

SARAH FERNANDES TEIXEIRA

Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2016

SARAH FERNANDES TEIXEIRA

Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientador: Dr. Adilson Kleber Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Teixeira, Sarah Fernandes.

Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP: fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células / Sarah Fernandes Teixeira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Emer Suavinho Ferro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Oncologia.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor against non-small cell lung cancer..

1. Neoplasias 2. Pulmão 3. Antineoplásicos 4. Imunobiologia I. Ferro, Emer Suavinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0102/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sarah Fernandes Teixeira.

Título da Dissertação: Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP: fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células.

Orientador(a): Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolaminacidiltransferase, sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células*", registrada sob nº 73, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 05/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) **Adilson Kleber Ferreira** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Sarah Fernandes Teixeira, Ricardo Alexandre de Azevedo*. Esta licença de uso de animais expira em 05/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor, against non-small cell lung cancer*", registered as **Number 73**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/5/2015.

Under this license, **Adilson Kleber Ferreira** (Principal Investigator) and team members *Sarah Fernandes Teixeira, Ricardo Alexandre de Azevedo* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/05/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 13 de agosto de 2015.

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

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto do Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo através do projeto financiado pela FAPESP sob o número de processo de 13/07273-2.

A aqueles que acreditaram em mim quando até mesmo eu duvidei e revigoraram minhas forças em todos os momentos: Deus, meus pais, meus amigos, meus irmãos e minha tia Dida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por nunca me abandonar, sempre me concedendo a força e a coragem necessárias para que eu não me apavorasse nem desanimasse.

Aos meus pais, Geraldo e Alveni, e aos meus irmãos, Sérgio e Saulo, por serem os meus exemplos e auxiliarem na formação do meu caráter. Obrigada por sempre me apoiarem e por perdoarem minhas ausências.

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, Luciana, Samyra, Thaynnara, Jefferson, Aline e Rosania), pelo incentivo e a cumplicidade que fazem 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 por tão gentilmente me acolher em seu laboratório e compartilhar sua vivência científica.

Ao Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo por ter me ajudado em todos os momentos, sempre com uma calma celestial, e os muitos conselhos científicos e de vida.

Ao Dr. Salomão Dória Jorge por me ensinar as bases dos estudos *in silico*, pelos os almoços bem-humorados e os auxílios nos experimentos.

À equipe que realizou os estudos *in silico* e a síntese do CHY-1: Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Dra. Liliansa 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.

Ao Dr. Carlos Rogério Figueiredo, por seu auxílio atencioso em diversos experimentos e também pelos importantes ensinamentos acadêmicos e de vida.

Aos colegas de bancada do Laboratório de Imunologia de Tumores, em especial a Ariane, a Aline, o Thiago, a Mariana, o Cícero, a Thais, a Carol, a Karen, a Maria, a Patrícia e a Cecília, por toda ajuda, paciência, ensinamentos e companheirismo.

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

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa (processo FAPESP nº 2014/24455-0) e o financiamento (processo FAPESP nº 2013/07273-2) deste trabalho.

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

“And in the end

The love you take is equal to

The love you make.”

(The Beatles, 1969)

