**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E APOPTÓTICOS DA
FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA NO MELANOMA B16F10.**

RENATO MENEGUELO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós
– Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de
Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

São Carlos,

2007.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M541e Meneguelo, Renato
Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da
fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10 / Renato
Meneguelo ; orientador Gilberto Orivaldo Chierice. -- São
Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia. Área de Concentração:
Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos,
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

1. Fármacos. 2. Fosfoetanolamina sintética.
3. Melanoma animal. 4. Metástase neoplásica. 5. Câncer.
I. Título.

AGRADECIMENTOS:

"Quando todos pensam da mesma maneira, é porque nenhum pensa grande coisa."
Walter Junior

Em primeiro lugar gostaria de agradecer do fundo do coração aquele que acreditou em um sonho, por mais louco que parecesse por mais inatingível que fosse um visionário, **SR. NELSON CIANFLONE in memória**, de onde estiver nos vendo, sei que está muito feliz por nossa conquista.....

A meus pais **Reinaldo e Ana Maria** que me ensinaram que o estudo é tudo.

Meu irmão **Sandro, Ivone** e o pequeno **Oto**.

A minha esposa luz da minha vida **Vivianne Paternostro Santa Rosa**, minha filhinha querida **Anna Clara**, minha outra bebê que chegou este mês para iluminar ainda mais nossas vidas **Geovanna**, a nosso braço direito **Lurilene**, haja paciência.

Ao grande amigo, professor, mestre, que me acolheu em seu laboratório sem pedir nada em troca, acreditou em minhas maluquices, e acrescentou muitas outras, foram quase três anos de uma troca gratificante de experiências, onde aprendi que devemos defender nossos pontos de vista para podermos ampliar nosso horizonte acadêmico. Sei que obrigado é muito pouco **Prof. DR. Durvanei Augusto Maria**. Agradeço a Deus o dia em que você me deu um voto de confiança, você sabe que foi o único. Muito Obrigado.

Amigo!! Agora **Prof. Marcos Vinicius de Almeida**, só nos sabemos como foi difícil, quantas vezes passou por nossas cabeças o pensamento em desistir, sem seu exemplo eu não teria conseguido.

Prof. Dr. Salvador Claro Neto obrigado pela paciência em nossas longas discussões, cheguei até vocês sem base alguma do que falava hoje amadurecido, posso discutir de igual com muita gente.

Ao amigo **Toninho**, sem ele não teríamos o material para estudo...

À **Dr. Sandra Vasconcellos Al-Asfour** por toda a parte química que está desenvolvendo.

Ao pessoal do Butantã, um obrigado muito especial, **Ricardo e Iara** eu torço muito por vocês, também ao **Rogério, Danilo, Fernanda, Kamila, Norma e Tiago**.

E principalmente aquele que foi os meus dois braços neste trabalho **Adilson Kleber Ferreira**, nós somos uma grande equipe...

Minha sempre amiga **Janete Ferreira Rodrigues**, obrigado pela paciência, você vai para o céu com certeza.

Aquele que me mostrou um formidável mundo novo de possibilidades, que acreditou em minha capacidade, que me escolheu, para mim foi muito mais que um orientador, me conduziu como se cuida de um filho. **Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice**. A mente mais brilhante que conheci em minha vida, sou uma pessoa de muita sorte.

Certa vez uma senhora me procurou desesperada para saber se eu poderia ajudar seu esposo que tem câncer cerebral, onde os médicos afirmaram que ele já estava em estado terminal e que a única coisa a ser feito era amor de família, eu lhe disse: “Senhora não sei se posso ajudar muito, pois o que fazemos é pesquisa”. Respondeu-me ela: “Dr. qualquer dúvida que o senhor me colocar na cabeça será melhor do que a certeza que tenho; que daqui três meses não terei mais meu marido”. Abraçou-me e chorou.

Essas pessoas que mostram o valor real do trabalho que realizamos na busca da cura para esta doença que mutila tantas famílias. Não podemos parar....

Não se preocupe com o futuro, cante, não se sinta culpado por não saber o que fazer da vida...

As pessoas mais interessantes que conheço não sabiam aos vinte e dois o que queriam fazer da vida, alguns dos quarentões mais interessantes que conheço não sabem...

As suas escolhas tem sempre metade de chances de dar certo, é assim pra todo mundo...Desfrute de seu corpo, dedique-se a conhecer os seus pais impossível prever quando eles terão ido embora de vez, seja legal com seus irmãos eles serão a melhor fonte com o seu passado e, possivelmente quem vai mesmo te apoiar no futuro...

Entenda que Amigos vão e vem, mas, nunca abra mão dos poucos e bons...aceite certas verdades inescapáveis, respeite os mais velhos, você também vai envelhecer....acredite....

Esforce-se de verdade para diminuir as distâncias geográficas e destinos de vida, por que quanto mais velho você ficar, mais vai precisar das pessoas que conheceu quando jovem, aceite certas verdades inescapáveis, respeite os mais velhos, você também vai envelhecer.

Lista de Abreviações:

1 – %: Porcentagem.

2 – MTT: Método Colorimétrico.

3 – IC 50 %: Concentração Inibitória 50%.

4 – ug: micrograma.

5 – ml: mililitro.

6 – CDKs: Quinases Dependentes de Ciclinas.

7 – G1: Fase do ciclo celular.

8 – S: Fase do ciclo celular.

9 – G2: Fase do ciclo celular.

10 – M: Fase do ciclo celular.

11 – CKIs: Inibidores de Quinase Dependente de Ciclinas.

12 – P15, P16, P21, P53,...: Proteínas específica de ativação.

13 – ATP: Aenosina Trifosfato.

14 – FO: Fosforilação Oxidativa.

15 – DNA: Ácido Desoxirribonucléico.

16 – GTP: Glutamina Trifosfato.

17 – mvolts: milivolts.

18 – Bcl2: mediador químico.

- 19 – Apaf-1: Proteína de ativação.
- 20 – Bcl-xl: Proteína antiapoptótica.
- 21 – Iap: Proteína de inibição de apoptose.
- 22 – PEA: Fosfoetanolamina.
- 23 – EA: Etanolamina.
- 24 – AMP: Adenosina Monofosfato.
- 25 – ADP: Adenosina Difosfato.
- 26 – Li: Lítio.
- 27 – SNC: Sistema Nervoso Central.
- 28 – mM: Milimol.
- 29 – cm²: Centímetro quadrado.
- 30 – DMSO: Dimetil Sulfóxido.
- 31 – NCI: National Institute of Cancer.
- 32 – mg: Miligrama.
- 33 – nm: Nanômetro.
- 34 – µl: Microlitro.
- 35 – µM: Micromolar.
- 36 – µl: Microlitro.
- 37 – mm: milímetro.
- 38 – g: grama.
- 39 – g/l: gramas por litro.

- 40 – Ht: Hematócrito.
- 41 – EDTA: Anticoagulante.
- 42 – PHT: Fitohemaglutinina.
- 43 – SFB: Soro Fetal Bovino.
- 44 – Ts: Duração da fase S.
- 45 – Tpot: Tempo de Duplicação Potencial.
- 46 – RPM: Rotações por Minuto.
- 47 – mg/ml: Miligramas por Mililitro.
- 48 – mg/kg: Miligramas por Kilograma.
- 49 – Hb: Hemoglobina.
- 50 – OMS: Organização Mundial de Saúde.
- 51 – Qt: Quimioterapia.
- 52 – MDR: Resistência a múltiplas drogas.
- 53 – T/C: Tratado por Controle.
- 54 – Gm – CSF: Fator estimulador de colônias do tipo granulócito-monócito.

Lista de Figuras:

Figura 1 – Determinação da atividade citotóxica da fosfoetanolamina sintética em células de melanoma B16F10, avaliada pelo método colorimétrico MTT, as barras do histograma representam a porcentagem relativa em cada concentração das células viáveis e mortas.

Figura 2 – Curva de regressão linear e concentração inibitória 50% (IC50%) da atividade citotóxica da fosfoetanolamina sintética em células de melanoma B16F10, avaliada pelo método colorimétrico MTT.

Figura 3 – Avaliação da resposta linfoproliferativa de linfócitos T normais, após 96 horas de cultura com fosfoetanolamina sintética e com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA). A porcentagem da capacidade proliferativa foi calculada comparando-se a resposta basal (ausência de mitógeno) e o controle na presença de PHA e 10% e 1% de soro fetal bovino (SFB).

Figura 4 – Determinação da distribuição das populações de células tumorais dos tumores dorsais melanoma dos animais do grupo controle (A) e tratados com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética (B) nas diferentes fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo.

Figura 5 - Determinação da distribuição das populações de células tumorais dos tumores dorsais melanoma dos animais do grupo controle (A) e tratados

com 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética (B) nas diferentes fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo.

Figura 6 - Análise comparativa da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores tratados com 6.6 mg de fosfoetanolamina (A) e tratados com o quimioterápico Taxol (B), obtidos por citometria de fluxo.

Figura 7 - Análise comparativa da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores tratados com 1.65 mg de fosfoetanolamina (A) e tratados com o quimioterápico Taxol (B), obtidos por citometria de fluxo.

Figura 8 - Aspectos macroscópicos dos tumores dorsais melanoma do grupo tratado com 1.65mg de fosfoetanolamina sintética, após 20 dias. Observa-se massa tumoral não pigmentada, com raras áreas de irrigação (*) e formação de cápsula fibrótica (&).

Figura 9 – Aspectos macroscópicos dos tumores dorsais melanoma do grupo controle que recebeu solução salina, após 20 dias. Observa-se extensa massa tumoral nodular, com grandes áreas de irrigação (#), necrose (*) e ulceração (&).

Figura 10 – Aspecto macroscópico dos tumores dorsais melanoma do grupo tratado com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética, após 20 dias. Observa-se pequena massa tumoral amorfa (&) ou pequenos pontos de aplicação no local

da implantação das células tumorais (#), com ausência de irrigação vascular (* @).

Figura 11 – Aspecto macroscópico dos tumores dorsais melanoma do grupo tratado com o quimioterápico Taxol 3.7 uM, após 20 dias. Observa-se volumosa massa pigmentada dorsal (&) com extensa área de irrigação, neoangiogênese (*) e metástases ganglionares satélites (# @).

Figura 12 – Aspecto macroscópico das lesões metastáticas presentes nos parênquimas hepático (&) e pulmonar (*) do grupo controle e dos animais com o quimioterápico comercial Taxol 3.7 uM (#) após 20 dias. Observa-se acentuado grau de anemia nos animais do grupo controle em relação aos animais tratados.

Figura 13 – Avaliação da área tumoral dorsal dos animais portadores de melanoma B16F10 durante o tratamento com fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 9.9, 6.6 e 1.65 mg, durante 20 dias de tratamento. Os animais tratados com fosfoetanolamina sintética apresentaram uma redução significativa na carga tumoral de 78%, 87% e 89%, nas respectivas doses 1.65, 6.6 e 9.9 mg.

Figura 14 – Análise do número de metástases internas obtidas após a necropsia dos grupos de animais tratados com 9.9, 6.6 e 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética e grupo controle.

Figura 15 – Avaliação do crescimento da massa tumoral dorsal do melanoma B16F10 implantado em camundongos e tratados com os quimioterápicos combinados Taxol (Paclitaxel) nas concentrações de 3.75 e 7mg/Kg e o Etoposídeo (Vipeside) nas concentrações de 2.5 e 5 mg/Kg.

Figura 16 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais B16F10 do grupo controle. Observam-se células tumorais em divisão celular (A), pigmentos melânicos (B), vasos sanguíneos neoformados, irregulares (C), células e debris celulares pincóticos (D) e áreas de hemorragia intra-tumoral (E).

Figura 17 – Aspectos histopatológicos das lesões metastáticas dos parênquimas hepático e pulmonar. Observa-se nódulo metastático hepático (A), vasos neoformados (B) e áreas hemorrágicas (C) de lesões metastáticas do pulmão.

Figura 18 – Aspectos histopatológicos dos tumores melanoma dorsais tratados com 1.65 mg/ml de fosfoetanolamina sintética. Observa-se extensa área de necrose intra-tumoral (A), infiltrado inflamatório intra-tumoral (B e C).

Figura 19 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se raras áreas com presença de fibras de colágeno deflagradas em vermelho ao redor dos vasos sanguíneos (A) e no interior do estroma tumoral (B), do grupo controle, que receberam solução salina.

Figura 20 – Aspectos histopatológicos dos tumores melanoma dorsais tratados com 6.6 mg/ml de fosfoetanolamina sintética. Observa-se extensa área de necrose intra-tumoral (A), células apoptóticas (B) e vasos neoformados (C).

Figura 21 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se moderadas áreas com presença de fibras de colágeno em vermelho das lesões primárias, tratadas com 1.65 mg/ml de fosfoetanolamina sintética.

Figura 22 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se extensas áreas com presença de fibras de colágeno em vermelho das lesões primárias, tratadas com 6.6mg/ml de fosfoetanolamina sintética.

Figura 23 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais do grupo controle corados pelo método histoquímico de Verloff. Observam-se, nas setas vasos sanguíneos neoformados irregulares e distribuídos no interior da massa tumoral.

Figura 24 – Aspecto histopatológico dos tumores dorsais do grupo de animais tratados com fosfoetanolamina sintética 1.65 mg/ml (A) e 6.6 mg/ml, corados pelo método histoquímico de Verloff. Observa-se nas setas pequena rede de vasos sanguíneos neoformados irregulares e distribuídos no interior da massa tumoral, os quais apresentaram pequeno diâmetro.

Figura 25 – Análise do número de glóbulos vermelhos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Figura 26 – Análise do hematócrito (Ht) dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Figura 27 – Análise quantitativa da hemoglobina (Hb) dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Figura 29 – Análise quantitativa do número de leucócitos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Análises das fases do ciclo celular obtidas por citometria de fluxo das células de melanoma B16F10 dos grupos: controle, tratados com 6.6 e 1.65 mg/ml de fosfoetanolamina sintética e com o quimioterápico Taxol.

