

SARAH FERNANDES TEIXEIRA

**Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas**

São Paulo

2020

**SARAH FERNANDES TEIXEIRA**

**Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientador: Dr. Adilson Kleber Ferreira

Versão Corrigida.

São Paulo

2020

**CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**  
**Serviço de Biblioteca e informação Biomédica**  
**do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)**

Fernandes Teixeira, Sarah

Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas / Sarah Fernandes Teixeira; orientador Emer Suavinho Ferro; coorientador Adilson Kleber Ferreira. -- São Paulo, 2020.

98 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Carcinoma de pulmão de células não pequenas. 2. Fosfatidiletanolamina. 3. CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2). 4. Transporte de etanolamina. I. Suavinho Ferro, Emer, orientador. II. Ferreira, Adilson Kleber, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Sarah Fernandes Teixeira

Titulo da Dissertação/Tese: Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura:.....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**VALIDAÇÃO DA ENZIMA CTP:FOSFOETANOLAMINA-CITIDILIL-TRANSFERASE E DO TRANSPORTE DE ETANOLAMINA COMO NOVOS ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DO CARCINOMA DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**", registrado sob o protocolo nº **90/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **18/11/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Adilson Kleber Ferreira**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Sarah Fernandes Teixeira (Pós-graduando), Ricardo Alexandre Azevedo (Pós-doutorando), Salomão Dória Jorge (Pós-doutorando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Validation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme and ethanolamine transport as new targets for the rational development of new drugs in Non-Small Cell Lung Cancer treatment**", protocol nº **90/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/18/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Adilson Kleber Ferreira**

- Team members: *Sarah Fernandes Teixeira (Graduate Student), Ricardo Alexandre Azevedo (Postdoctoral Researcher), Salomão Dória Jorge (Postdoctoral Researcher)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb-C nude</i>	<i>Fêmea/female</i>	24 g	300

São Paulo, 29 de novembro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida: Deus, Fernando, meus pais, meus irmãos, meus amigos e minha tia Dida.

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do processo número 2016/09392-7 (bolsa de doutorado) e foi vinculado ao projeto de apoio a jovens pesquisadores da FAPESP através do processo número 2015/18528-7 e ao projeto temático 2016/04000-3.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbutto do Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo através do projeto financiado pelo projeto universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) número 007.286.078-24.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos em todos desafios da vida.

Aos meus pais, Geraldo e Alveni, e aos meus irmãos, Sérgio e Saulo, pelos exemplos de cidadãos e profissionais e pelo apoio ao longo da minha jornada.

Ao Fernando por ser meu refúgio durante todo momento de dificuldade e minha força para continuar.

À minha tia Dida e aos meus padrinhos, Conceição e Laudelino (*in memoriam*), por nunca duvidarem do meu potencial.

Aos meus amigos (Taynã, Brunella, Felipe, Gabriela, Samyra, Thaynnara, Cícero, Gustavo, Rafael Cunha, Amana, Rodolfo, Rafael Crempe, Chrisnael, Maurício, Gean, Rafael Terras, Thais, Ivan, Natalia e Rosania, *in memoriam*) pela cumplicidade que faz cada segundo valer a pena.

Ao Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, pela orientação e, principalmente, pela confiança ao apostar no meu trabalho e sempre me ajudar com muita paciência e boa vontade.

Ao Dr. Adilson Kleber Ferreira, pela orientação, ensinamentos, incentivo, confiança e por sempre me apoiar, fazendo o possível para o melhor desenvolvimento do meu trabalho e da minha carreira.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto pelos ensinamentos, por tão gentilmente me acolher em seu laboratório e compartilhar sua vivência científica.

Ao Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, Dr. Salomão Dória Jorge e o Dr. Carlos Rogério Figueiredo por me ajudarem em todos os momentos.

À equipe que realizou os estudos *in silico* e a síntese do CHY-1: Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Dra. Liliana Marzorati e o Dr. Marcio Henrique Zaim.

Às queridas Celinha e Claudinha, pelo cuidado, dedicação e carinho com que me ajudaram, tão prontamente, em todos os momentos.

À Dra. Débora Levy e ao Dr. Jorge Luis Maria pelos conselhos científicos e pela gentil disponibilização dos equipamentos de seu laboratório.

Aos Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes e Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara pela parceria com o uso de equipamentos.

Aos colegas de bancada do Laboratório de Imunologia de Tumores, em especial a Gabriela, a Ariane, a Aline, o Thiago, a Mariana, a Thais, a Carol, a Karen, a Maria, a Patrícia, a Cecília, a Bárbara, a Elizabeth, a Jaqueline, a Carla, o Jean Carlos, a Lislely, a Nadia, o Victor, a Sumara, a Bruna e a Renata por toda ajuda, paciência, ensinamentos e companheirismo.



Aos colegas imunologistas de outros laboratórios, em especial, a Nathalia, a Isabella, a Ester, o Felipe, o Aamir, o Caio, o Rafael, a Chris, Carol, Wesley, Theresa, Eliza, Rogério, Meire, Camila e a Tabata pela ajuda em inúmeros sufocos.

À toda equipe do biotério do departamento de imunologia e do biotério da FMUSP, pelo atendimento e auxílio de excelência.

À atenciosa correção das normas da dissertação pela equipe da secretaria do ICB.

Às agências de fomento a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (processo número 2016/09392-7) e financiamento (processo número 2015/18528-7 e 2016/04000-3), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento (número 007.286.078-24) e o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001).

A todos que ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho. Obrigada!

“Blackbird singing in the dead of night  
Take these broken wings and learn to fly  
All your life  
You were only waiting for this moment to arise.”

(The Beatles, 1968)

## RESUMO

TEIXEIRA, S. F. **Validação da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase e do transporte de etanolamina como novos alvos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas.** 2020. 102 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos cresce há décadas, contudo, a chegada de novos fármacos na terapêutica sofre pelos entraves da validação de alvos. Neste contexto, muitas doenças graves permanecem sem cura, dentre elas, o carcinoma de pulmão (CP). O CP é o câncer de maior morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo cerca de oitenta por cento dos casos diagnosticados como carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP). O nosso grupo trabalha no desenvolvimento racional de novos fármacos capazes de interferir na produção de fosfatidiletanolamina (PE) como uma estratégia inovadora para o tratamento de CPCNP. Este enfoque é devido ao aumento deste fosfolípido nos CPCNP e a relação deste com a progressão tumoral. Há duas formas de reduzir a produção de PE: 1) reduzir a atividade da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2), responsável pela etapa limitante da sua principal via de produção e 2) reduzir o aporte celular de etanolamina, substrato inicial de todas as rotas de produção de PE. Dessa forma, este trabalho avaliou *in vitro* e *in vivo* a importância da atividade da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina em modelos de CPCNP. O efeito da inibição da Pcyt2 foi avaliado frente ao inibidor, meclizina, e utilizando células A549 e LL2/LC1 com deleção do gene PCYT2 (KO) e selvagens (WT). A inibição do transporte de etanolamina foi avaliada utilizando o inibidor DL-1-amino-2-propanol. A inibição concomitante da Pcyt2 e do transporte de etanolamina reduziu a viabilidade das células A549 por mecanismos independentes de apoptose. O mecanismo de ação da meclizina se mostrou associado aos danos mitocondriais. As células, A549 KO apresentaram diminuída proliferação celular, possivelmente associada a redução da proteína Rb fosforilada, resultante da ação da p21 e da p53 fosforiladas. A PE e o transporte de etanolamina se mostraram essenciais para a proliferação celular, pois apenas em cultura de células A549 selvagens expressando Pcyt2 a suplementação de etanolamina ou de soro foi capaz de aumentar a taxa proliferativa. As células LL2/LC1 KO demandam mais tempo para a formação de tumores em camundongos, corroborando a importância da Pcyt2 para o desenvolvimento tumoral. Em conjunto, estes dados mostram o potencial da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina como alvos de agentes citostáticos para a terapêutica de CPCNP.

**Palavras-chave:** Carcinoma de pulmão de células não pequenas. Fosfatidiletanolamina. CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2). Transporte de etanolamina.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, S. F. **Validation of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme and ethanolamine transport as new targets for the rational development of new drugs in Non-Small Cell Lung Cancer treatment.** 2020. 102 p. Thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The research and development of new drugs has grown for decades, however, the arrival of new drugs in therapy suffers from the barriers of target validation. In this context, therapeutics for critical diseases remain unresolved, including for lung carcinoma (LC). LC is the cancer with the highest morbidity and mortality worldwide, with around eighty percent of cases diagnosed as non-small cell lung cancer (NSCLC). Our group works on the development of new drugs capable of interfering in the production of phosphatidylethanolamine (PE) as an innovative strategy for the treatment of NSCLC. This focus is due to the increase of this phospholipid in NSCLC and its relationship with tumor progression. There are two ways to reduce the production of PE: 1) reduce the activity of the rate-limiting CTP enzyme: phosphoethanolamine-cytidyl transferase (Pcyt2), and 2) reduce the cellular supply of ethanolamine, which is the substrate of all PE production routes. Thus, this work evaluated *in vitro* and *in vivo* importance of Pcyt2 enzyme activity and ethanolamine transport, in NSCLC models. The effect of Pcyt2 inhibition was evaluated both against the meclizine inhibitor and using A549 and LL2/LC1 cells with the deletion of the PCYT2 (KO) gene. Inhibition of ethanolamine transport was assessed using the DL-1-amino-2-propanol inhibitor. Concomitant inhibition of Pcyt2 and ethanolamine transport reduced the viability of A549 cells, by mechanism independent of apoptosis. The meclizine mechanism of action was suggested to be associated with mitochondrial damage. A549 KO cells show decreased cell proliferation, possibly associated with a reduction in phosphorylated Rb protein, resulting from the action of phosphorylated p21 and p53. The transport of PE and ethanolamine were shown to be essential for cell proliferation, only in culture of wild-type A549 cells expressing Pcyt2. LL2/LC1 KO cells demanded longer time for the formation of tumors in mice, corroborating the importance of Pcyt2 for tumor development. Taken together, these data suggested the potential of the Pcyt2 enzyme and ethanolamine transport as targets for cytostatic agents in the treatment of NSCLC.

**Keywords:** Non-small cell lung cancer (NSCLC). Phosphatidylethanolamine. CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). Ethanolamine transport.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**7-AAD** 7-Aminoactinomicina D  
**[<sup>14</sup>C]** Carbono-14  
**°C** Graus Celsius  
**µg** Micrograma  
**µL** Microlitro  
**µm** Micrometro  
**µM** Micromolar  
**Δψ<sub>m</sub>** Potencial de membrana mitocondrial  
**AKT** Proteína quinase B  
**ALK** *Anaplastic lymphoma kinase*  
**ATP** Trifosfato de adenosina  
**BSA** Albumina sérica bovina  
**CaCl<sub>2</sub>** Cloreto de cálcio  
**CCCP** Carbonilcianeto m-Clorofenil-Hidrazona  
**CDK2** *Cyclin-dependent kinase 2*  
**CP** Câncer de Pulmão  
**CPCNP** Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas  
**CRISPR** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*  
**CTP** Citidina 5' trifosfato  
**D1A2P** DL-1-amino-2-propanol  
**DNA** Ácido Desoxirribonucleico  
**DMSO** Dimetilsulfóxido  
**DPM** Decaimento por minuto  
**EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EGFP** *Enhanced Green Fluorescent Protein*  
**EGFR** *Epidermal growth factor receptor*  
**ERO** Espécies reativas de oxigênio  
**ERK** Quinase regulada por sinal extracelular  
**g** Aceleração de gravidade(9,8m/s<sup>2</sup>)  
**h** Hora  
**H<sub>2</sub>O** Água  
**HCl** Ácido clorídrico  
**HCA** *Hierarchical Cluster Analysis*  
**IC<sub>50</sub>** Concentração inibitória de 50% da proliferação celular  
**kDa** Kilodaltons  
**Ko** célula *knockout* para a enzima Pcyt2  
**KOAc** Acetato de potássio  
**KRAS** *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
**LB** meio Luria-Bertani  
**M** Molar  
**MAPK** Proteína-quinases ativadas por mitógenos  
**MEC** Meclizina  
**MET** Microscopia eletrônica de transmissão  
**mg** Miligrama  
**MgCl<sub>2</sub>** Cloreto de magnésio  
**mL** Mililitro  
**mM** Milimolar  
**MnCl<sub>2</sub>** Cloreto de manganês II  
**MINIPREP** Minipreparação

**MTT** Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
**NaCl** Cloreto de sódio  
**NaOH** Hidróxido de sódio  
**nm** Nanometros  
**OsO4** Tetróxido de ósmio  
**PBS** Tampão fosfato-salino  
**PD-L1** *Programmed death-ligand 1*  
**PCA** *Principal Components Analysis*  
**Pcyt2** enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase  
**PCYT2** gene que codifica a CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase  
**PE** Fosfatidiletanolamina  
**pH** Potencial hidrogeniônico  
**pSpCas9** plasmídeo da Cas9 nuclease guiada por RNA para a deleção do gene PCYT2  
**PVDF** Fluoreto de polivinilideno  
**ROS1** *ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase*  
**RPMI-1640** *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*  
**SDS** Dodecil sulfato de sódio  
**SDS-PAGE** Gel de eletroforese de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio  
**SFB** Soro fetal bovino  
**SOB** *Super Optimal Broth*  
**SOC** *Super Optimal Broth with Catabolic repressor*  
**TMRE** Ester etílico tetrametilrodamina  
**TSS** *Transformation and Storage Soution*  
**TTBS** Tampão de Tris-salino com *Tween-20*  
**Wt** célula *wildtype* para a enzima Pcyt2

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma de tratamento de CPCNP metastático inoperáveis segundo os guias práticos da European Society for Medical Oncology (ESMO) e da American Society of Clinical Oncology (ASCO). .....	24
Figura 2 – A via de Kennedy: as reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes .....	28
Figura 3 – Estrutura molecular da meclizina e do DL-1-amino-2-propanol.....	30
Figura 4 - Caracterização dos plasmídeos utilizados no estudo .....	44
Figura 5 - Mapa do plasmídeo vetor controle GFP .....	45
Figura 6 - Separação da população GFP positiva transfectada com o plasmídeo pGFPmáx. ....	47
Figura 7 - Separação da população GFP positiva transfectada com os plasmídeos pGFPmáx, pSpCas9 e o scramble.....	49
Figura 8 - Expressão da enzima Pcyt2 nas células A549 nucleofectadas.....	50
Figura 9 - Expressão da enzima Pcyt2 nas células LL2/LC1 nucleofectadas. .	50
Figura 10 - Gráficos dot plot representativos dos efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células A549. ....	54
Figura 11 - Gráficos dot plot representativos dos efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células LL2/LC1 .....	55
Figura 12 – Os efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células A549.....	56
Figura 13 – Os efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células LL2/LC1.....	57
Figura 14 - Efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em 3 horas nas células A549 e LL2/LC1 .....	58
Figura 15 - O efeito dos tratamentos estudados sobre o potencial eletrônico mitocondrial das células A549.....	60
Figura 16 – O efeito dos tratamentos estudados sobre o potencial eletrônico mitocondrial das células LL2/LC1.....	61
Figura 17 – Avaliação das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO em 2500 x.....	63
Figura 18 - Avaliação das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO em 5000 x.....	64
Figura 19 - Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO.....	65
Figura 20 – Avaliação das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO em 2500 x .....	66
Figura 21 - Avaliação das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO em 5000 x .....	67
Figura 22 - Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO.....	68
Figura 23 – Avaliação da proliferação celular nas células A549 .....	70
Figura 24 – Avaliação da proliferação celular nas células LL2/LC1. ....	70
Figura 25 – Avaliação da proliferação celular das células A549 por ensaio clonogênico. ....	71
Figura 26 – Avaliação da distribuição das células A549 nas diferentes fases do ciclo celular.....	72

Figura 27 – Avaliação da distribuição das células LL2/LC1 nas diferentes fases do ciclo celular.....	73
Figura 28 – Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular nas células A549. ....	74
Figura 29 – Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular nas células LL2/LC1 .....	75
Figura 30 – Padronização dos modelos in vivo com células LL2/LC1 WT e KO .....	76
Figura 31 – Análise da progressão dos tumores dos camundongos nos quais foram inoculadas as células LL2/LC1 WT, GFP, SCR e KO .....	78
Figura 32 – Avaliação dos sinais de toxicidade dos tratamentos testados in vivo. ....	79



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da atividade da enzima Pcyt2 isolada através da detecção do decaimento do [ <sup>14</sup> C] da CDP-etanolamina produzida.....	42
Tabela 2 – Avaliação da atividade da enzima Pcyt2 em modelo de células CHO-K1 através da detecção do decaimento da [ <sup>14</sup> C]etanolamina incorporada e da [ <sup>14</sup> C]CDP-etanolamina produzida. ....	43
Tabela 3 - Quantificação em ng/μL dos plasmídeos extraídos e purificados das bactérias.....	45
Tabela 4 – Valores de IC <sub>50</sub> dos compostos em teste (μM) nos diferentes fenótipos de A549. ....	51
Tabela 5 – Valores de IC <sub>50</sub> dos compostos em teste (μM) nos diferentes fenótipos de LL2/LC1. ....	52
Tabela 6- Valores de IC <sub>50</sub> dos compostos em teste (μM) nos diferentes fenótipos de MRC-5.....	52
Tabela 7 - Valores da média e desvio-padrão da análise da série de células sanguíneas vermelhas. ....	80
Tabela 8 - Valores da média e desvio-padrão da análise da série de células sanguíneas brancas. ....	80

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 <i>Planejamento racional de fármacos</i>	19
1.2 <i>O câncer de pulmão</i>	20
1.3 <i>A importância da fosfatidiletanolamina no contexto tumoral</i>	25
1.4 <i>Biossíntese da fosfatidiletanolamina</i>	27
1.5 <i>Estudos prévios de um potencial inibidor da enzima Pcyt2</i>	30
<b>2 OBJETIVOS</b>	32
2.1 <i>Objetivo geral</i>	32
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1 <i>Cultivo das linhagens celulares</i>	33
3.2 <i>Plasmídeos utilizados</i>	33
3.3 <i>Nucleofecção das células A549 e LL2/LC1</i>	34
3.4 <i>Purificação das células GFP positivas</i>	34
3.5 <i>Western blotting</i>	34
3.6 <i>Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT</i>	35
3.7 <i>Determinação da inibição enzimática da Pcyt2 e do transporte de etanolamina</i>	36
3.8 <i>Determinação da capacidade de formação de colônia</i>	36
3.9 <i>Análise do ciclo celular</i>	37
3.10 <i>Análise da curva de crescimento das células</i>	37
3.11 <i>Análise morfológica das células tratadas por microscopia eletrônica de transmissão</i>	38
3.12 <i>Análise da apoptose através do ensaio de anexina V/7AAD</i>	38
3.13 <i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (<math>\Delta\psi_m</math>)</i>	39
3.14 <i>Animais de experimentação</i>	40
3.15 <i>Avaliação da tumorigenicidade in vivo das células KO</i>	40
3.16 <i>Avaliação dos efeitos antitumorais in vivo</i>	40
3.17 <i>Análise estatística dos resultados</i>	41
<b>4 RESULTADOS</b>	42
4.1 <i>Avaliação da inibição da enzima Pcyt2</i>	42
4.2 <i>Caracterização, ampliação, extração e purificação dos plasmídeos pSpCas9</i>	43
4.3 <i>Padronização das transfecções e seleção de células GFP<sup>+</sup> com o plasmídeo vetor controle GFP</i>	45
4.4 <i>Transfecção com os plasmídeos pSpCas9</i>	47

4.5	<i>Avaliação dos efeitos citotóxicos da inibição da Pcyt2 e do transporte de etanolamina</i> .....	50
4.6	<i>Avaliação dos efeitos citostáticos da inibição da Pcyt2 e do transporte de etanolamina</i> .....	68
4.7	<i>Avaliação dos efeitos in vivo da inibição da Pcyt2 e do transporte de etanolamina</i> .....	76
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	89
	<b>REFERÊNCIAS*</b> .....	90
	<b>ANEXO A</b> .....	101
	<b>ANEXO B</b> .....	102

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Planejamento racional de fármacos

O uso de substâncias no intuito de alterar as funções biológicas é antigo e o desenvolvimento de fármacos está intimamente relacionado aos avanços da humanidade (KOEHN; CARTER, 2005). A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são importantes linhas de pesquisa com grande impacto financeiro e social para a população mundial (CLEARY et al., 2018; DE RYCKER et al., 2018; MOHRS; GREIG, 2017).

Neste cenário, o planejamento racional de fármacos destaca-se pelo apelo de que alvos bem delineados, garantindo eficácia e redução dos efeitos adversos (DE RYCKER et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018). Nestes modelos os alvos são identificados e validados através da manipulação genética e/ou farmacológica do alvo em questão, a fim de avaliar a relevância deste para o modelo e, por conseguinte, prever uma resposta terapêutica (DE RYCKER et al., 2018; KAELIN et al., 2017). Assim, estes modelos são desenvolvidos por grupos multidisciplinares e exigem a identificação prévia de um alvo, preferencialmente alterado apenas no contexto da doença, o que torna um pouco mais complexa essa estratégia (GIBBS, 2000; SAWYERS, 2004). Em contrapartida, estes modelos contam com abordagens computacionais capazes de otimizar o processo de triagem de fármacos, quando comparado à busca através de quimiotecas. Dentre estas abordagens estão: a análise de *docking*; a avaliação da taxa de ligação com o alvo (afinidade/especificidade); o balanço entre hidrofobicidade/lipofobicidade; a relação quantitativa de estrutura-atividade e outros (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006).

Entretanto, a chegada de novos fármacos na terapêutica é desproporcional aos crescentes investimentos em inovação na área. Dentre os motivos para este *plateau* na chegada de novos fármacos no mercado está a validação superficial dos alvos e a falta de translação dos dados pré-clínicos para a prática clínica (CLEARY et al., 2018; DE RYCKER et al., 2018; KAELIN et al., 2017; MOHRS; GREIG, 2017). Dado esses entraves na chegada de novos fármacos no mercado e a fim de melhorar o cenário da terapêutica atual, ganharam destaque também novas estratégias com fármacos já aprovados, tais

quais, as novas combinações, com sorafenibe e oxaliplatina por exemplo (TEIXEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2016), ou até o reposicionamento terapêutico de fármacos, como a metformina (TEIXEIRA et al., 2013). Cumpre salientar que estratégias como estas também podem representar reduções dos gastos públicos com medicamentos (BERTOLINI; SUKHATME; BOUCHE, 2015) e dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos (MAXMEN, 2016).

Contudo, apesar de todos estes esforços, muitas doenças permanecem sem cura e representam um problema de saúde pública, dentre estas, o câncer destaca-se mundialmente por sua morbidade e mortalidade (BRAY et al., 2018). O câncer é uma designação para um conjunto de doenças marcadas por células modificadas (com alterações em seu metabolismo, sua sobrevivência e sua capacidade de evadir o sistema imune), permitindo seu crescimento desordenado e a invasão de tecidos e órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Desta forma, cada tipo de câncer apresenta particularidades biológicas que determinam sua melhor opção terapêutica e a negligência destas é um dos motivos para as estatísticas mundiais de mortalidade. Dentre os cânceres, o câncer de pulmão (CP) é a principal causa de morte por câncer no mundo e no Brasil (ARAUJO et al., 2018; BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; GBD 2017, 2018; INCA, 2014). Ademais, este câncer é o mais incidente no mundo (BRAY et al., 2018) e o segundo frequente no Brasil (ARAUJO et al., 2018; INCA, 2017).

### *1.2 O câncer de pulmão*

O CP é o conjunto de doenças neoplásicas cujo o sítio primário é o pulmão, entretanto, a fim de facilitar seus guias de tratamento a Organização Mundial de Saúde classifica o CP em grupos baseados no tipo celular e nas alterações genéticas da célula tumoral inicial (ETTINGER et al., 2018; SCAGLIOTTI et al., 2011). Usualmente há uma primeira divisão em dois grandes grupos: o carcinoma de pulmão de pequenas células e o carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (DAVIDSON; GAZDAR; CLARKE, 2013; TRAVIS, BRAMBILLA; RIELY, 2013).

O carcinoma de pulmão de células pequenas representa cerca de 14% dos casos de câncer pulmão e caracteriza-se por sua agressividade (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; DAVIDSON; GAZDAR; CLARKE, 2013; WAQAR; MORGENSZTERN, 2017). Estes tumores são tipicamente de porções medianas dos brônquios e expressam marcadores neuroendócrinos (por exemplo: o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a molécula de adesão celular neuronal 1 e a proteína *achaete-scute complex homolog-like 1*) (MEUWISSEN et al., 2003; WISTUBA et al., 2001). Preconiza-se o tratamento dos pacientes com este diagnóstico através de quimio e/ou radioterapia independente do seu estágio, dado a alta taxa de metástase associada a esta doença (WAQAR; MORGENSZTERN, 2017).

Já o CPCNP, representa cerca de 84% dos diagnósticos de CP e é um grupo heterogêneo que engloba diferentes tipos histológicos, tais como: o carcinoma de células epidermóides, os adenocarcinomas, o carcinoma de células grandes e outros tipos mais raros (ETTINGER et al., 2018; TRAVIS et al., 2011). Quanto à origem de cada subtipo, os carcinomas de células epidermóides e os adenocarcinomas apresentam origem bem distinta, já a origem do carcinoma de células grandes ainda não é bem estabelecida. Os adenocarcinomas apresentam características broncoalveolares e alveolares (co-expressão do antígeno 10 de células Clara e da proteína C surfactante de células alveolares do tipo 2), assim, a hipótese é de que estes tumores derivam de células da junção broncoalveolar com o oncogene K-RAS ativado denominadas células-tronco broncoalveolares (KIM et al., 2005; JACKSON et al., 2001). Ao passo que os carcinomas de células epidermóides são de origem traqueal, iniciando-se por células basais mutadas com fenótipo positivo para as queratinas 5 e 14 e para o fator de transcrição p63 (BORTHWICK et al., 2001). Vale ressaltar ainda que os casos de adenocarcinoma são mais frequentes entre os CPCNP e apresentam incidência crescente, enquanto o carcinoma de células epidermóides tem sua incidência em declínio junto a redução da taxa de fumantes (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005; CHANG et al., 2009; CHARLOUX et al., 1997; JANSSEN-HEIJNEN; COEBERGH, 2001; TSUKAZAN et al., 2017).

Apesar do fumo ser responsável por cerca de 90% de todos os casos de CP e do abandono deste hábito aumentar a sobrevivência de pacientes já

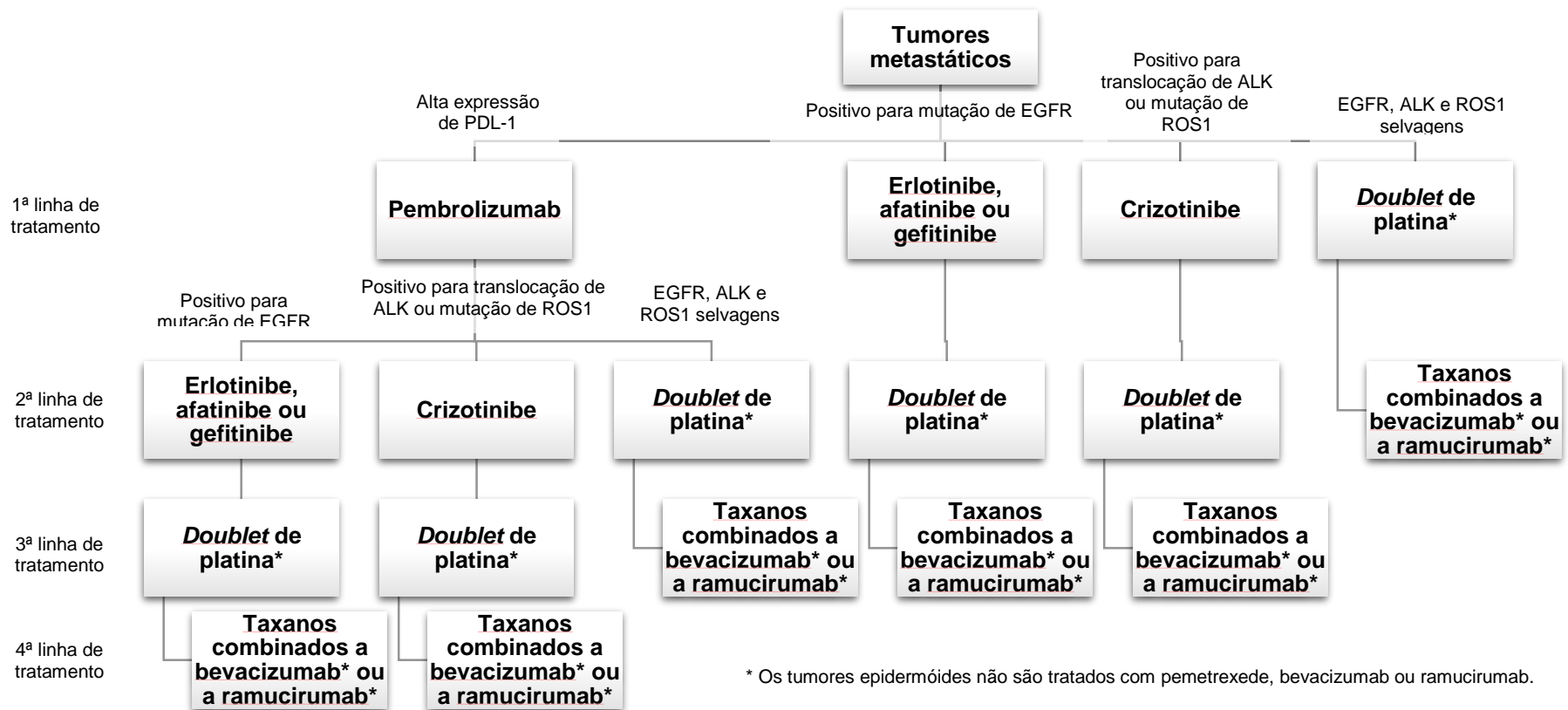
diagnosticados, vale destacar que o CP em pacientes sem histórico de fumo é a principal causa de morte por câncer (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; CATALDO et al., 2010; PASIC et al., 2004; HO et al., 2017). Nestes casos, a causa é atribuída a outros fatores que estão intimamente relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento desta neoplasia, tais quais: as dietas de baixo consumo de frutas e verduras; a poluição atmosférica; a doença pulmonar obstrutiva crônica; os fatores genéticos e a exposição ocupacional aos metais, aos pesticidas e às radiações (BOFFETTA, 2006; BOING; ROSSI, 2007; SAITO et al., 2017). Os casos de CP não associados ao fumo ocorrem principalmente em mulheres e são, com maior frequência, adenocarcinomas (SAITO et al., 2017; SAMET et al., 2009; YANO et al., 2011).