RESUMO

TEIXEIRA, S. F. **Avaliação da atividade do CHY-1, um novo análogo da miltefosina, como potencial inibidor da enzima CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase sobre o carcinoma de pulmão de não-pequenas células.** 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O câncer de pulmão é um dos mais incidentes e letais no Brasil e no mundo, por conseguinte, a busca de novos fármacos a fim de controlá-lo é necessária. Atualmente o desenvolvimento de fármacos conta com abordagens computacionais que otimizam este processo. Dado que a fosfatidiletanolamina (PE) desempenha importantes papéis fisiológicos e apresenta-se aumentada em tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC), fica claro que a PE e suas vias de produção são interessantes novos alvos. Dentre as enzimas envolvidas na síntese de PE, a CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) é frequentemente superexpressa em células neoplásicas, inclusive nas células de pulmão, e é um alvo ainda pouco explorado. Sendo assim, no presente trabalho, foi avaliado o potencial terapêutico do CHY-1, um análogo da miltefosina desenvolvido como inibidor da enzima Pcyt2, e os mecanismos inerentes à sua atividade antitumoral em modelo de CPNPC. Desde os testes iniciais, o CHY-1 apresentou citotoxicidade superior ao seu protótipo, a miltefosina, e, além disso, as células malignas apresentaram-se mais sensíveis ao CHY-1 do que as células não-tumorigênicas. Ademais, quando comparado a outro inibidor da enzima Pcyt2, a meclizina, o CHY-1 também foi superior quanto à atividade citotóxica. Nas células A549 e NCI-H460, a indução de apoptose pelo CHY-1 foi um mecanismo secundário de citotoxicidade, porém, foram evidenciadas alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático das células tratadas, bem como o estabelecimento de um ambiente com acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Nas células LL/2, por sua vez, CHY-1 induziu apoptose com alterações funcionais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático. O CHY-1 ainda é capaz de induzir o aumento da externalização de calreticulina nas células A549 e LL/2, um indicativo de que o CHY-1 gera um dos sinais que pode induzir estas células à morte imunogênica. Em conclusão, o presente trabalho evidencia o potencial do CHY-1 como um inibidor da enzima Pcyt2 e candidato a fármaco com atividade preferencial para CPNPC. Além disso, o CHY-1 é capaz de levar as células A549 e LL/2 à morte imunogênica.

Palavras-chave: Carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC). CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2). Morte imunogênica. Citotoxicidade.

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. F. **Evaluation of the activity of CHY-1, a novel miltefosine analogue, as a potential CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase enzyme inhibitor against non-small cell lung cancer.** 2016. 75 p. Master thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Lung cancer is one of the most incident and lethal cancers in Brazil and all over the world, thus, the pursuit for new drugs to control this disease is necessary. Nowadays, new drugs development has computational tools that improves this process. Once that phosphatidylethanolamine (PE) plays several important physiological roles and it is overexpressed in tumor tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, it is clear that PE and its production pathways are interesting new targets. Among the enzymes of PE production pathway, CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2) is usually overexpressed in tumor cells, included in lung cancer cells, and it remains as an underexplored target. Therefore, this study aimed to evaluate antitumor effects of CHY-1, a miltefosine analogue developed as an inhibitor of Pcyt2 enzyme, and to investigate the mechanisms related to its antitumor action against NSCLC. Initially, CHY-1 had already shown to be more cytotoxicity than its prototype, miltefosine, and malignant cells were more sensitive to CHY-1 effects than non-tumorigenic cells. Furthermore, when compared with another inhibitor of Pcyt2 enzyme, meclizine, CHY-1 had also higher cytotoxic activity. In A549 and NCI-H460 cells, CHY-1 triggers apoptosis as a secondary mechanism of cytotoxicity, although, treated cells have clearly morphological and functional changes on mitochondria and on endoplasmic reticulum, as well as the establishment of an environment of reactive oxygen species accumulation. On the other hand, in LL/2 cells, CHY-1 induced apoptosis with mitochondrial and endoplasmic reticulum changes. CHY-1 also increased calreticulin externalization in A549 and LL/2 cells, an indication that this compound generates signals that may induce immunogenic cell death. In conclusion, this work presents CHY-1 as an inhibitor of Pcyt2 enzyme and new drug candidate with preferential activity on NSCLC cells. Moreover, CHY-1 triggers immunogenic cell death in A549 and LL/2 cells.

Keywords: Non-small cell lung cancer (NSCLC). CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). Immunogenic cell death. Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enunciando o problema

O câncer de pulmão está entre os tipos de tumores malignos de maior incidência no mundo e apresenta uma alta taxa de mortalidade (FERLAY et al., 2013; SIEGEL et al., 2014). No Brasil, o câncer de pulmão foi estimado como o quarto mais incidente, acometendo 27.330 indivíduos em 2014 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2014). Dados obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde mostram que esse tipo de neoplasia maligna foi responsável por 24.490 mortes no ano de 2013 (INCA, 2013). Na verdade, nos últimos anos sua razão mortalidade/incidência tem sido superior a 0,8, mostrando claramente a letalidade desta doença (INCA, 2014). Diante desse cenário, esta doença mantém-se como um desafio à saúde pública nacional e mundial e são necessários esforços no sentido de buscar novas abordagens terapêuticas.