Resumo:

MENEGUELO, R.(2007). **EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E**

APOPTÓTICOS DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA NO MELANOMA

B16F10. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação da

Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São

Paulo, São Carlos, 2007.

A fosfoetanolamina sintética é uma molécula fosforilada artificialmente, com síntese inédita realizada pela primeira vez pelo nosso grupo, diferindo-se das moléculas atuais pelo seu nível de absorção de aproximadamente 90%, com diversas propriedades antiinflamatórias e apoptóticas. O objetivo principal desse estudo é avaliar os efeitos antitumorais “*in vitro*” e “*in vivo*” da fosfoetanolamina sintética em células de melanoma B16F10 implantados em camundongos Balb-c. Foram utilizados grupos de 60 camundongos Balb-c, fêmeas com aproximadamente 20g, tratados com água e ração “ad libidum”. A atividade citotóxica do composto foi testada em linhagens tumorais pelo método colorimétrico MTT, e determinada à concentração inibitória (IC50%), sua toxicidade foi também testada em linfócitos T normais, em ensaios de proliferação celular, estimulados por mitógeno. Os animais portadores de tumores foram tratados após o 14º dia do implante tumoral com solução aquosa (i.p) de fosfoetanolamina sintética e o grupo controle recebeu solução salina, e foram avaliados os seguintes parâmetros: volume tumoral, área e número de metástases em órgãos internos. Foi também realizada a comparação da fosfoetanolamina sintética em relação aos quimioterápicos comerciais Taxol e Etoposideo separados nas diferentes fases do ciclo celular.

Os resultados do tratamento com a fosfoetanolamina sintética “*in vitro*” mostraram que o composto induz citotoxicidade seletiva para as células tumorais com IC 50% de 1.69ug/ml sem afetar a capacidade proliferativa de células normais. Os animais portadores de tumores dorsais de melanoma B16F10 apresentaram significativa redução carga tumoral, mostrando inibição da capacidade de crescimento e a metastatização. A avaliação hematológica não demonstrou alterações relevantes após a administração da fosfoetanolamina sintética pela via intraperitoneal nos animais portadores de melanoma. Conclui-se que a fosfoetanolamina sintética diminuiu significativamente o tamanho de tumores de forma seletiva, sem alterações em células normais, com vantagem em relação aos quimioterápicos comerciais, pois a mesma não apresentou os terríveis efeitos colaterais dos mesmos. Neste trabalho ficou evidente a capacidade inibitória da fosfoetanolamina sintética na inibição da progressão e disseminação das células tumorais.

Palavras chaves: fármaco, fosfoetanolamina sintética, melanoma, metástases, fosfolípidos, câncer.

Summary:

MENEGUELO, R.(2007). EFFECTS ANTIPROLIFERATION AND APOPTOTIC OF THE SYNTHETIC PHOSPHOETHANOLAMINE IN MELANOMA B16F10.

106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação da Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

The synthetic phosphoethanolamine is a phosphorilad artificially molecule, with unknown synthesis carried through for the first time for our group, differing itself from current molecules for its level of absorption of approximately 90%, with diverse anti-inflammatory and apoptotic as properties. The main objective of this study and to evaluate the anti tumor effect “in vitro” and “in vivo” of the synthetic phosphoethanolamine in cells of melanoma B16F10 implanted in mice Balb-c. Groups of 60 Balb-c mice had been used, females with approximately 20g, treated with water and ration “ad libidum”. The cytotoxic activity of the composition was tested in lives tumor or normal cells for colorimetric method MTT, and determined to the inhibitory concentration (IC50%) its toxicid also it was tested in normal linphocytes T, in assays of cellular proliferation, stimulated for mitogen. The bearing animals of tumors had been dealt with after 14° day the tumor inoculation with watery solution (i.p) of synthetic phosphoethanolamine and the group control received solution saline, and had been evaluated the following parameters: tumor volume, area and number of metastases in internal agencies. Also the comparison of the synthetic phosphoethanolamine in relation to the convencionaly treatment with quimioterapics separate Taxol and Etoposideo in the different phases of the

cellular cycle was carried through. The results of the treatment with the synthetic phosphoethanolamine “in vitro” had shows that the composition induces selective citotoxicity for the tumor cells with IC 50% of 1.69ug/ml without affecting the proliferative capacity of normal cells. The bearing animals of dorsal tumors of melanoma B16F10 had presented significant reduction tumor load, showing to inhibition of the capacity of growth and the metastatization. The hematological evaluation did not show alterations the administration of the synthetic phosphoethanolamine by the intraperitoneal way in the bearing animals of melanoma. The synthetic phosphoethanolamine significantly reduced the size of tumors of selective form, without alterations in normal cells; with advantage in relation to the commercial quimioterapics therefore the same one did not present the terrible collaterals effect of the same ones. In this work it was evident the inhibitory capacity of the synthetic phosphoethanolamine in the inhibition of the progression and dissemination of the tumor cells.

Key words: drougs, synthetic phosphoethanolamine, melanoma, phospholipids, cancer.

SUMÁRIO:

1 – INTRODUÇÃO:

1.1 – Pele.....	1
1.2 – Câncer.....	3
1.3 – Etiologia.....	3
1.4 – Tumorigênese e Melanoma.....	5
1.5 – Epidemiologia do Melanoma Cutâneo.....	8
1.6 – Aspectos Clínicos do Melanoma.....	10
1.7 – Citotoxicidade: morte celular – apoptose e necrose.....	11
1.8 – Apoptose.....	13
1.9 – Aletrações Ultraestruturais Mitocondriais.....	14
1.10 – Apoptose mediado pela via mitocôndrial.....	16
1.11 – Fosfoetanolamina.....	17

2 – OBJETIVOS:

3 – MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 – Linhagens celulares tumorais e células normais.....	24
3.2 – Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT.....	24
3.3 – Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	25

3.4 – Determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	25
3.5 – Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	26
3.6 – Implantação de células tumorais.....	27
3.7 – Animais e delineamento experimental.....	27
3.8 – Divisão dos grupos experimentais.....	28
3.9 – Observação do crescimento tumoral.....	28
3.10 – Contagem e quantificação dos glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas.....	29
3.11 – Análises hematológicas.....	31
3.12 – Análises histopatológicas.....	31
3.13 – Preparo das amostras para análises histoquímicas: Picrosirius –red e Van Gienson-Verlof.....	32

4 – RESULTADOS:

4.1 – Avaliação da atividade citotóxica “ <i>in vitro</i> ” da fosfoetanolamina sintética em linhagens celulares.....	35
4.2 – Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	39
4.3 – Análise dos parâmetros tumorais dos camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com fosfoetanolamina sintética.....	48
4.4 – Avaliação histopatológica dos tumores dorsais e lesões metastáticas dos grupos tratados com fosfoetanolamina sintética e controle.....	60
4.5 – Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais portadores de melanoma B16F10 tratados e não tratados com fosfoetanolamina sintética....	75

5 – DISCUSSÃO:	82
6 – CONCLUSÕES:	93
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96.

Introdução:

1- INTRODUÇÃO:

1.1 - Pele:

A pele é constituída por dois principais componentes, a derme e a epiderme. A derme é basicamente constituída por tecido conectivo formando por fibras de colágeno, elásticas e reticulares, ricamente irrigadas por vasos sanguíneos e linfáticos, além de conter estruturas originalmente derivadas da epiderme, que são as glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e pelos. A derme possui terminações nervosas de medeiam às sensações de tato, calor, frio e dor, entre nervos do sistema nervoso autônomo simpático que regulam a atividade das glândulas sudoríparas e arteríola¹.

Em contraste, a epiderme é uma fina camada (0,1 a 0,15 milímetros de espessura) desprovida de vasos sanguíneos e terminações nervosas. É composta por duas populações distintas de células, células epiteliais ou queratinócitos (também conhecidas como células de Malpighi, que compreendem cerca de 95% da epiderme) e pelas células pigmentares ou melanócitos. A epiderme encontra-se dividida em 4 camadas ou estratos:

- Estrato basal (camada basal ou estrato germinativo): constituído por uma camada única de células colunares que delinea a superfície da derme. Os melanócitos constituem cerca de 10% das células presentes nessa camada, e a melanina é freqüentemente encontrada nos queratinócitos basais.
- Estrato espinhoso: constituído por varias camadas espessas de células poliédricas irregulares cobertas por estruturas

semelhantes a pequenos espinhos ou projeções, formando uma espécie de ponte com as células adjacentes.

- Estrato granuloso: consiste em inúmeras camadas de células irregulares e poliédricas, cujo o citoplasma contém grânulos de queratohialina (que aparentemente contribuem para a formação da queratina); como esses grânulos crescem em tamanho e número, o núcleo da célula gradualmente se degenera culminando na morte da mesma.
- Estrato córneo: composto por um número variável de camadas de células queratinizadas mortas, próximas umas das outras^{2, 3,4}.

Os melanócitos são células altamente especializadas que produzem e exportam melanina, um heteropolímero cuja estrutura precisa é até hoje desconhecida. Em mamíferos, estão presentes na camada basal da epiderme, nos folículos pilosos, na derme, na retina e íris. Na pele, os melanosomos (organelas que contêm melanina produzida nos melanócitos são transferidas para os queratinócitos vizinhos por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, mas que parece envolver a fagocitose da ponta dos processos dendríticos dos melanócitos pelos queratinócitos)^{5, 6,7}.

Por serem altamente diferenciados, os melanócitos apresentam baixa atividade mitótica *“in vitro”* e *“in vivo”* estas células necessitam de uma combinação de fatores de crescimento e agentes que elevem a atividade das proteínas quinase A e C, para manter uma taxa ótima de proliferação^{8, 9,10}.

1.2 - Câncer:

Câncer é o nome dado a uma patologia com mais de 100 subdivisões que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. A maioria dos cânceres origina-se de uma única célula alterada. O câncer é o resultado de uma série de alterações que controlam o crescimento e o comportamento celular. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco de vida. As células cancerosas mostram uma variedade de características e propriedades notáveis¹¹.

As células malignas possuem traços morfológicos que as distinguem, incluindo um núcleo maior, mitocôndrias pouco funcionais, alterações ultra estruturais do citoesqueleto, variação na diferença de potencial transmembrana, maior produção de energia anaeróbia, entre outras¹².

1.3 - Etiologia:

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de

se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns desses fatores são bem conhecidos: o cigarro, exposição excessiva ao sol, alguns vírus. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna, porém o surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores do câncer^{13, 14}.

As alterações são principalmente observadas dentro dos cromossomos das células cancerosas, bem como das “células transformadas” em cancerosas. As células normais mantêm seus cromossomos diplóides direcionados ao crescimento e divisão celular, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”. Em contraste, as células cancerosas freqüentemente têm aberrações cromossômicas, uma condição patológica conhecida por aneuploidia. Assim, os cromossomos diplóides de uma célula normal podem sofrer lesões, porém, antes que a célula sofra uma transformação em célula cancerosa, ocorre à ativação de proteínas específicas da célula que causam a sua eliminação, num processo conhecido por apoptose¹⁵.

Entretanto a célula cancerosa freqüentemente falha na estimulação da apoptose, e dessa forma seus cromossomos se desorganizam com mais intensidade.

As mais notáveis alterações morfológicas que ocorrem no citoplasma de uma célula cancerosa envolvem o citoesqueleto. Enquanto uma célula normal contém organizada rede de microtúbulos, microfilamentos, e filamentos

intermediários, o citoesqueleto da célula cancerosa é desorganizado e com redução na quantidade dessas organelas. Muitas mudanças morfológicas também são observadas na superfície da célula, incluindo o aparecimento (ou desaparecimento) de componentes específicos, como proteínas de superfície. Algumas células cancerosas possuem novas proteínas de superfícies, conhecidas por antígenos associados a tumores, que induzem a formação de anticorpos específicos contra as células^{16, 17}. Sendo que, quando as ações desses anticorpos se tornam insuficientes, as células cancerosas crescem desordenadamente em número e diferenciando-se em células tumorais. Essas mudanças nas superfícies das células cancerosas alteram a adesividade para com outras células teciduais bem como com substratos não celulares (proteínas de adesão). Assim, a perda da adesividade permite que as células cancerosas se destaquem da massa tumoral e migrem para outros tecidos e órgãos do corpo, cujo processo é conhecido por metástase¹⁸.

1.4 - Tumorigênese e Melanoma:

O câncer é uma doença genética no sentido de que o fenótipo maligno resulta de uma alteração genética que é transmitida da célula alterada para suas células filhas. Todos os dias, milhões de células se dividem no organismo adulto normal. A cada divisão celular, estamos expostos a sofrer o efeito dos inúmeros carcinógenos ambientais. No entanto, o aparecimento e desenvolvimento de um clone de células tumorais é um evento relativamente raro. Isto ocorre porque a célula necessita romper uma série de barreiras fisiológicas para se tornar cancerígena. As barreiras mais primárias são os próprios pontos de controle do ciclo celular. Esta sequência de fases, com

seus respectivos pontos de controle permitem que a célula complete seu ciclo normal, replicando-se sem dar origem a células anormais. A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras. Estas vias respondem a fatores extracelulares, os quais agem através de uma sequência de proteínas – por exemplo: receptores → proteína G → proteína-quinase → fatores de transcrição. A progressão pelo ciclo celular a seguir, em parte, é controlada, por uma série de proteínas chamadas “quinases dependentes de ciclinas” (CDKs), particularmente nas transições de fases, tanto de G1 para S quanto de G2 para M¹⁹. Os níveis de ciclinas oscilam durante as fases do ciclo, determinando o momento apropriado de sua ligação com CDKs. Este grupo de enzimas, por sua vez, fosforila a progressão de uma fase a outra do ciclo celular. Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras de tal progressão no ciclo de divisão celular. À semelhança dos fatores estimuladores que levam à produção de ciclinas/CDKs, os reguladores negativos ativarão inibidores dos CDKs: os CDKIs¹⁹.

Podemos distinguir duas famílias de CDKIs, de acordo com seu mecanismo de ação, homologia e CDK alvo:

- 1) o grupo do p21, p27 e p57.
- 2) o grupo do p15, p16, p18 e p19¹⁹.

Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (chamados de oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (chamados de genes supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais.

Cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é codificada por um gene. Mutações nestes genes podem levar à desregulação do ciclo celular.

Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são chamados proto-oncogenes, pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função à célula mutante. Ao contrário, as proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais. Mutações neste grupo de genes se manifestarão pela sua falta de ação, mas o efeito final será similar: perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal¹⁷. Já se sabe há muito tempo que expressão imprópria de fatores de crescimento ou de seus receptores contribui para o desenvolvimento de neoplasias. Mais recentemente, demonstrou-se que hiper-expressão da ciclina D1 induz progressão de hiperplasia a carcinomas em camundongos. Amplificações da ciclina D1 também foram encontradas em tumores primários e linhagens celulares tumorais¹⁹. No ser humano, medidas indiretas baseadas na prevalência de tumores em diferentes faixas etárias, permitem inferir que são necessárias cerca de cinco a seis mutações sucessivas para que uma célula se torne maligna e agressiva¹⁸.

Os mecanismos pelos quais os melanócitos tornam-se malignos “*in vivo*” ainda é pouco conhecido; no entanto, a ativação e inativação de oncogenes dominantes e recessivos estão envolvidos no processo tumoral. Sabe-se que as células neoplásicas apresentam profunda anormalidade quando interagem com seu micro ambiente, as transformações malignas são provavelmente também alterações gênicas que codificam fatores de crescimento e/ou seus

receptores, o que confere autonomia de sinais proliferativos positivos, independente do meio extracelular.

Outra evidência que suporta a idéia do envolvimento de pré-disposição genética e o fato que 10% dos pacientes portadores de melanoma possuem histórico familiar da doença (pelo menos um parente também desenvolveu o tumor)²⁰.

1.5 - Epidemiologia do Melanoma Cutâneo:

Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, que migram durante o desenvolvimento embrionário para a epiderme e cuja principal função é a síntese e transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos circunvizinhos²⁸. Em parte, é o tipo de grânulo de melanina sintetizado pelo melanócito, o qual pode ser composto por eumelanina (pigmento marrom ou preto), feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho) ou uma mistura de ambos, que irá determinar a coloração da pele. A quantidade de melanócitos presentes na epiderme varia segundo a região anatômica, sendo cabeça e antebraço as regiões com maior densidade dessas células²⁶. Estímulos externos tais como a radiação ultravioleta, podem induzir à proliferação dos melanócitos. Em indivíduos expostos à radiação solar, observa-se um aumento da sua quantidade em regiões do corpo mais expostas²¹.

As mudanças proliferativas no sistema melanocítico, da menos para a mais agressiva, são classificadas como:

- 1 - nevo melanocítico benigno;

- 2 - nevo displásico;
- 3 - melanoma de crescimento radial;
- 4 - melanoma de crescimento vertical;
- 5 - melanoma metastático.²⁸

Tanto o nevo melanocítico benigno quanto o displásico são considerados marcadores para o melanoma, e sua presença aumenta o risco de desenvolvê-lo^{57, 21, 24, 28}. Considera-se o nevo displásico como uma lesão precursora do melanoma¹⁵. De fato, em estudos clínicos de seguimento de lesões cutâneas, observou-se a evolução do nevo displásico para melanoma²⁴.

O melanoma corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica, no qual a instabilidade genética das células iniciadas leva a um aumento da sua capacidade proliferativa e de invasão¹⁵. Seu processo de progressão aumenta em agressividade, passando pelas fases de crescimento radial, vertical e no final, a metastática²⁴.

O melanoma cutâneo é classificado em quatro grupos clínico-histológicos:

- 1 - melanoma em lentigo maligno;
- 2 - melanoma disseminativo superficial;
- 3 - melanoma nodular;
- 4 - melanoma acral lentiginoso.

O primeiro subtipo corresponde a 5% dos melanomas em caucasianos, e é mais freqüentemente diagnosticado em mulheres, indivíduos com idade superior a 60 anos e em áreas anatômicas mais intensamente expostas ao sol. O subtipo mais comum em indivíduos de pele clara é o disseminativo superficial, correspondendo a 70% dos melanomas diagnosticados. A

localização anatômica predominante varia em função da idade, ocorrendo nos indivíduos mais jovens em áreas menos expostas ao sol (costas, braços, ombro, perna e coxa) e entre os mais velhos nas mais expostas (cabeça e pescoço)²⁵. O subtipo nodular é o segundo mais comum entre caucasianos, e corresponde entre 10 - 12% dos melanomas diagnosticados²⁸. Similarmente ao disseminativo superficial, a sua distribuição anatômica varia com a idade²⁵. O subtipo mais raro é o melanoma acral lentiginoso²⁴. Esse é mais comum entre negros e as áreas anatômicas predominantes são as palmas, solas e leito ungueal^{23, 25}.

O prognóstico para melanoma é melhor para os subtipos; lentigo maligno e disseminativo superficial. O pior prognóstico está associado à idade superior a 60 anos, gênero masculino, lesões localizadas no tronco, tumores de maior espessura, e padrão sócio econômico mais baixo^{8, 27, 28,31}.

1.6 - Aspectos Clínicos do Melanoma:

O tumor apresenta, na maioria das vezes, duas fases distintas:

1 - fase inicial ou de crescimento radial, no qual a lesão ainda é plana, pequena e possui comportamento mais benigno,

2 - fase de crescimento vertical, com pior prognóstico, apresentando células malignas profundamente localizadas na derme reticular ou mesmo invadindo o subcutâneo.

A impressão clínica é de que aproximadamente metade dos melanomas surgem em associação com nevos preexistentes.

Sinais precoces em um nevo que podem sugerir malignidade incluem variações de cor, prurido, aumento do tamanho, irregularidade das bordas e desenvolvimento de satelitose ulceração e sangramento que são sinais tardios^{29, 30}.

Uma recente proposta divide as lesões de pele em três classes:

A - Classe I representa o nevo precursor;

B - Classe II são lesões intermediarias nas quais as células melanocíticas encontram-se confinadas a epiderme ou em micro invasões na derme e representada pelos melanomas *in situ* ou melanomas invasivos;

C - Classe III compreende os melanomas tumorigênicos.

Assim como em qualquer sistema neoplásico, o melanoma pode eventualmente escapar de etapas durante seu desenvolvimento, isto é, aparecer mesmo na ausência de lesões intermediarias, alternativamente o melanoma pode surgir da transformação maligna de células precursoras³².

1.7 - Citotoxicidade: morte celular-apoptose e necrose:

Fatores como estresse oxidativo, anóxia, isquemia e uma grande variedade de substancias tóxica são capazes de causar danos severos, culminando na morte celular o que pode ocorrer pelo processo conhecido por apoptose ou por outro extremo denominado necrose. Estudos demonstram que células cancerígenas têm uma peculiaridade em comum em relação à produção de energia, onde a via preferencial de produção de coenzimas

reduzidas (ATPs), é a glicólise anaeróbica que contra põem a fosforilação oxidativa³³.

A fosforilação oxidativa mitocôndrial é o meio mais comum e eficaz de produção de ATP pelas células, através da via do ciclo de Krebs, onde produz a maior parte energia que será disponibilizada para os vários compartimentos celulares, em quantidades diferentes para cada organela. Sabemos que a fosforilação oxidativa (FO) produz 17 vezes mais ATPs em relação à glicólise anaeróbia. O ponto em comum e focado por nós esta relacionado na teoria de **Cabtree**. Que existe inibição da FO que ocorre quando se estimula a glicólise anaeróbia, este efeito e observado somente em células tumorais e leveduras. A FO fornece energia para o citoplasma e a glicólise anaeróbia para o núcleo celular, em células cancerígenas temos uma diminuição de ATPs no citosol conseqüentemente aumento da função glicolítica que produzirá energia para o núcleo celular gerando conseqüências para o hospedeiro, como divisão celular perpétua³³

As células cancerígenas apresentam grande variedade de estágios de diferenciação, indo de células altamente diferenciadas, semelhantes a célula original com glicólise anaeróbia próxima do normal e uma baixa taxa de crescimento, até células altamente indiferenciadas com alta glicólise anaeróbia e rápida velocidade de crescimento. A perda de ATPs pelo núcleo das células malignas fazem com que haja um impedimento de algumas funções celulares primordiais, como, transcrição e replicação de DNA, diminuindo a proliferação celular e iniciando os mecanismos de apoptose. Em alguns tipos celulares a decisão de morrer por apoptose ou necrose é determinada pela quantidade de

ATPs presente na célula, de modo que a necrose acontece quando a quantidade de coenzimas é limitante^{34, 35}.

1.8 - Apoptose:

O termo apoptose é usado nos casos de morte celular quando, a célula diminui seu volume, apresenta alterações em sua superfície como a externalização de fosfatidilserina (que se liga com alta afinidade a proteína anexina V), alterações nucleares típicas como condensação e marginalização da cromatina, além da quebra do DNA em pequenos fragmentos³⁶.

Com respeito aos mecanismos intracelulares que participam da apoptose, estes processos podem ter início com a ativação de um receptor específico ou por alterações nas mitocôndrias, sendo que ambos levam ao vazamento do citocromo c dessa organela e a ativação de caspases, família de sisteínas proteases que coordenam e atuam como efetores da apoptose, promovendo a hidrólise de proteínas e DNA, alterações do citoesqueleto, dentre outros processos apoptóticos³⁷.

A resistência a apoptose é uma característica das células cancerígenas. O conceito de que a apoptose pode influenciar o fenótipo maligno de uma célula foi primeiramente mencionado em 1972³⁶. Contudo, a importância do processo na patogênese do câncer permaneceu sob investigação por quase duas décadas, até que evidências de genes reguladores da apoptose no processo de tumorigênese comesçassem a surgir. Sabe-se, que em grande parte as terapias existentes contra os diversos tipos de câncer eliminam as células malignas através da indução de apoptose, de modo que, alterações na

regulação deste tipo de morte celular podem tornar o tumor mais resistente ao tratamento, assim especulasse que um desequilíbrio das proteínas reguladoras do processo apoptótico possa contribuir a resistência do melanoma maligno ao tratamento. As bases moleculares para a resistência a apoptose em melanoma ainda não são bem compreendidas, alterações nas diversas etapas do programa da morte celular, tem sido descritos, variando desde a ineficiência da sinalização extracelular, ativação de caspase 8 até o desbalanço na expressão de proteínas pró e anti apoptótica³⁷.

1.9 - Alterações Ultraestruturais Mitocondriais:

Mitocôndria é uma organela citoplasmática que está envolvida nos processos primordiais de respiração celular a qual pertence à maquinaria celular, sendo também uma das mais importantes organelas celulares. A mitocôndria é abastecida pela célula que a hospeda por substâncias orgânicas como oxigênio e glicose, as quais processam e convertem em energia na forma de ATP, e fornece para a célula hospedeira. Tendo como função a produção de coenzimas reduzidas pela cadeia de fosforilação oxidativa, função essa essencial para as células de mamíferos. São responsáveis pela produção de grande parte dos compostos fosfatados de alta energia (ATP, GTP, creatina fosfato) e também participam da geração de calor celular, controle das concentrações de cálcio citosólicos, regulação da morte celular, geração e detoxificação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

Existe uma íntima relação entre o potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi$ -m), e proliferação celular onde a queda do potencial transmembrana a

níveis inferiores a -15mvolts, desencadeia um mecanismo de síntese de DNA nuclear dependente de glicólise e conseqüente mitose, os valores normais dos potenciais transmembranas devem permanecer em torno de -20mvolts à -90mvolts, dependendo do tipo celular, e sendo mantidos estes valores através da FO³⁸.

A alteração ultraestrutural da cadeia de transporte de elétrons como uma das explicações para diminuição do processo respiratório, uma seqüência de enzimas respiratórias que se localizam na membrana interna mitocondrial estão cobertas por lipídeos para isolar o transporte de elétrons da fase aquosa e evitar um curto-circuito.

O sistema efector-mecânico-químico responsável pelo inchaço e contração da mitocôndria onde está intimamente ligado a cadeia respiratória, e sua seqüência de acoplamento responsável pela FO, este sistema pode sofrer lesão devido alterações metabólicas dos ácidos graxos, fosfolipídios e colesterol, componentes estes da membrana interna da mitocôndria. Uma vez que a perda da habilidade do inchaço-contração mitocondrial parece ser um fator constante de todas as mitocôndrias tumorais é possível que a maioria dos tumores apresente lesão da camada lipídica isolante.

Em relação as mitocôndrias podemos seguir os seguintes passos, um carcinógeno lesa a membrana mitocondrial, provoca escape de elétrons que alimenta a geração de radicais livres que vão lesar o DNA, ocorrendo então a fase de iniciação do câncer³⁸. A lesão da mitocôndria diminui a FO que faz surgir o predomínio da glicólise anaeróbia que gera a proliferação celular maligna. O sistema mitocondrial defeituoso existente nas células cancerosas pode ser melhorado e o fenômeno sendo reversível do ponto de vista estrutural

e funcional com a mudança do metabolismo anaeróbio para o aeróbio (FO), promovendo diferenciação de célula maligna em célula não tumoral³³.

A região lesada da membrana mitocondrial interna pode ser susceptível a reparo porque o impedimento respiratório *“in vitro”*, é substancialmente diminuído ou abolido pela adição de lipídeos totais, obtidos de mitocôndrias normais³⁸.