No que tange as linhas de tratamento para os CPCNP, em estágios iniciais, todos os subtipos são tratados com cirurgia podendo associar-se aos protocolos de rádio- e/ou quimioterapia. Ao passo que a doença metastática, conforme o fluxograma da Figura 1, apresenta como primeira linha a imunoterapia utilizando o pembrolizumab, um anticorpo monoclonal anti-proteína 1 de morte celular programada (PD-1) para tumores com alta expressão de ligante da proteína 1 de morte celular programada (PDL-1) ou as “terapias-alvo” para os receptores de tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a quinase do linfoma anaplásico (ALK) e o proto-oncogene ROS1 (ROS1), caso os tumores sejam positivos para alterações nessas proteínas (GARON et al., 2015; HANNA et al., 2017; PLANCHARD et al., 2019; VOKES et al., 2018). A mutação mais comum é em EGFR, principalmente entre asiáticos, o que permite utilizar como a terapia de primeira linha com os inibidores de tirosina quinase anti-EGFR, tais quais erlotinib, gefitinib ou afatinib (SEQUIST et al., 2008). Por outro lado, pacientes com a fusão de ALK e a mutação em ROS1 são tratados com crizotinib, outro inibidor de tirosina quinase (SGAMBATO et al., 2018).

Os pacientes que apresentarem progressão da doença após a imunoterapia e/ou a terapia com inibidores de tirosina quinase seguirão seu tratamento na mesma conduta terapêutica dos pacientes que não apresentam estes fenótipos. Ou seja, os protocolos de rádio- e/ou quimioterapia clássica de *doublet* de platina (associação de cisplatina ou carboplatina com pemetrexede

ou bevacizumab ou paclitaxel ou gemcitabina ou docetaxel ou vinorelbina) por 4 a 6 ciclos são a escolha clínica mais adequada. Em caso de resistência aos *doublet* de platina, o tratamento é feito pelo uso de docetaxel em monoterapia ou associado a outros fármacos como o ramucirumab. Contudo, o tratamento dos tumores epidermóides não devem seguir protocolos contendo pemetrexede, ramucirumab e bevacizumab devido ao risco de hemorragia graves nestes casos (ETTINGER et al., 2018; HANNA et al., 2017; PLANCHARD et al., 2019; THOMAS et al., 2015; VANSTEENKISTE et al., 2013).





**Figura 1 – Fluxograma de tratamento de CPCNP metastático inoperáveis segundo os guias práticos da *European Society for Medical Oncology (ESMO)* e da *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*. A primeira linha de tratamento para CPCNP nos estádios avançados é a imunoterapia com pembrolizumab para tumores com alta expressão de PDL-1. Os tumores resistentes a este tratamento ou com baixa expressão de PDL-1 são prioritariamente tratados com os inibidores de tirosina quinase, caso sejam positivos para mutações no EGFR ou no ROS1 ou translocação de ALK. Em contrapartida os tumores sem essas alterações ou resistentes às linhas de tratamento anteriores são tratados com o *doublet de platina\**, ou seja, a combinação de cisplatina ou carboplatina com pemetrexede, bevacizumab, paclitaxel, gemcitabina, vinorelbina ou docetaxel. Vale frisar que os tumores epidermóides não podem ser tratados com pemetrexede, bevacizumab ou ramucirumab. Em todos os casos a segunda linha terapêutica usa docetaxel em monoterapia ou combinado com ramucirumab.**

Embora a cirurgia nos estágios iniciais possa ser curativa, 70% dos casos de CPCNP são diagnosticados já em estádios avançados e, por conseguinte, são inoperáveis (ARAUJO et al. 2018; BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; VANSTEENKISTE et al., 2013). Este diagnóstico tardio deve-se, em parte, aos sintomas genéricos da doença e que aparecem tardiamente, tais quais tosse persistente, dor e perda de peso (WOOD et al., 2018). No intuito de alterar este cenário, o *National Lung Cancer Screening Trial* realizou triagens anuais em pacientes de alto risco (fumantes e ex-fumantes com idade entre 55 e 80 anos com histórico de fumo de 30 maços cigarros ou mais por ano), no entanto, dado ao seu custo, o estresse o qual o paciente é submetido e a detecção frequente de nódulos benignos, estas triagens preventivas estão ainda sendo avaliadas (NLSTRT et al., 2011; WOOD et al., 2018). No Brasil, estas triagens ainda não são prática clínica devido a seus custos, falta de profissionais preparados e aos altos índices de doenças granulomatosas na população (DE SÁ et al., 2016).

Desta forma, apesar da redução das taxas de morte e de novos casos de CP relacionadas ao tabaco devido às extensivas políticas públicas de saúde no Brasil e no mundo (LEVY; DE ALMEIDA; SZKLO, 2012), as tentativas de diagnóstico precoce e todos os avanços terapêuticos das últimas décadas (DENG; NAKAMURA, 2017; GOTWALS et al., 2017; KUMAR et al., 2017; ROY; TRINCHIERI, 2017), o prognóstico dos pacientes com o CP permanece ruim (BOLOKER; WANG; ZHANG, 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Neste contexto, o CP e, principalmente o adenocarcinoma de pulmão, são desafios à saúde pública nacional e mundial, sendo, pois, necessária a busca por estratégias inovadoras para transformar este cenário.

### *1.3A importância da fosfadiletanolamina no contexto tumoral*

Ao buscar por novos alvos terapêuticos, inicialmente é necessário compreender que os fármacos clássicos utilizados no tratamento do câncer têm como alvos a replicação do DNA e a divisão celular, porém, alvos relacionados aos fosfolípidos vêm ganhando destaque no desenvolvimento de novos antineoplásicos (IORIO et al., 2010; KECKESOVA et al., 2017; MARINO et al., 2015; VALENZUELA-OSES et al., 2017; WEICHERT et al., 2014). Este interesse advém das funções celulares e da presença de alterações relacionadas aos

fosfolipídios no contexto tumoral (IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007; RYSMAN et al., 2010; SCOTT et al., 2010; SWINNEN et al., 2003). Os fosfolipídios, além de serem os principais componentes das membranas plasmáticas (ROTHMAN; LENARD, 1977), também estão relacionados aos processos de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação e motilidade (HUANG; FRETER, 2015; VANCE; TASSEVA, 2013). Juntos, todos esses processos celulares, apresentam-se alterados e são de extrema importância na iniciação e no desenvolvimento tumoral. Desta forma, as vias de produção de fosfolipídios estão aumentadas nas células tumorais e tornam-se possíveis alvos em potencial para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007).

Dentre os mais abundantes fosfolipídios das membranas celulares temos a fosfatidiletanolamina (PE), que desempenha importantes papéis em processos fisiológicos, tanto diretamente quanto através de seus metabólitos biologicamente ativos, tais como, ácidos graxos livres e diacilglicerol, ambos importantes segundos mensageiros intracelulares (VANCE, 2008). Diversas das atividades exercidas pela PE estão intimamente relacionadas aos mecanismos de desenvolvimento tumoral como a citocinese (EMOTO et al., 1996), a apoptose (EMOTO et al., 1997) e a autofagia (LAMB, YOSHIMORI, TOOZE, 2013; ROCKENFELLER et al., 2015).

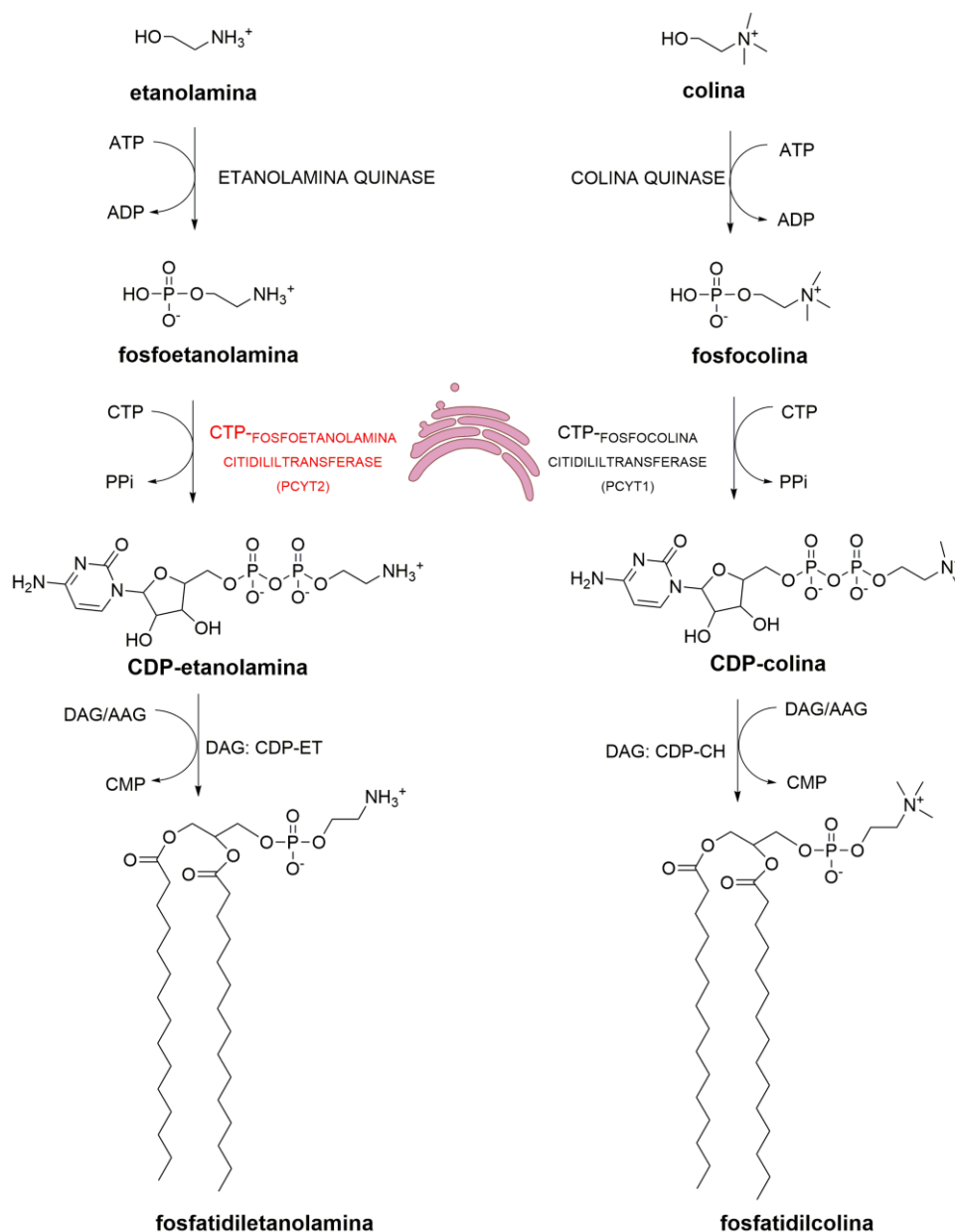
As perturbações na produção de PE geram alterações nas sinalizações celulares devido à função de chaperona deste fosfolipídio que faz pontes de hidrogênio com uma ampla variedade de aminoácidos (MILEYKOVSKAYA; DOWHAN, 2005; SIGNORELL et al., 2009). Além de suas características anfipáticas e de sua forma cônica (QUINN, 2010) que, juntas, permitem a topologia adequada dos domínios de membrana. Ao considerar os papéis da PE na morte celular, esta forma os intermediários nos processos de fusão e fissão de membrana, como as proteínas mitofusina 1 e mitofusina 2, diretamente associadas a proliferação e sobrevivência das células tumorais pelo constante recrutamento da PE (REHMAN et al., 2012). Em relação à maquinaria mitocondrial, a PE é crucial na biogênese das proteínas da membrana externa mitocondrial TOM e a SAM, além de manter a sintonia entre as proteínas da

membrana externa mitocondrial relacionadas à apoptose, como BAD, BAX e BID (LI et al., 2015). Ademais, a PE está intimamente relacionada a formação do sulco de clivagem, assegurando uma citocinese adequada pela sua redistribuição para o folheto externo da membrana (EMOTO et al., 1996), propiciando uma curvatura de membrana adequada, auxiliando o estrangulando o citoplasma pela contração dos filamentos proteicos de actina e miosina (EMOTO et al., 2000). Neste contexto, estudos com o produto natural ofiobolina A mostraram o potencial antineoplásico da redução da funcionalidade da PE em células tumorais pela ligação covalente da ofiobolina a este fosfolípido, formando poros na membrana celular (CHIDLEY et al., 2016).

Tecidos tumorais de amostras de pacientes com CPCNP, quando comparado ao tecido de uma região pulmonar não afetada, apresentam alterações proeminentes no perfil de fosfolípidios, em especial um aumento da PE (MARIEN et al., 2015). Portanto, há um interessante potencial terapêutico relacionado à intervenção no metabolismo dos fosfolípidios e, em especial, a PE, principalmente em modelo de CPCNP.

#### *1.4 Biossíntese da fosfatidiletanolamina*

Em células eucarióticas, quantitativamente, a principal via de produção de PE é a via de Kennedy (Figura 2), em que a PE é sintetizada a partir da fosforilação da etanolamina pela etanolamina-quinase, seguida da conversão da fosfoetanolamina em PE pela ação da CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) (GIBELLINI; SMITH, 2010; PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Apesar da via de Kennedy ser a principal rota de produção da PE, esta também é sintetizada a partir da via de descarboxilação da fosfatidilserina nas mitocôndrias através da ação da enzima fosfatidilserina descarboxilase (VANCE, 2008). Esta última via de produção de PE é importante principalmente na geração de PE com ácidos graxos polinsaturados que serão preferencialmente mantidos na mitocôndria. No entanto, esta via pode compensar os casos onde ocorre a redução de produção de PE pela via de Kennedy (BLEIJERVELD et al., 2007).



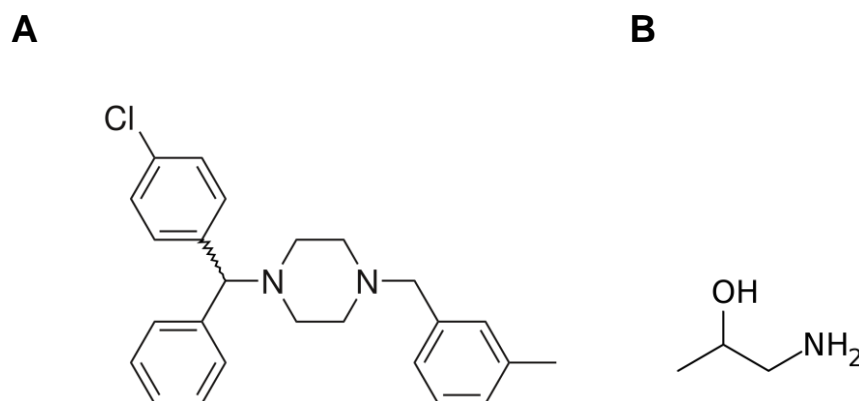
**Figura 2 – A via de Kennedy: as reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes.** A via de Kennedy apresenta duas rotas distintas para a produção de, respectivamente, PE e a fosfatidilcolina. As duas rotas são bem similares e apresentam enzimas análogas, responsáveis pela conversão dos precursores, etanolamina e a colina, em seus respectivos fosfolipídios. A via de Kennedy é iniciada pela ação de uma amino-álcool-fosfotransferase que fosforila a etanolamina ou a colina, resultando na produção da fosfoetanolamina e fosfocolina, respectivamente. A reação subsequente entre a citidina 5' trifosfato (CTP) e os produtos fosforilados é mediada pelas enzimas Pcyt2 e CTP:fosfocolina-citidilil-transferase, resultando na produção de CDP-etanolamina ou CDP-colina e pirofosfato. A última etapa da reação é pela CDP etanolamina: 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferase ou CDP colina: 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferase, que acopla o produto da reação anterior ao diacilglicerol formado como produto final a PE ou a fosfatidilcolina, respectivamente. Neste contexto, essas enzimas surgem como possíveis alvos terapêuticos para reduzir a excessiva reciclagem de membrana das células tumorais, em especial, enzima da etapa limitante da reação, presente no retículo endoplasmático, Pcyt2 (destacada em vermelho).

Neste contexto, a Pcyt2 surge como um alvo terapêutico potencial, pois compõe a etapa limitante da principal via de produção do segundo fosfolípido de membrana mais abundante (SUNDLER; AKESSON, 1975), encontra-se frequentemente superexpressa em diversos tumores malignos, incluindo o CP (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Ademais, a inibição do transporte de etanolamina também apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, dado que sua inibição levaria à redução da produção da PE, pela redução do substrato inicial, a etanolamina, que é adquirida exclusivamente através da dieta ou da troca de bases com a serina na via de decarboxilação da fosfatidilserina (BREMER et al., 1960). Desde a década de 80, o transporte desta amina de carga positiva em pH fisiológico já é estudado, sendo realizado de forma dependente ou não de sódio, como no caso da borda em escova da placenta, em que o transporte ocorre por meio de vesículas (GRASSL, 2011; YOREK et al., 1985; ZELINSKI; CHOY, 1982). Portanto, a inibição do transporte de etanolamina culmina na redução de produção de PE pela redução de disponibilidade do substrato inicial, a etanolamina (YOREK et al., 1985).

Ambas as estratégias, a inibição da enzima Pcyt2 e a inibição do transporte de etanolamina, levam a redução da produção de PE, que culmina na parada da divisão celular, desestruturação dos *lipid rafts*, alteração da produção de segundos mensageiros e apoptose (EMOTO; UMEDA, 2000; SIGNORELL et al., 2009; VANCE, 2008; ZHU; BAKOVIC, 2012). A inibição da Pcyt2 leva ao acúmulo de seu substrato, a fosfoetanolamina, que, quando em excesso, leva à inibição da respiração celular mitocondrial (FERREIRA et al., 2012<sup>a</sup>; FERREIRA et al., 2012<sup>b</sup>; FERREIRA et al., 2013; GOHIL et al., 2013; MAMBELLI et al., 2018). No entanto, há poucos relatos do papel da enzima Pcyt2 nos processos de iniciação e desenvolvimento tumoral, sendo frequentemente relacionada aos processos oxidativos, isquemia, esteatose hepática, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e como uma estratégia neuroprotetora (SINGH et al., 2012; BASU et al., 2015).

Ademais, há poucos relatos na literatura de uso de inibidores da Pcyt2, como a meclizina (Figura 3A) (GOHIL et al., 2013), ou inibidores do transporte de etanolamina, como o DL-1-amino-2-propanol (Figura 3B) (RIFKIN;

STROBOS; FAIRLAMB, 1995), para fins antitumorais e, nenhum destes com avaliação em modelo *in vivo* ou em CP. Além do uso clássico da meclizina para combater náuseas e vertigem, este fármaco já foi estudado com citoprotetor em casos de isquemia cardíaca, cerebral e renal (GOHIL et al., 2010; KISHI et al., 2015; ZHUO, GORGUN, ENGLANDER, 2016), na doença de Huntington (GOHIL et al., 2011) e na doença de Parkinson (HONG, CHAU, SCHAPIRA, 2016).



**Figura 3 – Estrutura molecular da meclizina e do DL-1-amino-2-propanol.** (A) A meclizina foi o primeiro inibidor da enzima Pcyt2 descrito na literatura. (B) O DL-1-amino-2-propanol é um composto muito semelhante estruturalmente à etanolamina e por isso é utilizado como inibidor competitivo do transporte de etanolamina.

### 1.5 Estudos prévios de um potencial inibidor da enzima Pcyt2

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo já demonstraram o potencial da Pcyt2 no CP como alvo terapêutico para o tratamento do CP através do uso de um inibidor da enzima Pcyt2, denominado CHY-1 (dados não publicados). O CHY-1 foi o composto mais promissor selecionado de um conjunto de mais de oitenta derivados de éter fosfolípides que foram estudados através de métodos de modelagem molecular e da aplicação de ferramentas quimiométricas incluindo a análise hierárquica de *cluster* e a análise de componentes principais (HCA/PCA). Tais análises identificaram padrões de similaridade capazes de selecionar CHY-1 como um inibidor da enzima Pcyt2.

Em seguida, o CHY-1 apresentou efeitos citotóxicos preferenciais para células tumorais, em cultura bi e tridimensional, de células de CPCNP. A concentração citotóxica máxima utilizada de CHY-1 em células de CPCNP não reduziu a viabilidade de células de linhagem de fibroblasto humano de pulmão. Esses dados sugeriram a seletividade citotóxica de CHY-1 para células tumorais.

Ademais, CHY-1 também apresentou efeito antiproliferativo nas células de CPCNP, inibindo a formação de colônias por parada na transição das células da fase G1 para a S do ciclo celular, por mecanismos que envolvem a redução do complexo ciclina-A/Cdk2 e a expressão da proteína Cdk1 (dados não publicados). Dentre os mecanismos relacionados à toxicidade de CHY-1 estão também alterações derivadas do estresse do retículo endoplasmático devido a redução da produção de PE, tais como: o acúmulo de proteínas desdobradas ou deformadas, a inibição da síntese de proteínas anti-apoptóticas e o bloqueio da autofagia (dados não publicados). Ainda, o CHY-1 levou à desestruturação mitocondrial e ao aumento da expressão de calpaína 1. Além dos efeitos tóxicos diretos de CHY-1, este composto levou ao aumento da externalização de calreticulina e a liberação de HMGB1 nas células tumorais, sinais estes relacionados à indução de morte imunogênica, um interessante efeito que pode levar a uma resposta sinérgica do sistema imune contra o tumor.

No entanto, ao avaliar a inibição da atividade catalítica da Pcyt2 utilizando o isótopo radioativo [<sup>14</sup>C] fosfoetanolamina, o CHY-1 reduziu a produção de PE não apenas pela inibição de forma não competitiva, mas também inibindo o transporte de etanolamina. Este último efeito, potencializa o efeito inibitório de CHY-1 sobre a produção de PE em CPCNP. Contudo, esse segundo efeito inespecífico de CHY-1 dificultou a compreensão precisa dos seus alvos e de seu mecanismo de ação terapêutico. Além da dificuldade de determinar o seu mecanismo de ação, CHY-1 também apresenta uma rota de síntese complexa, que inviabilizou a continuação de seus testes. Portanto, o nosso grupo iniciou testes com seu intermediário, denominado SF2.

Desta forma, este trabalho avaliou o potencial terapêutico isolado dos alvos Pcyt2 e transporte celular de etanolamina em modelos de CPCNP, pois, a partir da análise isolada de cada um desses alvos podemos avaliar melhor os efeitos dos inibidores desenvolvidos pelo grupo (CHY-1 e SF2) e outros potenciais inibidores destes alvos em modelo de CPCNP.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Validar *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (camundongos) o papel da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina como alvos terapêuticos para o tratamento de CPCNP.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar os efeitos citotóxicos da inibição da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina em células de CPCNP humano e murino;
- Estudar os mecanismos de morte celular induzidos pela modulação da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina em células de CPCNP humano e murino;
- Analisar as alterações nos mecanismos do ciclo celular das células de CPCNP humano e murino pela modulação da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina;
- Avaliar a atividade antitumoral causada pela inibição da enzima Pcyt2 e/ou transporte de etanolamina em modelo equitópico células de CPCNP murino injetadas em camundongos BALB/c *nude*;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Cultivo das linhagens celulares*

As linhagens de CPCNP [A549 e LL/2 (LLC1)] certificadas (Anexo A e B) foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe, Alemanha) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 0,5% (p/v) de anfotericina B (Gibco, Karlsruhe, Alemanha). Todas estas linhagens foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e, ao atingirem a subconfluência, as culturas foram ampliadas e as células criopreservadas em solução de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em SFB a -80 °C.

#### 3.2 *Plasmídeos utilizados*

Os plasmídeos utilizados foram pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458) com 9,3 kb adquiridos da GenScript USA Inc (Piscataway, NJ, EUA). Os plasmídeos codificam a enzima Cas9 com o RNA guia para o silenciamento da enzima Pcyt2, a produção de proteína verde fluorescente (GFP) como gene-repórter e o gene de resistência à ampicilina para a seleção de bactérias transformadas. Foram utilizados três diferentes plasmídeos com uma sequência de RNA guia de 20 pares de base para a Pcyt2 humana ou murina.

As sequências guias da Cas9 dos plasmídeos para a Pcyt2 humana são:

- Plasmídeo 1: TGCGGGGCCATGATCCGGAA
- Plasmídeo 2: AGAGAATGCAAGCGCACGCA
- Plasmídeo 3: CTGCAGCCCCGCGCCCGTTC

Já as sequências guias da Cas9 dos plasmídeos para a Pcyt2 murina são:

- Plasmídeo 1: TGGCCCGTGCCTGCCGTAGC
- Plasmídeo 2: CCGTATGCACACCCACGATG

- Plasmídeo 3: CCAGCAGCATGCGACCCACG

### 3.3 Nucleofecção das células A549 e LL2/LC1

As células foram nucleofectadas utilizando o *kit Cell line optimization 4D-Nucleofector® X* e o 4D- Nucleofector® (Lonza, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando a solução SF e os programas EH100 e EN138, respectivamente, para as linhagens A549 e LL2/LC1. O plasmídeo pmaxGFP (pmax GFP™, Lonza, Alemanha) (1 ug) foi incluído para monitorar a eficiência de transfecção. A eficiência da transfecção foi analisada através da porcentagem de células positivas para GFP por microscopia de fluorescência, usando o microscópio ZOE (Biorad, CA, EUA).

### 3.4 Purificação das células GFP positivas

As células GFP positivas da nucleofecção foram separadas por separação citométrica das populações celulares de acordo com a fluorescência no canal FL-1. As células transfectadas foram coletadas utilizando solução de EDTA 0,5 M e mantidas em tubos de 15 mL contendo 1 mL de PBS com 0,5 % de SFB e EDTA 0,5 M e separada com *nozzel* de 85 µm e filtro de 1 com o auxílio do FACS Aria III (Becton Dickinson, CA, EUA) através do *software* FACSDiva. As 50 000 células foram separadas e analisadas. As células GFP positivas foram coletadas em tubo de 15 mL com meio de cultura suplementado com 5 % de solução antibiótica e antimicótica e 10 % de SFB e mantidas em cultura.

### 3.5 Western blotting

A avaliação dos níveis de expressão de Pcyt2 foi realizada por *Western blotting* com objetivo de caracterizar as células transfectadas, validando a deleção da PCYT2. Este ensaio também foi utilizado para a análise da expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular. As células A549 e LL2/LC1 WT e KO (10<sup>6</sup> células/poço) foram lisadas com o reagente de extração de proteínas de mamíferos (*Mammalian Protein Extraction Reagent®*, Thermo Scientific Pierce, IL, EUA) contendo 10% de inibidor de protease e de inibidor de fosfatase. A concentração de proteínas do lisado foi determinada, em seguida, através do ensaio de Bradford. De acordo com a concentração de proteínas obtida, os

lisados celulares foram diluídos em tampão *Standard Western blotting* (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS a 2%, glicerol 10%, 5% de 2-β mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol) e desnaturados por aquecimento. Em seguida, os lisados celulares foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE, Biorad, CA, EUA) e transferidos para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão de Tris-salino (TTBS: 100 mM Tris-HCl, 137 mM de NaCl e 0,05% de *Tween-20*, pH 7,8) e bloqueadas durante 1 h em leite desnatado 5% diluído em TTBS. Após outra lavagem com TTBS, a membrana foi incubada *overnight* com os anticorpos primários anti-β-actina, Pcyt2, pRb, p-p53, p21, ciclina E2 e CDK4 a 8 °C (diluição 1:1000; Cell Signaling Technology, TX, EUA). A membrana foi novamente lavada com TTBS e, então, incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (diluição 1:1000; Cell Signaling Technology, TX, EUA). A detecção foi realizada com o kit de *Pierce® Western Blotting Substrate Plus* (Thermo Scientific Pierce, IL, EUA).

### 3.6 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular das células tratadas com meclizina (inibidor bem estabelecido da enzima Pcyt2), do DL-2-amino-1-propanol (inibidor do transporte de etanolamina), do SF2 (novo candidato a fármaco), da etanolamina e da cisplatina foram avaliados em células de CPCNP humano A549 e murina LL2/LC1 selvagens (WT) ou na ausência da enzima Pcyt2 (KO) pelo ensaio de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. As células foram semeadas na densidade de  $10^4$  células/poço em placas de 96 poços e, após adesão, tratadas com cada fármaco descrito acima, nas doses de 1 a 400 μM, por 24 h. Em seguida, foram adicionados 10 μL de MTT (Sigma-Aldrich, MO, EUA) a 5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada por 3 h. As placas foram então centrifugadas a 240 x g por 10 minutos, o meio foi removido e os cristais de formazam diluídos em 100 μL de DMSO. Neste experimento, os valores de absorbância do controle, ou seja, expostas somente ao meio RPMI-1640 com o veículo, representam 100% de viabilidade celular. A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo estimado da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) em relação ao controle. A densidade ótica foi

determinada utilizando o leitor de microplacas (VERSAmax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, CA, EUA) em comprimento de onda de 538 nm.