1.2 O câncer de pulmão

Em relação à classificação clínica do câncer de pulmão, apesar da existência de algumas exceções e do comportamento biológico distinto entre os subtipos do mesmo grupo, este é usualmente dividido em carcinoma de pulmão de pequenas células e carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC) (DAVIDSON, GAZDAR; CLARKE, 2013; TRAVIS, BRAMBILLA; RIELY, 2013). O carcinoma de pulmão de pequenas células representa cerca de 14% dos casos de câncer de pulmão e caracteriza-se por sua agressividade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; DAVIDSON, GAZDAR; CLARKE, 2013). Já o CPNPC, representa cerca de 84% dos diagnósticos de câncer de pulmão 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 mais raros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; TRAVIS et al., 2011).

Enquanto o tratamento do carcinoma de células pequenas realiza-se principalmente por quimio e/ou radioterapia, o tratamento do CPNPC (em estágios iniciais) é baseado na cirurgia, incluindo também a radio- e a quimioterapia além de, mais recentemente, as chamadas “terapias-alvo” (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; VANSTEENKISTE et al., 2013). Embora a cirurgia nos estágios iniciais possa ser curativa, 70% dos casos de CPNPC são

diagnosticados já em estádios avançados e, por conseguinte, inoperáveis (VANSTEENKISTE et al., 2013). Nestes casos, preconiza-se a quimioterapia, que é capaz de estender a sobrevida, e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

1.3 Biossíntese dos fosfolipídios

Atualmente, o desenvolvimento de novos fármacos conta com as abordagens computacionais que tornam esta busca racional e otimizam este processo, uma vez que estas abordagens consideram a identificação de alvos que estejam alterados preferencialmente nas células malignas (AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006; DAMIÃO et al., 2014; OVERINGTON; NARANG; DESAI, 2009; PALACEBERL et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2014). Neste contexto os fosfolipídios e as vias de produção destes surgem como um ponto de interesse devido as suas funções celulares e à presença de alterações relacionadas a eles e suas funções no contexto tumoral (IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007; RYSMAN et al., 2010; SCOTT et al., 2010; SWINNEN et al., 2003). Os fosfolipídios são os componentes principais das membranas plasmáticas, sendo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina (PE) os mais abundantes (LI et al., 2006). Ademais, os fosfolipídios também estão relacionados aos processos de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação e motilidade (CULLIS; DE KRIJFF, 1979; HUANG; FRETER, 2015; VANCE; TASSEVA, 2013). Juntos, todos esses processos celulares, apresentam-se alterados e são de extrema importância no desenvolvimento tumoral, desta forma, as vias de produção de fosfolipídios estão aumentadas nas células tumorais e tornam-se alvos em potencial (BRASKY et al., 2013; IGAL, 2010; MENENDEZ; LUPU, 2007).

Dentre os mais abundantes fosfolipídios de membrana celular temos a 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 (VANCE, 2008). Diversas das atividades exercidas por esse fosfolipídio 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). Em células normais, a distribuição dos fosfolipídios de membrana é

assimétrica, sendo mantida por ATPases do tipo P, denominadas amino-fosfolipídios-translocases, que catalisam o transporte de PE e fosfatidilserina do folheto externo membranar para o folheto interno (DEVAUX, 1992; MARCONESCU; THORPE, 2008). Células tumorais possuem o perfil de distribuição de fosfolipídios alterado e expõem maiores níveis de PE e fosfatidilserina no folheto externo (EMOTO et al., 1997). É interessante notar que a exposição da PE ocorre também na superfície do endotélio tumoral, provavelmente devido ao estresse oxidativo do microambiente, o qual perturba a atividade das aminofosfolipídios translocases (STAFFORD; THORPE, 2011). Outra interessante evidência é que tecidos tumorais de amostras de pacientes com CPNPC, quando comparado ao tecido de uma região pulmonar não afetada, apresenta alterações proeminentes no perfil de fosfolipídios, em especial um aumento de PE (MARIEN et al., 2015). De posse de todos esses dados, fica claro que a PE e suas vias de produção podem ser interessantes pontos para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente em modelo de CPNPC.

