, p. 261-70, Sep 2005. ISSN 0344-5704. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856232> >.

PARKER, S. E. et al. Plasmid DNA gene therapy: studies with the human interleukin-2 gene in tumor cells in vitro and in the murine B16 melanoma model in vivo. **Cancer Gene Ther**, v. 3, n. 3, p. 175-85, 1996 May-Jun 1996. ISSN 0929-1903. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8725882> >.

PEDERSEN, A. E. et al. An exploration of the patient navigator role: perspectives of younger women with breast cancer. **Oncol Nurs Forum**, v. 41, n. 1, p. 77-88, Jan 2014. ISSN 1538-0688. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368241> >.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 2001. ISSN 1362-4962. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886> >.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-6, Mar 2003. ISSN 0304-3940. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618301> >.

ROCHÉ, H. et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 36, p. 5664-71, Dec 2006. ISSN 1527-7755. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116941> >.

RUAN, S.; JIA, F.; LI, J. Potential Antitumor Effect of Harmine in the Treatment of Thyroid Cancer. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 9402615, 2017. ISSN 1741-427X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270853> >.

SCHEULE, R. K. et al. Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. **Hum Gene Ther**, v. 8, n. 6, p. 689-707, Apr 1997. ISSN 1043-0342. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113509> >.

SCHMITT, F. A journey through breast cancer research. Interview by Hannah Branch. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 10, n. 1, p. 9-11, Jan 2014. ISSN 1745-5065. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24328594> >.

SHIRATORI, Y. et al. Gene therapy for hepatic micrometastasis of murine colon carcinoma. **J Hepatol**, v. 28, n. 5, p. 886-95, May 1998. ISSN 0168-8278. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625325> >.

SILVA, M. G. L. **Avaliação antitumoral da fosfoetanolamina sintética e da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética em células tumorais de mama humana.** São Paulo: Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina de da Universidade de São Paulo, 2017. 104.

SODERGREN, M. H. et al. Carcinosarcoma of the biliary tract: two case reports and a review of the literature. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 6, p. 683-5, Jun 2005. ISSN 0954-691X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879734> >.

SPRONG, H.; VAN DER SLUIJS, P.; VAN MEER, G. How proteins move lipids and lipids move proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 7, p. 504-13, Jul 2001. ISSN 1471-0072. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433364> >.

SULIK, G. What cancer survivorship means. **Virtual Mentor**, v. 15, n. 8, p. 697-703, Aug 2013. ISSN 1937-7010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937787> >.

TAGUCHI, H.; ARMAREGO, W. L. Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. **Med Res Rev**, v. 18, n. 1, p. 43-89, Jan 1998. ISSN 0198-6325. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436181> >.

TAHARA, H. et al. Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. **J Immunol**, v. 154, n. 12, p. 6466-74, Jun 1995. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7759882> >.

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

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803-15, Apr 2001. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313928> >.

Trevisane, M. G. Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença de Chagas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. 2014

VAN DER LUIT, A. H. et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 8, p. 2337-45, Aug 2007. ISSN 1535-7163. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699729> >.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112-24, Feb 2008. ISSN 1471-0080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216768> >.

VERWEIJ J, PLATING A, VAN DER BURG M, et al. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992. 118:606-608.

WIECHMANN, L.; KUERER, H. M. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. **Cancer**, v. 112, n. 10, p. 2130-42, May 2008. ISSN 0008-543X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383519> >.

YAO, Y. et al. Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/Bax pathway. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 14, p. 1751-8, Apr 2009. ISSN 1007-9327. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360919> >.

XIAOFELI, X.; ZHENXIAO, L.; WENAN, Q.; BEIHUA, K.; JULIE, K.; JIAN-JUN, W. Inactivation of AKT induces cellular senescence in uterine leiomyoma. **Endocrinology**. 2014.

ZHANG, S. et al. Malignant transformation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 1, p. 119-26, Oct 2010. ISSN 1872-7786. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599846> >.

ZHU, X.; ZHOU, W. The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 159, 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26500608> >.

ŠAŠKOVÁ, P.; PAVLIŠTA, D. [Breast self-examination. Yes or no?]. **Ceska Gynekol**, v. 81, n. 6, p. 463-469, 2016. ISSN 1210-7832. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27918166> >.