### *3.7 Determinação da inibição enzimática da Pcyt2 e do transporte de etanolamina*

Os tratamentos com o SF2 e a meclizina em células CHOK1 foram validados através da incorporação de etanolamina radioativa e da formação de CDP-etanolamina radioativa. As células foram cultivadas e tratadas por 5 h com cada um dos compostos testados e, em seguida, foi adicionada [<sup>14</sup>C]etanolamina (0.5 µCi/poço) por mais 24 h. Após os tratamentos, as amostras foram lisadas e submetidas a duas diferentes análises. Na primeira condição foi utilizado o isótopo [<sup>14</sup>C] fosfoetanolamina como substrato para a enzima isolada. Ao passo que na segunda condição, para a avaliação da inibição intracelular da enzima, foi utilizado o isótopo [<sup>14</sup>C] etanolamina ao invés da [<sup>14</sup>C] fosfoetanolamina, pelo fato da difícil captação da fosfoetanolamina pelas células, devido a sua alta polaridade. Sendo a fosfoetanolamina um substrato da enzima, o acúmulo deste isótopo, bem como a presença do produto, CDP-etanolamina estará condicionado aos efeitos inibitórios da enzima, detectados por contador de cintilação líquida. Antes da quantificação, as amostras foram eluídas em cromatografia de camada delgada, em sílica G, separando produtos, tais como, CDP-etanolamina, que portará o isótopo [<sup>14</sup>C], o substrato, [<sup>14</sup>C] etanolamina ou [<sup>14</sup>C] fosfoetanolamina.

### *3.8 Determinação da capacidade de formação de colônia*

O ensaio clonogênico é comumente utilizado para monitorar a eficácia de novos compostos antitumorais, permitindo avaliar o efeito de fármacos na proliferação das células que sobreviveram ao tratamento. As células A549 WT e KO foram semeadas em placas de 12 poços, na concentração de 200 células/poço. As células foram mantidas em estufa contendo atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, e após 4 h de incubação, as células foram sincronizadas por 12 h por privação de SFB e, em seguida, tratadas com o SF2, meclizina ou mantidas apenas em privação de fatores de crescimento (meio de cultivo com 1% de SFB) por 12 h. Após o tratamento, o sobrenadante foi removido e as

células mantidas em cultura por 10 dias com meio de cultura suplementado com 10% SFB. Ao final deste tempo de incubação, o meio foi removido cuidadosamente por aspiração, e as placas lavadas três vezes com 1 mL de tampão salino. Em seguida as colônias foram fixadas e coradas com uma solução de glutaraldeído 6% e cristal de violeta 0,5% em água (v/v) durante 30 minutos. Para retirar o excesso de corante, as placas foram lavadas com água e deixadas em temperatura ambiente para total secagem. As colônias contendo mais que 50 células individuais foram contadas em microscópio estereoscópico e adquiridas em câmera digital.

### *3.9 Análise do ciclo celular*

Dado a importância da PE na proliferação celular e citocinese, foram avaliadas a distribuição das células ao longo do ciclo celular após os tratamentos individuais com meclizina, cisplatina ou SF2 em células LL2/LC1 WT e KO nas diferentes fases do ciclo celular. As células foram semeadas em placas de 12 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) e, após adesão, as células foram sincronizadas por 12 h mediante privação de SFB. Em seguida, foram tratadas com SF2, meclizina ou mantidas em privação de fatores de crescimento (meio de cultivo com 1% de SFB) por 12 h. As células foram removidas da placa e lavadas duas vezes com PBS/BSA 0,5% azida 0,02%. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 300 x g, fixadas e permeabilizadas com álcool 70% (v/v) gelado e mantidas durante 16h em freezer. Posteriormente as células foram marcadas com solução de 0,1 mg/mL de 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 0,25 mg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A fluorescência celular foi medida no citômetro de fluxo FACSFortessa (Becton Dickinson, CA, EUA) com o auxílio do *software* FACSDiva, e, para cada amostra, foram adquiridos 20000 eventos. As análises posteriores foram realizadas através do programa FlowJo versão 10 (Tree Star Inc., OR, EUA).

### *3.10 Análise da curva de crescimento das células*

A caracterização do crescimento celular das células A549 e LL2/LC1 WT ou KO foi avaliada por curva de crescimento celular. As células foram semeadas a uma densidade de  $3 \times 10^3$  células/ poço em placas de 12 poços Cada fenótipo

celular foi cultivado em meio de cultura com ou sem suplementação de etanolamina 100  $\mu$ M. As células foram tripsinizadas a cada 24h, por 7 dias, e contadas com solução de azul de Trypan 0,4%.

### 3.11 *Análise morfológica das células tratadas por microscopia eletrônica de transmissão*

As alterações morfológicas das células A549 e LL2/LC1, WT ou KO, foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) foram ressuspensas e mantidas por 24h em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,2). As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e sobre os *pellets* foi adicionada a solução fixadora de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), permanecendo por 24 h a 4 °C. O material foi congelado em acetona anidra, contendo 1% de OsO<sub>4</sub> por 48 h a -90 °C. As amostras foram gradualmente aquecidas a -30 °C para finalização em acetona: resina (1:2) sendo, posteriormente, embebidas em resina de epóxido. Secções ultrafinas de 60 nm foram feitas e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram adquiridas no microscópio eletrônico de transmissão TECNAI G2 20 TWIN (TEM FEI Company, OR, EUA) com o auxílio dos *softwares* FEI: Tecnai pertencentes ao Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### 3.12 *Análise da apoptose através do ensaio de anexina V/7AAD*

Dentre as metodologias utilizadas para avaliar indução de apoptose pelos tratamentos está o uso do kit “Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V AlexaFluor® 488 & Propidium Iodide” (Molecular Probes®, Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido). Esse protocolo permite a avaliação da população apoptótica de uma amostra, uma vez que nesta há a exposição de fosfatidilserina, que se liga à anexina V marcada com Alexafluor488, um dos marcos iniciais da apoptose. Porém, o iodeto de propídeo(PI) do kit foi substituído pelo 7-aminoactinomicina D (7AAD), um composto fluorescente com características parecidas com o PI. A incorporação 7AAD ao DNA indica estágios mais tardios da apoptose ou outros tipos de morte celular. As células A549 e

LL2/LC1 foram semeadas ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) e tratadas com a meclizina, o DL-2-amino-1-propanol, o SF2, a etanolamina ou a cisplatina por 6, 12 ou 24 h. O tratamento com peróxido de hidrogênio 1mM, por 30 minutos, foi utilizado como controle positivo experimental de dupla marcação (anexina V e 7AAD). Após lavagem com o tampão de ligação 1 x do kit, as células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C na presença de anexina V-Alexafluor488 (diluição de 1:50). As células foram novamente lavadas com tampão de ligação 1 x e incubadas a 37 °C com 20 µg de 7AAD ressuspensas em 300 µL deste e analisadas por citômetro de fluxo FACSFortessa (Becton Dickinson, CA, EUA) com o auxílio do *software* FACSDiva. Foram adquiridos 20000 eventos para cada amostra. As análises posteriores foram realizadas através do programa FlowJo versão 10 (Tree Star Inc., OR, EUA).

### 3.13 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

A fim de melhor compreender os mecanismos de morte celular e os danos mitocondriais relacionados à inibição da Pcyt2, foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) utilizando a sonda éster etílico tetrametilrodamina (TMRE). Desta forma, as células A549 e LL2/LC1 ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) foram tratadas por 3, 6, 12 e 24 h com meclizina, DL-2-amino-1-propanol, SF2, etanolamina ou cisplatina. O carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) é um potente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, e foi utilizado como controle positivo de despolarização mitocondrial na concentração de 100 µM por 10 minutos. Após o tratamento, as células foram coletadas, lavadas com PBS/BSA 0,5% azida 0,02% e incubadas por 15 minutos a 37 °C com TMRE (Molecular Probes, OR, EUA) 50 nM. As células foram lavadas novamente, ressuspensas em 300 µL da solução de PBS/BSA e analisadas no citômetro de fluxo FACSFortessa (Becton Dickinson, CA, EUA) com o auxílio do *software* FACSDiva. Foram adquiridos 20000 eventos para cada amostra. As análises posteriores foram realizadas através do programa FlowJo versão 10 (Tree Star Inc., OR, EUA).



### 3.14 Animais de experimentação

Os camundongos Balb/c *nu/nu*, fêmeas, de 5 semanas foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e mantidos sob condições livres de patógenos específicos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP do Departamento de Imunologia. Todos os procedimentos foram conduzidos em acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética e pesquisa em animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (projeto aprovado sob o número 90/2016). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos com água e ração *ad libidum*. Os animais foram analisados e pesados três vezes por semana durante todo o período experimental. Durante todo o período experimental o volume tumoral dos animais foi calculado, três vezes por semana, a partir da seguinte fórmula:  $\{[\text{comprimento longitudinal (cabeça-cauda)}] \times [\text{comprimento transversal (pata-pata)}]^2\}/2$ . Vale ressaltar que animais que apresentaram durante o período experimental qualquer efeito adverso ou tumores com dimensões a partir de  $2 \text{ cm}^3$  foram eutanasiados através da administração por via intraperitoneal de sobredosagem de cetamina 240 mg/kg associada à xilazina 24 mg/kg. Após a eutanásia dos animais, foram retirados sangue por punção cardíaca bem como os tumores formados e órgãos relevantes como fígado, pulmões e coração.

### 3.15 Avaliação da tumorigenicidade *in vivo* das células KO

Após estabelecer as linhagens A549 e LL2/LC1 KO, determinamos se a ausência expressão da enzima Pcyt2 altera a tumorigenicidade dessas linhagens. Foram inoculadas, via subcutânea no flanco direito dos camundongos,  $5 \times 10^5$  células WT ou KO por animal em 100 $\mu$ L de RPMI 1640. Os animais foram acompanhados por um período máximo de 30 dias e eutanasiados conforme o descrito no item 3.14.

### 3.16 Avaliação dos efeitos antitumorais *in vivo*

Após inocular as células LL2/LC1 KO ou WT via subcutânea no flanco direito dos camundongos ( $5 \times 10^5$  células por animal em 100 $\mu$ L de RPMI 1640), os animais foram avaliados quanto a presença de tumores palpáveis. Eles foram randomizados e divididos em grupos de 6 animais e foram tratados com quatro

doses, a cada dois dias, com e veículo (PBS), cisplatina (4mg/kg), SF2 (4mg/kg), meclizina (20mg/kg), DL-2-aminopropanol (4mg/kg) e a combinação de cisplatina (0,5mg/kg) com meclizina (20mg/kg). Os animais foram acompanhados por um período máximo de 30 dias e eutanasiados conforme o descrito no item 3.14. O sangue dos animais eutanasiados foi avaliado com o auxílio de um analisador hematológico automático BC-2800Vet da Mindray (SZ, China).

### 3.17 *Análise estatística dos resultados*

As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de Bonferroni usando o *software Graph Prism* versão 7. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata, considerando-se como valores significantes  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) e  $p < 0.001$  (\*\*).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da inibição da enzima Pcyt2

Inicialmente, em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marica Bakovic da Universidade de Guelph no Canadá, foi avaliado um novo composto de interesse do grupo, o SF2, quanto a sua capacidade de inibir tanto a enzima Pcyt2 quanto o transporte de etanolamina. Esta análise do novo composto foi feita comparando-o ao grupo onde havia apenas inibição da Pcyt2 pela meclizina. Primeiramente, *in vitro*, a enzima Pcyt2 isolada foi incubada com o SF2 ou meclizina, ambos na concentração de 50  $\mu$ M, em meio com [<sup>14</sup>C] fosfoetanolamina. Foi avaliado o decaimento de [<sup>14</sup>C]CDP-etanolamina com o auxílio de um contador de cintilação líquida. Conforme descrito na Tabela 1, o SF2 foi tão eficaz quanto a meclizina em reduzir a produção de [<sup>14</sup>C]CDP-etanolamina (redução de mais de 60% do composto marcado). Em seguida, avaliamos essa atividade inibitória e o transporte de etanolamina através do tratamento das células CHO-K1 mantidas em meio [<sup>14</sup>C]etanolamina na presença de SF2 ou meclizina, ambos na concentração de 25  $\mu$ M. Após a lise das células, foram quantificados a [<sup>14</sup>C]etanolamina e a [<sup>14</sup>C]CDP-etanolamina por contador de cintilação líquida (Tabela 2). Também neste ensaio, o SF2 e a meclizina se comportaram de forma semelhante, reduzindo a captação da etanolamina (redução mais de 60%) e a produção de CDP-etanolamina (redução mais de 20%) (Tabela 2).

**Tabela 1 – Avaliação da atividade da enzima Pcyt2 isolada através da detecção do decaimento do [<sup>14</sup>C] da CDP-etanolamina produzida.**

	Porcentagem média de [ <sup>14</sup> C] CDP-etanolamina $\pm$ DP
<b>Controle</b>	100,00 $\pm$ 6,23
<b>Meclizina 50 <math>\mu</math>M</b>	37,00 $\pm$ 4,92***
<b>SF2 50 <math>\mu</math>M</b>	35,30 $\pm$ 5,33**

DP = desvio padrão

\*\*\* p<0.001 vs. controle

\*\* p<0.01 vs. controle

**Tabela 2 – Avaliação da atividade da enzima Pcyt2 em modelo de células CHO-K1 através da detecção do decaimento da [<sup>14</sup>C]etanolamina incorporada e da [<sup>14</sup>C]CDP-etanolamina produzida.**

	DPM/μg de proteína x 1000 (média ± DP)	
	[ <sup>14</sup> C]Etanolamina	[ <sup>14</sup> C]CDP-etanolamina
<b>Controle</b>	29,59 ± 1,77	11,62 ± 0,43
<b>Meclizina 25 μM</b>	6,30 ± 0,45**	5,10 ± 0,21**
<b>SF2 25 μM</b>	9,19 ± 0,58*	8,34 ± 0,45*

DPM = decaimento por minuto

DP = desvio padrão

\*\* p<0.01 vs. controle

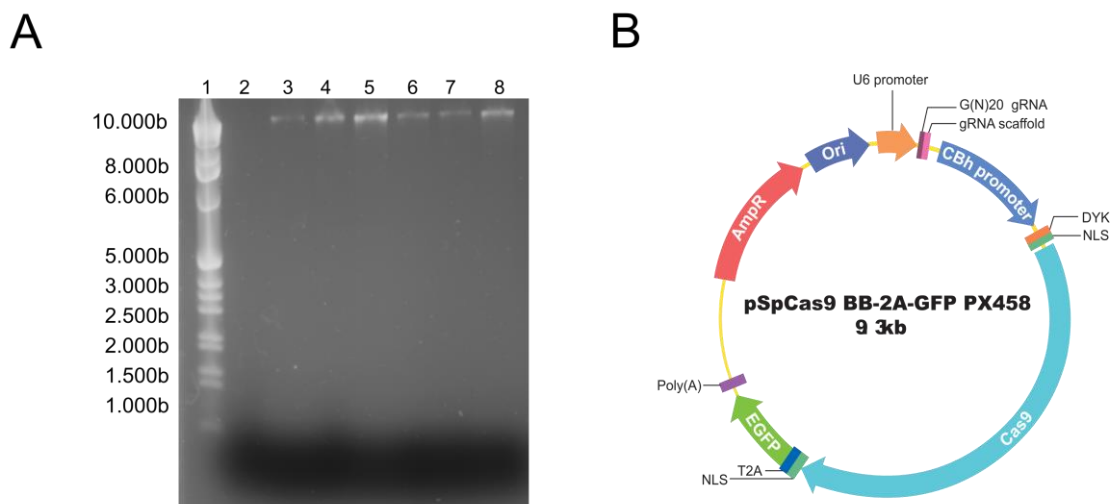
\*p<0.05 vs. controle

O projeto inicial tinha por objetivo validar o composto já testado pelo grupo, CHY-1, e os seus alvos, o transporte de etanolamina e a enzima Pcyt2, porém, a síntese deste composto não é trivial e permanece como um entrave em estudo para o grupo. Neste contexto, foram avaliados os intermediários do processo de síntese de CHY-1, dentre eles, o SF2, que atua nos mesmos alvos de CHY-1 e, por conseguinte, foi utilizado nos experimentos de validação dos alvos em substituição do CHY-1 enquanto o processo de síntese deste é aperfeiçoado.

#### 4.2 Caracterização, ampliação, extração e purificação dos plasmídeos pSpCas9

A qualidade dos plasmídeos pSpCas9 foram avaliadas em gel de agarose 1% corado com *Gel Red* e avaliada em transiluminador (Figura 4A). Apesar de algumas bandas mais fracas, todos os plasmídeos apresentaram-se íntegros com bandas de tamanho próximo ao esperado, ou seja, 9 kb. Todos os plasmídeos são do tipo pSpCas9 BB-2A-GFP PX458 (Figura 4B), ou seja, apresentam: a região promotora U6 que garante a expressão do RNA guia; uma sequência de 20 nucleotídeos não-codificantes de RNA; uma sequência específica de 20 nucleotídeos do seu alvo (sequência RNA guia); a sequência promotora do híbrido da β-actina de galinha (CBh) que induz a expressão da enzima Cas9; a sequência codificante da enzima Cas9 com sinal para

localização nuclear; o sinal T2A que permite a expressão igualitária das proteínas Cas9 e GFP; a sequência codificante da GFP com sinal para localização nuclear; uma sequência de poliadenilação determinando o fim da transcrição e aumentando a meia-vida do RNA para eucariotos; o gene da resistência à ampicilina para a seleção das bactérias transformadas.



**Figura 4 - Caracterização dos plasmídeos utilizados no estudo.** (A) O gel de agarose 1% corado com *Gel Red* da corrida eletroforética dos plasmídeos ressuspensos em água ultrapura MilliQ, confirmando a integridade dos plasmídeos adquiridos com cerca de 9 kb cada. As *lanes* 3, 4 e 5 são, respectivamente, dos pSpCas9 das sequências humanas 1, 2 e 3 e as *lanes* 6, 7 e 8, são, respectivamente, dos pSpCas9 das sequências murinas 1, 2 e 3. A *lane* 1 apresenta o *ladder* e a *lane* 2 é apenas a água utilizada na diluição dos plasmídeos. (B) O mapa do plasmídeo pSpCas9 BB-2A-GFP PX458 que foi utilizado para a produção das células *KO* para a enzima *Pcyt2*. Este plasmídeo codifica a nuclease Cas9 da *S. pyogenes* com o RNA guia para a deleção da *Pcyt2* bem como a produção de GFP pelas células transfectadas, como gene repórter. Fonte: *Datasheet* do fabricante (GenScript).

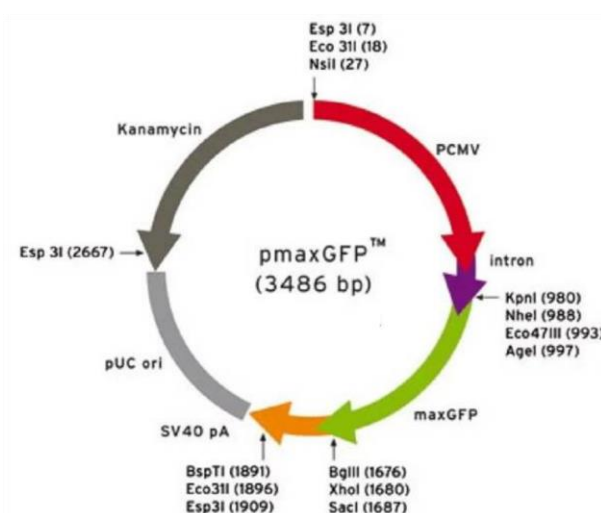
Após a confirmação da integridade dos plasmídeos adquiridos, a fim de obter maiores quantidades dos plasmídeos para os próximos ensaios, as bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  e TOP10 foram cultivadas. Após estabelecer a cultura das bactérias, estas foram preparadas para a transformação, transformadas com os plasmídeos adquiridos, ampliadas, selecionadas com meio LB-ágar com ampicilina e lisadas. Após a lise das bactérias, os plasmídeos foram extraídos, purificados e quantificados através de um espectrofotômetro de microvolume (Tabela 3). Todos os plasmídeos foram ampliados com sucesso e apresentaram uma média de 254,43 ng/ $\mu$ L de plasmídeo.

**Tabela 3 - Quantificação em ng/μL dos plasmídeos extraídos e purificados das bactérias.**

Espécie	Plasmídeo	ng/μL
Humana	1	380,70
	2	209,20
	3	138,10
Murina	1	231,50
	2	474,10
	3	93,00

#### 4.3 Padronização das transfecções e seleção de células GFP<sup>+</sup> com o plasmídeo vetor controle GFP

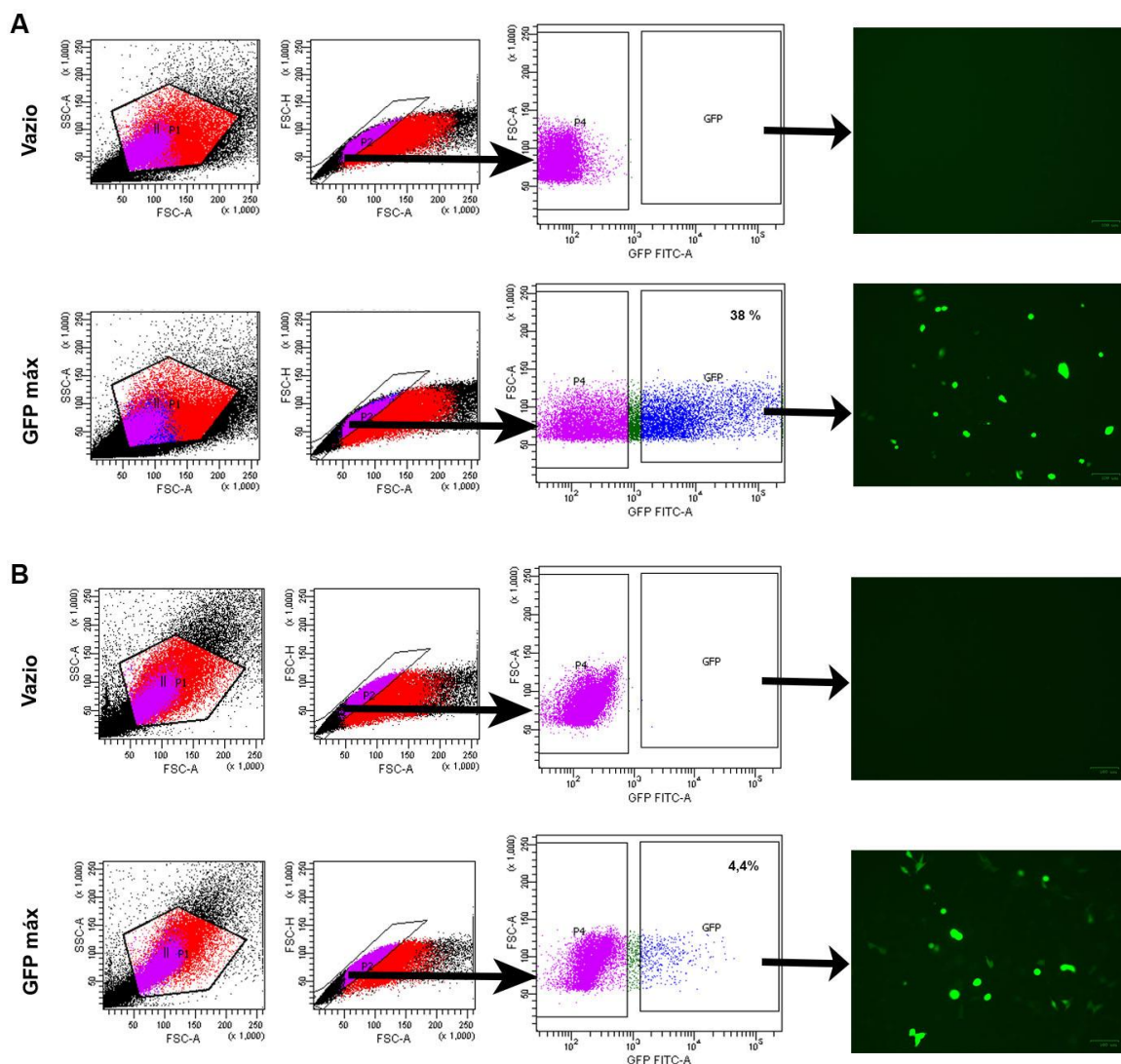
As condições dos ensaios de transfecção foram padronizadas para as linhagens celulares utilizando o plasmídeo vetor controle GFP pmaxGFP (Figura 5) que codifica a proteína verde fluorescente do copépodo *Pontellina p.* e, permite uma fácil análise da eficiência da transfecção, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência.



**Figura 5 - Mapa do plasmídeo vetor controle GFP.** O plasmídeo pmaxGFP foi utilizado na padronização da transfecção e como controle positivo da eficiência da transfecção em todos os experimentos. Este plasmídeo apresenta 3486 bp, seu

promotor é o CMV e pode ser selecionado pelo uso de canamicina. Fonte: *Datasheet* do fabricante (Lonza).

Foram testados diferentes protocolos de transfecção com o complexo lipofectamina 3000 ou através de nucleofecção seguido de separação das células GFP positivas por citometria de fluxo. Dentre todos os protocolos testados, o que obteve melhores resultados utilizou 500 ng do plasmídeo pGFPmáx por 48 h com adição de meio após 6h do início da transfecção por nucleofecção. As células foram selecionadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e dentro deste *gate*, foram selecionados apenas o *singlets* através da relação altura-área do tamanho das células. Finalmente, as populações GFP positivas e negativas foram selecionadas dentro da população de *singlets*, em comparação à célula exposta ao vetor vazio. A média da porcentagem da população de células GFP positivas para as linhagens A549 e LL2/LC1 foram, respectivamente, 38 % e 4,4 %. Após a coleta da população GFP positiva, estas células foram semeadas e observadas, após 24h, em microscópio de fluorescência sob a luz UV (Figura 6). Apesar de uma queda já esperada na viabilidade celular pós-separação, as células separadas apresentaram de fato a fluorescência e pureza esperada.



**Figura 6 - Separação da população GFP positiva transfectada com o plasmídeo pGFPmáx.** As células A549 (A) e LL2/LC1 (B) foram semeadas em meio sem soro e nucleofectadas e com 500 ng do plasmídeo pGFPmáx com adição de meio após 6h do início da transfecção. Os *dot plots* são representativos de três experimentos independentes, em que foram separadas as células GFP positivas (FL1-H) dentro dos *singlets* da população com tamanho e granulosidade adequada. Após a separação das células, as células GFP positivas foram semeadas e observadas após 24 h sob luz UV em um microscópio de fluorescência.

#### 4.4 Transfecção com os plasmídeos pSpCas9

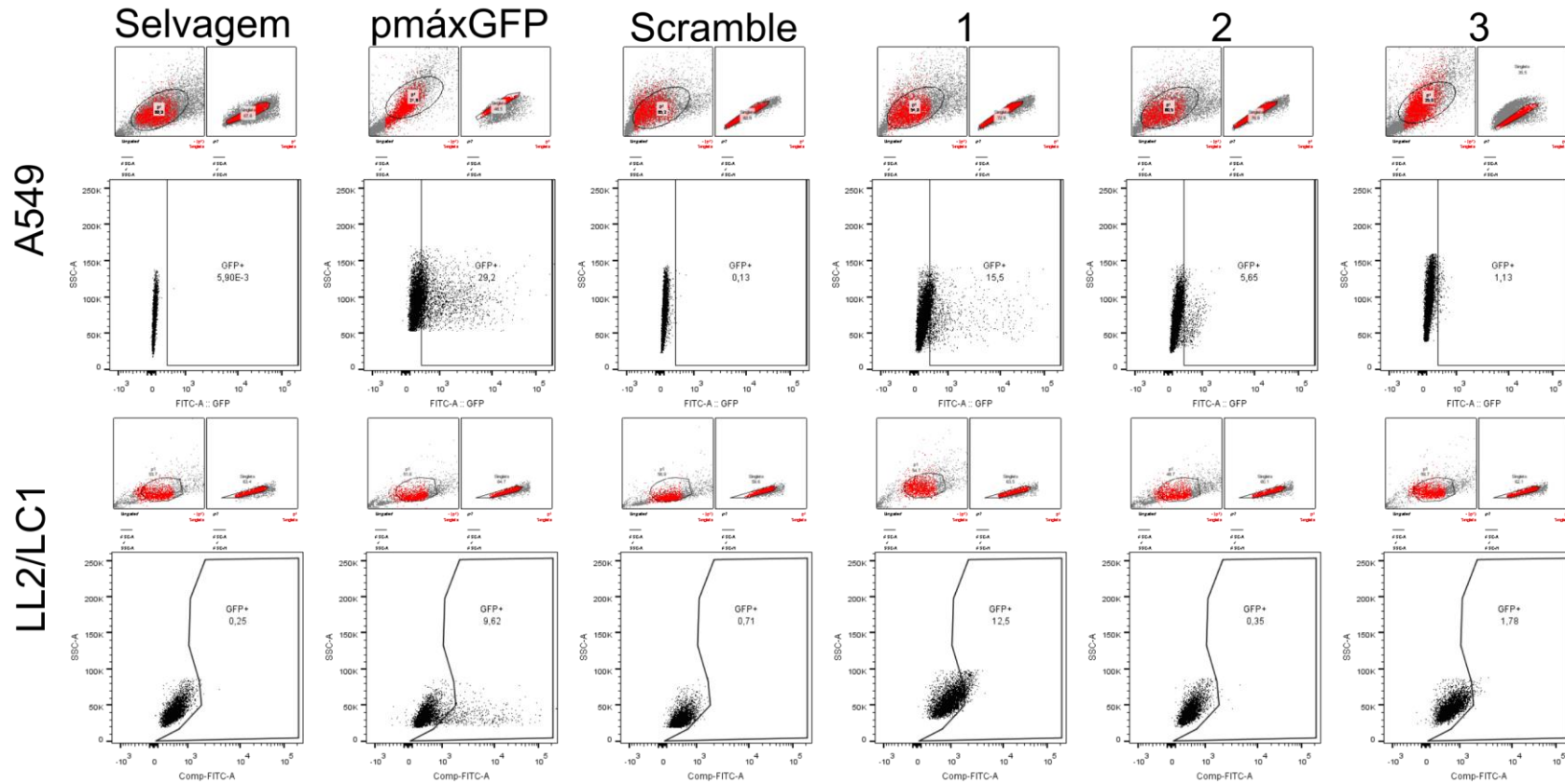
Após a determinação das melhores condições de transfecção e seleção das células, foram iniciados os testes para a padronização do uso dos plasmídeos de interesse pSpCas9, utilizando exatamente as mesmas condições otimizadas com o plasmídeo pGFPmáx, ou seja, nucleofecção com 500ng de plasmídeo e adição de 1 mL de meio completo após 6 h do início da transfecção. Os resultados tanto para a linhagem A549 quanto para a LL2/LC1 mostraram



uma eficiência de transfecção menor, quando comparada à transfecção com o gene repórter GFP. A média de células positivas foi de 2,8 % para o plasmídeo com a sequência 1 humana utilizando a célula A549 e, 1,8 % para o plasmídeo com a sequência 1 murina para a célula LL2/LC1. Apesar da baixa eficiência de transfecção, as células nucleofectadas com os plasmídeos pSpCas9 foram ampliadas e separadas por citometria de fluxo (Figura 7). Desta forma, foram selecionadas 907, 52 e 485 células A549 GFP positivas após a transfecção com os plasmídeos pSpCas9 com as sequências humanas 1, 2 e 3, respectivamente. Das células da linhagem celular LL2/LC1, por sua vez, foram selecionadas 278, 41 e 22 células GFP positivas após a transfecção com os plasmídeos pSpCas9 com as sequências murinas 1, 2 e 3, respectivamente. A partir deste experimento, além do controle plasmídeo pmáxGFP (GFP), foi adicionado outro grupo controle de transfecção utilizando o plasmídeo controle pSpCas9 cuja sequência não é capaz de nocautear a enzima Pcyt2 (*scramble*, SCR).