1.10 - Apoptose mediado pela via mitocondrial:

A via mitocondrial envolve membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, mais precisamente, elementos da sub-família BH3 estas proteínas, que incluem a Bid, Bim, Harakiri, Noxa, entre outras, possuem apenas um dos domínio (o BH 3) característicos da família Bcl-2. Em resposta a um estímulo, que compromete outro conjunto de membros pró apoptóticos, a sub-família da Bax, que inclui a Bax, Bak e, provavelmente, a Bok, que normalmente se encontram fracamente associados à membrana externa da mitocôndria, prevalecendo majoritariamente no citosol. A interação entre proteínas das subfamílias BH3 e Bax leva à oligomerização dos elementos do último grupo, seguido de inserção na membrana externa da mitocôndria. Estas moléculas passam, então, a constituir canais de saída de proteínas intermembranares desde a mitocôndria até ao citoplasma, incluindo o citocromo c e o factor indutor da apoptose. O citocromo c, uma vez liberado, ativa uma proteína citoplasmática designada de Apaf-1, a qual recruta e ativa a pró-caspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptossoma. A caspase-9, na sua função de “caspase iniciadora”, irá requerer e ativar a caspase-3, “executora”, a qual

degradará proteínas importantes para a viabilidade celular, e também, outras caspases. As proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, bloqueiam a morte celular por prevenirem a liberação das proteínas intermembranares da mitocôndria. No entanto, uma vez ultrapassada a fase de morte celular que envolve, as proteínas anti-apoptóticas, deixam de ter qualquer efeito na inibição da apoptose. As proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2, podem inter atuar entre si através dos domínios de homologia BH, formando homo e heterodímeros e regular, assim, reciprocamente, as suas funções. Por outro lado, a função das “caspases executoras” também pode ser modulada por outro tipo de proteínas, as IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), que podem ligar à caspase 9 e inibir sua atividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico. Contudo, também a atividade destas proteínas podem ser reguladas por outra proteína de nome duplo Smac/DIABLO, a qual, juntamente com o citocromo c, é liberada do espaço intermembranar da mitocôndria durante a apoptose. A Smac/DIABLO associa-se às IAPs e inibe sua ação, permitindo a ativação da caspase 9 a partir do complexo Apaf-1, e consequentemente, favorecendo a apoptose^{40, 41,42}.

1.11 - Fosfoetanolamina:

A fosfoetanolamina (PEA) foi isolada em 1936 por **OUTHOUSE**, (um monoéster cujo grupo R corresponde a NH₂-CH₂-CH₂-), de tumores malignos bovinos, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza⁴³. Após seus trabalhos, outros pesquisadores

encontraram a fosfoetanolamina em intestinos de ratos e em tecidos cerebrais de bovinos ^{44,45}.

Por estarem presentes em tecidos orgânicos, surgiu um especial interesse científico nos compostos fosforilados, com o objetivo de se elucidar o papel bioquímico destas substâncias. Assim, vários trabalhos enfocaram os diferentes comportamentos químicos dos fosfolipídios, fosfoproteínas e outras classes de organofosforados ⁴⁵.

Os aspectos da interação entre ésteres fosfóricos, como a lecitina, a cefalina e a serina, com íons metálicos como sódio e potássio. Sugeriram, na época, um papel bioquímico destas substâncias, no controle do equilíbrio entre os eletrólitos nos organismos vivos. Desde então, o interesse na interação fosfolipídeos-metais tem aumentado e outros trabalhos abrangendo complexações com outros cátions metálicos foram publicados, como o exemplo do estudo onde foram medidas as constantes de estabilidade dos complexos formados entre adenosina mono, di e trifosfato (AMP, ADP e ATP) com cálcio. Tais complexações são de grande importância na formação das lipoproteínas, transporte de cátions e outros processos bioquímicos ^{46, 47, 48}.

Verificou-se existir uma interação específica e atípica entre a fosfatidilserina e o cátion Li(I), resultando na cristalização de um complexo cristalino. Como o lítio costuma ser usado na terapia de doenças maníaco-depressivas, esses autores sugeriram que esta interação representaria provavelmente um papel na ação farmacológica do lítio ⁴⁹. Com relação ao equilíbrio de dissociação da fosfoetanolamina, preocupados em manter um rigor para cálculo termodinâmico, surpreendentemente ignoraram o desvio ocorrido do pK da forma protonada e a forma livre da protonação. Esse estudo

do comportamento da FO gerou interesse de verificar se outros aminoácidos apresentariam também tal fenômeno de dimerização, já que possuem a mesma estrutura⁵⁰.

A fosfoetanolamina orgânica e a etanolamina (EA) estão presentes no cérebro normal em grandes quantidades e sua concentração também se encontra aumentada em vários tipos de tumores, onde este aumento pode ser da ordem de até 10 vezes⁵¹. Essas aminas estão envolvidas no metabolismo dos fosfolípides e são precursoras da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilcolina, dois dos quatro fosfolípides que compõe a membrana celular⁵². Foi demonstrado por vários pesquisadores que a PEA e a EA são liberadas por despolarização em algumas circunstâncias, embora não se saiba qual é o verdadeiro significado fisiológico desta constatação, discute-se ainda quais as reais interações eletroquímicas envolvidas na dimerização do composto fosfoetanolamina no organismo^{52, 53}.

As funções precisas da PEA e da EA ainda são desconhecidas. No coelho a PEA é liberada do hipocampus após despolarização com potássio, glutamato ou metil-aspartato. A liberação de PEA está sempre associada com o aumento da concentração de taurina. A interação entre taurina e PEA foi confirmada quando se mostrou que a taurina exógena e os bloqueadores da recaptação de taurina aumentam os níveis de PEA. O metil-aspartato induz a liberação de taurina e PEA dos locais dendrosomáticos, mas não nos sinaptosomáticos⁵⁴.

A EA se converte em PEA no sistema nervoso sob a ação da etanolamina-kinase. No próximo passo, através da via de Kennedy, forma-se a fosfatidiletanolamina, um dos quatro fosfolípides componentes da membrana

celular⁵⁵. Uma segunda via envolve o cálcio estimulando a incorporação de serina, etanolamina e colina nos fosfolípides endógenos já existentes, em reações que não precisam de ATP⁵⁶. A colina é uma trimetil-etanolamina e se transforma por acetilação em acetilcolina.

Estudos recentes indicam que muitas patologias de SNC e tumores inespecíficos, têm causa provável na deficiência de fosfoetanolamina. Em pacientes com doença de Alzheimer confirmadas neuropatologicamente, foram dosados a fosfoetanolamina nas regiões de predileção da doença. Os dados foram comparados com cérebros normais da mesma idade. Constataram que com diferenças estatisticamente significantes, quando comparados com cérebros normais da mesma idade, os níveis de fosfoetanolamina se encontravam 64% reduzidos no cortex temporal (área 21 de Brodmann), 48% no cortex frontal (área 9 de Brodmann) e 40% no hipocampo⁵⁷.

Objetivo:

2 - Objetivos:

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos anti-tumorais e anti-proliferativos “*in vitro*” e “*in vivo*” da fosfoetanolamina sintética em células normais e linhagens de células tumorais de Melanoma Murino B16F10. Foram avaliados os seguintes aspectos na inibição do crescimento e disseminação das células tumorais em animais portadores de melanoma:

- A determinação das concentrações inibitórias (IC50%) e toxicidade nas linhagens tumorais e células normais por ensaios colorimétricos (MTT);
- Analisar as modificações na distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo e as proporções de células mortas por necrose e ou apoptose;
- Avaliar “*in vivo*” os efeitos anti-tumorais nos camundongos portadores de melanoma B16F10 e as comparações com os quimioterápicos comerciais Taxol e Etoposídeo;
- Avaliar as alterações histopatológicas e histoquímicas da matriz extracelular e dos vasos sanguíneos dos tumores nos animais tratados com diferentes concentrações da fosfoetanolamina sintética
- Determinar as alterações hematológicas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) nos animais portadores de melanoma submetidos ao tratamento com fosfoetanolamina sintética.

Materiais e Métodos:

3 - Materiais e Métodos:

3.1 - Linhagens celulares tumorais e células normais.

A linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 foi gentilmente cedida pelo Instituto de Pesquisa para o Câncer Ludwig, Genebra, Suíça. As células serão cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura (RPMI - 1640), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. Antes das células atingirem confluência, as células serão subcultivadas para ampliação e congelamento (meio completo contendo 10% de dimetil-sulfóxido), e mantidas em nitrogênio líquido. As suspensões celulares utilizadas para a implantação no flanco dorsal dos animais serão obtidas após o tratamento dos frascos de cultura com Tripsina 0,2% por 5 minutos e inativação com 10% de soro fetal bovino. As células desprendidas serão centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada por contagem em câmara de Mallassez.

3.2 - Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT.

A viabilidade celular das linhagens celulares tumorais e normais foram tratadas com as diferentes concentrações de fosfoetanolamina sintética e avaliadas pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide)⁵⁸. Este método é baseado na redução do MTT a Formazan pelas células vivas. A determinação da sensibilidade das diferentes doses foi otimizada de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto

Nacional de Câncer, USA (NCI). Foi determinada a atividade citotóxica das suspensões das linhagens celulares e das células tumorais “*in vivo*”, retiradas cirurgicamente e em condições estéreis, incubadas em placas de 96 orifícios. Foram adicionados 10 ml de MTT (5mg/ml) às células, incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o meio foi removido e acrescentado 100 ml de dimetilsulfoxido (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 (TiterTek Multiskan)^{59,71}.

3.3 - Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo aplicada no estudo do ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, aploidia, a fração de proliferação celular, e a porcentagem de células encontradas nas fases G₀/G₁, S e G₂/M, indicando parâmetros uni ou multivariáveis, prognósticos e possíveis rumos terapêuticos. A análise da porcentagem de células fornece o percentual de células que estão sintetizando DNA (“labeling index”), da duração da fase S (T_s) e do tempo de duplicação potencial (T_{pot}).

3.4 - Determinação do conteúdo de DNA por Citometria de Fluxo.

Alíquotas das suspensões das células normais e tumorais tratadas e não tratadas, foram imediatamente congeladas em tampão citrato (2mM), sucrose

25 mM e 0,05% dimetil sulfoxido (DMSO), e mantidas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.

Após o descongelamento das amostras em banho de gelo, as células foram digeridas com 375 ml de tripsina 0,03 g/l (Sigma) por 10 minutos à temperatura ambiente e neutralizada com o inibidor de tripsina 0,5 g/l (Sigma), ribonuclease A 0,1 g/l (Sigma) e espermina 1,2 g/l (Sigma). As amostras foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo, níveis de apoptose (Sub-G1) e conteúdo de DNA na fase S, que serão obtidos pela análise em Software Mod-fit.

3.5 - Determinação das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo:

As suspensões celulares (106/ml) normais dos tumores dorsais e ou metástases foram centrifugadas duas vezes a 3000 rpm com solução PBS e ressuspensas em 200 ml solução de iodeto de propidium (20 mg/ml), contendo 20 ml Triton X-100 e 4 mg RNase-A, por trinta minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria, e as imagens adquiridas serão capturadas em citômetro de Fluxo (Scalibur-Becton e Dickson) e analisadas em Software Cell-Quest. As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (G0-G1, fase S e G2-M) serão analisadas em software Modi-fit

3.6 - Implantação das células tumorais:

Os camundongos foram injetados subcutaneamente no dorso com 5×10^4 células tumorais de melanoma murino B16F10. Após o décimo quarto dia do implante tumoral, os tumores dorsais foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Os tumores em média apresentaram diâmetro médio de 0,5 cm², foi iniciado o tratamento com a fosfoetanolamina sintética nas diferentes concentrações descritas anteriormente, injetados pela via intraperitoneal.

Como grupo controle os animais receberam solução salina pelas mesmas vias de tratamento. Após o 20º dia do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e em seguida, realizados a necropsia, os tumores dorsais analisados, lesões internas macroscópicas identificadas, medidas e fotodocumentadas. Amostras dos tumores dos diferentes grupos de tratamento e grupo controle, não tratado, foram processadas para as análises do conteúdo de DNA, ciclo celular e anatomopatológico.

3.7 - Animais e Delineamento Experimental:

Utilizaremos 40 camundongos da linhagem Balb c, fêmeas e machos, com aproximadamente 25g, idade aproximada de 6 a 8 semanas, dieta e água “*ad libitum*”, dos quais serão divididos em 4 grupos distintos a seguir:

3.8 - Os grupos experimentais foram compostos por:

Grupo A – 10 camundongos Balb c, inoculados com 5×10^4 células tumorais pela via subcutânea, após o 14º dia do implante os animais foram tratados com fosfoetanolamina sintética pela via intraperitoneal com a concentração de 0,033g/ml em 100ul;

Grupo B – 10 camundongos Balb c, inoculados com 5×10^4 células tumorais pela via subcutânea, após o 14º dia do implante os animais foram tratados com fosfoetanolamina sintética pela via intraperitoneal com a concentração de 0,066g/ml em 200ul;

Grupo C – 10 camundongos Balb c, inoculados com 5×10^4 células tumorais pela via subcutânea, após o 14º dia do implante os animais foram tratados com fosfoetanolamina sintética pela via intraperitoneal com a concentração de 0,099g/ml em 300ul;

Grupo D – 10 camundongos Balb c, inoculados com 5×10^4 células tumorais pela via intraperitoneal, após o 14º dia do implante os animais foram tratados com solução salina pela via intraperitoneal;

3.9 - Observação do crescimento tumoral:

Após a injeção de células B16F10, o crescimento tumoral foi medido e fotodocumentado, diariamente com o auxílio de um paquímetro para medições longitudinais e transversais do tumor (duas medidas). Foram calculados a área e o volume médio do tumor, através das seguintes fórmulas:

$A = \pi R^2$ e $V = 4/3 \pi R^3$ onde:

A=área, R= raio, V= volume.

Os animais foram sacrificados a cada etapa de tratamento, necropsiados e os nódulos tumorais macroscópicos presentes nos órgãos internos foram contados e medidos.

3.10 - Contagem e quantificação dos glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas:

Glóbulos Vermelhos: alíquotas de 10µl do sangue de cada grupo experimental e controle foram diluídas 1:1000 em solução salina 0,9% e 0,01% paraformaldeído para a análise do número total de glóbulos vermelhos. A contagem foi realizada em câmara de Malassez, e o número de células será expresso em 10^9 /ml.

Hematócrito: a determinação do hematócrito (Ht) foi realizada pela coleta do sangue em microcapilar de 10ul heparinizado selado em uma das extremidades com fogo no bico de Bunsen. O capilar foi colocado em microcentrifuga com a extremidade fechada voltada para o círculo externo e centrifugada a 11.000 rpm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos após a análise comparativa da relação do sedimento rico em glóbulos vermelhos e o plasma, em tabela de referência padrão.