Em células eucarióticas, a PE é sintetizada majoritariamente através da via da citidina 5-difosfocolina, também denominada de via de Kennedy (Figura 1), a partir da fosforilação da etanolamina pela etanolamina-quinase, seguida de conversão da fosfoetanolamina em PE pela ação da CTP:fosfoetanolamina-citidilil-transferase (Pcyt2) e, em sequência no retículo endoplasmático, da fosfoetanolamina-transferase (GIBELLINI; SMITH, 2010; PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Por outro lado, a fosfatidilcolina pode ser sintetizada por duas vias distintas: a via de Kennedy e a via de transmetilação da PE, catalisada pela fosfatidiletanolamina n-metiltransferase (FAGONE; JACKOWSKI, 2013; GIBELLINI; SMITH, 2010). Desta forma, na via de Kennedy, a transformação de colina em fosfatidilcolina ocorre através de um processo análogo ao da etanolamina: a fosfatidilcolina é formada pela fosforilação da colina proveniente da dieta, em uma reação catalisada pela colina-quinase, seguida de duas reações sequenciais catalisadas pelas enzimas CTP:fosfocolina-citidilil-transferase e, em seguida, pela fosfocolina-transferase. A fosfatidilcolina também pode ser produzida por três metilações sequenciais da PE, através da ação da fosfatidiletanolamina n-metiltransferase (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013; VANCE; VANCE, 2009).