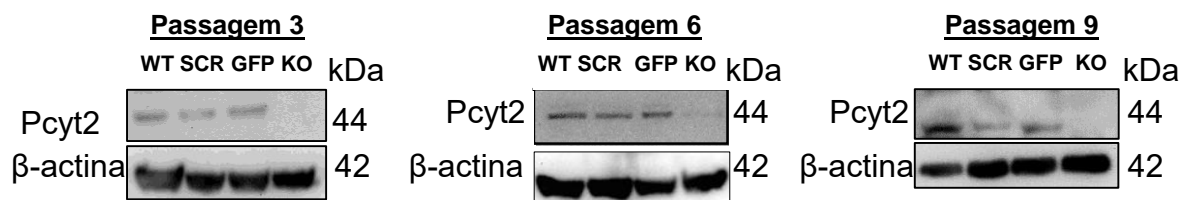
Vale ressaltar que a quantidade de células positivas sorteadas foi um entrave, dado que em condições ideais, como no ensaio de padronização com o plasmídeo vetor controle GFP máx na Figura 6, eram sorteadas entre 1000 a 3000 células. Desta forma foi necessário ampliar as culturas antes de avaliar a expressão da enzima Pcyt2 nestas células e, assim, confirmar a eliminação da sua expressão (KO) nessas células por *Western blotting*.

## pSpCas9

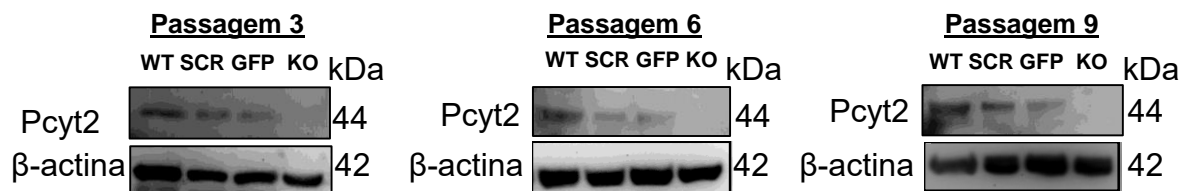


**Figura 7 - Separação da população GFP positiva transfectada com os plasmídeos pGFPmáx, pSpCas9 e o *scramble*.** As células A549 e LL2/LC1 nucleotransfectadas foram removidas das placas de cultura, contadas, submetidas ao *cell stainer* de 70  $\mu$ M e sorteadas no FACSaria II. Os *dot plots* são representativos de dois experimentos independentes, em que foram separadas as células GFP positivas (FL1-H) dentro dos *singlets* da população com tamanho e granulosidade adequada.

Durante a ampliação das células GFP positivas nucleofectadas com os plasmídeos pSpCas9, foi possível observar em poucas passagens a perda da expressão de GFP, o que impossibilitou a realização de *sortings* posteriores de purificação. Conforme o observado nas Figuras 8 e 9, as células selecionadas não apresentam a expressão da enzima Pcyt2 e, ao longo das passagens, mantiveram este fenótipo. Após estes resultados, foi preparado um estoque e estas células foram criopreservadas e utilizadas posteriormente. Uma vez que a análise da expressão da Pcyt2 foi feita apenas até a 9ª passagem, foram utilizadas as alíquotas das linhagens no máximo até esta passagem durante todos os seguintes experimentos seguintes.



**Figura 8 - Expressão da enzima Pcyt2 nas células A549 nucleofectadas.** As imagens são representativas das membranas de *Western blotting* das células A549 selvagem (WT), *scramble* (SCR), controle positivo com o pmáxGFP e com a sequência 1 humana do pSpCas9 para KO da enzima Pcyt2 (KO). A β-actina foi utilizada como proteínas normalizadora.



**Figura 9 - Expressão da enzima Pcyt2 nas células LL2/LC1 nucleofectadas.** As imagens são representativas das membranas de *Western blotting* das células LL2/LC1 selvagem (WT), *scramble* (SCR), controle positivo com o pmáxGFP e com a sequência 1 murina do pSpCas9 para o KO da enzima Pcyt2 (KO). A β-actina foi utilizada como proteínas normalizadora.

#### 4.5 Avaliação dos efeitos citotóxicos da inibição da Pcyt2 e do transporte de etanolamina

Após a confirmação da obtenção de ambas as linhagens A549 e LL2/LC1 com ausência da expressão da Pcyt2, iniciaram-se os estudos para a validação da importância da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina no modelo de CPCNP. Primeiramente, foram realizados ensaios de citotoxicidade após 24h de

tratamento com meclizina, DL-1-amino-2-propanol, SF2, etanolamina e cisplatina, nas faixas de concentração de 1 a 400  $\mu\text{M}$  com as linhagens celulares de fibroblasto humanos (MRC-5, controle) e as de CPCNP humana (A549, WT, GFP, SCR ou KO) e murina (LL2/LC1, WT, GFP, SCR ou KO) (Tabela 4-6). Cabe ressaltar que a cisplatina será utilizada em alguns experimentos como controle de morte celular.

**Tabela 4 – Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos em teste ( $\mu\text{M}$ ) nos diferentes fenótipos de A549.**

	Valor do IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ DP			
	WT	GFP	SCR	KO
<b>Cisplatina</b>	54,29 $\pm$ 2,56	45,42 $\pm$ 8,21	43,75 $\pm$ 5,87	57,06 $\pm$ 4,38
<b>DL-1-amino-2-propanol</b>	17,49 $\pm$ 1,34	13,24 $\pm$ 1,39	12,20 $\pm$ 1,03	10,70 $\pm$ 1,60
<b>Meclizina</b>	235,06 $\pm$ 10,39	245,17 $\pm$ 3,25	262,43 $\pm$ 11,08	$\geq$ 400 ***
<b>SF2</b>	51,85 $\pm$ 5,76	63,67 $\pm$ 3,51	67,62 $\pm$ 3,12	66,45 $\pm$ 8,53
<b>Etanolamina</b>	>400	>400	>400	>400

Os valores representam as médias desvio padrão de 3 repetições

WT= células com Pcyt2 selvagem

GFP= células transfectadas com pmáxGFP

SCR= células transfectadas com o plasmídeo *scramble*

KO = células *knockout* para Pcyt2

IC<sub>50</sub>= concentração responsável pela inibição de 50% da viabilidade células em relação ao controle

DP= Desvio padrão

**Tabela 5 – Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos em teste (µM) nos diferentes fenótipos de LL2/LC1.**

	Valor do IC <sub>50</sub> (µM) ± DP			
	WT	GFP	SCR	KO
<b>Cisplatina</b>	3,59 ± 1,06	3,42 ± 2,16	3,80 ± 0,93	1,22 ± 0,58
<b>DL-1-amino-2-propanol</b>	15,71 ± 1,78	16,75 ± 0,21	18,90 ± 3,59	16,86 ± 2,94
<b>Meclizina</b>	44,92 ± 10,09	46,43 ± 9,31	43,76 ± 4,20	225,1 ± 10,59***
<b>SF2</b>	50,40 ± 0,78	59,59 ± 3,70	53,31 ± 2,71	71,90 ± 4,02
<b>Etanolamina</b>	>400	>400	>400	>400

Os valores representam as médias desvio padrão de 3 repetições

WT= células com Pcyt2 selvagem

GFP= células transfectadas com pmáxGFP

SCR= células transfectadas com o plasmídeo *scramble*

KO = células *knockout* para Pcyt2

IC<sub>50</sub>= concentração responsável pela inibição de 50% da viabilidade células em relação ao controle

DP= Desvio padrão

**Tabela 6- Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos em teste (µM) nos diferentes fenótipos de MRC-5.**

	Valor do IC <sub>50</sub> (µM) ± DP
<b>Cisplatina</b>	176,56 ± 15,90 ***
<b>DL-1-amino-2-propanol</b>	13,88 ± 7,28
<b>Meclizina</b>	145,48 ± 22,29
<b>SF2</b>	105,17 ± 12,69 ***
<b>Etanolamina</b>	>400

Os valores representam as médias desvio padrão de 3 repetições.

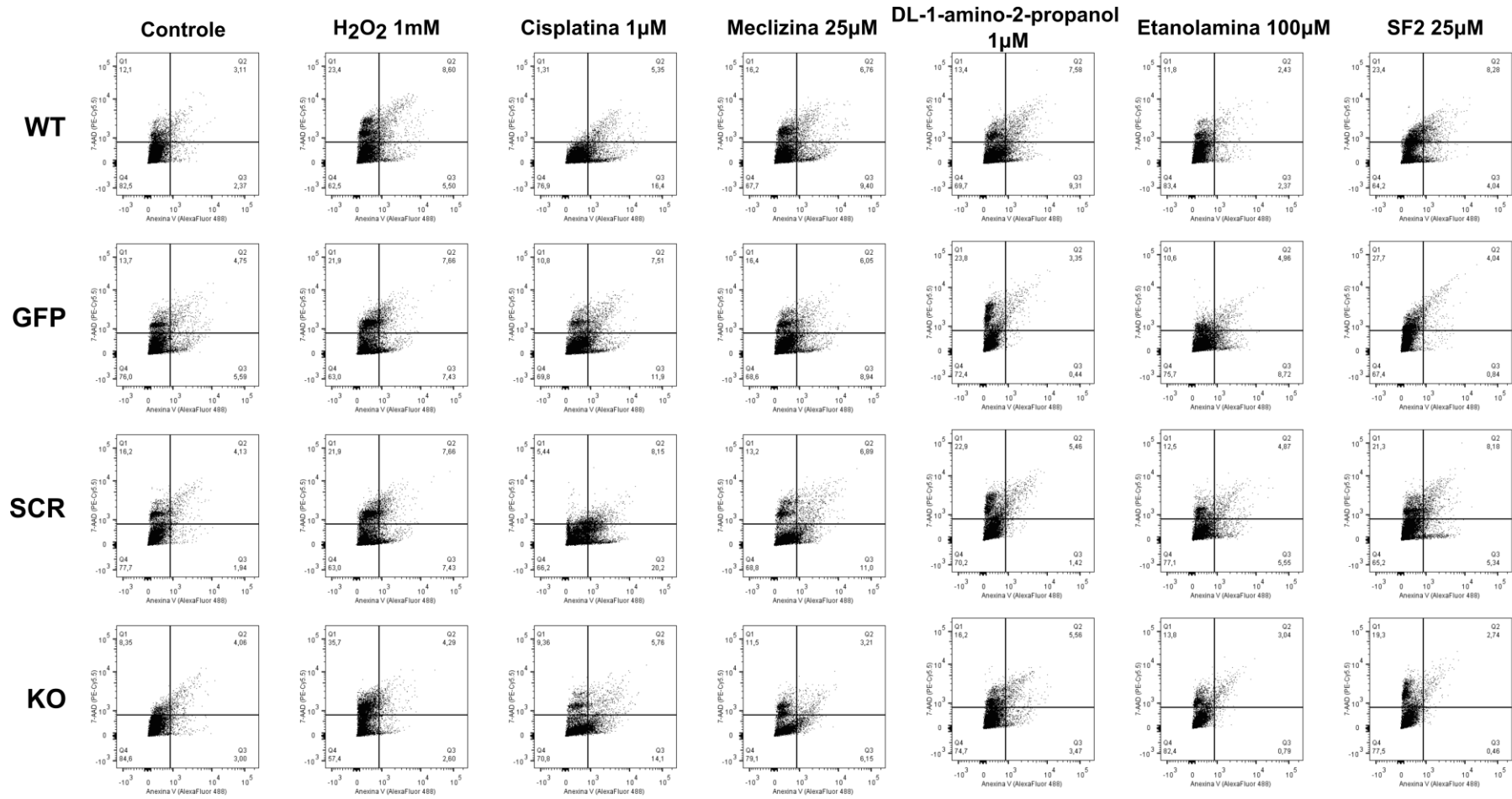
IC<sub>50</sub>= concentração responsável pela inibição de 50% da viabilidade células em relação ao controle.

DP= Desvio padrão

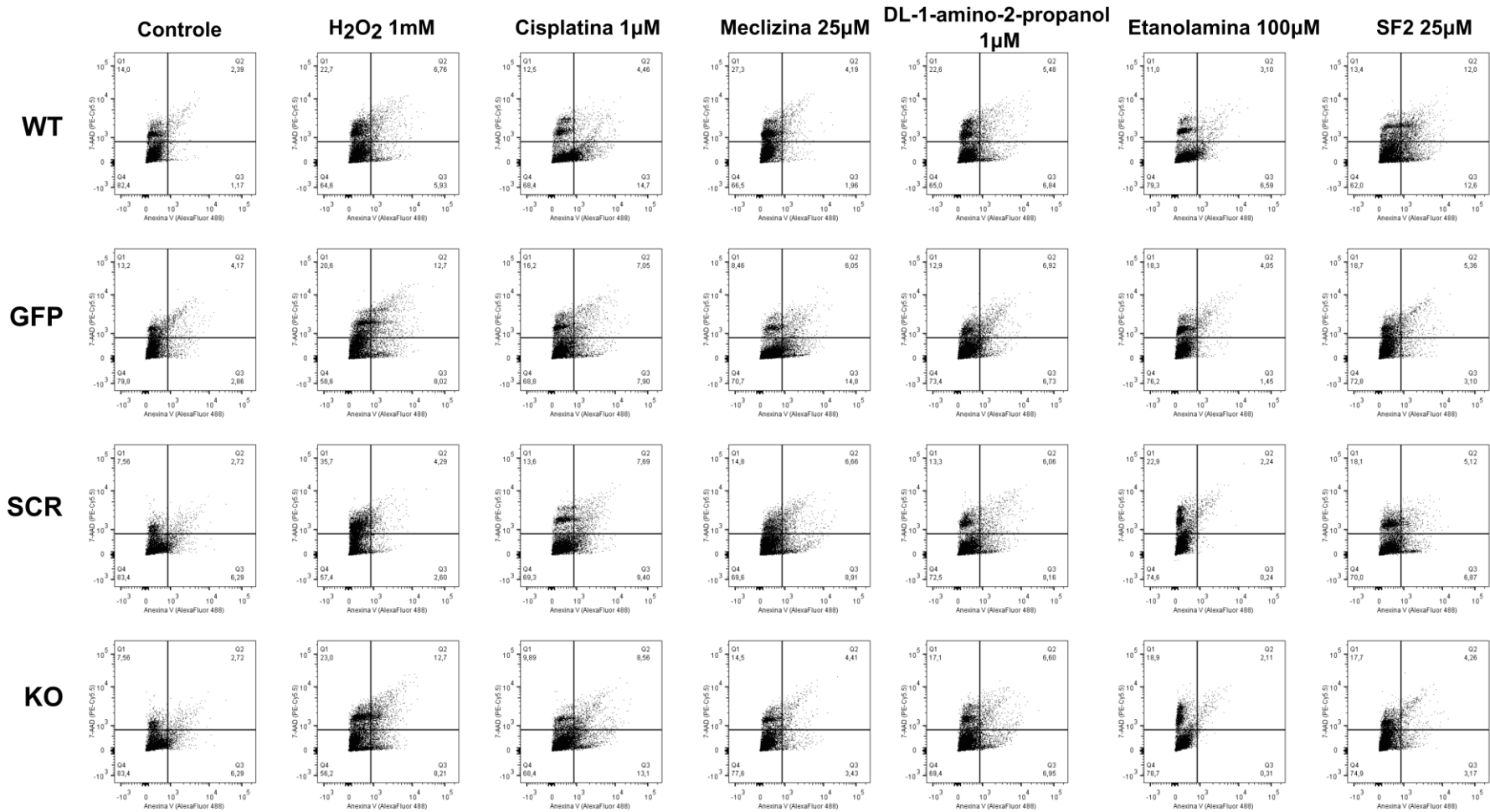
Os resultados das Tabelas 4 e 5 mostram que exceto pela meclizina e etanolamina, todos os outros compostos testados apresentaram toxicidade semelhante entre as células WT GFP, SCR ou KO. A etanolamina não apresentou toxicidade alguma, em nenhuma das linhagens testadas. A meclizina, como esperado, devido a Pcyt2 ser seu alvo farmacológico, apresentou atividade citotóxica muito reduzida em células KO. Esse efeito foi mais evidente nas células humanas A549, sugerindo que em células murinas LL2/LC1 possa existir alguma isoforma ou enzima semelhante à Pcyt2, que seja alvo da meclizina. O que não ocorre em células humanas A549. Apenas em células murinas LL2/LC1 KO o SF2 apresentou uma toxicidade reduzida, sugerindo um possível mecanismo de ação envolvendo a Pcyt2.

A linhagem de fibroblasto pulmonar humana MRC-5 se mostrou mais resistente a cisplatina, meclizina e SF2 que ao DL-1-amino-2-propanol (Tabela 6). A maior segurança observada com o uso da cisplatina e meclizina, corroboram o fato dessas moléculas serem fármacos já em uso clínico. O DL-1-amino-2-propanol apresenta potencial bastante tóxico, considerando que foi o mais citotóxico para todas as linhagens celulares investigadas aqui; estes dados sugerem que eventuais testes clínicos com esse fármaco devem ser acompanhados de maiores cuidados.

No intuito de avaliar os mecanismos de ação relacionados à citotoxicidade, foram avaliados a função mitocondrial e a morte celular. As células A549 e LL2/C1 (WT GFP, SCR ou KO) tratadas com cisplatina, DL-1-amino-2-propanol, meclizina, SF2 ou etanolamina, foram analisadas quanto a capacidade de externalização de fosfatidilserina e alteração da permeabilidade da membrana plasmática das células, através do ensaio de anexina V/7AAD (Figuras 10-14).

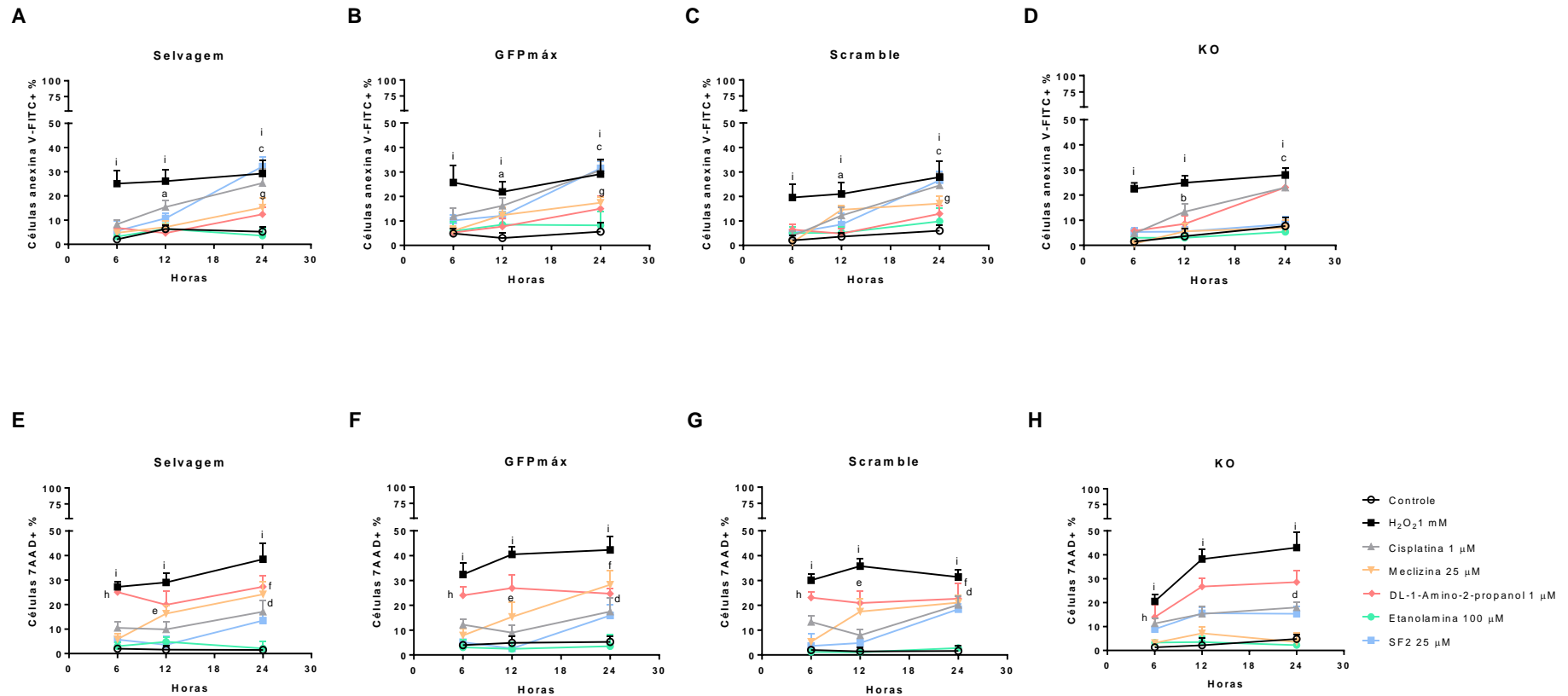


**Figura 10 - Gráficos dot plot representativos dos efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células A549. Nos eixos “y” estão representados, respectivamente, o marcador de permeabilidade de membrana (o 7-AAD, avaliado no canal PE-Cy5.5) e o de externalização de fosfatidilserina (a anexina V marcada com Alexafluor 488). Os gráficos são representativos de três experimentos independentes no tempo de 24h.**

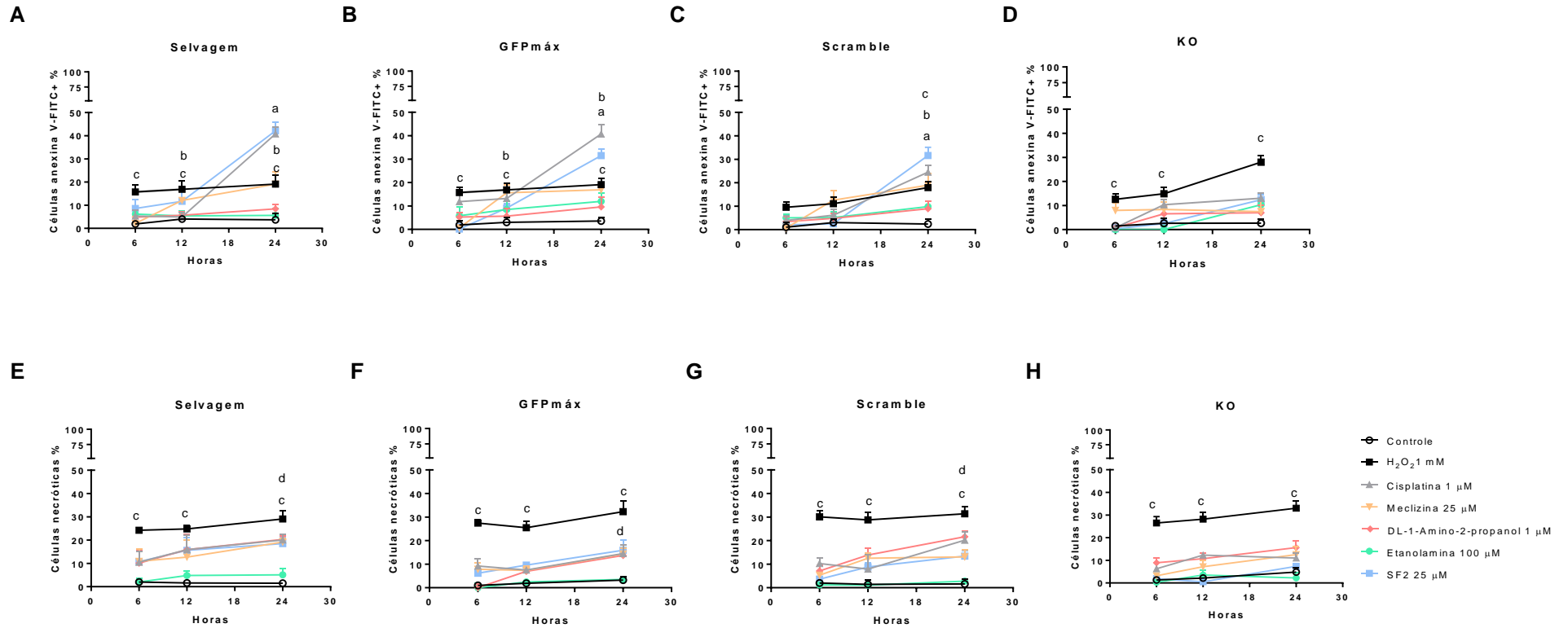


**Figura 11 - Gráficos dot plot representativos dos efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células LL2/LC1.** Nos eixos “y” estão representados, respectivamente, o marcador de permeabilidade de membrana (o 7-AAD, avaliado no canal PE-Cy5.5) e o de externalização de fosfatidilserina (a anexina V marcada com Alexafluor 488). Os gráficos são representativos de três experimentos independentes no tempo de 24h.

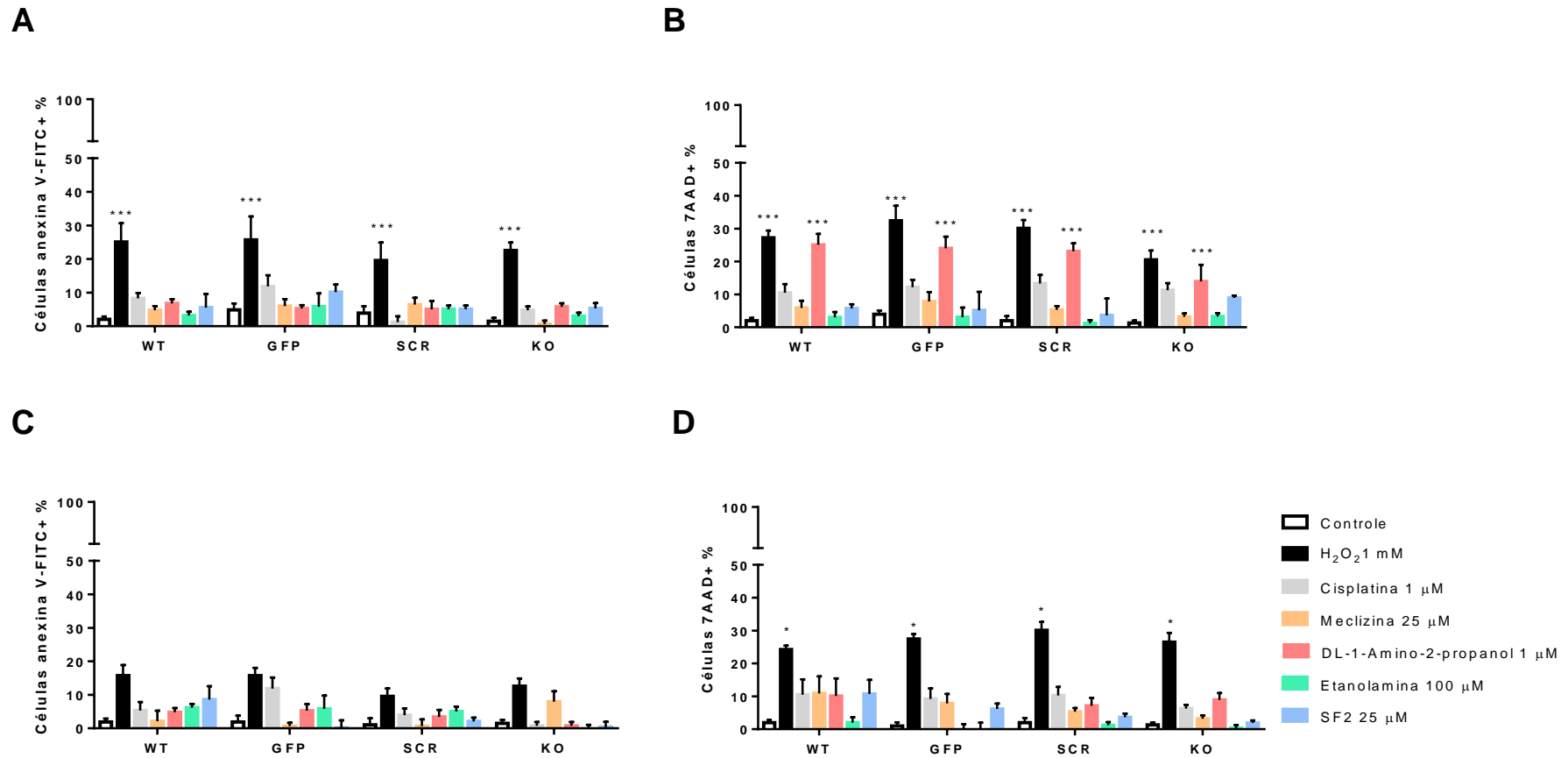




**Figura 12 – Os efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células A549.** Os diferentes fenótipos das células A549 são indicados em cada painel como selvagem, GFPmax, SCR ou KO. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. a =  $p < 0,01$  cisplatina vs. controle, b =  $p < 0,001$  cisplatina vs. controle, c =  $p < 0,05$  cisplatina 12 h vs cisplatina 24 h, d =  $p < 0,05$  cisplatina vs controle, e =  $p < 0,05$  meclizina vs controle, f =  $p < 0,001$  meclizina 12 h vs meclizina 24 h, g =  $p < 0,01$  meclizina vs controle, h =  $p < 0,001$  DL-1-amino-2-propanol vs controle e i =  $p < 0,001$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs controle.