Hemoglobina: a determinação do teor de hemoglobina foi coletada 200ul de sangue do plexo venoso retro orbital em tubos microcapilares contendo como anticoagulante o EDTA. Utilizando-se o método da

cianometa-hemoglobina, com leitura em espectrofotômetro 540nm, foram analisadas as concentrações de hemoglobina.

Plaquetas: a contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando como diluente a solução de oxalato de amônio a 1% (líquido de Brecker). Também foram realizados esfregaços sanguíneos, dos diferentes grupos de animais tratados e grupo controle para a avaliação da morfologia e do diâmetro plaquetário médio. Foram também avaliados aspectos citológicos, como a presença de macro ou micro plaquetas, que são mais funcionais que as plaquetas normais e indicam regeneração da medula óssea e a presença de agregados plaquetários indicativos de alterações tóxicas promovidas pelos compostos como também alguma alteração morfológica celular.

Leucócitos: uma alíquota de 10 μ l do sangue de cada grupo experimental e controle foram diluídos em 90 μ l de solução de Turk (azul de metileno 0,5% em 30% de ácido acético glacial) para a análise do número total de glóbulos brancos. A contagem foi realizada em câmara de Malassez, e o número de células foi expresso em 10⁶/ml. O sangue total dos camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com fosfoetanolamina sintética durante 20 dias e grupo controle que recebeu solução salina, foram coletados pela punção do plexo venoso retro-orbital com o auxílio de um microcapilar de 10 μ l heparinizado. Parte desse material foi utilizado para a confecção do esfregaço sanguíneo.

3.11 - Análises Hematológicas:

A análise dos números globais de glóbulos vermelhos e leucócitos constitui em um importante exame de auxílio diagnóstico para doenças hematológicas, sistêmicas e ações farmacológicas ou terapêuticas. Rotineiramente indicado para avaliação de anemias, neoplasias sistêmicas, reações infecciosas e inflamatórias, acompanhamento de terapias medicamentosas e avaliação de distúrbios plaquetários. Fornecem dados para classificação das anemias de acordo com alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias e conseqüente direcionamento diagnóstico e terapêutico, orienta na diferenciação entre infecções viróticas e bacterianas, parasitoses, inflamações, intoxicações, interações medicamentosas e neoplasias através das contagens globais e diferenciação de leucócitos e avaliação morfológica dos mesmos.

As lâminas para as análises diferenciais dos leucócitos foram fixadas em metanol puro por cinco minutos, em seguida coradas em solução de Giemsa por quinze minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas foi realizada a contagem diferencial de glóbulos brancos em microscopia óptica com aumento de 1000x em óleo de imersão.

3.12 - Análises histopatológicas:

Foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 0.2cm² dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, pâncreas e rins), dos animais tratados

e controles, pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina, tamponado com o $\text{pH} = 7.4$ para a realização de análises histopatológicas, também como de seus tumores e metástases, para serem corados de diversas maneiras possibilitando uma melhor visualização das manifestações ocorridas no microambiente celular, como diferenciação celular, neoformação vascular, apoptose, necrose, regeneração tecidual, hemorragias entre outros.

3.13 - Preparo das amostras para análises histoquímicas – Picrosirius-Red e Van Gienson-Verhoff:

Após período de fixação de 24 horas, utilizando-se lâmina histológica sobre tábua de macroscopia foram retiradas duas amostras retangulares. Todas as amostras foram acondicionadas em cápsula histológica e colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM 2145) para processamento “overnight”, sendo desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Realizada inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG 1160), os blocos foram microtomizados (Leica® modelo RM 2145) em cortes de 5 μm e dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm, realizando-se dois níveis de corte para cada área de estudo e a seguir as lâminas foram corados pelos métodos citoquímicos de Picrosirius Red, para fibras de colágeno e Van Gienson – Verhoff para as fibras elásticas e vasos.

Os cortes histológicos (3 μm) dos tumores dos grupos tratados com fosfoetanolamina sintética e controles que receberam solução salina foram

fixados em tampão contendo 3% paraformaldeído, 0,2% de glutaraldeído e 0,1% triton X-100 em tampão fosfato de sódio pH= 7.4.

O colágeno, por ser uma proteína básica, provavelmente interage com os grupos sulfônicos do corante Vermelho Sírrio a 0,1%, e em pH baixo, com os grupos amino da lisina e da hidroxilisina e os grupos guanidina da arginina. A coloração pelo método do Picrosirius faz com que grande quantidade de moléculas do Sirius Red, de caráter ácido e alongado, disponha-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas à luz polarizada. Assim, o método da coloração com Picrosirius associado à microscopia de polarização é um método histoquímico específico para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas^{60, 61, 62, 63,64}.

Resultados:

4.1 - Avaliação da atividade citotóxica “*in vitro*” da fosfoetanolamina sintética em linhagens celulares:

Após 24 horas de cultura, fase de crescimento exponencial das células de melanoma B16F10 foram plaqueadas em microplacas de 96 orifícios e adicionadas às diferentes concentrações do composto diluído em meio de cultura. O tratamento com a fosfoetanolamina sintética, em culturas celulares de melanoma murino B16F10, mostrou efeito adverso sobre a toxicidade deste composto, tempo e dose dependentes (Figura -1). A viabilidade celular após 24 horas de tratamento nas concentrações de 6 mg à 0.005 mg da fosfoetanolamina sintética mostrou que este composto apresenta alta citotoxicidade em células tumorais somente nas altas concentrações analisadas (6 a 1.5mg/ml), porém nas outras concentrações testadas não foram observados efeitos deletérios significantes (menor 0.75mg/ml). Nessas condições foi determinada a concentração inibitória 50% a partir da curva de regressão linear, nosso resultado para as células de melanoma foi de 2.3 mg/ml (Figura – 2).

A fosfoetanolamina sintética não inibe a resposta proliferativa inespecífica de linfócitos T normais mantidos em cultura por 96 horas e ativados pelo mitógeno PHA (fitohemaglutinina) (Figura - 3).

Figura 1 – Determinação da atividade citotóxica da fosfoetanolamina sintética em células de melanoma B16F10, avaliada pelo método colorimétrico MTT, as barras do histograma representam a porcentagem relativa em cada concentração de células viáveis e mortas.

Figura 2 – Curva de regressão linear e concentração inibitória 50% (IC₅₀%) da atividade citotóxica da fosfoetanolamina sintética em células de melanoma B16F10, avaliada pelo método colorimétrico MTT.

Figura 3 – Avaliação da resposta linfoproliferativa de linfócitos T normais, após 96 horas de cultura com fosfoetanolamina sintética e com o mitógeno fitoemaglutinina (PHA). A porcentagem da capacidade proliferativa foi calculada comparando-se a resposta basal (ausência de mitógeno) e o controle na presença de PHA à 10% e 1% de soro fetal bovino (SFB).

4.2 - Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo:

Os animais portadores de melanoma B16F10 tratados durante 20 dias consecutivos com fosfoetanolamina sintética, apresentaram aumento significativo na taxa de sobrevivência nas concentrações variando de 9.9 mg até 1.65 mg em comparação ao grupo controle. Após a necrópsia destes grupos de animais portadores de tumor dorsal ou metástases pulmonares e do grupo controle que recebeu solução salina, foram avaliadas as fases do ciclo celular por citometria de fluxo e determinadas a porcentagem das células nas seguintes fases: sub G1 ou apoptóticas que apresentam DNA fragmentado, G0/G1 células quiescentes, Fase S em síntese de DNA e G2/M em mitose.

Nossos resultados mostraram que as células tumorais B16F10 obtidas do tumor dorsal do grupo controle apresentam $6.9\% \pm 3.4$ em apoptose (sub-G1), $25.6\% \pm 4.8$ células quiescente (G0/G1) e em grande proporção com capacidade proliferativa $51.3\% \pm 3.0$ na fase (G2/M). Os animais tratados com 9.9 mg apresentaram significativo aumento na taxa de mortalidade e seus tumores significativas áreas de necrose.

Os tumores dos animais tratados com a concentração de 6.6 mg apresentaram aumento extremamente significativo na proporção de células em apoptose, sub G1 ($12.8\% \pm 4.4$) em comparação ao grupo controle não tratado. Também foram observadas diminuições significantes ($p < 0.001$) na porcentagem de células em G0/G1 ($2.90\% \pm 0.9$), e células com capacidade de síntese de DNA, fase S ($1,49\% \pm 0.28$) induzidos pela fosfoetanolamina sintética em comparação

ao grupo controle ($23.1\% \pm 4.6$). A proporção de células com capacidade proliferativa (G2/M) valor significativamente menor ($P < 0.001$) nas células tumorais tratadas com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética ($2.1\% \pm 0.89$) em relação ao grupo controle ($51.4\% \pm 3.0$). Os dados estão apresentados na figura - 4.

Figura - 4 Determinação da distribuição das populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle (A) e tratados com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética (B) nas diferentes fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo.

* Análise estatística – One-Way Analise of Variance ANOVA (p significativo $p < 0.05$)

Os tumores do grupo de animais tratados com a concentração de 1.65 mg apresentaram aumento significativo na proporção de células em apoptose ($17.5\% \pm 2.3$) em comparação ao grupo controle não tratado ($6.8\% \pm 3.4$). Quando comparadas às concentrações de 6.6 e 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética os níveis de apoptose não tiveram diferenças significantes. As proporções de células quiescentes diminuíram significativamente ($p=0.0015$) no grupo de células tratadas com fosfoetanolamina sintética ($12.7\% \pm 4.06$) em relação ao controle ($25.6\% \pm 4.8$). A capacidade de síntese (fase S) diminuiu significativamente ($P<0.001$) no grupo tratado com fosfoetanolamina sintética ($4.9\% \pm 1.2$) enquanto que no grupo controle ($23.01\% \pm 4.6$).

As células com capacidade proliferativa (G2/M) diminuíram significativamente ($p<0.001$) no grupo de tumores tratados com 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética ($11.9\% \pm 2.2$) em relação ao grupo controle ($51.4\% \pm 3.0$). Os dados estão apresentados na figura - 5.

Figura - 5 Determinação da distribuição das populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle (A) e tratados com 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética (B) nas diferentes fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo.

* Análise estatística – One-Way Analise of Variance ANOVA (p significativo $p < 0.05$)

Análises comparativas entre os tratamentos com a fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 6.6 e 1.65 mg com o quimioterápico Taxol na concentração de 3.7uM, específico de última geração responsável pela inibição de proteínas envolvidas na dimerização de microtúbulos durante a divisão celular, nas fases G2/M; mostraram que em todas as fases do ciclo a fosfoetanolamina sintética na concentração de 6.6 mg diminui significativamente a capacidade de proliferação celular e é um indutor importante de células em apoptose com a mesma eficácia terapêutica, porém sem apresentar catastróficos efeitos colaterais. Na concentração de 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética a eficácia de inibição das fases quiescentes, S e proliferativa G2/M mostrou-se dependente da dose administrada no tratamento. Os dados e as análises estatísticas estão apresentados nas figuras 6 e 7.

Figura - 6 Análise comparativa da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores tratados com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética (A) e tratados com o quimioterápico Taxol (B), obtidos por citometria de fluxo.

Figura - 7 Análise comparativa da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos tumores tratados com 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética (A) e tratados com o quimioterápico Taxol (B), obtidos por citometria de fluxo.

Tabela - Análises das fases do ciclo celular obtidas por citometria de fluxo das células de melanoma B16F10 dos grupos: controle, tratados com 6.6 e 1.65 mg/mL de fosfoetanolamina sintética e com o quimioterápico Taxol.

Linhagem B16F10	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
/ Tratamento	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle	6.9 ± 3.4	25.6 ± 4.8	23.1 ± 4.6	51.3 ± 3.0
Fosfoetanolamina	12.8 ± 4.4	2.9 ± 0.9	1.49 ± 0.28	2.1 ± 0.89
6.6mg/mL				
(0.0468uM)				
(80 x)				
Fosfoetanolamina	17.5 ± 2.3	12.7 ± 4.1	4.9 ± 1.2	11.9 ± 2.2
1.65mg/mL				
(0.0117uM)				
(320 x)				
Taxol (3.75 uM)	15.4 ± 8.7	2.6 ± 1.6	0.61 ± 0.43	1.38 ± 0.7

Valores expressos em média (x) e desvio padrão (± d.p.)

4.3 - Análise dos parâmetros tumorais dos camundongos portadores de Melanoma B16F10 tratados com fosfoetanolamina sintética:

Após o 14º dia da implantação de 5×10^4 células tumorais na região dorsal, 100% dos animais apresentavam tumores dorsais próximos aos locais de inoculação apresentando em média volume de $0.10 \pm 0.05 \text{ cm}^3$. Os animais de todos os grupos de experimentação tratados e controle foram pesados e realizados a medição (comprimento x largura), dos tumores diariamente com o auxílio do paquímetro, e fotodocumentados.

Os animais foram observados diariamente e após 20 dias de tratamento com fosfoetanolamina sintética administrada pela via intraperitoneal, com as seguintes concentrações (9.9, 6.6 e 1.65 mg), e foram sacrificado por deslocamento cervical, necropsiados e os tumores dorsais e as metástases presentes nos órgãos internos, (coração, pulmão, fígado, rins, baço), pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina, tamponado com o pH 7,4 para a realização de análises histopatológicas.

Macroscopicamente os tumores dos animais tratados com 1.65 mg de fosfoetanolamina sintética apresentavam-se como massas nodulares dorsais não pigmentadas, não ulceradas e com raras áreas de irrigação ou neoangiogênese, também foi observada a formação de tecido encapsulado característico de fibrose, a massa não se apresentava aderida á superfície interna do animal, características de tumores benignos. Por outro lado, o grupo controle apresentava tumores dorsais pigmentados e necrose, com extensas áreas de ulceração, extremamente irrigada e ocupando um volume expressivo em relação à superfície corpórea total do animal (Figuras 8 e 9).

Figura – 8 Aspecto macroscópico dos tumores dorsais de melanoma do grupo tratado com 1.65mg de fosfoetanolamina sintética, após 20 dias. Observa-se massa tumoral não pigmentada, com raras áreas de irrigação (*) e formação de cápsula fibrótica (&).

Figura – 9 Aspectos macroscópicos dos tumores dorsais de melanoma do grupo controle que recebeu solução salina, após 20 dias. Observa-se extensa massa tumoral nodular, com grandes áreas de irrigação (#), necrose (*) e ulceração (&).

Os tumores melanoma B16F10 dos animais tratados com 6.6 mg de fosfoetanolamina sintética apresentaram pequenas massas tumorais amorfas ou um pequeno ponto de aplicação na área onde foi inoculado às células, ausência de metástases internas, ausência de neoangiogênese. Não foi observada perda de peso significativo ou alterações comportamentais importantes pela utilização do composto (Figura - 10).

Figura – 10 Aspecto macroscópico dos tumores dorsais de melanoma do grupo tratado com 6.6mg de fosfoetanolamina sintética, após 20 dias. Observa-se pequena massa tumoral amorfa (&) ou pequenos pontos de aplicação no local da implantação das células tumorais (#), com ausência de irrigação vascular (* @).

Figura – 11 Aspecto macroscópico dos tumores dorsais de melanoma do grupo tratado com o quimioterápico Taxol 3.7uM, após 20 dias. Observa-se volumosa massa pigmentada dorsal (&) com extensa área de irrigação, neoangiogênese (*) e metástases ganglionares satélites (# @).

Figura – 12 Aspecto macroscópico das lesões metastáticas presentes nos parênquimas hepático (&) e pulmonar (*) do grupo controle e dos animais com o quimioterápico comercial Taxol 3.7 uM (#) após 20 dias. Observa-se acentuado grau de anemia dos animais do grupo controle em relação aos animais tratados.

A curva de crescimento tumoral foi avaliada pela medição dos seguintes parâmetros tumorais: incidência, taxa de sobrevivência, área tumoral e número de metástases internas. Os animais portadores de melanoma B16F10 e tratados com a concentração de 9.9mg apresentaram redução significativa da massa tumoral de 89% em comparação ao grupo controle não tratado. Este grupo de animais apresentou pequenas massas tumorais, porém a taxa de mortalidade no curso do tratamento foi grande, possivelmente pela interação do composto com o microambiente tumoral, o que levaria possivelmente a liberação de substâncias ou produtos da degradação celular com potencial citotóxico (*“horror” citotóxico*), figura 13.

Nas concentrações de 6.6 e 1.65mg de fosfoetanolamina sintética observa-se uma redução significativa da massa tumoral (figura 13), sem a ocorrência de mortalidade, como também não foram observados efeitos colaterais, como caquexia ou modificações comportamentais.

Após a dissecação cirúrgica verificamos que o tumor implantado localizava-se no tecido subcutâneo, apresentando coloração enegrecida decorrente da produção excessiva de liberação para o meio de melanina pelas células tumorais, em diferentes proporções e também nos diferentes grupos de tratamento com a fosfoetanolamina sintética. A necropsia revelou que os animais tratados com fosfoetanolamina sintética apresentaram redução altamente significativa ($p < 0.001$) da formação de metástases internas. Os animais que foram tratados com fosfoetanolamina sintética na concentração de 6.6mg apresentam tumores dorsais com lesões ocupando área e volume extremamente reduzidos com características amorfas, sem sinais de metástases macroscópicas em órgão alvo como os gânglios linfáticos, pulmão

e fígado e ausência significativa de neovascularização, como também não apresentaram sinais de anemia e caquexia. (Figura – 14).

Em nenhum grupo experimental foi observada a formação em órgãos internos de modificações estruturais dignas de nota, como áreas hemorrágicas, exsudato peritoneal, infecções no parênquima pulmonar, quadros de hemorrágica pulmonar ou mesmo depressão imunológica.

Por outro lado, o tratamento combinado com os quimioterápicos Taxol (Paclitaxel) nas concentrações de 3.75 e 7.0 mg/Kg e o Etoposídeo (Viposide) nas concentrações de 2.5 e 5.0 mg/Kg administrados no mesmo esquema terapêutico, mostraram uma redução importante na carga tumoral de 66.7 e 91%, respectivamente, porém foi observada alta e significativa taxa de mortalidade (>85%), além dos extremos efeitos colaterais mielossupressores causados por estes grupos de inibidores da proliferação celular em todas as concentrações avaliadas (Figura 15).

Figura – 13 Avaliação da área tumoral dorsal dos animais portadores de melanoma B16F10 durante o tratamento com fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 9.9, 6.6 e 1.65 mg, durante 20 dias de tratamento. Os animais tratados com fosfoetanolamina sintética apresentaram uma redução significativa na carga tumoral de 78%, 87% e 89%, nas respectivas doses 1.65, 6.6 e 9.9 mg.

Figura – 14. Análise do número de metástases internas obtidas após a necropsia dos grupos de animais tratados com 9.9, 6.6 e 1.65mg de fosfoetanolamina sintética e grupo controle.

***** Análise estatística comparativa entre os grupos tratados e controles**

Análise de Contingência – Teste Exato de Fisher's.

Figura – 15 Avaliação do crescimento da massa tumoral dorsal do melanoma B16F10 implantado em camundongos e tratados com os quimioterápicos combinados Taxol (Paclitaxel) nas concentrações de 3.75 e 7mg/Kg e o Etoposideo (Vipeside) nas concentrações de 2.5 e 5 mg/Kg.

4.4 - Avaliação histopatológica dos tumores dorsais e lesões metastáticas dos grupos tratados com fosfoetanolamina sintética e controle:

Após 20 dias de tratamento dos animais portadores de melanoma B16F10 com fosfoetanolamina sintética nas diversas concentrações, os camundongos foram necropsiados e seus tumores dorsais e lesões metastáticas, retirados fotodocumentados e realizados as análises histopatológicas.

Os animais do grupo controle possuem massas tumorais dorsais volumosas, ocupando em torno de 40 – 60% de seu peso corpóreo, seus tumores macroscopicamente apresentavam-se nodulares, pigmentados, ulcerados e necróticos. Histologicamente observou-se, massa celular, pleomórfica (várias formas e tamanhos celulares), pigmento melânico intra e extracelular, células tumorais apresentando-se com figuras de divisão (mitose), vasos sanguíneos neoformados, áreas hemorrágicas proximais, raras células tumorais picnóticas e raras áreas de necrose intra-tumoral. Não foram observados infiltrados inflamatórios, intra ou peri-tumorais (Figura 15).

Figura - 15 Aspectos histopatológicos dos tumores dorsais B16F10 do grupo controle. Observam-se células tumorais em divisão celular (A), pigmentos melânicos (B), vasos sanguíneos neoformados irregulares (C), células e debris celulares picnóticos (D) e áreas de hemorrágicas intra-tumorais (E).

Os animais do grupo controle apresentaram uma quantidade significativa de lesões metastáticas em órgãos internos, principalmente pulmão e fígado. Essas lesões apresentaram-se como massas nodulares irregulares, com alta densidade e capacidade proliferativa, alta rede neovascular, com presença de infiltrado intra ou peri-tumoral e/ou áreas de hemorragia intersticial (Figura 16 e 17).

Figura 16 – Aspecto macroscópico das metástases pulmonares, grupo controle. As setas mostram nódulos tumorais distribuídos nos lóbulos pulmonares

Figura 17 - Aspectos histopatológicos das lesões metastáticas do parênquima hepático e pulmonar. Observa-se nódulo metastático hepático (A), vasos neoformados (B) e áreas hemorrágicas metastáticas do pulmão (C).

Os animais portadores de melanoma tratados com fosfoetanolamina sintética na concentração de 1.65 mg apresentaram pequenas massas tumorais nodulares, pouco pigmentadas e com extensas áreas de necrose. Histologicamente, os tumores dorsais indicam pequenas áreas tumorais, ausência de figuras de divisão celular e extensas e significativas áreas de necrose que foram substituídas por elementos fibrilares do estroma. Essa organização da matriz extracelular foi avaliada pelo método citoquímico de Picrosirius. Observa-se moderado infiltrado inflamatório peri-tumoral, rico em células mononucleares, e digno de nota, foram encontradas células em degeneração, núcleos celulares fragmentados e apoptóticos (Figura 18).

Figura 18 - Aspectos histopatológicos dos tumores dorsais de melanoma tratados com 1.65 mg/ml de fosfoetanolamina sintética. Observa-se extensa área de necrose intra-tumoral (A), infiltrado inflamatório intra-tumoral (B e C).

Figura 19 - Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se raras áreas com presença de fibras de colágeno deflagradas em vermelho ao redor dos vasos sanguíneos (A) e no interior do estroma tumoral (B), do grupo controle, que recebeu solução salina.

Os animais portadores de melanoma tratados com fosfoetanolamina sintética na concentração de 6.6 mg apresentaram pequenas e raras ou ausência de massas tumorais nodulares, pouco pigmentadas. Histologicamente, os tumores dorsais apresentaram-se com pequenas áreas tumorais, ausência de figuras de divisão celular e extensas e significativas áreas de necrose que foram substituídas por elementos fibrilares do estroma. Observam-se numerosas células em degeneração celular, apoptóticas e com núcleos fragmentados. A vascularização neste grupo de tumores tratados apresentava-se escassa, com vasos irregulares e ausência de áreas hemorrágicas (Figura 20).

Figura 20 - Aspectos histopatológicos dos tumores dorsais de melanoma tratados com 6.6mg/ml de fosfoetanolamina sintética. Observa-se extensa área de necrose intra-tumoral (A), células apoptóticas (B) e vasos neoformados (C).

Figura 21 - Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se moderadas áreas com presença de fibras de colágeno (em vermelho) das lesões primárias, tratadas com 1.65mg/ml de fosfoetanolamina sintética.

Figura 22 - Aspecto histopatológico dos tumores dorsais corados pelo método citoquímico Picrosirius, evidenciando-se extensas áreas com presença de fibras de colágeno em vermelho das lesões primárias, tratadas com 6.6mg/ml de fosfoetanolamina sintética.

Os vasos sanguíneos foram corados pelo método citoquímico de Verloff, para evidenciar as fibras musculares lisas das paredes dos vasos.

Os tumores do grupo controle apresentaram vasos sanguíneos neoformados distribuídos em toda a massa tumoral. Estes se mostraram com grandes diâmetros ao redor da massa tumoral e com propriedades proliferativas. (Figura 23)

Figura 23 - Aspecto histopatológico dos tumores dorsais do grupo controle corados pelo método histoquímico de Verloff. Observam-se nas setas vasos sanguíneos neoformados irregulares e distribuídos no interior da massa tumoral.

Nos grupos de animais portadores de melanoma B16F10 e tratados com fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 1.65 e 6.6 mg observamos uma redução significativa na rede vascular neoformada, como também no diâmetro dos vasos existentes (Figuras 24).

Figura 24 - Aspecto histopatológico dos tumores dorsais do grupo de animais tratados com fosfoetanolamina sintética 1.65mg/ml (A) e 6.6mg/ml, corados pelo método histoquímico de Verloff. Observa-se nas setas pequena rede de vasos sanguíneos neoformados irregulares e distribuídos no interior da massa tumoral, os quais apresentam pequeno diâmetro.

4.5 - Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais portadores de melanoma B16F10 tratados e não tratados com fosfoetanolamina sintética:

As amostras sanguíneas de animais tratados com fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 9.9 a 1.65mg e grupo controle na presença do anticoagulante EDTA (10%), foram obtidas do plexo venoso retro-orbital dos camundongos portadores de tumores dorsais B16F10. Os animais foram mantidos durante a experimentação e colheita em condições normais e não estressantes sem o uso de sedação ou anestesia.

As análises hematológicas do tratamento com fosfoetanolamina sintética mostraram que em todas as concentrações administradas pela via intraperitoneal, nos animais portadores de tumores melanoma, submetidos ao tratamento apresentaram um aumento significativo ($p < 0.001$) no número total de glóbulos vermelhos, sem modificações em seus aspectos morfológicos, não sendo observados: anemia, hemorragia ou estímulo de eritropoiese extramedular e sem desvio a esquerda, quando foram comparados ao grupo controle, que recebeu solução salina. Esses resultados também foram comprovados pela determinação do hematócrito e da quantidade de hemoglobina, em todas as concentrações e observamos um aumento extremamente significativo em torno de 37% no grupo de animais submetidos ao tratamento com fosfoetanolamina sintética (Figura 25).

*** Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com fosfoetanolamina.

Teste estatístico de Variância de ANOVA.

Figura 25 - Análise do número de glóbulos vermelhos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

*** Diferenças estatísticas entre os grupos controle portador de tumor e tratado com fosfoetanolamina sintética.

Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado com fosfoetanolamina.

Teste Estatístico de Variância de ANOVA.

Figura 26 - Análise do hematócrito (Ht) dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Figura 27 - Análise quantitativa da hemoglobina (Hb) dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Não foram observadas alterações quantitativas no número total de plaquetas após o tratamento dos animais portadores de melanoma B16F10 com o composto fosfoetanolamina sintética (Figura 28).

Figura 28 - Análise quantitativa do número de plaquetas dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

O tratamento com fosfoetanolamina sintética nos animais portadores de melanoma mostrou que o composto induz um aumento extremamente significativo ($p < 0.001$), no número de leucócitos total nas concentrações de 9.9 e 6.6 mg/ml, quando comparados aos grupos controles tratados com salina ou animais normais (Figura 29).

*** Diferenças estatísticas entre os grupos controle portador de tumor e tratado com fosfoetanolamina sintética.

Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado com fosfoetanolamina.

Teste Estatístico de Variância de ANOVA.

Figura 29 - Análise quantitativa do número de leucócitos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com fosfoetanolamina sintética.

Discussão:

5 - Discussão

A cada ano, o câncer tem se consolidado como um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer atinge pelo menos 9 milhões de pessoas e mata cerca de 5 milhões a cada ano, sendo hoje a segunda causa de morte por doença nos países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares^{58, 59,60}.