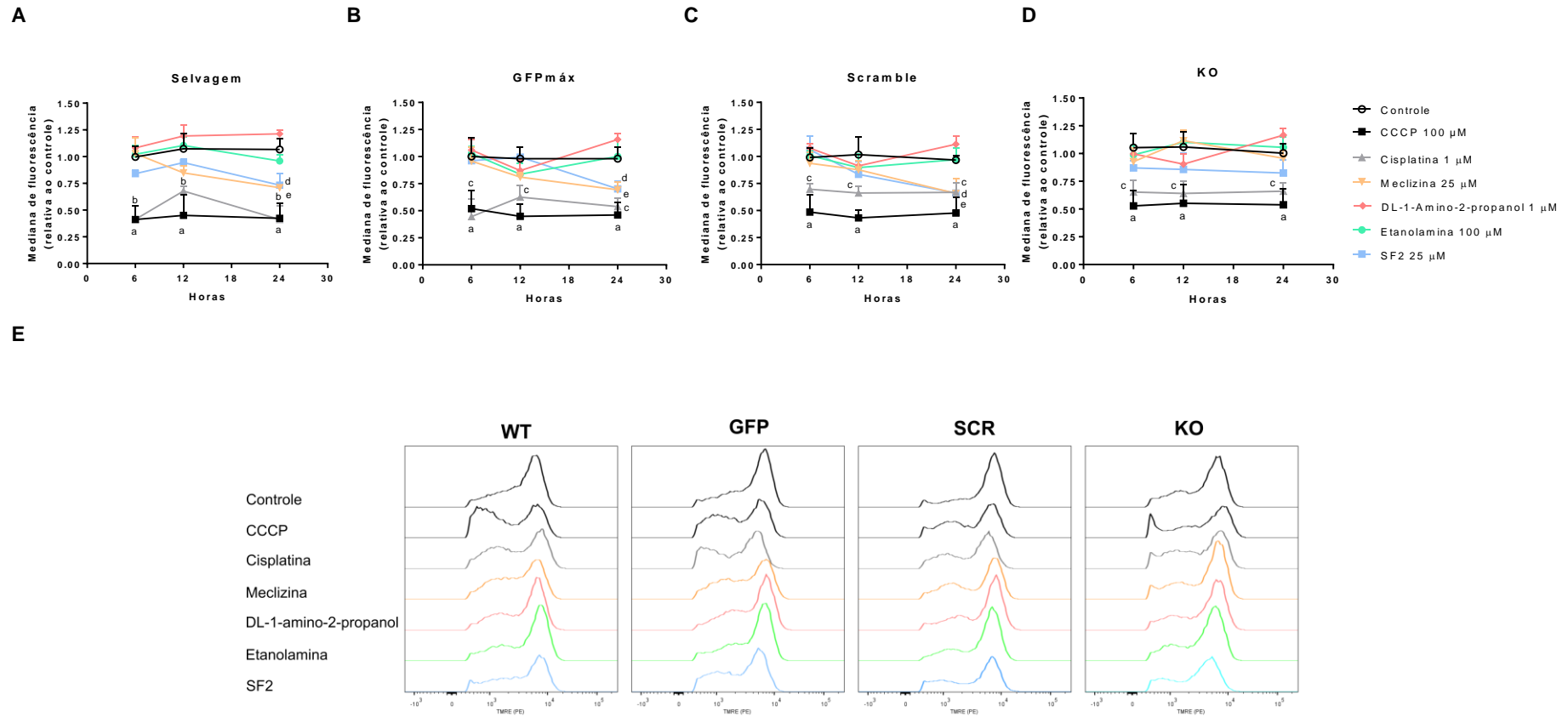
**Figura 13 – Os efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em células LL2/LC1.** Os diferentes fenótipos das células LL2/LC1 são indicados em cada painel como selvagem, GFPmax, SCR ou KO. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. a =  $p < 0,001$  cisplatina e SF2 vs. controle, b =  $p < 0,05$  meclizina vs. controle, c =  $p < 0,05$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs controle, d =  $p < 0,05$  cisplatina, meclizina, SF2, DL-1-amino-2-propanol vs controle.



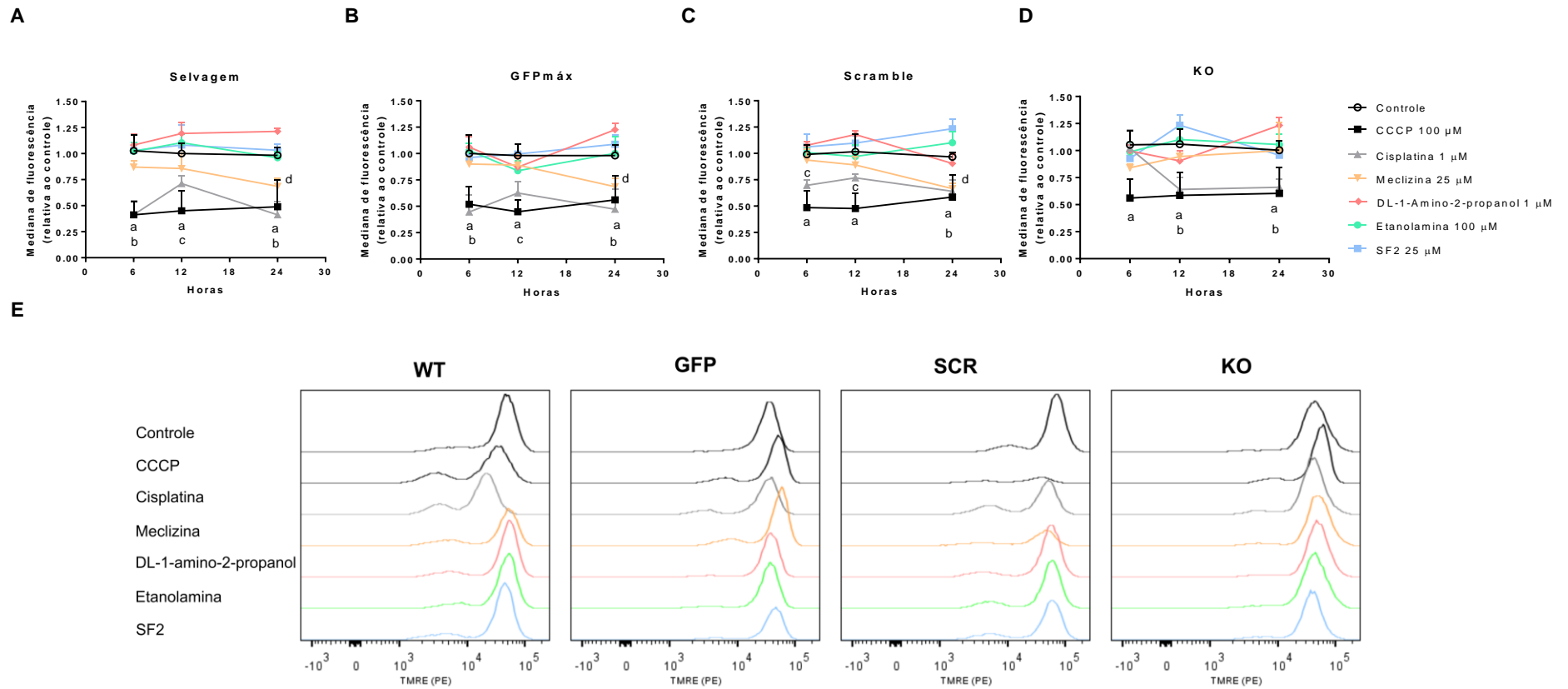
**Figura 14 - Efeitos apoptóticos dos diferentes tratamentos em 3 horas nas células A549 e LL2/LC1.** Os diferentes fenótipos das células A549 e LL2/LC1 são indicados em cada painel como selvagem (WT), GFPmax, SCR ou KO. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. \*\*\* =  $p < 0,001$  vs. controle, \* =  $p < 0,05$  vs. controle.

Nesses experimentos, não houve diferenças no perfil de respostas entre os fenótipos selvagem, SCR e GFP para linhagens A549 e LL2/LC1. Após 12h ou 24h de tratamento com cisplatina, as células A549 WT ou KO apresentaram um aumento na externalização de fosfatidilserina (Figura 12 A-D). Um aumento na marcação de 7AAD ocorreu apenas após 24h, sugerindo apoptose tardia (Figura 12 E-H). Após 12h de tratamento das células com meclizina, como pode ser observado pela marcação das células com 7AAD, houve um aumento na permeabilidade de membrana (Figura 12 E-H). Uma maior marcação com anexina-V ocorreu após 24h de tratamento com meclizina, apenas nas células WT (Figura 12 A-D). Em todos os fenótipos de células A549, o DL-1-amino-2-propanol foi capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular nas seis primeiras horas de tratamento (Figura 12 E-G). Conforme o observado na Figura 13, apenas a cisplatina, o SF2 e a meclizina em 24 horas de tratamento foram capazes de externalizar a fosfatidilserina nas células LL2/LC1 WT, GFP e SCR (Figura 13 A-C) com aumento da permeabilidade de membrana (Figura 13 E-G). Para esses mesmos fenótipos, o DL-1-amino-2-propanol foi capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular após 24h de tratamento (Figura 13 E-G). A linhagem KO não mostrou alterações na marcação de anexina V, nem de 7AAD em nenhum dos tratamentos estudados.

Em seguida, a fim de compreender melhor os fenômenos até então observados, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial sob as mesmas condições analisadas no ensaio de anexina V/7AAD. Em consonância com os resultados do ensaio de anexina V/7AAD (Figuras 10-14), não houve diferença no perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial das células A549 WT em relação aos diferentes tratamentos. O carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi utilizado como controle positivo para despolarização mitocondrial, sendo eficaz em todos os tempos e linhagens testadas (Figuras 15 e 16). A cisplatina também foi capaz de reduzir o potencial eletrônico mitocondrial de todas as células (Figuras 15 e 16). Apenas nas células selvagem para Pcyt2 (WT, GFP e SCR) a meclizina reduziu o potencial eletrônico mitocondrial após 24h de tratamento (Figuras 15 e 16).

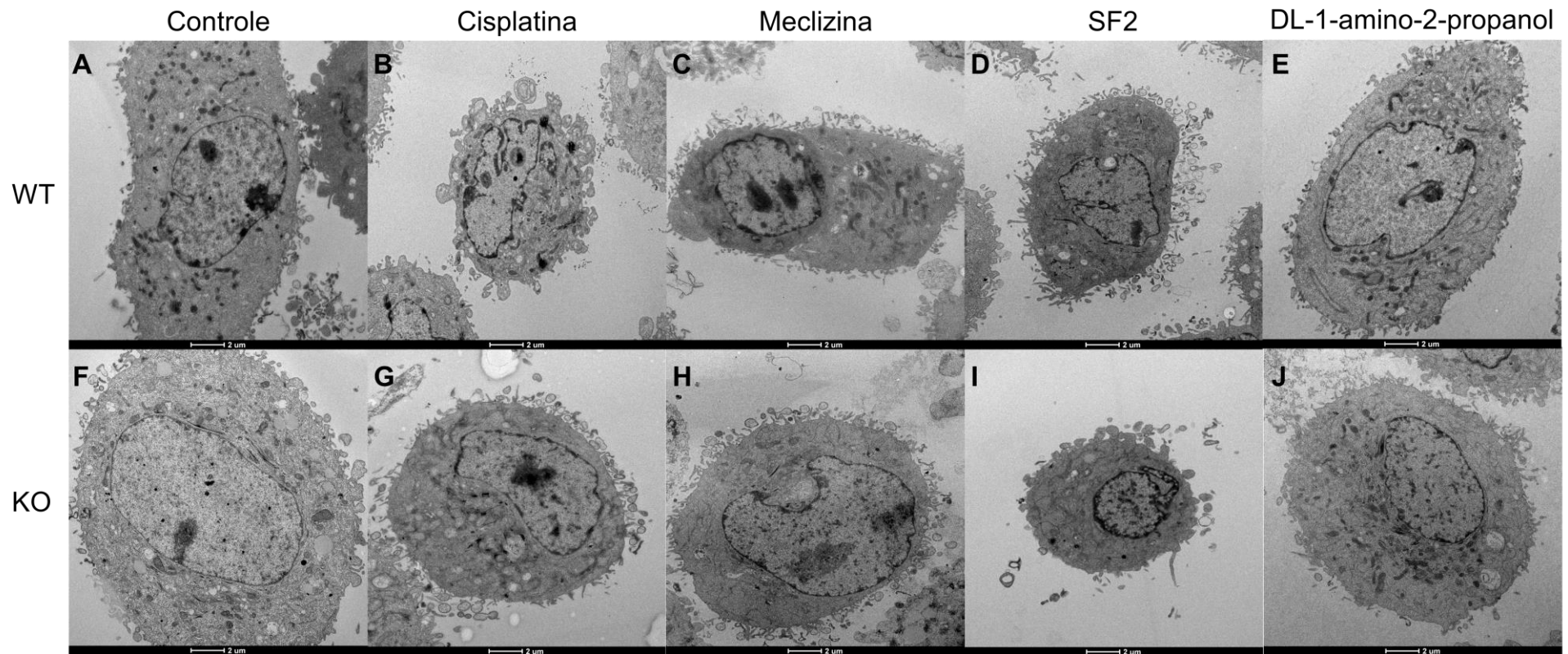


**Figura 15 - O efeito dos tratamentos estudados sobre o potencial eletrônico mitocondrial das células A549.** Os gráficos da análise da intensidade de fluorescência média relativa ao controle da marcação com TMRE das células tratadas por 6, 12 ou 24 h com cisplatina 1  $\mu$ M, o DL-1-amino-2-propanol 1  $\mu$ M, a meclizina 25  $\mu$ M, o SF2 25  $\mu$ M e a etanolamina 100  $\mu$ M. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. Em que: a =  $p < 0,01$  CCCP vs controle, b =  $p < 0,01$  cisplatina vs controle, c =  $p < 0,05$  cisplatina vs controle, d =  $p < 0,05$  meclizina vs controle e e =  $p < 0,05$  SF2 vs controle).



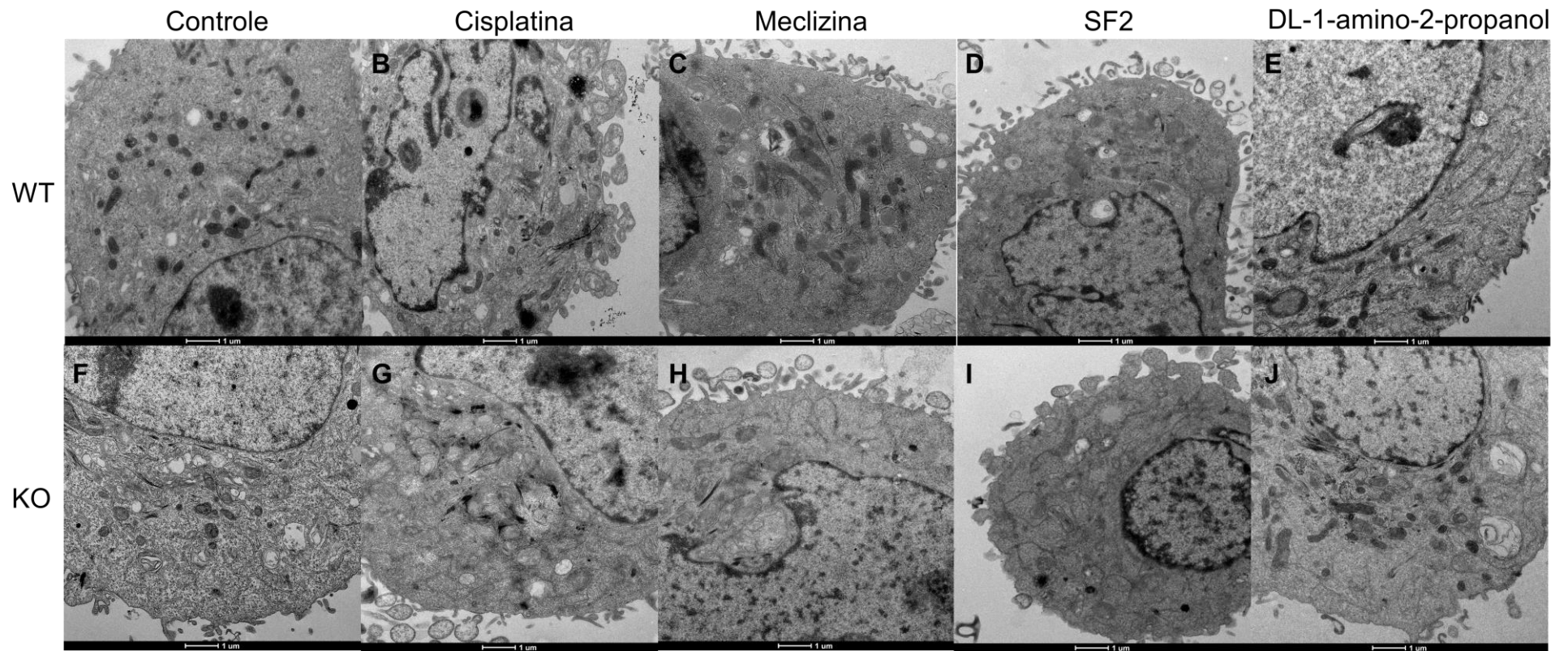
**Figura 16 – O efeito dos tratamentos estudados sobre o potencial eletrônico mitocondrial das células LL2/LC1.** Os gráficos da análise da intensidade de fluorescência média relativa ao controle da marcação com TMRE das células tratadas por 6, 12 ou 24 h com cisplatina 1  $\mu$ M, o DL-1-amino-2-propanol 1  $\mu$ M, a meclizina 25  $\mu$ M, o SF2 25  $\mu$ M e a etanolamina 100  $\mu$ M. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, onde a=  $p < 0.001$  CCCP vs controle, b=  $p < 0.01$  cisplatina vs controle, c =  $p < 0.05$  cisplatina vs controle, d=  $p < 0.05$  meclizina vs controle.

No intuito de analisar as organelas envolvidas nos efeitos dos tratamentos, as células A549 e LL2/LC1, WT e KO, foram tratadas, por 24 horas com cisplatina (1  $\mu\text{M}$ ), meclizina (25  $\mu\text{M}$ ) ou SF2 (25  $\mu\text{M}$ ), fixadas e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (Figuras 17-21). As células WT e KO tratadas com cisplatina tiveram reduzidos o tamanho celular (Figuras 17B, 17G e 19A para células A549; Figuras 20B, 20G e 22A para células LL2/LC1), mitocondrial (Figuras 17B, 17G, 18B, 18G e 19C para células A549; Figuras 20B, 20F, 21B, 21G e 22C para células LL2/LC1) e nuclear (Figuras 17B, 17G e 18D para células A549; Figuras 20B, 20G e 22D para células LL2/LC1), comparadas aos respectivos controles (Figuras 17A, 18A, 17F, 18F, 19A, 19C e 19D para células A549; Figuras 20A, 21A, 20F, 21F, 22A, 22C e 22D para células LL2/LC1). O SF2 foi capaz de reduzir apenas o tamanho das células KO (Figuras 17D, 17I, 18D, 18I e 19A para células A549; Figuras 20D, 20I, 21D, 21I e 22A para células LL2/LC1). As células WT tratadas com cisplatina e com SF2 reduziram seu volume celular (Figuras 17B, 17D e 19A para células A549; Figuras 20B, 20D e 22A para células LL2/LC1), mitocondrial (Figuras 17B, 17D, 18B, 18D e 19B para células A549; Figuras 20B, 20D, 21B, 21D e 22B para células LL2/LC1), e nuclear (Figuras 17B, 17D e 19D para células A549; Figuras 20B, 20D e 22D para células LL2/LC1). Estas células também apresentaram maior condensação nuclear (Figuras 17B, 17D e 19E para células A549; Figuras 20B, 20D e 22E para células LL2/LC1) em relação ao controle (Figura 17A, 18A, 19A, 19B, 19D, 19F, 20A, 21A, 22A, 22B, 22D e 22F). Estes dados corroboram a sugestão de indução de apoptose com participação mitocondrial observada para a cisplatina e SF2 nos ensaios com anexina-V, 7AAD ou TMRE (Figuras 17-22). As células WT tratadas com meclizina não apresentaram alteração no seu tamanho, mas suas mitocôndrias estavam menores, e em menor quantidades, também corroborando que ocorre morte não-apoptótica associada a danos mitocondriais (Figuras 17-22).

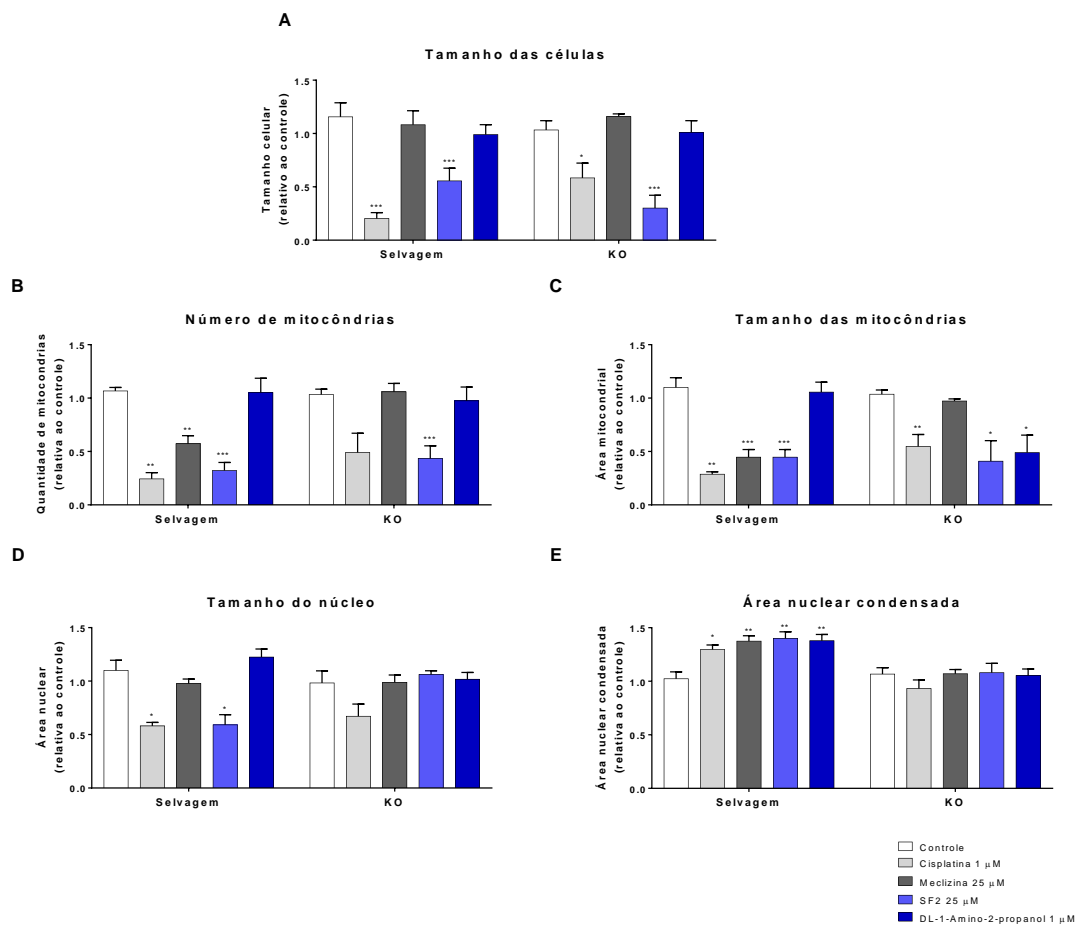


**Figura 17 – Avaliação das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO em 2500 x. As elétrón-micrografias representativas da morfologia geral das células A549 tratadas por 24 h com cisplatina 1 μM, a meclizina 25 μM e o SF2 25 μM (aumento 2500 x).**

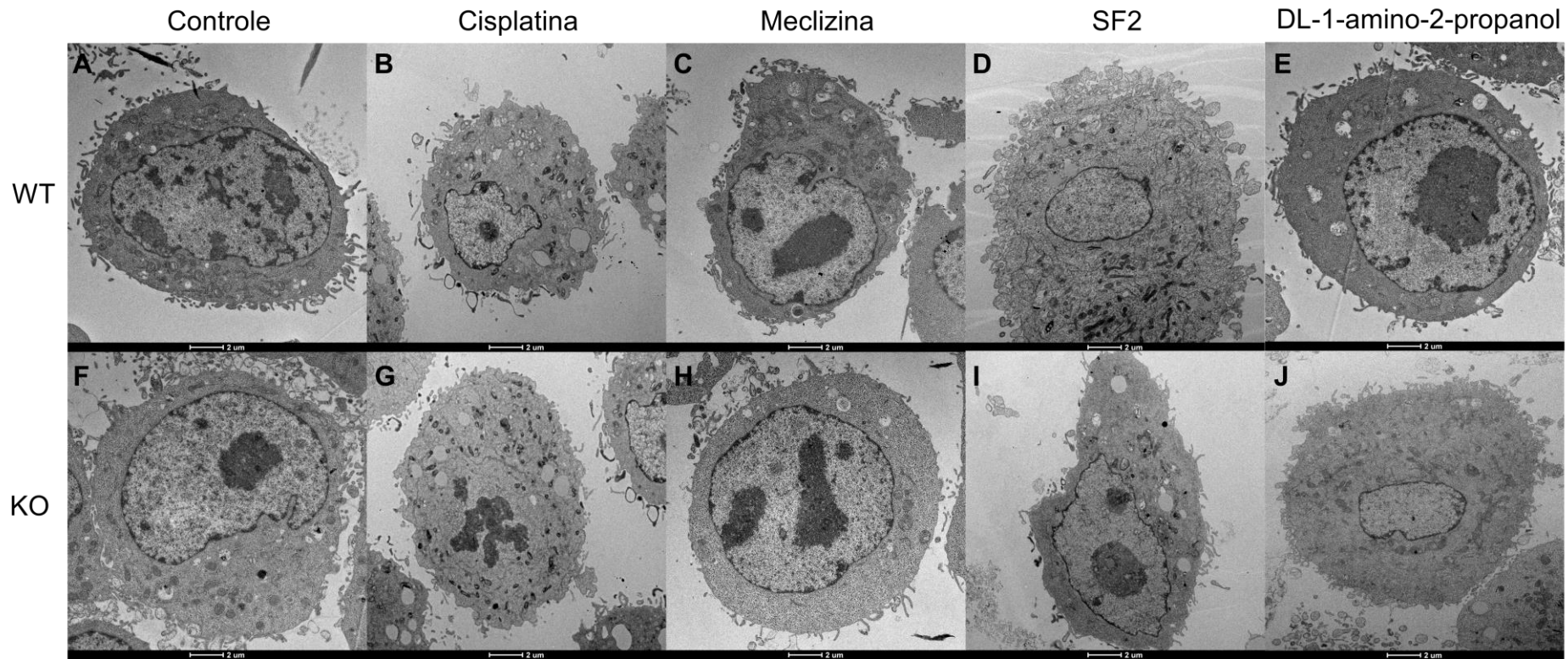




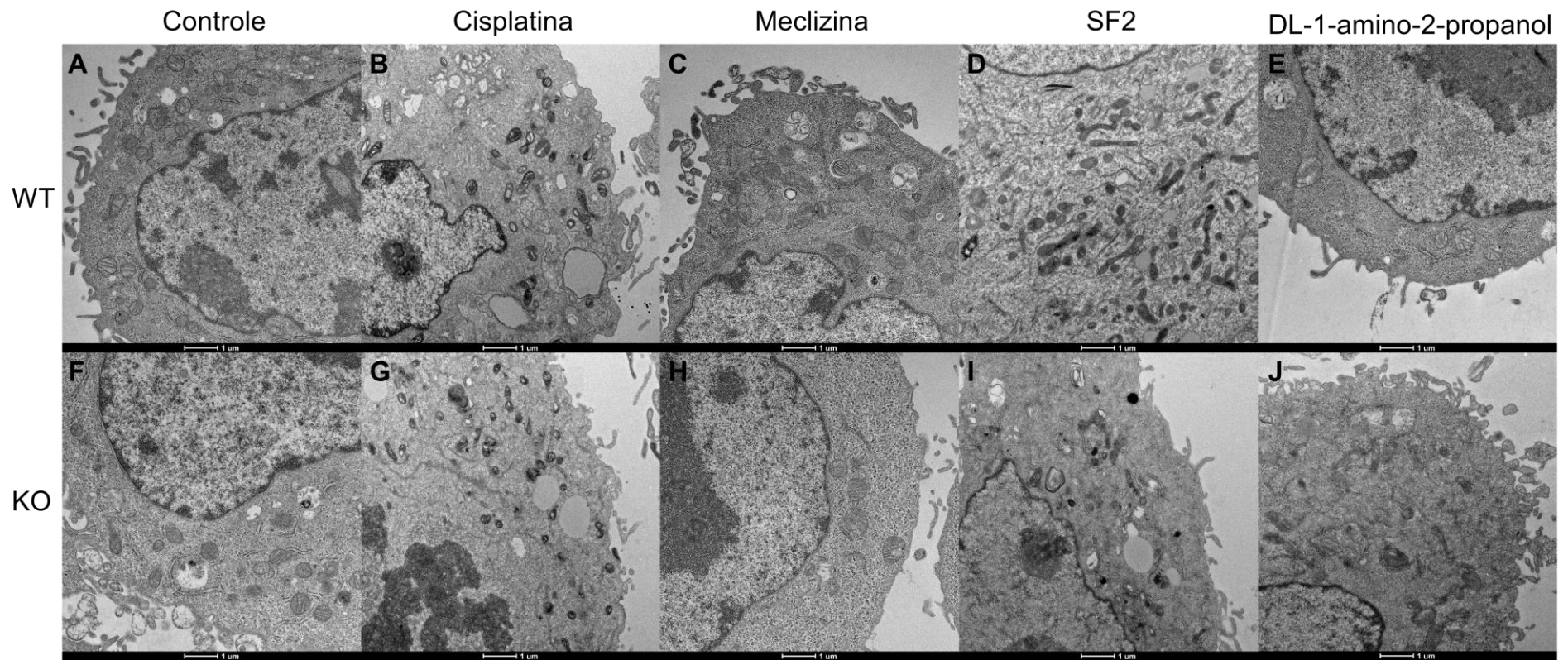
**Figura 18 - Avaliação das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO em 5000 x.** As elétron-micrografias representativas da morfologia geral das células A549 tratadas por 24 h com cisplatina 1 µM, a meclizina 25 µM e o SF2 25 µM (aumento 5000 x).