As células malignas, diferentemente das outras células, são caracterizadas por um processo de crescimento no qual existe uma perda parcial ou mesmo total dos mecanismos normais de controle. Como resultado deste crescimento descontrolado, as células malignas se multiplicam mais rápido do que as células normais. Esta maior taxa de crescimento, em parte responsável por sua sensibilidade as formas de tratamento, como a quimioterapia (QT). A taxa de crescimento ou multiplicação celular não pode explicar isoladamente a maior sensibilidade das células tumorais à QT ou mesmo a sua resistência ao próprio tratamento (genes ativos de resistência a múltiplas drogas - MDR) ou a própria morte celular programada.

A desregulação da apoptose leva provavelmente, ao menor número de células mortas encontradas em várias patologias como câncer, AIDS, Mal de Alzheimer e artrite reumatóide. A morte de células por necrose oposta a apoptose ocorre quando uma célula é severamente injuriada, por desastre físico, químico ou pela privação de oxigênio, por exemplo⁶¹.

A apoptose pode começar pela ação de vários gatilhos, inclusive pela remoção dos sinais químicos das células (fatores de crescimento ou de sobrevivência). A morte celular pode também ser desencadeada pelos receptores de mensagens internos e externos, que podem começar a ignorar certas mensagens químicas; ou pelos receptores celulares para sinais conflitantes como aqueles que indicam se ela deve ou não sofrer divisão celular, mecanismos de reparo ou pontos de checagem da integridade estrutural e seqüencial do DNA⁶¹.

As células tumorais podem ainda estar desprovidas de seus gatilhos apoptóticos que controlam diretamente a entrada e a saída das células no ciclo celular. A tendência das células normais em cometer suicídio, quando privadas de seus fatores de crescimento ou de contatos juncionais ou pela perda da expressão de moléculas de adesão com células adjacentes são provavelmente uma das formas para a inibição da formação de metástases em tipos de tumores⁶⁶.

Em diversos tipos de neoplasias, especialmente certos linfomas, a morte da célula é impedida pela excessiva produção de proteína inibidora a Bcl-2, regulada pelas vias de sinalização mitocondrial. Os melanócitos expressam grandes quantidades de Bcl-2, como mecanismo reparador dos efeitos deletérios da luz ultravioleta. As células geralmente morrem por apoptose, freqüentemente pela ativação da p53, por outro lado, a inibição ou supressão de sua expressão produz altos níveis da proteína inibidora Bcl-2, as quais contribuem para a progressão e disseminação³².

O acúmulo de células tumorais em alguns tipos de câncer pode estar relacionado com o funcionamento anormal das vias proliferativas, que induzem a multiplicação das células, podendo ocorrer simultaneamente ou não a inibição do turnover celular - processo de renovação e substituição de células que já não exercem suas atividades corretamente^{58,59,60}.

Considerando a necessidade de novas abordagens para o tratamento do câncer, estudos bioquímicos dos mecanismos de transdução de sinal celular possibilitaram um melhor entendimento da biologia da célula neoplásica. Dessa forma, novos mecanismos de ação estão sendo explorados no desenvolvimento de novos medicamentos para o seu controle. O surgimento

de fármacos antitumorais seletivos como alvo para cada capacidade adquirida do comportamento do câncer, e seu uso em combinações apropriadas; associado com tecnologia sofisticada para detectar e identificar todos os estágios da doença pode contribuir na prevenção do desenvolvimento de muitos tumores, ou até mesmo, na cura de tumores pré-existentes ⁶¹.

A fosfoetanolamina é metabolizada em fosfatidiletanolamina, principal fosfolípide da membrana mitocondrial um dos principais responsáveis pela manutenção do potencial transmembrana - Deltapsi-m - da mitocôndria³⁸. A fosfoetanolamina é convertida no fígado nos três fosfolípidos constituintes da membrana interna mitocondrial: a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina. Esses três fosfolípidos estão implicados diretamente na permeabilidade da membrana interna da mitocôndria. O evento mais precoce produzido pela lesão mitocondrial é a alteração do potencial transmembrana Deltapsi-m e somente a alteração deste potencial já diminui drasticamente a produção de ATP, em um processo contínuo cuja seqüência provoca alteração do Complexo I e demais componente da cadeia de elétrons da mitocôndria^{38,39}.

Neste trabalho, a fosfoetanolamina sintética obtida a partir de um processo de latenciação mostrou-se eficaz inicialmente "*in vitro*" na capacidade de inibir o crescimento de células de melanoma B16F10, expostas as varias concentrações deste composto. Apresentou uma concentração inibitória 50% de 2.3 ug/m avaliada pelo método colorimétrico MTT, método fundamentado na capacidade de enzimas do tipo succinato desidrogenases, presentes na mitocôndria, quando as células viáveis degradam o substrato fornecido pelo reagente MTT^{71,72}. Comparando sua atividade inibitória "*in vitro*" a outros quimioterápicos, usualmente administrado em pacientes portadores de

cânceres, como o paclitaxel, inibidor específico da fase G2/M ou o etoposídeo, inibidor de topoisomerasas tipo II, a fosfoetanolamina sintética se mostrou cerca de 130 vezes mais eficaz em sua atividade inibitória que as drogas comerciais, demonstrados neste mesmo estudo.

O conceito de ciclo celular introduzido em 1953 tem auxiliado no delineamento de diversos eventos que governam a proliferação das células de mamíferos. Durante o ciclo celular podem ser distintas as seguintes fases: G1 ("Gap 1"), intervalo após a mitose durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA⁶³. Este período é caracterizado pela transcrição gênica e tradução, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA; S período no qual ocorre a duplicação do DNA celular e o G2/M ("Gap 2") intervalo após a síntese de DNA, durante o qual as células se preparam para a divisão e a mitose propriamente dita.

Análises genéticas de cânceres humanos têm revelado que proteínas envolvidas no ponto de checagem G0/G1 - S estão inativas na maioria dos casos, e que alterações no ponto de checagem da ocorrência de danos no DNA parecem ser responsáveis pela resistência das células tumorais a agentes quimioterápicos ou irradiação. Em contraste, alterações no ponto de checagem G2/M são encontradas mais raramente⁶⁴. Algumas alterações no complexo mecanismo regulatório da transição G0/G1- S, maior alvo de alterações em câncer, envolvem deleção ou superexpressão de genes ou mutações pontuais que impossibilitam a função gênica, com resultado comum de alteração do balanço fosforilação/desfosforilação, determinando o estado proliferativo da célula⁶⁵.

O controle da proliferação celular ocorre, sobretudo, na fase G1, e a parada do crescimento de células de mamíferos pode ser concluída nesta fase, pela depleção de fatores de crescimento ou soro ou em condições de cultura sob alta densidade celular. O estado de parada de crescimento é alternativamente chamado de repouso, G0 ou fase quiescente do ciclo⁶⁶. A saída do ciclo celular para um estado de parada de crescimento reversível (G0) é um processo ativo que envolve a expressão e atividade de produtos de genes de parada de crescimento⁶⁷. Sob estas condições, um programa intrínseco de expressão gênica é induzido e genes envolvidos na parada de crescimento começam a ser altamente expressos. Este quadro de expressão gênica é reversível, por exemplo, fibroblastos em parada de crescimento quando estimulados apresentam regulação negativa dos genes de parada de crescimento⁶⁸.

O tratamento “*in vivo*” de animais portadores de melanoma dorsal B16F10 com fosfoetanolamina sintética, nas concentrações de 6.6 e 1.65mg/ml durante 20 dias, induziu aumento expressivo das células apoptóticas (>54%), quando comparadas ao grupo controle. Quando analisados as diferenças de apoptose induzida por quimioterápicos clássicos, como o Paclitaxel (Taxol), a fosfoetanolamina sintética é um composto seletivo e com alta especificidade por este tipo de morte celular.

As demais fases do ciclo celular obtidas por citometria de fluxo dos tumores dorsais tratados com fosfoetanolamina sintética revelaram que o efeito citotóxico é equivalente aos apresentados por drogas quimioterápicas como o Taxol. As fases quiescentes (G0/G1) foram diminuídas significativamente, quando comparadas ao grupo controle ou ao Taxol, possivelmente decorrentes

das diferenças de massas moleculares entre os compostos testados. As diferenças das massas moleculares da fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 6.6 mg/ml (~ 4.7nM) e 1.65 mg/ml (~ 1.2nM) em relação a massa do Taxol (~3.7uM) mostraram que o composto sintético é respectivamente 230 e 100 vezes, mais potente nesta inibição que a droga comercial.

Na fase S de síntese foi demonstrado que a fosfoetanolamina sintética na dose de 6.6 mg/ml >93% é equivalente ao quimioterápico comercial Taxol >97%, enquanto que na dose de 1.65mg/ml seu efeito foi significativo >78%, na inibição, porém em menor proporção.

O Taxol é um taxano inibidor da polimerização dos microfilamentos envolvidos na formação do fuso equatorial durante a divisão mitótica, o tratamento das células de melanoma B16F10 foi capaz de inibir em média 97% das células na fase G2/M. O tratamento com a fosfoetanolamina sintética nas concentrações de 6.6 e 1.65mg/mL inibiram respectivamente, 96 e 77% das células em divisão celular. Como o fármaco comercial Taxol, a fosfoetanolamina sintética mostrou-se dose dependente na parada (“*arrest*”) das células em G2/M.

O processo da carcinogênese varia dependendo da intensidade e agressividade do agente promotor, convertendo-se em um processo rapidamente progressivo, como ocorre em certos tumores de alta agressividade biológica.

O modelo de melanoma murino B16F10 é um dos modelos utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI – USA), para a avaliação da atividade antitumoral de novos agentes antineoplásicos.

WITTES e GOLDIN em 1986 mostraram que a curva de dose resposta para um determinado composto indica que à medida que a dose é aumentada, o tempo de sobrevivência dos animais portadores de tumor é estendido até que o máximo efeito terapêutico seja alcançado. À medida que a concentração é aumentada a toxicidade do fármaco se manifesta e o tempo de sobrevivência dos animais diminui. Este tipo de sistema fornece uma medida quantitativa da efetividade do fármaco e permite avaliação da eficácia antitumoral baseada no aumento do tempo de sobrevida. Os resultados encontrados no tratamento dos animais após o 14º dia do implante das células tumorais no dorso aumentaram a taxa de sobrevida nas concentrações de 1.65 e 6.6 mg/ml, administradas durante 20 dias pela via intraperitoneal.

Nos experimentos de eficácia anti-tumoral, a partir do 14º dia, todos animais apresentavam nódulos de pelo menos 0.5 mg, calculados a partir da fórmula utilizada pelo NCI para estes estudos. Neste momento foram iniciados os tratamentos de cada grupo de animais com seus respectivos regimes terapêuticos. As curvas de crescimento do tumor indicaram haver diferenças significativas entre os grupos de tratamento com fosfoetanolamina sintética, controle – salina e com o quimioterápico paclitaxel. A taxa de redução da carga tumoral foi calculada a partir da média da massa tumoral dos grupos tratados em relação à média do grupo controle, descritos por Plowman⁶⁹.

A eficácia antitumoral de todos os grupos de camundongos que receberam fosfoetanolamina sintética foi refletida nos altos índices de redução da carga tumoral observados, ultrapassando 89% de redução na carga tumoral em relação ao controle e de 67% para os quimioterápicos Taxol e Etoposideo.

De acordo com os padrões estabelecidos pelo NCI, valores de T/C < 42 % (tratado/controle) são indicativos de atividade antitumoral significativa. Quando estes valores são < 10, indicam atividade antitumoral altamente significativa⁶⁹.

Nos camundongos tratados com fosfoetanolamina sintética os valores obtidos de T/C são aproximadamente < 8%, indicando sua significativa efetividade como droga anti-tumoral.

Em camundongos do grupo , foi nítida a intensa disseminação e agressividade do tumor. Todos os animais deste grupo apresentaram nódulos metastáticos, principalmente em pulmão, fígado e linfonodos satélites e sistêmicos e também em 66% foram encontrados nódulos em gânglios para-aórticos.

O número de linfonodos comprometidos por metástases é um aspecto crítico do prognóstico. No câncer de mama, por exemplo, a presença de quatro ou mais gânglios axilares ipsilateral comprometidos sem evidência de outras metástases, é interpretada como de pior prognóstico do que a presença de até três gânglios comprometidos. Nos animais do grupo controle foram encontradas presenças de nódulos pulmonares e hepáticos, e acima de 30% apresentavam metástases retro abdominais, no mesentério e no peritônio, caracterizando uma intensa disseminação do tumor neste grupo.

A necrópsia dos camundongos tratados com fosfoetanolamina sintética, macroscopicamente mostrou ausência de neovascularização, anemia, caquexia e as análises histológicas e histoquímicas revelaram tumores com baixa densidade celular, aumento de células apoptóticas, necróticas e em degeneração. Foi observado intensa deposição de material fibrilar ao redor da

massa tumoral, rico em fibras de colágeno, expressivamente na concentração de 1.65 mg/ml de fosfoetanolamina sintética.

As análises hematológicas dos números de glóbulos vermelhos e leucócitos constituem um importante exame de auxílio diagnóstico para doenças hematológicas, sistêmicas e ações farmacológicas ou terapêuticas de várias drogas, principalmente aquelas decorrentes às doenças neoplásicas. Rotineiramente indicado para avaliação de anemias, neoplasias sistêmicas, reações infecciosas e inflamatórias, acompanhamento de terapias medicamentosas e avaliação de distúrbios plaquetários. Fornecem dados para classificação das anemias de acordo com alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias e conseqüente direcionamento diagnóstico e terapêutico, orienta na diferenciação entre infecções viróticas e bacterianas, parasitoses, inflamações, intoxicações, interações medicamentosas e neoplasias através das contagens globais, diferenciação de leucócitos e avaliação morfológica dos mesmos.

A fosfoetanolamina sintética alterou significativamente a quantidade do número de glóbulos vermelhos e leucócitos, nos animais portadores de melanoma. O composto previne os quadros anêmicos decorrentes do desenvolvimento e da disseminação das células tumorais.

A mielossupressão, decorrente de quimioterapias clássicas mono ou politerapêuticas, podem levar a granulocitopenia e conseqüente quadros infecciosos sistêmicos graves. Quando são utilizados esquemas terapêuticos de múltiplas drogas, existe um somatório de efeitos colaterais em função da associação. A princípio, nestes casos, a droga é mielotóxica. Fatores de crescimento, por exemplo, a eritropoetina ou os fatores estimuladores de

colônias, fator estimulador de colônias do tipo granulócito-monócito (GM-CSF), diminuem a morbidade e a mortalidade por estas complicações⁷⁰.

A imunossupressão que acomete os animais portadores de tumores foi suprimida pela administração da fosfoetanolamina sintética, somente em altas concentrações. Não foram evidenciadas alterações quantitativas ou qualitativas das plaquetas, não se observou agregações ou macroplaquetas.

Desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer na década de 40, pós-guerra foram identificados muitos caminhos pelos quais as células cancerosas “escapam” do agente químico. Embora a terapia atual para o câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação e morte da célula normal e cancerosa⁷¹ proporcionou a descoberta de novos alvos possíveis para o tratamento do câncer. É provável que novas terapias, como no caso da fosfoetanolamina sintética, desenvolvida pelo nosso grupo, venham a substituir ou combinar-se as já existentes, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais.

Conclusões:

6 - Conclusões:

- A fosfoetanolamina sintética apresentou concentração inibitória (IC 50%) de 2.3mg/ml em células de melanoma B16F10, sem efeito sobre células normais;
- Quando linfócitos T cultivados e ativados por mitógenos específicos, a fosfoetanolamina sintética não apresentou efeito inibitório sobre a resposta linfoproliferativa;

- As fases do ciclo celular por citometria de fluxo dos tumores tratados a fosfoetanolamina sintética induziu a parada (*arrest*) nas fases G0/G1, não proliferativas e aumentou significativamente a população celular morta, possivelmente por apoptose;
- Quando comparado o tratamento do melanoma B16F10 com fosfoetanolamina sintética e os quimioterápicos comerciais, Taxol e Etoposideo, foi significativa a redução da carga tumoral e aumento da taxa de sobrevivência dos animais dos animais tratados sem efeitos colaterais importantes e caquexia;
- Alterações macro e microscópicas foram observadas no tratamento do melanoma B16F10 com a fosfoetanolamina sintética, redução do volume e densidade de células tumorais, necrose, aumento importante de células apoptóticas, e redução e ou ausência de neovascularização;
- A fosfoetanolamina sintética reduziu drasticamente a formação de metástases;
- As análises da matriz fibrilares do colágeno mostraram que a fosfoetanolamina sintética, induziu significativamente a síntese dessa proteína, possivelmente pela substituição da densidade das células tumorais, como também pelo aumento das áreas de fibrose encontradas nos grupos de tratamento;
- Os dados hematológicos avaliados neste estudo mostraram, que o tratamento com a fosfoetanolamina sintética nos animais portadores de melanoma apresentou durante o crescimento

tumoral, o composto aumenta significativamente o número de leucócitos totais, eritrócitos durante o tratamento não alterarão elementos eritropoiéticos.

- Nos padrões estabelecidos pelo NCI (National Câncer Institute) com relação à eficácia classificamos a fosfoetanolamina sintética como um agente antitumoral de efetividade altamente significativa.
- Sendo a fosfoetanolamina sintética um composto seletivo e com alta especificidade contra a proliferação e disseminação das células tumorais.

Supostamente temos indicações para trabalhos futuros, que o composto também é promissor para o tratamento de outras patologias como: doenças neurodegenerativas, autoimunes, neurológicas, endócrinas e cardiológicas, pois vemos no ciclo da fosfoetanolamina através do mapa metabólico a diversidade e o poder de transformação deste composto em nosso organismo.

Referência Bibliográfica:

7 - Referência Bibliográfica:

1 - Massi D, Borgognoni L, Franchi A, Martini L, Reali UM, Santucci M. Thick - Cutaneous Melanoma: A reapraisal of prognostic factors. **Melanoma Res.** 10:153-64, 2000.

2 - Hensin Tsao, Michael Atkins and Arthur J. Sober. - Menagement of Cutaneous Melanoma. **N. Engl. J. Med.** 351; 10 998-1012, 2004.

3 - Krown SE, Chapman PB - Defining adequate surgery for primary melanoma. **N. Engl. J. Med.** 350:823- 825, 2004.

4 - Tueche SG. - Behavior of malignant melanoma with tonsil metastasis. **Ann. Med. Interne.** 153:136-8, 2002.

5 - Hafner J, Schmid MH, Kempf W. - Baseline staging in cutaneous malignant melanoma. **Br. J. Dermatol.** 150:677-686, 2004.

6 - Mangini, J, Li N, Bhawan J. - Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic use fulness. **Am. J. Dermatopathol.** 24: 270-81, 2002.

7 - Adema GJ, de Boer AJ, van't Hullenaar R, et al. - Melanocyte lineage-specific antigens recognized by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-50 and HMB-45 are encoded by a single cDNA. **Am. J. Pathol.** 143:1579-1585, 1993.

8 - Grichnik JM, Burch JA, Burchette J, Shea CR. - The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. **J. Invest. Dermatol.** 111:233-238, 1998.

9 - Pui CH, Behm FG, Christ WM. - Clinical and biologic relevance of immunologia marker Studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 82:323-380, 1993.

10 - Stiene-Martin EA, Steininger CAL, Koepke. - **Clinical Hematology**. Lippincott. New York, 23: 301, 1998.

11 - Roberts DL, Anstey AV, Barlow RJ. - U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma. **Br. J. Dermatol.** 146:7-17, 2002.

12 - Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. - Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. **Am. J. Pathol.** 164:193-203, 2004.

13 - Sober AJ, Chuang TY, Duvic M. - Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.** 45:579-586, 2001.

14 - Sondak VK, Taylor JM, Sabel MS. - Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. **Ann. Surg. Oncol.** 11:247- 258, 2004.

15 - Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ. - Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J. Clin. Oncol.** 19:3635-3648, 2001.

16 - Krown SE, Chapman PB - Defining adequate surgery for primary melanoma. **N. Engl. J. Med.** 350:823- 825, 2004.

17 - Ward LS. - Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. **Rev. Bras. Clin. Terap.** 26:103-7, 2000.

18 - Nowell PC, Jensen J, Gardner F. - Two complex translocations in chronic granulocytic leukemia involving chromosomes 22, 9 and a third chromosome. **Human. Genetic.** 30:13-21, 1975.

19 - Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. - When checkpoints fail. **Cell.** 83:315-21. 1997.

20 - Brodland DG. - The life of a skin cancer. **Mayo Clin. Proc.** 72:475-8. 1997.

21 - Castanet J, Ortonne JP. - Pigmentary changes in aged and photoaged skin. **Arch. Dermatol.** 133:1296-9, 1997.

22 - Castle CM, Skinner TC, Hampson SE. - Young women and suntanning: an evaluation of a health education leaflet. **Psychol. Health.** 14:517-27, 1999.

23 - Coleman WP, Loria PR, Reed RJ, Krementz ET. - Acral lentiginous melanoma. **Arch. Dermatol.** 116:773-6, 1980.

24 - Elder D. - Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. **Acta Oncol.** 38:535-47, 1999.

25 - Elwood JM, Gallagher RP. - Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun-exposure. **Int. J. Cance.**, 78:276-80, 1998.

26 - Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabó G. - Biology of Melanocytes. In: Fitzpatrick TB et al., editors. **Dermatology in general medicine**. 4th ed. New York: MacGraw-Hill, p. 261-89. 1993

27 - MacKie RM, Hole DJ. Incidence and thickness of primary tumours and survival of patients with cutaneous malignant melanoma in relation to socioeconomic status. **BMJ**, 312:1125-8, 1996.

28 - Slominski A, Ross J, Mihm MC. Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression. **Br Med Bull**, 51:548-69, 1995.

29 - Hafner J, Schmid MH, Kempf W, et al. - Baseline staging in cutaneous malignant melanoma. **Br J Dermatol**, 150:677-686, 2004.

30 - Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, et al. - Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. **J Am Acad Dermatol**, 45:579-586, 2001.

31 - Fonte: INCA-Ministério da Saúde (www.inca.gov.br)

- 32 - Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schitteck B, Garbe C, Herlyn M. Molecular events in melanoma development and progression. **Front Biosci.**15: 1005 - 101, 1998.
- 33 - Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Res.** 64:985-93, 2004.
- 34 - Baggetto LG. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. **Biochimie.**74: 959-74. 1992
- 35 - Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. **Biochem Biophys Res Commun.** 9:1-9, 1997.
- 36 - Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.** 26:239-57, 1972.
- 37 - Cornelis S, Kersse K, Festjens N, Lamkanfi M, Vandenabeele P. Inflammatory caspases: targets for novel therapies.**Curr Pharm Des.** 13:365-83, 2007.
- 38 - Cone CD,Jr. Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. **Oncology.** 24: 438-470, 1970.

39 - Arcos JC. Ultrastructural alteration of the mitochondrial electron transport chain involving electron leak: possible basis of "respiratory impairment" in certain tumors. **J Theor Biol.** 30: 533-43, 1971.

40 - Verhagen A, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell.** 102: 43- 53, 2000.

41 - Rodrigues CMP, Linehan-Stieers C, Keene CD, Ma X, Kren BT, Low WC, Steer CJ. Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition. **J. Neurochem.** 75: 23:68 - 79, 2000.

42 - Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X.. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell.** 102, 33-42, 2000.

43 - Outhouse EL. Related Articles, Links Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochem J.** 30:197-201, 1936.

44 - Awapara J. Related Articles, Links Alanine and taurine formation from injected cysteine in the rat. **Nature.** 14:165-76, 1950.

45 - Folsch G, Osterberg R. The apparent acid ionization constants of some O-phosphorylated peptides and related compounds. **Biol Chem.** 234:2298-303, 1959.

46 - Plumb RC, Martell AE, Bersworth FC. Spectrophotometric determination of displacement series of metal complexes of the sodium salts of ethylenediaminetetraacetic acid. **J Phys Colloid Chem.** 54:1208-15,1950.

47 – Schwazzenbach FH. Experiment with a microbiological cancer reaction. **Oncologia.** 8:93-120, 1955.

48 - Schwarzenbach FH. Studies on a microbiologically detectable serum factor in jaundice. **Experientia.** 15:289-91, 1956.

49 - Hauser H, Shipley GG. Related Articles, Links Crystallization of phosphatidylserine bilayers induced by lithium. **J Biol Chem.** 256:11377-80, 1981.

50 - Clarke HB, Cusworth DC, Datta SP. Related Articles, Links Thermodynamic quantities for the dissociation equilibria of biologically important compounds. 3. Thedissociations of the magnesium salts of phosphoric acid, glucose 1-phosphoric acid and glycerol 2-phosphoric acid. **Biochem J.** 58:146-54, 1954.

51 - Perry TL, Berry K, Hansen S, Diamond S, Mok C. Related Articles, Links Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. **J Neurochem.** 18:513-9, 1971.

52 - Corazzi L, Porcellati G, Freydz L, Binaglia L, Roberti, R. Arienti, G. Ethanolamine base-exchange reaction in rat brain microsomal subfractions. **J. Neurochem.** 46:202-207, 1986.

- 53 - Maire JCE, Wurtman RJ. Choline production from choline-containing phospholipids: a hypothetical role in Alzheimer's disease and aging. **Biol. Psychiatry.** 8: 637-642, 1984.
- 54 - Lehmann A, Hamberger A. A possible relationship between extracellular taurine and phosphoethanolamine in the hippocampus. **J. Neurochem.** 42: 1286-1290, 1984.
- 55 - Pu GA, Masland RH. Biochemical interruption of membrane phospholipid renewal in retinal photoreceptor cells. **J Neurosci.** 4:1559-76, 1984.
- 56 - Porcellati G, Arienti G, Pirotta M, Giorgini D. Base-exchange reactions for the synthesis of phospholipids in nervous tissue: the incorporation of serine and ethanolamine into the phospholipids of isolated brain microsomes. **J Neurochem.** 18:1395-417, 1971.
- 57 - Ellison DW, Beal MF, Martin JB. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. **Brain Res.** 417:389-92, 1987.
- 58 - Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 65:55-63, 1983.
- 59 - Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med.** 353:2135-47, 2005

- 60 - Marks R. Epidemiology of melanoma. **Clin Exp Dermatol.** 25:459-63, 2000
- 61 - McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. **Cell.** 109:707-18, 2002.
- 62 - Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell.**100 : 57-70, 2000.
- 63 - Howard A, Pelc SR. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **Heredity.** 6 : 261-273, 1953.
- 64 - Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation.** 33: 261-274, 2000.
- 65 - Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins,cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. **Adv Cancer Res.** 68: 67, 1996.
- 66 - Barsega R. The Biology of Cell Reproduction.Cambridge: **Harvard University Press.** 1985.
- 67 - Cowled PA, Evdokiou A. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS 1, in NIH-3T3 fibroblasts. **Experimental Cell Research.** 240: 359-367, 1998.

68 - Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG & Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. **FEBS Letters**. 481: 152-158. 2000.

69 - Plowman PN, Costello J, O'Donoghue N. Complete remission of extensive metastatic renal cancer following immunotherapy. **Clin Oncol**. 9:176-80, 1997.

70 - Stanford, S.J, Pepper J.R. Release of GM-CSF and G-CSF by human arterial and venous smooth cells: differential regulation by COX-2. **Br. J. Pharmacol**. 129: 835-8, 2000.

71 – Wilson AP. Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach, **Oxford University Press**. 175 - 219, 2000.

Animal do grupo controle apresentando grande massa tumoral dorsal.

Diferença de tamanho entre tumores do animal controle e tratado com FOS.

Animal controle com tumor aderido ao corpo e grande neovascularização.

Animal tratado apresenta pequena massa amorfa não aderida ao corpo sem presença de neovascularização.

Animal controle apresentando área hemorrágica e grande massa tumoral

Animal tratado não apresenta área hemorrágica ou sinais de caquexia, podemos notar apenas um pequeno ponto no local de aplicação do tumor.

Animal controle, tumor muito agressivo, incapacitante.