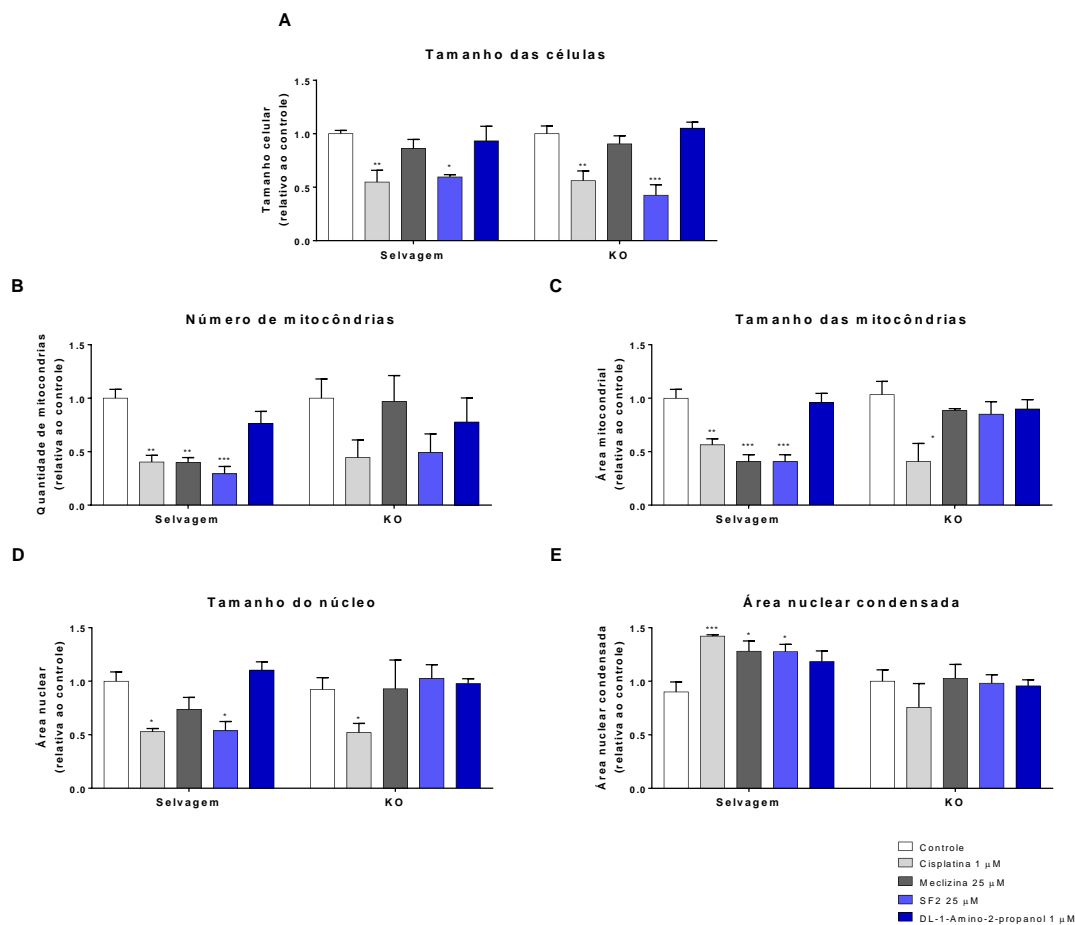
**Figura 19 - Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO.** Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células A549 WT e KO. Os gráficos representam a quantificação de três diferentes células representativas de três experimentos independentes das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Em que: \* =  $p < 0,05$  vs o controle, \*\* =  $p < 0,01$  vs controle e \*\*\* =  $p < 0,001$  vs controle.



**Figura 20 – Avaliação das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO em 2500 x.** As elétron-micrografias representativas da morfologia geral das células LL2/LC1 tratadas por 24 h com cisplatina 1 µM, a meclizina 25 µM e o SF2 25 µM (aumento 2500 x).



**Figura 21 - Avaliação das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO em 5000 x. As elétrón-micrografias representativas da morfologia geral das células LL2/LC1 tratadas por 24 h com cisplatina 1 μM, a meclizina 25 μM e o SF2 25 μM (aumento 5000 x).**

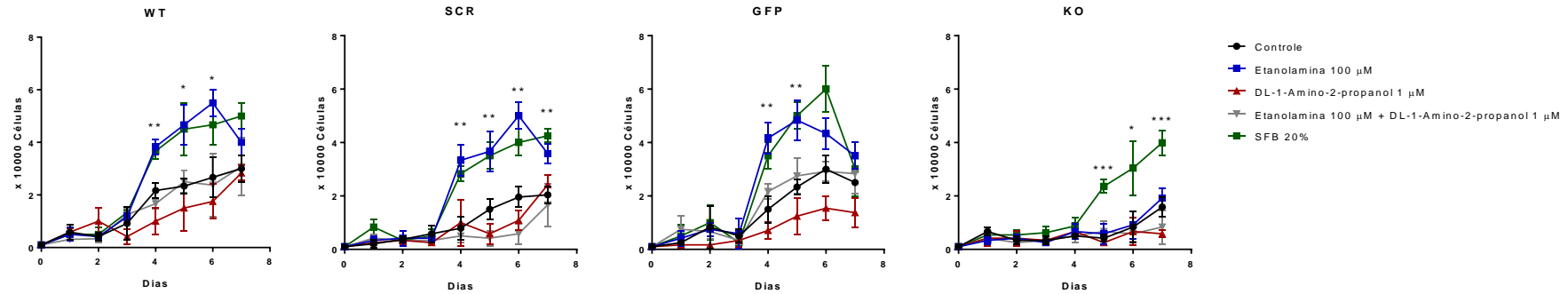


**Figura 22 - Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO.** Análise quantitativa das alterações morfológicas nas células LL2/LC1 WT e KO. Os gráficos representam a quantificação de três diferentes células representativas de três experimentos independentes das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Em que: \* =  $p < 0,05$  vs o controle, \*\* =  $p < 0,01$  vs controle e \*\*\* =  $p < 0,001$  vs controle.

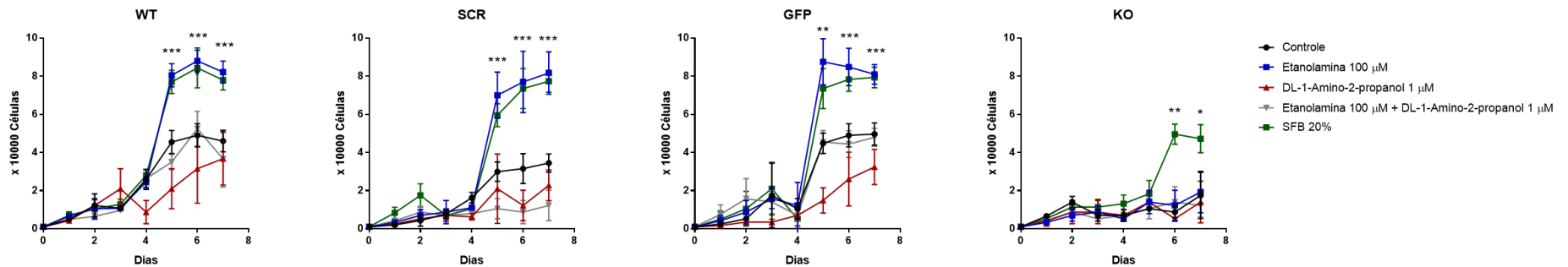
#### 4.6 Avaliação dos efeitos citostáticos da inibição da *Pcyt2* e do transporte de etanolamina

Após a avaliação da citotoxicidade induzida pela inibição da *Pcyt2* e do transporte de etanolamina, também foi avaliado o efeito citostático destas intervenções. Desta forma as células foram semeadas, divididas em grupos de tratamentos e contadas diariamente ao longo de sete dias. Tanto as células A549 (Figura 23) quanto as LL2/LC1 (Figura 24) apresentaram um comportamento proliferativo similar. Neste experimento, as células *Pcyt2* selvagens (WT, GFP e SCR) cresceram exponencialmente entre o terceiro e o quinto dia. Nestes grupos, tanto as células que receberam a suplementação de etanolamina quanto as que receberam maiores concentrações de SFB apresentaram maior taxa de

proliferação, principalmente após o quarto dia. Porém, as células KO não apresentaram crescimento exponencial no período avaliado e não foram afetadas pela suplementação com etanolamina. Apenas quando o meio foi suplementado com uma maior concentração de SFB, as células KO aumentaram sua proliferação.



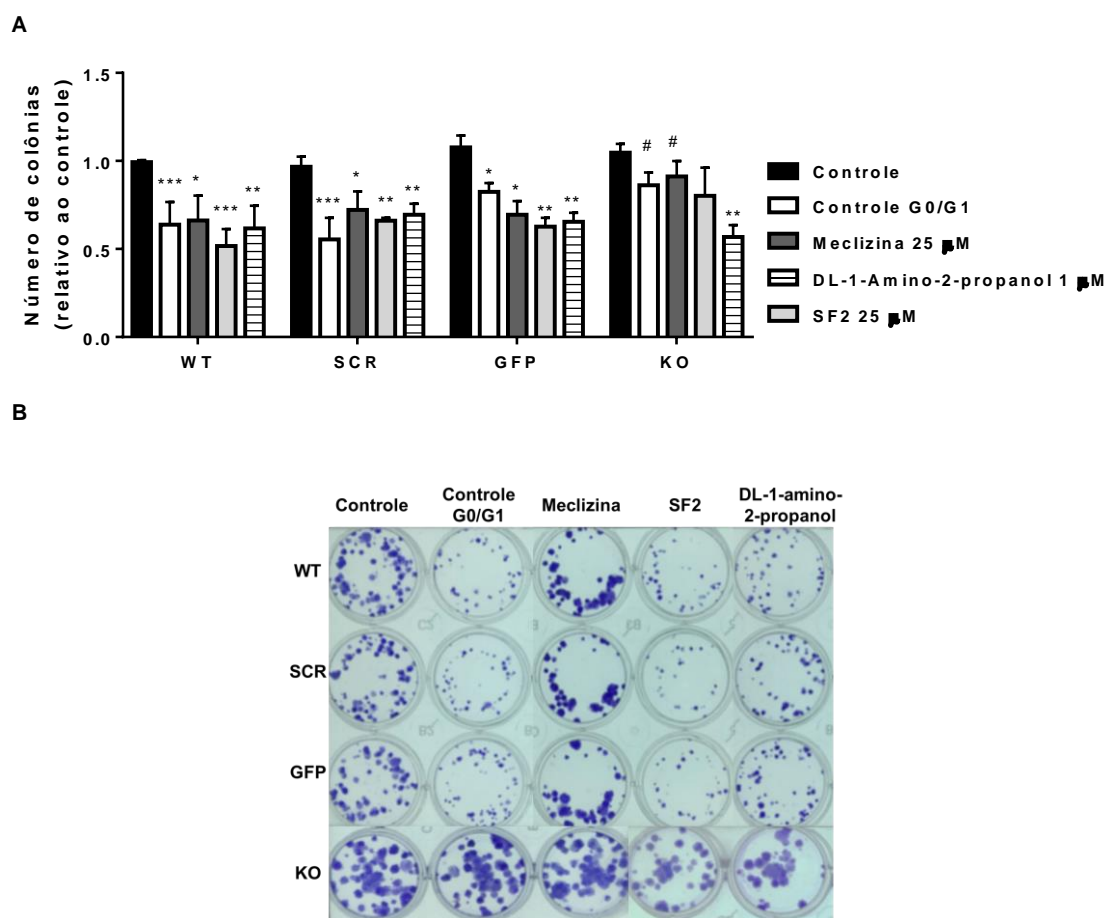
**Figura 23 – Avaliação da proliferação celular nas células A549.** As células A549 com Pcyt2 selvagem, transfectadas com o pmáxGFP, transfectadas com o plasmídeo *scramble* e KO para a Pcyt2 foram cultivadas por 7 dias com ou sem suplementação diária de etanolamina 100 μM e contadas diariamente. A partir dos dados realizados em n=3, os números de células contadas diariamente foram utilizados para traçar a curva de crescimento.



**Figura 24 – Avaliação da proliferação celular nas células LL2/LC1.** As células LL2/LC1 com Pcyt2 selvagem, transfectadas com o pmáxGFP, transfectadas com o plasmídeo *scramble* e KO para a Pcyt2 foram cultivadas por 7 dias com ou sem suplementação diária de etanolamina 100 μM e contadas diariamente. A partir dos dados realizados em n=3, os números de células contadas diariamente foram utilizados para traçar a curva de crescimento.



Para melhor avaliar esta alteração na duplicação celular na ausência de Pcyt2, foram realizados os ensaios clonogênicos, a análise do ciclo celular por citometria de fluxo e a avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular. Contudo, não foi possível realizar o ensaio clonogênico com células LL2/LC1 devido a sua fraca adesão à placa de cultura. As concentrações de meclizina, SF2 e cisplatina foram escolhidas priorizando a inibição da enzima Pcyt2 com citotoxicidade máxima de 50%, dado que os efeitos a serem observados dependem da análise das células vivas. No ensaio clonogênico com as células A549 (Figura 25), a inibição da Pcyt2 pela meclizina (\*\* $p < 0,01$ ) e pelo SF2 (\*\* $p < 0,001$ ), assim como a privação dos fatores de crescimento do soro (\*\* $p < 0,001$ ), foram capazes de inibir o crescimento de colônias nas células com a enzima Pcyt2 expressa. As células KO, por sua vez, não apresentaram seu crescimento de colônias afetados por nenhuma dessas condições.

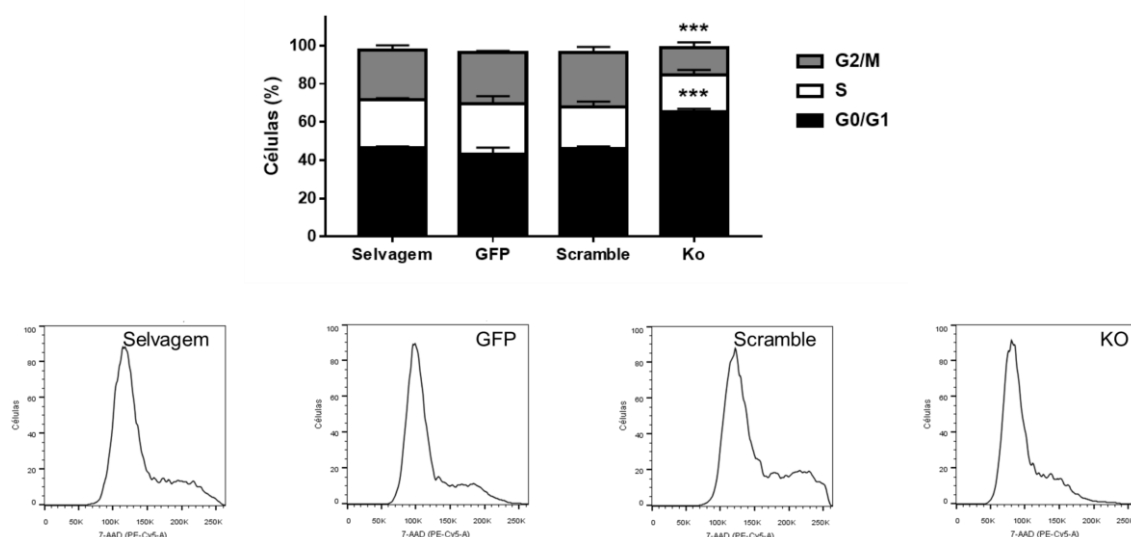


**Figura 25 – Avaliação da proliferação celular das células A549 por ensaio clonogênico.** As células A549 com a expressão da Pcyt2 selvagem e KO foram semeadas, sincronizadas e tratadas por 12 h com meclizina 25 µM, cisplatina 1 µM, SF2 25 µM ou sob privação de SFB (controle G0/G1). Após o período de tratamento, o meio



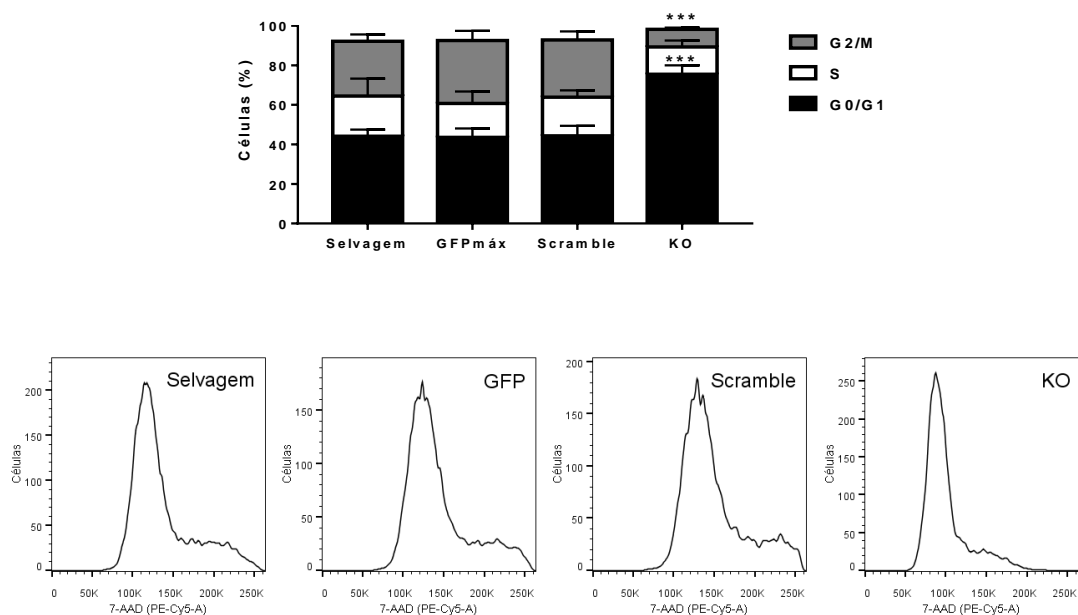
foi substituído por meio de cultura completo suplementado e as células foram mantidas em cultura por 10 dias. Finalmente as células foram fixadas e coradas com cristal violeta e as colônias (grupos de células com número igual ou superior a 50 células) contadas. A privação de soro (\*\* $p < 0,001$ ) e a inibição da Pcyt2 pela meclizina (\*\* $p < 0,01$ ) e pelo SF2 (\*\* $p < 0,001$ ) foram capazes de reduzir a proliferação das células com Pcyt2 selvagem. As células KO também são resistentes a privação de soro e a meclizina ( $\#p < 0,05$ , quando comparado ao WT). Os gráficos representam as médias e o desvio-padrão de três experimentos independentes.

Ao analisar a distribuição das células A549 nas fases do ciclo celular (Figura 26) sem nenhum tratamento, fica evidente que as células KO estão paradas em G0/G1, posto que há um aumento da porcentagem de células em G0/G1 ( $p < 0,001$ ) e redução das células nas fases G2/M ( $p < 0,001$ ), ambos em relação ao controle. De forma semelhante ao observado com as células A549, as células LL2/LC1 KO (Figura 27) encontram-se predominantemente nas fases G0/G1 ( $p < 0,001$  em relação ao WT). Houve ainda uma redução das células na fase G2/M ( $p < 0,001$  em relação ao WT). A análise da expressão das proteínas do ciclo celular corrobora estes dados (Figura 28 e 29), pelo aumento da via iniciada pela p53 fosforilada e de p21, com consequente redução da proteína Rb fosforilada, apesar do aumento de ciclina E2 e, da não alteração da CDK4 nas células KO, quando comparado aos demais grupos.



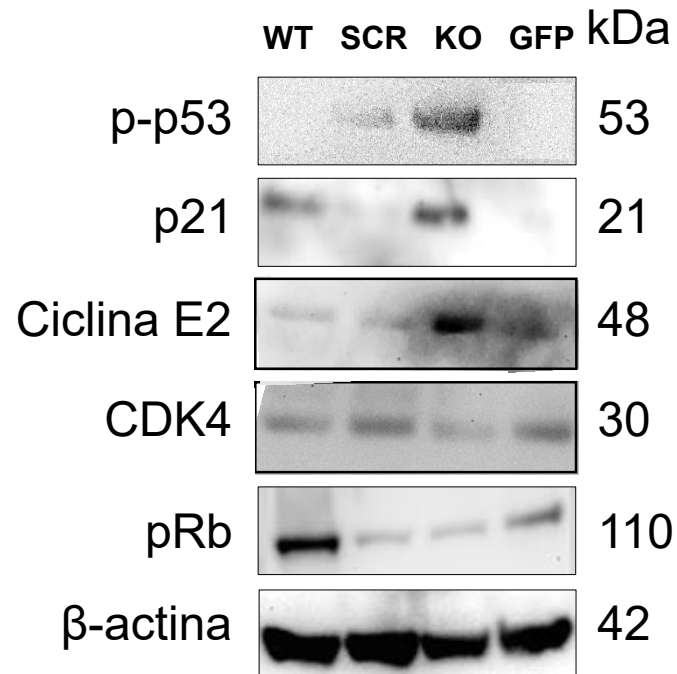
**Figura 26 – Avaliação da distribuição das células A549 nas diferentes fases do ciclo celular.** As células A549 com a expressão da Pcyt2 selvagem e KO bem como as células transfectadas com os plasmídeos controle pSpCas9 (*scramble*) e pmáxGFP (GFP) foram semeadas, sincronizadas e avaliadas por citometria de fluxo utilizando o marcador nuclear 7-AAD. Os gráficos representam as médias das porcentagens das células em cada fase do ciclo celular e o desvio-padrão de três experimentos independentes. As células KO apresentam aumento da porcentagem de células nas fases G0/G1 (\*\* $p < 0,001$ ) com redução da porcentagem de células nas fases G2/M

( $***p < 0,001$ ) quando comparado às células selvagem. Não há diferença entre as células selvagem e os controles de transfecção.

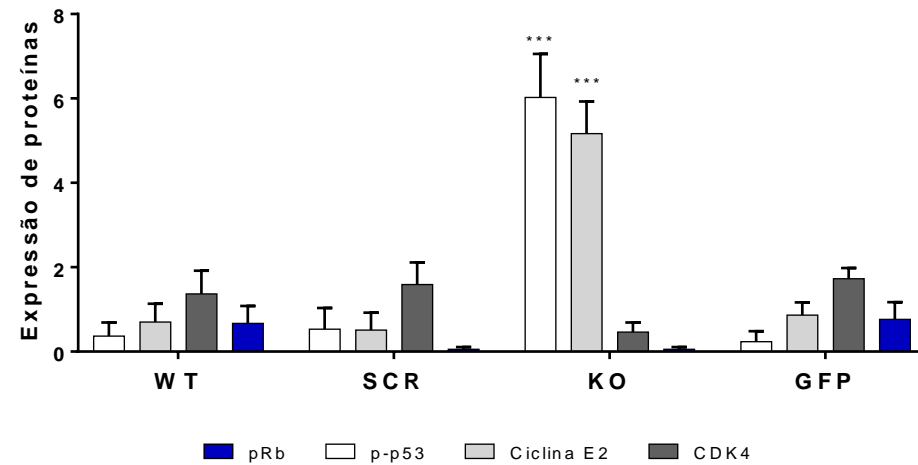


**Figura 27 – Avaliação da distribuição das células LL2/LC1 nas diferentes fases do ciclo celular.** As células LL2/LC1 com a expressão da Pcyt2 selvagem e KO bem como as células transfectadas com os plasmídeos controle pSpCas9 (scramble) e pmáxGFP (GFP) foram semeadas, sincronizadas e avaliadas por citometria de fluxo utilizando o marcador nuclear 7-AAD. Os gráficos representam as médias das porcentagens das células em cada fase do ciclo celular e o desvio-padrão de três experimentos independentes. As células KO apresentam aumento da porcentagem de células nas fases G0/G1 ( $***p < 0,001$ ) com redução da porcentagem de células nas fases G2/M ( $***p < 0,001$ ) quando comparado às células selvagem. Não há diferença entre as células selvagem e os controles de transfecção.

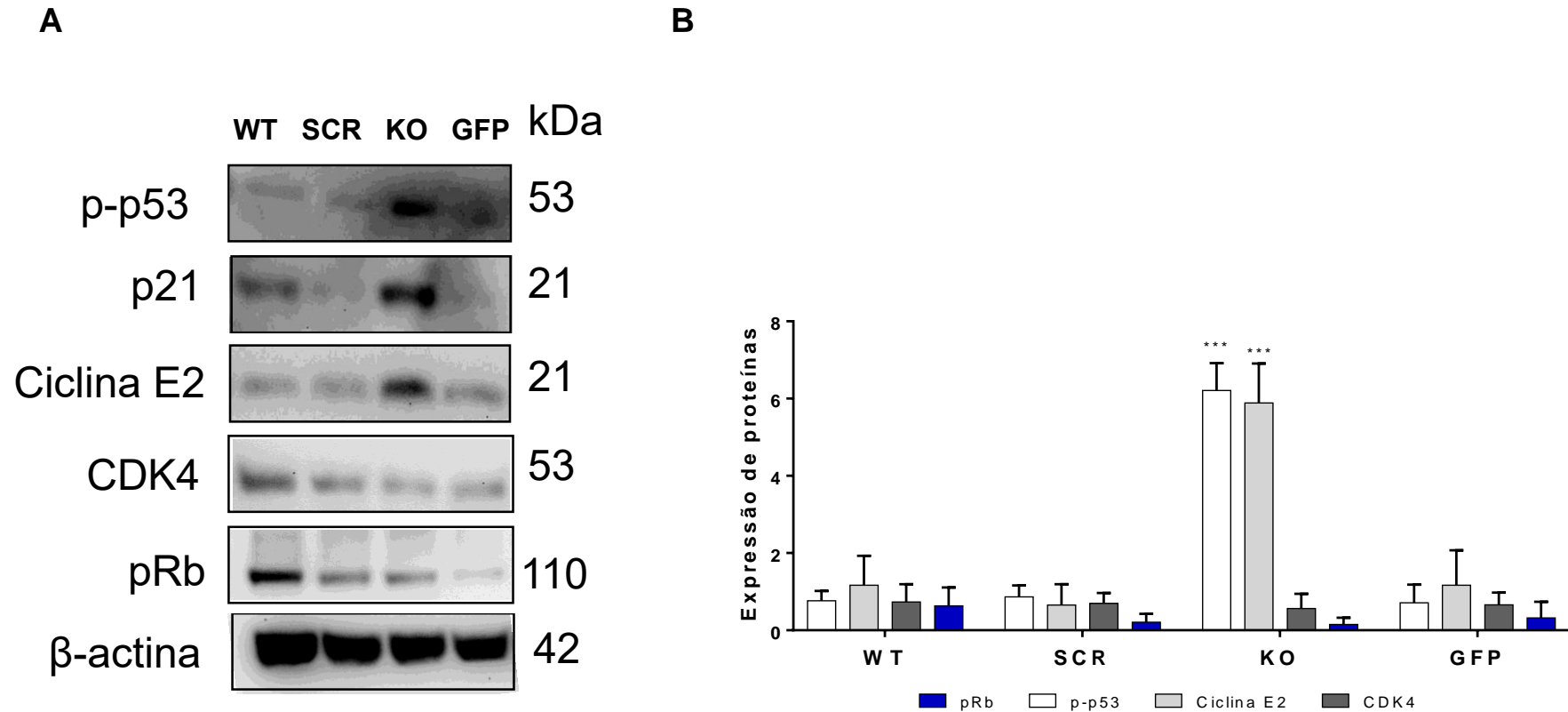
A



B



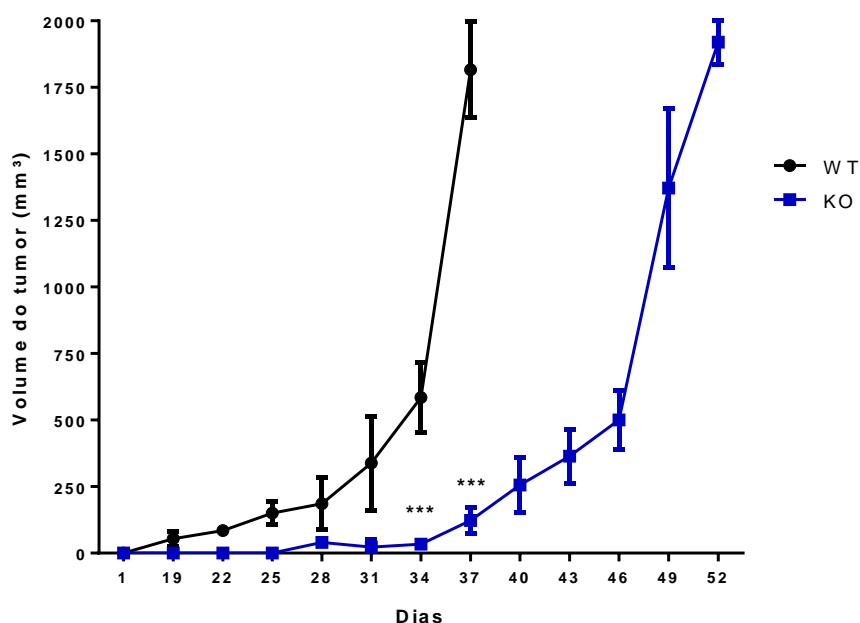
**Figura 28 – Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular nas células A549.** A expressão das proteínas relacionadas ao ciclo celular foi analisada pelo *Western blotting* dos lisados das células A549 com a expressão da Pcyt2 selvagem (WT) e KO bem como as células transfectadas com os plasmídeos controle pSpCas9 (*scramble*) e pmáxGFP (GFP) em seu estado basal. (A) As imagens são representativas das membranas de três experimentos independentes avaliando as proteínas p-p53, p21, ciclina E2, CDK4 e pRb, utilizando a  $\beta$ -actina como proteína normalizadora. (B) O gráfico com a quantificação dos *dot plots* através do software *Image J*.



**Figura 29 – Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular nas células LL2/LC1.** A expressão das proteínas relacionadas ao ciclo celular foi analisada pelo *Western blotting* dos lisados das células LL2/LC1 com a expressão da Pcyt2 selvagem (WT) e KO bem como as células transfectadas com os plasmídeos controle pSpCas9 (*scramble*) e pmáxGFP (GFP) em seu estado basal. (A) As imagens são representativas das membranas de três experimentos independentes avaliando as proteínas p-p53, p21, ciclina E2, CDK4 e pRb, utilizando a  $\beta$ -actina como proteína normalizadora. (B) O gráfico com a quantificação dos *dot plots* através do software *Image J*.

#### 4.7 Avaliação dos efeitos *in vivo* da inibição da *Pcyt2* e do transporte de etanolamina

Após o avanço dos estudos dos mecanismos *in vitro*, foi iniciada a padronização do ensaio de tumorigenicidade das células A549 e LL2/LC1 WT e KO (Figura 30). Os animais balb/c *nude* foram inoculados por via subcutânea com as linhagens em estudo. A linhagem LL2/LC1 na sua forma selvagem foi capaz de induzir tumores a partir de 15 dias, tendo estes atingido o valor máximo de volume tumoral no 37º dia. Enquanto os animais que receberam o LL2/LC1 KO apresentaram os primeiros tumores no 28º dia e atingiram o valor máximo de volume no 52º dia. Portanto, nos 34º e 37º dias os tumores derivados de implantes de células KO eram muito menores que os das células com *Pcyt2* selvagem ( $p < 0.001$ ). As células A549, WT ou KO, não induziram a formação tumoral no período de 30 dias (dados não mostrados).

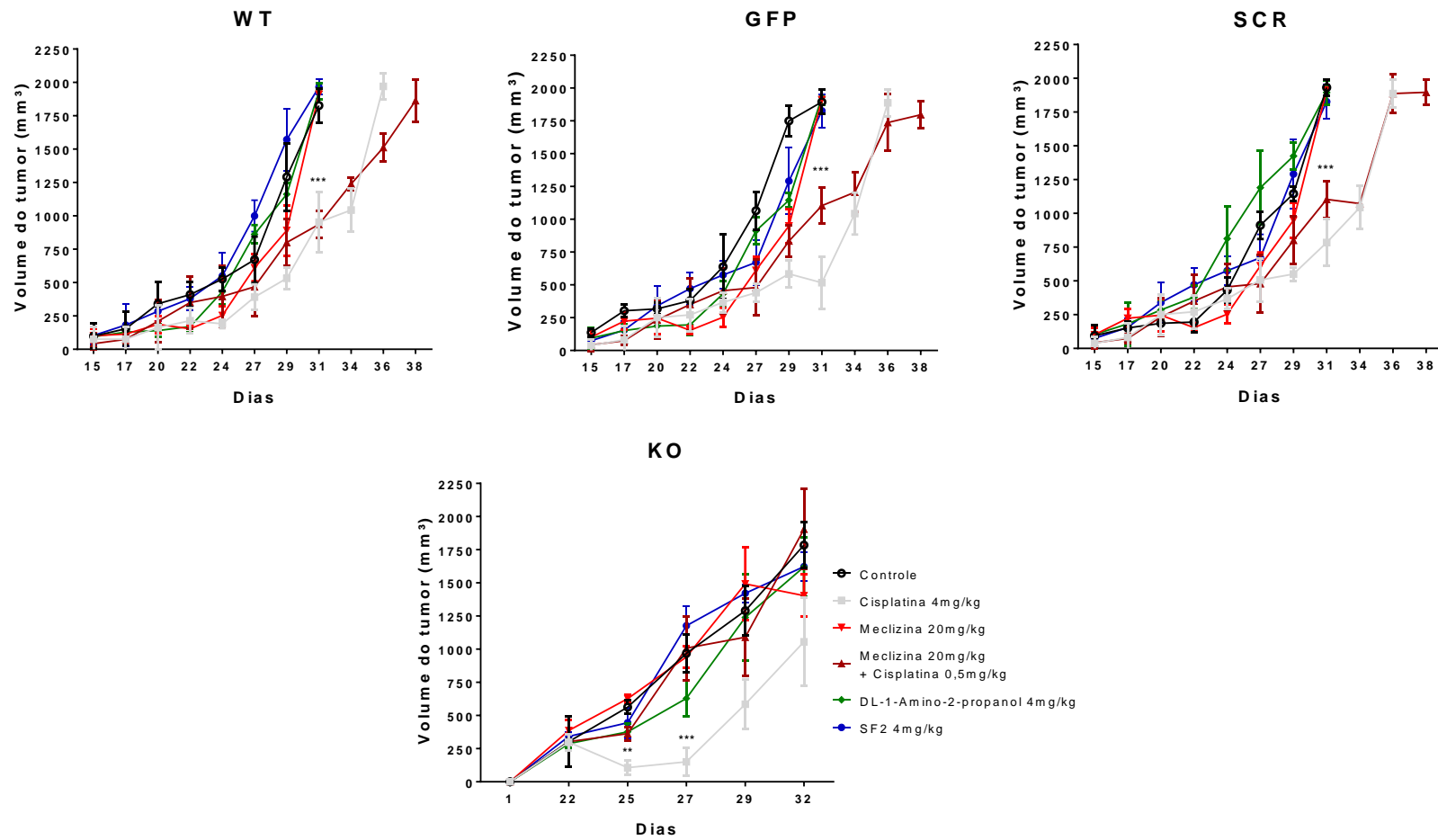


**Figura 30 – Padronização dos modelos *in vivo* com células LL2/LC1 WT e KO.** Os camundongos Balb/c *nude* foram inoculados, via subcutânea, com células LL2/LC1 WT ou KO. As células KO mostraram um atraso na produção de tumores quando comparada às células WT. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.

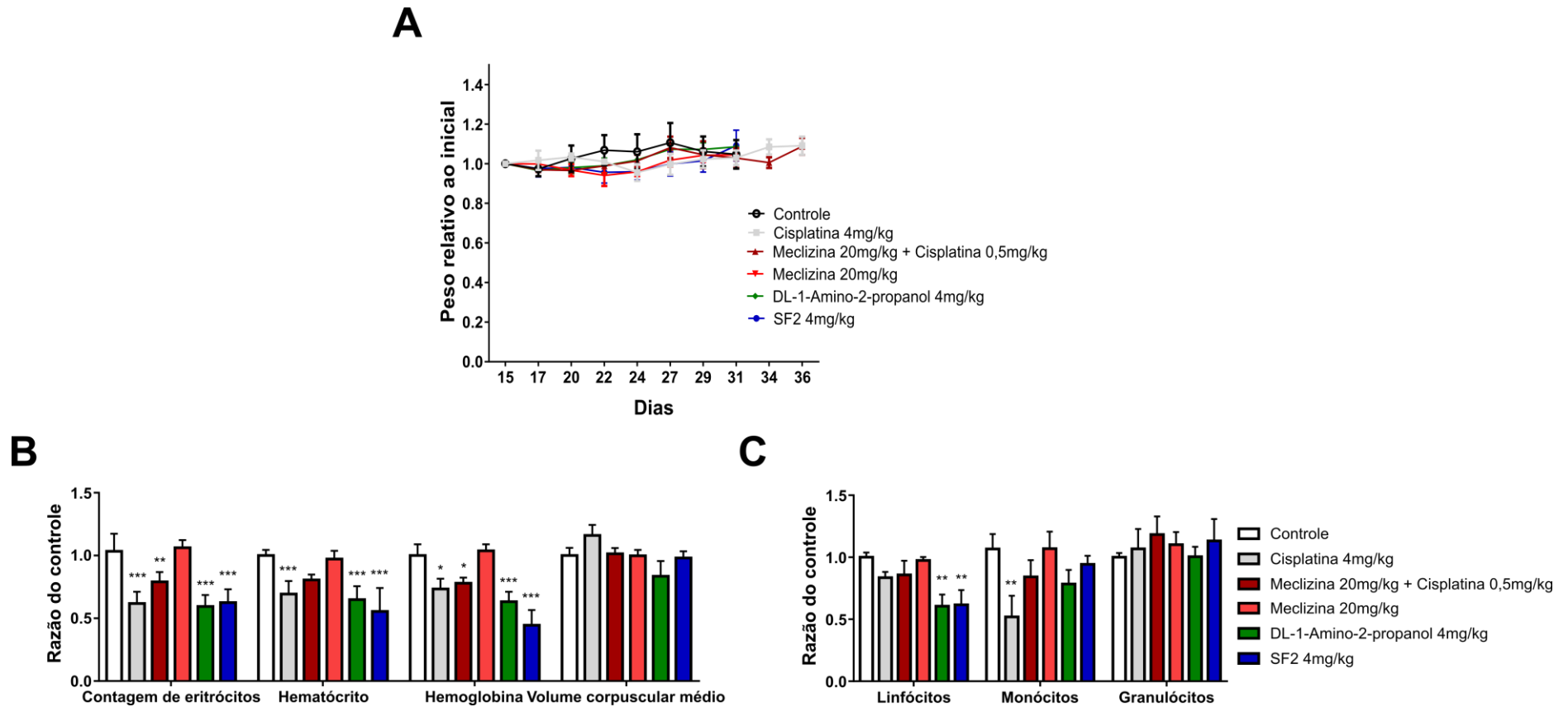
Após esses experimentos iniciais, as células LL2/LC1 WT, GFP, SCR e KO foram inoculadas nos camundongos, porém, ao formar um tumor de volume palpável, os animais eram randomizados e tratados com cisplatina 4mg/kg, SF2 4mg/kg, meclizina 20mg/kg, DL-2-aminopropanol 4mg/kg ou a combinação de

cisplatina 0,5mg/kg com meclizina 20mg/kg (Figura 31). Apenas os animais dos grupos cisplatina (4mg/kg) e cisplatina (0,5mg/kg) associada a meclizina (20mg/kg) apresentaram reduzida taxa de crescimento tumoral, quando inoculados com células LL2/LC1 WT, GFP e SCR a partir do dia 31 ( $p < 0.001$ ). Já os animais que com tumores de células KO já apresentaram menor crescimento tumoral, quando tratados com cisplatina 4mg/kg nos dias 26 e 27 ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente).

Durante todo período experimental, o peso dos animais foi avaliado e, ao final, o sangue também foi analisado (Figura 32). Apesar de não ser possível observar grandes flutuações no peso dos animais (Figura 32A), os animais tratados com SF2 e o DL-2-aminopropanol apresentaram redução da contagem de eritrócitos, do hematócrito, da hemoglobina (Figura 32B e Tabela 7) e da contagem de linfócitos (Figura 32C e Tabela 8). Vale ressaltar que os animais não apresentaram nenhum outro sinal de toxicidade nas condições testadas.



**Figura 31 – Análise da progressão dos tumores dos camundongos nos quais foram inoculadas as células LL2/LC1 WT, GFP, SCR e KO.** Os camundongos balb/c *nude* foram inoculados, via subcutânea, com células LL2/LC1 WT, GFP, SCR ou KO. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos, onde \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 em relação ao controle.



**Figura 32 – Avaliação dos sinais de toxicidade dos tratamentos testados *in vivo*.** Durante todo o período experimental foram avaliados o peso dos animais (A) e ao final do experimento foi analisado o sangue (B e C) dos animais obtidos a partir de punção cardíaca. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  e \*\*\*= $p < 0.001$  em relação ao grupo controle.



Tabela 7 - Valores da média e desvio-padrão da análise da série de células sanguíneas vermelhas.

	Controle	Cisplatina 4mg/kg	Meclizina 20mg/kg + Cisplatina 0,5mg/kg	Meclizina 20mg/kg	DL-1-Amino-2-propranol 4mg/kg	SF2 4mg/kg	Valores de referência
<b>Contagem de eritrócitos</b>	7,2 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,9	4,3 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,6	5,5 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,5	7,4 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,4	4,1 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,6	4,3 x 10 <sup>12</sup> /L ± 0,7	6,3-9,4 x 10 <sup>12</sup> /L
<b>Hematócrito</b>	40,0 % ± 1,8	27,7 % ± 4,1	32,1 % ± 1,7	38,8 % ± 2,6	25,9 % ± 4,2	22,1 % ± 7,4	34,6-44,6%
<b>Hemoglobina</b>	13,0 g/dL ± 1,1	9,5 g/dL ± 1,0	10,1 g/dL ± 0,6	13,4 g/dL ± 0,6	8,2 g/dL ± 1,0	5,7 g/dL ± 1,5	11-14,3 g/dL
<b>Volume corpuscular médio</b>	55,0 fL ± 3,3	63,7 fL ± 4,6	55,8 fL ± 2,4	54,9 fL ± 2,5	45,9 fL ± 6,6	53,9 fL ± 2,8	48,2-58,3 fL

Tabela 8 - Valores da média e desvio-padrão da análise da série de células sanguíneas brancas.

	Controle	Cisplatina 4mg/kg	Meclizina 20mg/kg + Cisplatina 0,5mg/kg	Meclizina 20mg/kg	DL-1-Amino-2-propranol 4mg/kg	SF2 4mg/kg	Valores de referência
<b>Linfócitos</b>	0,7 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,2	0,5 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,3	0,6 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,6 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,2	0,4 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,6	0,4 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,8	0,7-5,7 10 <sup>9</sup> /L
<b>Monócitos</b>	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,2	0,1 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,2	0-0,3 10 <sup>9</sup> /L
<b>Granulócitos</b>	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,2 x 10 <sup>9</sup> /L ± 0,1	0,1-0,5 10 <sup>9</sup> /L

## 5 DISCUSSÃO

O CP é um problema de saúde pública e, apesar de todos os avanços tecnológicos das últimas décadas, as chances de cura dos pacientes acometidos com sua forma metastática não são altas (DENG; NAKAMURA, 2017; ETTINGER et al., 2018; GOTWALS et al., 2017; INCA, 2017; INCA, 2014; KUMAR et al., 2017; ROY; TRINCHIERI, 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Neste contexto, a busca por novas estratégias terapêuticas para esta doença se torna urgente e, entre estas, o desenvolvimento racional de novos fármacos e a busca por novos alvos ganham destaque (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006).

Na busca por novos alvos terapêuticos, os fosfolipídios e suas rotas de síntese devem ser ressaltados dado às suas funções celulares, principalmente no contexto tumoral (DOBBELSTEIN; MOOL, 2014; IORIO et al., 2010; KECKESOVA et al., 2017; MARINO et al., 2015; VALENZUELA-OSES et al., 2017; WEICHERT et al., 2014). Dentre os fosfolipídios de membrana celular, o enfoque do nosso grupo tem sido na alteração da produção de PE através, principalmente, da inibição da Pcyt2, que é frequentemente superexpressa em diversos tumores malignos, dentre os quais, pode-se destacar, o CP (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Entretanto, a inibição do transporte de etanolamina também apresenta um potencial terapêutico interessante, pois, esta é adquirida unicamente na dieta e ambas estas estratégias reduzem a produção de membrana celular, a citocinese e o transporte mitocondrial por reduzir a produção de PE (YOREK et al., 1985).

Em 2013, Gohil e colaboradores já descreveram o primeiro inibidor da enzima Pcyt2, a meclizina, e seus efeitos tóxicos nas mitocôndrias, entretanto, a meclizina é um fármaco com muitos alvos, afinal trata-se de uma piperazina antagonista dos receptores H1 utilizada como anti-emético com atividade anticolinérgica (COHEN; DEJONG, 1972; WEERTS et al., 2014). Portanto, o uso apenas da meclizina não seria adequado para observar unicamente os efeitos da inibição enzima Pcyt2, dado que este fármaco modula várias proteínas. O nosso grupo, desde 2013, estuda essa enzima como um potencial alvo para o tratamento do CPCNP e, inclusive, desenvolveu um inibidor da Pcyt2,

denominado CHY-1, que é citotóxico para células de CPCNP e reduz a progressão tumoral de células NCI-H460 *in vivo* (dados não publicados). Este composto também se mostrou um bom inibidor do transporte de etanolamina e, desta forma, para o melhor entendimento do potencial dos alvos terapêuticos, este trabalho procurou avaliar a modulação destes alvos tanto geneticamente quanto através do uso de fármacos (utilizando a meclizina como inibidor da Pcyt2 o DL-1-amino-2-propanol como inibidor competitivo do transporte de etanolamina).

Apesar do potencial de CHY-1, ao considerar a sua síntese difícil, nosso grupo passou a investir em um intermediário de sua rota de síntese, o SF2, que se mostrou inclusive superior ao CHY-1 quanto a sua citotoxicidade em um painel de células de câncer de mama (dados não publicados). Inicialmente, em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marica Bakovic, o potencial do SF2 como inibidor da Pcyt2 e do transporte de etanolamina foi avaliado com o auxílio de um contador de cintilação líquida. Neste experimento SF2 inibiu a Pcyt2 em modelo de enzima isolada e *in vitro*, além de reduzir o transporte de etanolamina. Portanto, o SF2 é um composto de interesse a ser estudado em substituição ao CHY-1.

Inicialmente, o foco do trabalho foi no estabelecimento de linhagens de CPCNP ausentes de expressão da enzima Pcyt2 (KO), no intuito de compará-las às células WT e, por conseguinte, melhor compreender os efeitos antitumorais e tóxicos que este alvo poderia apresentar na terapêutica do CPCNP. Para tanto, foram utilizados plasmídeos pSpCas9 com a tecnologia do sistema de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR)/CRISPR-associado à proteína Cas 9. Trata-se de uma técnica de edição genômica em destaque atualmente que se baseia no mecanismo de defesa bacteriano contra inserções de material genético viral, utilizando um pequeno RNA guia e a nucleasse Cas9, que se liga no DNA e eficientemente gera quebras exatamente no seu alvo (JANSEN et al., 2002; STERNBERG et al., 2014). Esta técnica foi escolhida tanto sua inovação tecnológica quanto por gerar KO estáveis, permitindo os ensaios *in vivo* com as células KO. No entanto, há dificuldades na técnica de CRISPR/Cas9 que já são bem descritas na literatura e estão associadas principalmente aos métodos de *delivery* de seus

plasmídeos (PENG; LIN; LI, 2016). Este trabalho também enfrentou esta dificuldade tanto ao utilizar a lipofectamina quanto a nucleofecção. Os sistemas de entrega de genes mediados por vírus estão entre os mais escolhidos devido a sua alta eficiência, porém exigem laboratórios com nível de segurança superior e podem integrar também genes do vírus no genoma, causando mutagênese e resposta imunogênica anormal (KIM et al., 2010; WANG et al., 2013). Neste trabalho, a transfecção com lipofectamina 3000 e a nucleofecção foram selecionadas, a princípio, por serem fáceis, rápidas e não exigirem um laboratório com nível de segurança superior. Vale frisar também que a nucleofecção apresenta taxas de eficiência semelhantes a transfecção viral.

A transfecção com lipofectamina, em conformidade com o descrito na literatura, é um sistema de *delivery* de baixa eficiência (HAN et al., 2015). Em consonância, a eficiência com o plasmídeo vetor controle para a expressão transiente de GFP gerou a taxa máxima de transfecção de 29,5% para a linhagem celular A549. Essa eficiência reduzida se deve ao fato do mecanismo de entrega desta técnica: as micelas de DNA ou RNA (carregado negativamente) com a lipofectamina (carregada positivamente). Essas micelas formadas são endocitadas através de interações não-específicas com os proteoglicanos das células das células aderentes (MILLER, 2003). Posto que a técnica de CRISPR exige a entrega do plasmídeo no núcleo, por não se tratar de um RNAm, torna-se compreensível a reduzida eficiência de transfecção encontrada com o uso do plasmídeo pSpCas9, no qual a eficiência máxima foi de 2,8 % para a linhagem A549.

Contudo, esperava-se que a nucleofecção superasse os entraves da técnica com lipofectamina, dado que se trata de uma técnica de transfecção baseada na eletroporação com reagentes e voltagens específicas para cada tipo celular que garantem a entrega do material genético até o núcleo (ALUIGI et al., 2006). Esta garantia de entrega direta no núcleo com reduzida toxicidade representa ganhos em eficiência desta técnica de transfecção para edição gênica por CRISPR, com eficiência comparável à viral (CHICAYBAM et al., 2016; PETIT et al., 2013; RAN et al., 2013). No entanto, não foi observado nenhum ganho de eficiência em nosso modelo.

A despeito da baixa eficiência de transfecção, foi possível estabelecer células A549 e LL2/LC1 KO para a Pcyt2 de forma perene, no entanto, as células perderam a fluorescência do gene repórter rapidamente. Juntos, estes dados podem explicar a baixa eficiência das transfecções pelos dois métodos estudados. A princípio, suspeitávamos que o KO para a Pcyt2 nestas linhagens celulares poderia ser inviável, porém ao estabelecê-lo, é possível que as taxas de transfecção fossem superiores ao indicado pelo gene repórter dado a alterações pós-translacionais ou sua expressão pode ter ocorrido em níveis tóxicos. Este tipo de entrave pode ocorrer pois o GFP requer oxigênio para catalisar a ciclização da forma pós-translacional da proteína fluorescente, o que pode estar comprometido em células com alta demanda de energética como as tumorais ou em células com alterações mitocôndrias como as que ocorrem na ausência de PE (HEIM, PRASHER, TSIEN, 1994). Outra possível explicação é que as células transfectadas produziram tanto GFP que levou ao acúmulo em níveis tóxicos (HAUTEFORT et al., 2003), que levaria a morte de parte das células transfectadas e apenas as com baixa expressão de GFP sobreviveriam.

Após a obtenção das células A549 e LL2/LC1 KO, iniciamos os ensaios de citotoxicidade, que confirmou a ausência da expressão de Pcyt2 pela célula KO, dado que esta foi mais resistente à meclizina que a célula WT e mais sensível à inibição do transporte de etanolamina pelo DL-1-amino-2-propanol. A maior sensibilidade à inibição do transporte de etanolamina deve-se ao fato da PE, na célula KO, apenas ser produzida por uma via minoritária, que também é prejudicada pela redução do aporte de etanolamina pela célula (BREMER et al., 1960). A linhagem LL2/LC1 mostrou-se mais sensível que a A549 à cisplatina, meclizina e ao DL-1-amino-2-propanol. No entanto, ambas respondem de forma semelhante ao composto em teste SF2. Já a linhagem de fibroblasto mostrou-se mais resistente ao DL-1-amino-2-propanol, a cisplatina e ao SF2. Estes dados indicaram uma tendência do DL-1-amino-2-propanol e do SF2 serem mais tóxicos para células tumorais. É importante também ressaltar os dados indicativos de segurança *in vitro*. Ainda que sejam resultados insipientes, a segurança dos fármacos já utilizados na clínica foi confirmada pela resistência dos fibroblastos a cisplatina e a meclizina. O DL-1-amino-2-propanol mostrou

citotoxicidade aos fibroblastos, o que é um importante indicativo de baixa tolerância.

Vale ressaltar ainda que, conforme o mostrado pelos dados da curva de crescimento, a presença de etanolamina em células com a expressão da Pcyt2 é capaz de impulsionar a sua proliferação, dado ao aumento da produção de PE, uma vez que as células KO apresentavam uma redução do crescimento logarítmico precoce e não eram afetadas pela suplementação com etanolamina. Estes dados só confirmam a importância da PE na citocinese e o desenvolvimento tumoral (EMOTO et al., 1996). É importante ressaltar que muitas células epiteliais de mamíferos, incluindo as de pulmão, tem alta demanda de etanolamina para a síntese de PE durante sua proliferação, e, caso o suprimento de etanolamina seja insuficiente, ainda há aumento da descarboxilação da fosfatidilserina para suprir esta demanda (KANO-SUEOKA; KING, 1981). As células epiteliais intestinais IPEC-1, apresentam comportamento semelhante ao observado nas células A549 e as LL2/LC1, com proliferação aumentada quando cultivadas com suplementação de etanolamina 100 ou 200  $\mu\text{M}$ , porém as concentrações superiores a 500  $\mu\text{M}$  são tóxicas (YANG et al., 2016). Ademais, do papel da etanolamina na síntese de PE, a etanolamina regula a função de receptores de EGF (YANG et al., 2016), que ativam os receptores de mTOR, proteína que controla proliferação, crescimento, diferenciação e metabolismo celular (EKIM et al., 2011; SENGUPTA et al., 2010; SOBOLEWSKA et al., 2009; XIANG et al., 2011).

É interessante observar ainda que as células KO não apresentaram alteração em sua resistência à cisplatina e ao SF2 no ensaio de citotoxicidade. Ainda, apesar dos tratamentos com a meclizina e o SF2 ou a privação de soro inibirem o crescimento de colônias nas células que expressam Pcyt2, o crescimento das colônias das células KO não foi afetado por nenhuma das condições avaliadas. A cisplatina é um antitumoral clássico capaz de intercalar-se nas bases purínicas do DNA em células com o DNA frouxo, ou seja, em divisão celular, causando danos e consequente morte celular (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Dado que as células KO, mostraram-se, nos ensaios de ciclo celular e de *Western blotting*, paradas em G0/G1, fica claro que a

proliferação destas células está estacionada e a ação de fármacos que dependam da proliferação celular ficam comprometidos.

Os eucariotos contam com diversos mecanismos para monitorar e responder a perturbações celulares, assim, a célula para sua progressão natural do ciclo celular a fim de proteger-se de danos ao seu material genético até que a perturbação se cesse. Dentre os sensores de danos celulares, a proteína p53 media o *checkpoint* induzido por danos ao DNA, ativando através de sua forma fosforilada (p-p53), proteínas e genes inibitórios do crescimento celular ou até apoptóticos, dentre esses, a p21 (WANG; PRIVES, 1995; RONINSON, 2002). A p21, ao ser ativada pela p-p53 é capaz de suprimir tumores e promover parada do ciclo celular nas fases G0/G1 por se ligar a ciclina E2 e interagir com a CDK2, rompendo a interação ciclina-CDK e, conseqüentemente, impossibilitando este complexo de fosforilar a proteína do retinoblastoma (Rb) e a liberação da transcrição de fatores da fase S do ciclo celular, como o fator de transcrição E2F1 (RONINSON 2002). Contudo o aumento de p21 também protege as células da apoptose por fármacos que agem no DNA, dado que estes dependem da maior exposição do DNA que ocorre durante a duplicação celular (WEISS, 2003). Portanto, novamente os dados de *Western blotting* confirmam os dados da curva de crescimento, do ciclo celular e do ensaio clonogênico, que mostram a parada das células KO nas fases G0/G1 do ciclo celular e a redução da proliferação, provavelmente devido ao aumento da expressão de p-p53 e p21 e, conseqüente, redução de pRb. Cumpre ressaltar que o ensaio clonogênico mostra a proliferação total das células ao longo de 10 dias, assim, é possível observar uma proliferação total alta. Todavia, conforme o observado no ensaio da curva de crescimento, este processo proliferativo é retardado na ausência de Pcyt2.

A análise dos mecanismos envolvidos nos efeitos da meclizina, do DL-2-aminopropanol e do SF2 mostraram que o SF2 foi capaz de em 24 h induzir a apoptose de células LL2/LC2 WT, GFP e SCR. A meclizina gerou danos mitocondriais, porém ela e o DL-2-aminopropanol apresentaram efeitos relacionados à apoptose. A linhagem KO, por sua vez, foi mais resistente a apoptose que a célula WT. O modelo tumorigênico também mostrou que as células LL2/LC1 KO induziram a formação de tumores em camundongos, no entanto, elas apresentaram um período de latência maior até o desenvolvimento

do primeiro nódulo. As células LL2/LC1 se mostram um excelente modelo no estudo de câncer de pulmão, porque têm alta capacidade tumorigênica, sendo um dos poucos modelos singênicos de câncer de pulmão (BERTRAM; JANIK, 1980; PAPAGEORGIOU et al., 2000; VAN MOORSEL et al., 1999). Ademais, dados anteriores do grupo mostraram que a linhagem LL2/LC1 sofria apoptose com alterações funcionais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático associado a indução de sinais de morte imunogênica *in vitro* e *in vivo*, quando tratada com potenciais inibidores da Pcyt2 (manuscrito em preparação). Desta forma, nosso grupo tem interesse em compreender melhor o papel da Pcyt2 neste modelo tumoral, pois esse é um importante alvo terapêutico para o tratamento do câncer como sugerem nossos resultados. O grupo também vislumbra compreender melhor o papel da modulação da Pcyt2 na resposta imunológica dos camundongos contra as células LL2/LC1, dado que este é um dos poucos modelos singênicos de câncer de pulmão.

Vale ressaltar que apenas a cisplatina em dose subtóxica combinada com a meclizina foram capazes de reduzir o crescimento dos tumores com Pcyt2 selvagens. No entanto, os tumores de células KO foram sensíveis apenas à cisplatina. Juntos, estes resultados apontam que a meclizina, nas concentrações testadas, não apresentou toxicidade para os animais e nem efeitos antitumorais no modelo de LL2/LC1, porém, a sua combinação com a concentrações subtóxicas de cisplatina foi tão eficiente quanto o uso da cisplatina em monoterapia em concentrações maiores. O SF2 também não apresentou interessantes efeitos antitumorais e na concentração testada e induziu anemia e linfopenia nos animais, doses superiores podem causar efeitos tóxicos consideráveis. Já o uso de um inibidor do transporte de etanolamina, o DL-2-amino-1-propanol, não mostrou efeitos interessantes *in vivo* e levou a um quadro de anemia e linfopenia nos animais, fator que limita o teste de doses superiores. Portanto os inibidores da Pcyt2, apesar de induzirem morte celular *in vitro*, não apresentaram efeitos antitumorais *in vivo*, porém podem ser interessantes potencializadores dos efeitos de outros agentes antitumorais como a cisplatina. Nossos resultados sugerem que os inibidores da Pcyt2, apesar de induzirem morte celular *in vitro*, não apresentaram efeitos antitumorais *in vivo*. Esse fato pode estar relacionado a farmacocinética dos compostos quando testados *in*



*vivo*. A estrutura desses compostos pode ser modificada para melhorar a farmacocinética, considerando seu potencial antitumoral é evidente. Além desses aspectos, esses inibidores têm potencial como possíveis potencializadores de outros agentes antitumorais, como a cisplatina.

## 6 CONCLUSÕES

Em resumo, podemos afirmar que:

- A inibição farmacológica da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina reduziu a viabilidade celular das células A549, LL2/LC1 e MRC5;
- As células de fibroblasto MRC5 foram menos sensíveis a inibição da enzima Pcyt2 e do transporte de etanolamina do que as células tumorais A549 e LL2/LC1;
- As células A549 e LL2/LC1 KO para a enzima Pcyt2 apresentaram redução de sua proliferação devido a parada em G0/G1 induzida por redução da proteína Rb fosforilada, através da ação da p21 e da p53 fosforilada;
- As células A549 e LL2/LC1 aumentaram sua taxa de proliferação quando cultivadas em meio suplementado com etanolamina;
- A inibição da enzima Pcyt2 nas células LL2/LC1 induziu danos mitocondriais não associados a indução de apoptose;
- As células LL2/LC1 KO são menos tumorigênicas do que as células WT;

Portanto, podemos concluir que a inibição da Pcyt2 e o transporte de etanolamina nas células de CPCNP A549 e LL2/LC1 apresenta efeitos citostáticos mais proeminentes do que os citotóxicos. Desta forma, estes alvos devem ser melhor estudados quanto aos seus efeitos citostáticos ou em combinação com agentes citotóxicos.

**REFERÊNCIAS\***

- ALBERG, A.J.; BROCK, M.V.; SAMET, J.M. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. **J Clin Oncol.**, v. 23, n. 14, p. 3175-3185, 2005.
- ALUIGI, M.; FOGLI, M.; CURTI, A.; ISIDORI, A. et al. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells.**, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2006.
- ARAUJO, L.H.; BALDOTTO, C.; CASTRO, G. JR.; KATZ, A. et al. Lung cancer in Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 44, n.1, p. 55-64, 2018.
- BASU, P.; ALIBHAI, F.J.; TSIMAKOURIDZE, E.V.; SINGH, R.K. et al. Male-Specific Cardiac Dysfunction in CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcvt2)-Deficient Mice. **Mol Cell Biol.**, v. 35, n. 15, p. 2641-2657, 2015.
- BERTOLINI, F., SUKHATME, V.P.; BOUCHE, G. Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 732-742, 2015.
- BERTRAM, J.S.; JANIK, P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture. **Cancer Lett.**, v. 11, n. 1, p. 63-73, 1980.
- BLEIJERVELD, O.B.; BROUWERS, J.F.; VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B. et al. The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 39, p. 28362-28372, 2007.
- BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. **Mutat Res.**, v. 608, n. 2, p. 157-162, 2006.
- BOING, A.F.; ROSSI, T.F. Temporal trend in and spatial distribution of lung cancer mortality in Brazil between 1979 and 2004: magnitude, regional patterns, and gender-related differences. **J Bras Pneumol.**, v. 33, n. 5, p. 544-551, 2007.
- BORTHWICK, D.W.; SHAHBAZIAN, M.; KRANTZ, Q.T.; DORIN, J.R.; et al. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 24, n. 6, p. 662-670, 2001.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BREMER, J.; FIGARD, P.H.; GREENBERG, D.M. The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism. **Biochim Biophys Acta.**, v. 43, p. 477-488, 1960.
- BOLOKER, G.; WANG, C.; ZHANG, J. Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States (2018). **J Thorac Dis.**, v. 10, n. 3, p. 1158-1161, 2018.
- CATALDO, J.K.; DUBEY, S.; PROCHASKA, J.J. Smoking cessation: an integral part of lung cancer treatment. **Oncology**, v. 78, n. 5-6, p. 289-301, 2010.

CHANG, J.W.; ASAMURA, H.; KAWACHI, R.; WATANABE, S. Gender difference in survival of resected non-small cell lung cancer: histology-related phenomenon? **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v. 137, n. 4, p. 807-812, 2009.

CHARLOUX, A.; QUOIX, E.; WOLKOVE, N.; SMALL, D. et al. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. **Int J Epidemiol.**, v. 26, n. 1, p. 14-23, 1997.

CHICAYBAM, L.; BARCELOS, C.; PEIXOTO, B.; CARNEIRO, M. et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 4, n. 99, 2017.

CHIDLEY, C.; TRAUGER, S.A.; BIRSOY, K.; O'SHEA, E.K. The anticancer natural product ophiobolin A induces cytotoxicity by covalent modification of phosphatidylethanolamine. **Elife.**, v. 5, p. pii: e14601, 2016.

CLEARY, E.G.; BEIERLEIN, J.M.; KHANUJA, N.S.; MCNAMEE, L.M. et al. Contribution of NIH funding to new drug approvals 2010-2016. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 115, n. 10, p. 2329-2334, 2018.

COHEN, B.; DEJONG, J.M. Meclizine and placebo in treating vertigo of vestibular origin. Relative efficacy in a double-blind study. **Arch Neurol.**, v. 27, n. 2, p. 129-135, 1972.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol.**, v. 740, p. 364-78, 2014.

DAVIDSON, M.R.; GAZDAR, A.F.; CLARKE, B.E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **J Thorac Dis.**, v. Suppl 5, p. S463-S478, 2013.

DENG, X.; NAKAMURA, Y. Cancer Precision Medicine: From Cancer Screening to Drug Selection and Personalized Immunotherapy. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 38, n. 1, p. 15-24, 2017.

DE RYCKER, M.; BARAGAÑA, B.; DUCE, S.L.; GILBERT, I.H. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498-506, 2018.

DE SÁ, V.K.; COELHO, J.C.; CAPELOZZI, V.L.; DE AZEVEDO, S.J. Lung cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer (Auckl).**, v. 14, n. 7, p. 141-148, 2016.

DOBDELSTEIN, M.; MOLL, U. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 13, n. 3, p. 179-196, 2014.

EKIM, B.; MAGNUSON, B.; ACOSTA-JAQUEZ, H.A.; KELLER, J.A. et al. mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. **Mol Cell Biol.**, v. 31, n. 14, p. 2787-2801, 2011.

EMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; YAMAJI, A.; AIZAWA, H. et al. Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, n. 23, p. 12867-1272, 1996.

EMOTO, K.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; KARASUYAMA, H.; INOUE, K. et al. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. **Exp Cell Res.**, v. 232, p. 430-434, 1997.

EMOTO, K.; UMEDA, M. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. **J Cell Biol.**, v. 149, p. 1215-1224, 2000.

ETTINGER, D.S.; AISNER, D.L.; WOOD, D.E.; AKERLEY, W. et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. **J Natl Compr Canc Netw.**, v. 16, n. 7, p. 807-821, 2018.

<sup>a</sup> FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F.L.; RADIN, A. et al. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomed Pharmacother.**, v. 66, n. 7, p. 541-548, 2012.

<sup>b</sup> FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; MENDONÇA FILHO, O. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 1, p. 95-104, 2012.

FERREIRA, A.K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; FILHO, O.M. et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomed Pharmacother.**, v. 67, n. 6, p. 481-487, 2013.

GARON, E.B.; RIZVI, N.A.; HUI, R.; LEIGHL, N. et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, v. 372, n. 21, p. 2018-20, 2015.

GIBELLINI, F.; SMITH, T.K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 414-428, 2010.

GIBBS, J.B. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1969-1973, 2000.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2017 CAUSES OF DEATH COLLABORATORS (GBD 2017). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, 2018.

GOHIL, V. M.; OFFNER, N.; WALKER, J.A.; SHETH, S.A.; FOSSALE, E.; GUSELLA, J.F.; MACDONALD, M.E.; NERI, C.; MOOTHA, V. K. Meclozine is neuroprotective in models of Huntington's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 20, n. 2, p. 294-300, 2011.

GOHIL, V.M.; SHETH, S.A.; NILSSON, R.; WOJTOVICH, A.P.; LEE J. H., PEROCCHI F., CHEN W., CLISH C. B., AYATA C., BROOKES P. S., MOOTHA V. K. (2010) Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, n. 3, p. 249-255, 2010.

GOHIL, V.M.; ZHU, L.; BAKER, C.D.; CRACAN, V. et al. Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 49, p. 35387-35395, 2013.

GOTWALS, P.; CAMERON, S.; CIPOLLETTA, D.; CREMASCO, V. et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 5, p. 286-301, 2017.

GRASSL, S.M. Ethanolamine transport in human placental brush-border membrane vesicles. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 298, n. 2, p. 695-702, 2001.

HAN, N.R.; LEE, H.; BAEK, S.; YUN, J.I. et al. Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 461, n. 2, p. 348-353, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANNA, N.; JOHNSON, D.; TEMIN, S.; MASTERS, G. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. **J Oncol Pract.**, v. 13, n. 12, p. 832-837, 2017.

HAUTEFORT, I.; PROENÇA, M.J.; HINTON, J.C.D. Single-Copy Green Fluorescent Protein Gene Fusions Allow Accurate Measurement of Salmonella Gene Expression In Vitro and during Infection of Mammalian Cells. **Appl Environ Microbiol.**, v. 69, n. 12, p. 7480-7491, 2003.

HEIM, R.; PRASHER, D.C.; TSIEN, R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 26, p. 12501-12504, 1994.

HO, J.; MCWILLIAMS, A.; EMERY, J.; SAUNDERS, C. et al. Integrated care for resected early stage lung cancer: innovations and exploring patient needs. **BMJ Open Respir Res.**, v. 4, n. 1, p. e000175, 2017.

HONG, C.T.; CHAU, K.Y.; SCHAPIRA, A.H. Meclizine-induced enhanced glycolysis is neuroprotective in Parkinson disease cell models. **Sci Rep.**, v. 6, p. 25344, 2016.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **Int J Mol Sci.**, v. 16, n. 1, p. 924-949, 2015.

IGAL, R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1509-1515., 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2017. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 07, ago, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2014. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 07, ago, 2018.

IORIO, E.; RICCI, A.; BAGNOLI, M.; PISANU, M.E. et al. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. **Cancer Res.** v.70, n. 5, p. 2126-2135, 2010.

JACKSON, E.L.; WILLIS, N.; MERCER, K.; BRONSON, R.T. et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. **Genes Dev.**, v. 15, n. 24, p. 3243-3248, 2001.

JANSEN, R.; EMBDEN, J.D.; GAASTRA, W.; SCHOULS, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Mol Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.

JANSSEN-HEIJNEN, M.L.; COEBERGH, J.W. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. **Lung Cancer**, v. 31, n. 2-3, p. 123-137, 2001.

KAELIN, W.G. JR. Common pitfalls in preclinical cancer target validation. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 7, p.425-440, 2017.

KANO-SUEOKA, T.; KING, D.M. Phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat mammary carcinoma cells that require and do not require ethanolamine for proliferation. **J Biol Chem.**, v. 262, n. 13, p. 6074-6081, 1987.

KECKESOVA, Z.; DONAHER, J.L.; DE COCK, J.; FREINKMAN, E. et al. LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state. **Nature**, v. 543, n. 7647, p. 681-686, 2017.

KIM, C.F.; JACKSON, E.L.; WOOLFENDEN, A.E.; LAWRENCE, S. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. **Cell**, v. 121, n. 6, p.823-835, 2005.

KIM, T.K.; EBERWINE, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem.**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 2010.

KISHI, S.; CAMPANHOLLE, G; GOHIL, V.M.; PEROCCHI, F.; BROOKS, C.R.; MORIZANE, R.; SABBISSETTI, V.; ICHIMURA, T.; MOOTHA, V.K.; BONVENTRE, J.V. Meclizine Preconditioning Protects the Kidney Against Ischemia-Reperfusion Injury. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1090-1101, 2015.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 4, n.3, p. 206-220, 2005.

KUMAR, B.; SINGH, S.; SKVORTSOVA, I.I.; KUMAR, V. Promising Targets in Anti-cancer Drug Development: Recent Updates. **Curr Med Chem.**, v. 24, n. 42, 4729-4752, 2017.

LAMB, C.A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 12, p. 759-774, 2013.

LEVY, D.; DE ALMEIDA, L.M.; SZKLO, A. The Brazil SimSmoke policy simulation model: the effect of strong tobacco control policies on smoking prevalence and smoking-attributable deaths in a middle income nation. **PLoS Med.**, v. 9, n. 11, p. e1001336, 2012.

LI, J.; QI, W.; CHEN, G.; FENG, D. et al. Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. **Autophagy.**, v. 11, n. 8, p. 1216-1229, 2015.

MAMBELLI, L.I.; TEIXEIRA, S.F.; JORGE, S.D.; KAWAMURA, B. et al. Phosphoethanolamine induces caspase-independent cell death by reducing the expression of C-RAF and inhibits tumor growth in human melanoma model. **Biomed Pharmacother.**, v. 103, p. 18-28, 2018.

MARIEN, E.; MEISTER, M.; MULEY, T.; FIEUWS, S. et al. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. **Int J Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1539-1548, 2015.

MARINO, R.; BAIU, D.C.; BHATTACHARYA, S.; TITZ, B. et al. Tumor-selective anti-cancer effects of the synthetic alkyl phosphocholine analog CLR1404 in neuroblastoma. **Am J Cancer Res.**, v. 5, n. 11, p. 3422-3435, 2015.

MAXMEN, A. Busting the billion-dollar myth: how to slash the cost of drug development. **Nature**, v. 536, p. 388-390, 2016.

MENENDEZ, J.A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 10, p. 763-777, 2007.

MEUWISSEN, R.; LINN, S.C.; LINNOILA, R.I.; ZEVENHOVEN, J., et al. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2013.

MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. **Curr Opin Microbiol.**, v. 8, n. 2, p. 135-142, 2005.

MILLER, A.D. The problem with cationic liposome/micelle-based non-viral vector systems for gene therapy. **Curr Med Chem.**, v. 10, n. 14, p. 1195-1211, 2003.

MOHS, R.C.; GREIG, N.H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimers Dement.**, v. 3, n. 4, p. 651-657, 2017.

NATIONAL LUNG SCREENING TRIAL RESEARCH TEAM (NLSTRT), ABERLE, D.R.; ADAMS, A.M.; BERG, C.D. et al. Reduced lung-cancer mortality with low-



dose computed tomographic screening. **N Engl J Med.**, v. 365, n. 5, p. 395-409, 2011.

OVERINGTON, J.P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A.L. How many drug targets are there? **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, n. 12, p. 993-996, 2006.

PAPAGEORGIU, A.; STRAVORAVDI, P.; SAHPAZIDOU, D.; NATSIS, K. et al. Effect of navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. **Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 188-194, 2000.

PASIC, A.; POSTMUS, P.E.; SUTEDJA, T.G. What is early lung cancer? A review of the literature. **Lung Cancer**, v. 45, n. 3, p. 267-277, 2004.

PAVLOVIC, Z.; BAKOVIC, M. Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis - The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidyltransferase (Pcyt2). **Int J Mol Sci.**, v. 14, n. 2, p. 2529-2550, 2013.

PENG, R.; LIN, G.; LI, J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **FEBS J.**, v. 283, n. 7, p. 1218-1231, 2016.

PETIT, C.S.; ROCZNIAK-FERGUSON, A.; FERGUSON, S.M. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. **J Cell Biol.**, v. 202, n. 7, p. 1107-1122, 2013.

PLANCHARD, D.; POPAT, S.; KERR, K.; NOVELLO, S. et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, v. 30, n. 5, p. 863-870, 2019.

QUINN, P.J. A lipid matrix model of membrane raft structure. **Prog Lipid Res.**, v. 49, n. 4, p. 390-406, 2010.

RAN, F.A.; HSU, P.D.; LIN, C.Y.; GOOTENBERG, J.S. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, 2013.

REHMAN, J.; ZHANG, H.J.; TOTH, P.T.; ZHANG, Y. et al. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. **FASEB J.**, v. 26, n. 5, p. 2175-2186, 2012.

RIFKIN, M.R.; STROBOS, C.A.; FAIRLAMB, A.H. Specificity of ethanolamine transport and its further metabolism in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 27, p. 16160-16166, 1995.

ROCKENFELLER, P.; KOSKA, M.; PIETROCOLA, F.; MINOIS, N. et al. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. **Cell Death Differ.**, v. 22, n. 3, p. 499-508, 2015.

RONINSON, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Lett.**, v. 179, n. 1, p. 1-14, 2002.

ROTHMAN, J.E.; LENARD, J. Membrane asymmetry. **Science**, v. 195, n. 4280, p. 743-53, 1977.

ROY, S.; TRINCHIERI, G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 5, p. 271-285, 2017.

RYSMAN, E.; BRUSSELMANS, K.; SCHEYS, K.; TIMMERMANS, L. et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res.**, v. 70, n. 20, p. 8117-8126, 2010.

SAITO, S.; ESPINOZA-MERCADO, F.; LIU, H.; SATA, N. et al. Current status of research and treatment for non-small cell lung cancer in never-smoking females. **Cancer Biol Ther.**, v. 18, n. 6, p. 359-368, 2017.

SAMET, J.M.; AVILA-TANG, E.; BOFFETTA, P.; HANNAN, L.M. et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. **Clin Cancer Res.**, v. 15, n. 18, p. 5626-5645, 2009.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 294-297, 2004.

SENGUPTA, S.; PETERSON, T.R.; SABATINI, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Mol Cell.**, v. 40, n. 2, p. 310-322, 2010.

SCAGLIOTTI, G.; BRODOWICZ, T.; SHEPHERD, F.A.; ZIELINSKI, C. et al. Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol.**, v. 6, n. 1, p. 64-70, 2011.

SCOTT, K.F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J.; NIXDORF, S. et al. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 601-610, 2010.

SEQUIST, L.V.; MARTINS, R.G.; SPIGEL, D.; GRUNBERG, S.M. et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. **J Clin Oncol.**, v. 26, n. 15, p. 2442-2449, 2008.

SGAMBATO, A.; CASALUCE, F.; MAIONE, P.; GRIDELLI, C. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: a focus on ALK/ROS1 tyrosine kinase inhibitors. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2018.

SIGNORELL, A.; GLUENZ, E.; RETTIG, J.; SCHNEIDER, A. et al. Perturbation of phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial morphology and cell-cycle progression in procyclic-form *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol.**, v. 72, n. 4, p. 1068-1079, 2009.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SINGH, R.K.; FULLERTON, M.D.; VINE, D.; BAKOVIC, M. Mechanism of hypertriglyceridemia in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice. **J Lipid Res.**, v. 53, n. 9, n. 1811-1822, 2012.

SOBOLEWSKA, A.; GAJEWSKA, M.; ZARZYŃSKA, J.; GAJKOWSKA, B. et al. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. **Eur J Cell Biol.**, v. 88, n. 2, p. 117-130, 2009.

STERNBERG, S.H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E.C. et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, 62-67, 2014.

SUNDLER, R.; AKESSON, B. Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes—effect of different substrates. **J Biol Chem.**, v. 250, p. 3359-3367, 1975.

SWINNEN, J.V.; VAN VELDHoven, P.P.; TIMMERMANS, L.; DE SCHRIJVER, E. et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 302, n. 4, p. 898-903, 2003.

TEIXEIRA, S. F.; GUIMARÃES, I. S. ; MADEIRA, K.P. ; DALTOÉ, R.D. et al. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. **J Bras Pneumol.**, v. 39, n. 6, p. 644-649, 2013.

TEIXEIRA, S.F.; DE AZEVEDO, R.A.; SALOMON, M.A.; JORGE, S.D. et al. Synergistic anti-tumor effects of the combination of a benzofuroxan derivate and sorafenib on NCI-H460 human large cell lung carcinoma cells. **Biomed Pharmacother.**, v. 68, n. 8, p. 1015-1022, 2014.

TEIXEIRA, S. F.; DE AZEVEDO, R.A.; SILVA, A.C.; BRAGA, R.C. et al. Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. **Biomed Pharmacother.**, v. 84, p. 1019-1028, 2016.

TEIXEIRA, S.F.; RODRIGUES, C.P.; COSTA, C.J.S.; PETTINATI, T.N. et al. Edelfosine: an antitumor drug prototype. **Anticancer Agents Med Chem.**, 2018. [*Epub ahead of print*]

THOMAS, A.; LIU, S.V.; SUBRAMANIAM, D.S.; GIACCONE, G. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 12, n. 9, p. 511-526, 2015.

TRAVIS, W.D.; BRAMBILLA, E.; RIELY, G.J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. **J Clin Oncol.**, n. 31, v. 8, p. 992-1001, 2013.

TRAVIS, W.D. Pathology of lung cancer. **Clin Chest Med.**, v. 32, n. 4, p. 669-692, 2011.

TSUKAZAN, M.T.R.; VIGO, Á.; SILVA, V.D.D.; BARRIOS, C.H. et al. Lung cancer: changes in histology, gender, and age over the last 30 years in Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 43, n. 5, p. 363-367, 2017.

VALENZUELA-OSES, J.K.; GARCÍA, M.C.; FEITOSA, V.A.; PACHIONI-VASCONCELOS, J.A. et al. Development and characterization of miltefosine-

loaded polymeric micelles for cancer treatment. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 81, p. 327-333, 2017.

VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res.**, v. 49, n. 7, p. 1377-1387, 2008.

VANCE, J.E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1831, n. 3, p. 543-554, 2013.

VAN MOORSEL, C.J.; PINEDO, H.M.; VEERMAN, G.; VERMORKEN, J.B. et al. Scheduling of gemcitabine and cisplatin in Lewis lung tumour bearing mice. **Eur J Cancer.**, v. 35, n. 5, p. 808-814, 1999.

VANSTEENKISTE, J.; DE RUYSSCHER, D.; EBERHARDT, W.E.; LIM, E.; SENAN, S. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, v. 24, n. Suppl 6, p. vi89-vi98, 2013.

VOKES, E.E.; READY, N.; FELIP, E.; HORN, L. et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 017 and CheckMate 057): 3-year update and outcomes in patients with liver metastases. **Ann Oncol.** v. 29, n. 4, p. 959-965, 2018.

WANG, T.; WARREN, S.T.; JIN, P. Toward pluripotency by reprogramming: mechanisms and application. **Protein Cell.**, v. 4, n. 11, pp. 820-832, 2013.

WANG, Y.; PRIVES, C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. **Nature**, v. 376, n. 6535, p. 88-91, 1995.

WAQAR, S.N.; MORGENZTERN, D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). **Pharmacol Ther.**, v. 180, p. 16-23, 2017.

WEERTS, A.P.; PATTYN, N.; VAN DE HEYNING, P.H.; WUYTS, F.L. Evaluation of the effects of anti-motion sickness drugs on subjective sleepiness and cognitive performance of healthy males. **J Psychopharmacol.**, v. 28, n. 7, p. 655-664, 2014.

WEICHERT, J.P.; CLARK, P.A.; KANDELA, I.K.; VACCARO, A.M. et al. Alkylphosphocholine analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy. **Sci Transl Med.**, v. 6, n. 240, p. 240ra75, 2014.

WEISS, R.H. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 425-429, 2003.

WISTUBA, I.I.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. **Semin Oncol.**, v. 28, n. 2, suppl 4, p. 3-13, 2001.

WOOD, D.E.; KAZEROONI, E.A.; BAUM, S.L.; EAPEN, G.A. et al. Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw.** v. 16, n. 4, p. 412-441, 2018.

XIANG, X.; ZHAO, J.; XU, G.; LI, Y. et al. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).**, v. 43, n. 7, p. 501-510, 2011.

YANG, H.; XIONG, X.; LI, T.; YIN, Y. Ethanolamine enhances the proliferation of intestinal epithelial cells via the mTOR signaling pathway and mitochondrial function. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 52, n. 5, p. 562-567, 2016.

YANO, T.; HARO, A.; SHIKADA, Y.; MARUYAMA, R. et al. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. **Int J Clin Oncol.**, v. 16, n. 4, p. 287-293, 2011.


YOREK, M.A.; ROSARIO, R.T.; DUDLEY, D.T.; SPECTOR, A.A. The utilization of ethanolamine and serine for ethanolamine phosphoglyceride synthesis by human Y79 retinoblastoma cells. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 5, p. 2930-2936, 1985.

ZELINSKI, T.A.; CHOY, P.C. Phosphatidylethanolamine biosynthesis in isolated hamster heart. **Can J Biochem.**, v. 60, n. 8, p. 817-823, 1982.


ZHU, L.; BAKOVIC, M. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase-Pcyt2 activity. **Biochem Cell Biol.**, v. 90, n. 2, p. 188-199, 2012.

ZHUO, M.; GORGUN, M.F.; ENGLANDER, E.W. Augmentation of glycolytic metabolism by meclizine is indispensable for protection of dorsal root ganglion neurons from hypoxia-induced mitochondrial compromise. **Free Radic Biol Med.**, v. 99, p. 20-31, 2016.

## ANEXO A

ENVIO DE CÉLULAS ADERENTES		
	FOR.PR.008.1	REVISÃO 03
PÁGINA 1/1		
<b>DADOS DA CULTURA ENVIADA</b>		
OS: C.3917.17		
Célula: A549	Código BCRJ: 0033	
Lote: 001317	Passagem: 90	Nível de Biossegurança: 1
<b>CONTROLE DE QUALIDADE</b>		
Teste microbiológico: Negativo		
Teste para avaliação da presença de micoplasma: Negativo		
<p>Para maiores informações sobre o cultivo dessas células, consulte a ficha de dados (Data Sheet) em nosso site (<a href="http://www.bcrj.org.br">www.bcrj.org.br</a>). Essa ficha foi enviada ao seu e-mail quando informamos sobre a entrega das células.</p>		
<b>DADOS DO TRANSPORTE</b>		
Data de saída: 08/03/2017	Validade do transporte: 11/03/2017	Apresentação: Garrafa de 25 cm <sup>2</sup>
Meio de transporte: RPMI 1640 com Soro Fetal Bovino 5 %		
<b>PROCEDIMENTOS NECESSÁRIOS AO RECEBER A CULTURA</b>		
<p>Ao receber as células, o operador deve fazer uma avaliação da garrafa por visualização a olho nu. Turvação do meio de cultivo pode indicar presença de agentes contaminantes. Se isto ocorrer, entre em contato o mais breve possível com o BCRJ. No microscópio invertido deve-se avaliar as condições da cultura. Se possível, antes de qualquer procedimento recomenda-se que as células sejam colocadas na estufa para repouso por 1 a 2 horas.</p> <p>É possível que algumas linhagens celulares aderentes apresentem a não adesão da monocamada devido aos procedimentos de transporte. Caso isso ocorra, o cliente deve dissociar mecanicamente os grumos celulares, centrifugar e refazer o plaqueamento em outra garrafa que ficará na estufa por 1 – 2 horas e verificar a adesão e posterior proliferação.</p> <p>Após este período, proceder a tripsinização ou troca do meio. No caso de troca do meio, como a tampa encontra-se molhada, recomenda-se a substituição da tampa a fim de evitar contaminações. <b>Não utilizar o meio de envio no cultivo, este meio é somente para o transporte da célula.</b></p> <p>O BCRJ prepara e mantém uma contraprova da cultura por aproximadamente 15 dias úteis para qualquer eventualidade que venha ocorrer com a cultura enviada. Em caso de perda da cultura, o cliente pode requisitar esta contraprova que será entregue apenas com o custo de frete.</p> <p>No caso de qualquer dúvida, favor entrar em contato com o Banco de Células.</p>		
<b>Observações:</b>		
<hr/>		
<hr/>		
<hr/>		
<hr/>		

## ANEXO B

		BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO	
ENVIO DE CÉLULAS ADERENTES		FOR PR 008.1	
REVISÃO: 01		PÁGINA: 1/1	

DADOS DA CULTURA ENVIADA			
OS.C.3333.15			
Célula: LL/2 (LLC1)		Código BCRJ: 0145	
Lote: 000623	Passagem: desconhecida	Nível de Biossegurança: 1	
CONTROLE DE QUALIDADE:			
Teste microbiológico: Negativo			
Teste para avaliação da presença de micoplasma: Negativo			
Para maiores informações sobre o cultivo dessas células, consulte a ficha de dados (Data Sheet) em nosso site ( <a href="http://www.bcrj.org.br">www.bcrj.org.br</a> ). Esta ficha foi enviada ao seu e-mail quando informamos sobre a entrega das células.			

DADOS DO TRANSPORTE			
Data de saída: 14/09/2015	Validade do transporte: 18/09/2015	Apresentação: Garrafa de 25 cm <sup>2</sup>	
Meio de transporte: RPMI 1640 com 5% Soro Fetal Bovino			

## PROCEDIMENTOS NECESSÁRIOS AO RECEBER A CULTURA:

Ao receber as células, o operador deve fazer uma avaliação da garrafa por visualização a olho nu. Turvação do meio de cultivo pode indicar presença de agentes contaminantes. Se isto ocorrer, entre em contato o mais breve possível com o BCRJ. No microscópio invertido deve-se avaliar as condições da cultura. Se possível, antes de qualquer procedimento recomenda-se que as células sejam colocadas na estufa para repouso por 1 a 2 horas.

É possível que algumas linhagens celulares aderentes apresentem a não adesão da monocamada devido aos procedimentos de transporte. Caso isso ocorra, o cliente deve dissociar mecanicamente os grumos celulares, centrifugar e refazer o plaqueamento em outra garrafa que ficará na estufa por 1 – 2 horas e verificar a adesão e posterior proliferação.

**É normal que esta cultura apresente-se com células aderidas e em suspensão, neste caso deve-se proceder conforme o parágrafo anterior.**

Após este período, proceder a tripsinização ou troca do meio. No caso de troca do meio, como a tampa encontra-se molhada, recomenda-se a substituição da tampa a fim de evitar contaminações. **Não utilizar o meio de envio no cultivo, este meio é somente para o transporte da célula.**

O BCRJ prepara e mantém uma contraprova da cultura por aproximadamente 15 dias úteis para qualquer eventualidade que venha ocorrer com a cultura enviada. Em caso de perda da cultura, o cliente pode requisitar esta contraprova que será entregue apenas com o custo de frete.

No caso de qualquer dúvida, favor entrar em contato com o Banco de Células

Obs: \_\_\_\_\_

Data de liberação: 06/10/2014