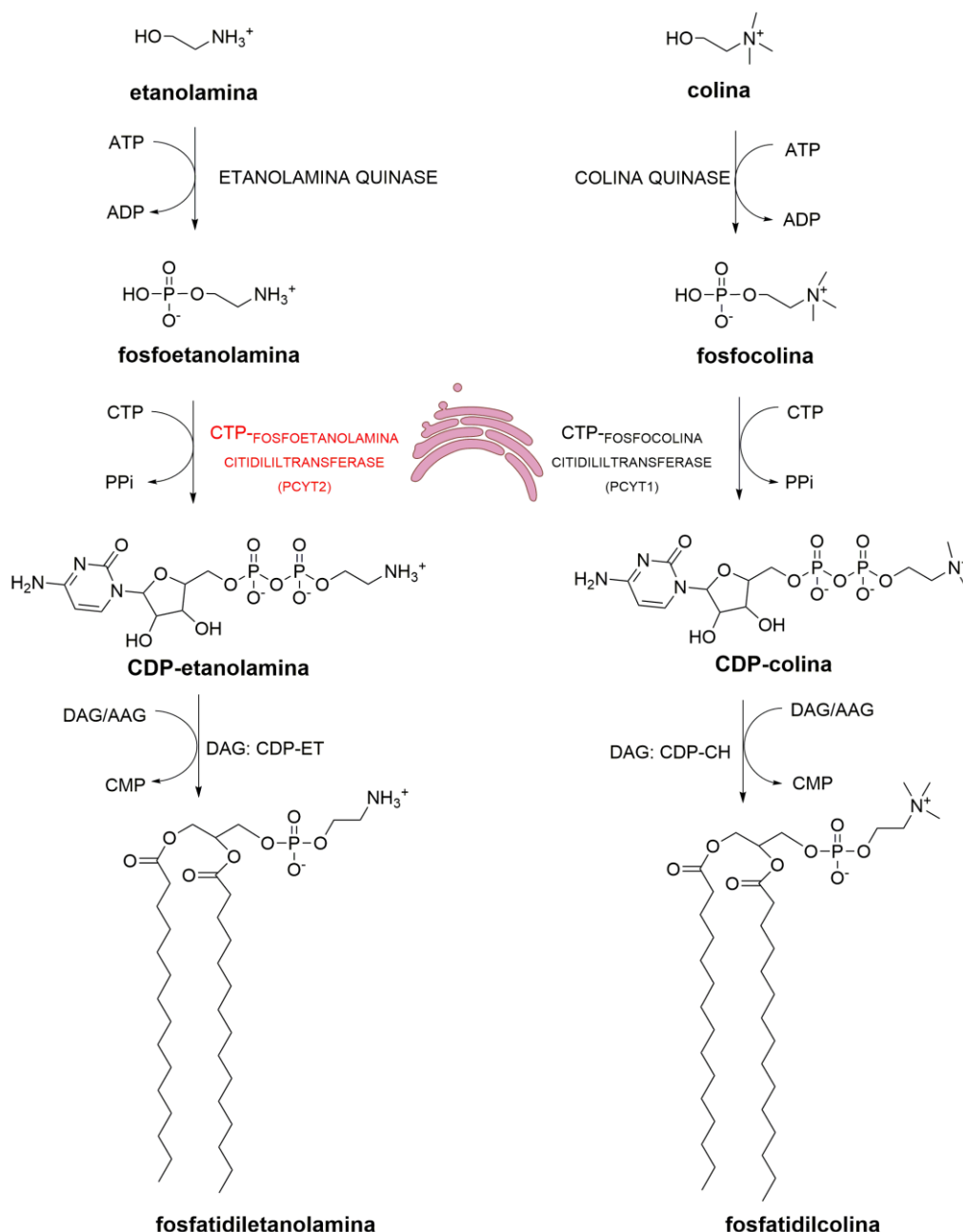


Figura 1 - As reações da principal via de biossíntese dos dois fosfolipídios de membrana mais abundantes: a via de Kennedy. A via de Kennedy apresenta duas rotas distintas para a produção de, respectivamente, PE e a fosfatidilcolina. As duas rotas são bem similares e apresentam enzimas análogas, responsáveis 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 citinina 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).

Portanto, pode-se buscar interferir no metabolismo de fosfolípidios nas células como uma estratégia terapêutica. Neste contexto, a Pcyt2 surge como um alvo potencial posto que esta enzima é frequentemente superexpressa em diversos tumores malignos, dentre os quais, pode-se destacar, o câncer de pulmão (PAVLOVIC; BAKOVIC, 2013). Ademais, ela é uma das peças-chaves da formação de membranas, uma vez que está envolvida na síntese dos seus principais componentes. Portanto, a inibição de sua atividade é capaz de interromper a divisão celular, desestruturar os *lipid rafts*, alterar a produção de segundos mensageiros e levar à apoptose (EMOTO; UMEDA, 2000; FULLERTON, HAKIMUDDIN; BAKOVIC, 2007; VANCE, 2008; SIGNORELL et al., 2009; ZHU; BAKOVIC, 2012). Concomitantemente, a inibição da Pcyt2 leva ao acúmulo de seu substrato, a fosfoetanolamina, que, quando em excesso, leva à inibição da respiração celular (GOHIL et al., 2013). Em 2013, Gohil e colaboradores também identificaram a meclizina, apesar de ser mais conhecida como um anti-histamínico usado há décadas na profilaxia de náusea e vertigem, como o primeiro fármaco inibidor da Pcyt2.

Na verdade, o uso de fosfolípidios no tratamento de alguns tipos de câncer já é conhecido (GAJATE; MOLLINEDO, 2002; VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013), tendo como exemplo dessa classe, os fosfolípidios antineoplásicos: edelfosina, miltefosina e ilmofosina. A miltefosina é a única com uso clínico aprovado, sendo este para o tratamento tópico de metástases cutâneas do câncer de mama (KAMINSKY, 2002), enquanto a edelfosina e a ilmofosina apresentam uso limitado por sua instabilidade metabólica (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013). Entretanto, o uso clínico da miltefosina apresenta uma severa restrição devido aos seus efeitos adversos no sistema gastrointestinal e hemolíticos (GAJATE et al., 2011). O protótipo deste estudo, a miltefosina, é um inibidor da CTP:fosfocolina-citidilil-transferase, enzima análoga a enzima alvo deste estudo, induzindo, por conseguinte, à apoptose devido a deficiência de colina e ao aumento dos níveis de ceramida (RAMOS et al., 2002; YOSIFOV et al., 2014; WNETZAK et al., 2014).

1.4 Morte imunogênica

Alguns estudos apontam um possível papel imunogênico de fosfolipídios antineoplásicos, devido às alterações nos *lipid rafts* e no estresse do retículo endoplasmático (GAJATE; MOLLINEDO, 2001; GAJATE; MOLLINEDO, 2007; MOLLINEDO et al., 1997; MOLLINEDO; GAJATE, 2006; VAN DER LUIT et al., 2007; WELLER et al., 2009). Este fato, aliado a crescente compreensão e interesse do papel da resposta imune contra os tumores e dos mecanismos capazes de favorecê-la, como a morte imunogênica, faz com que seja interessante avaliar também estes fármacos em um contexto imunológico.

A morte imunogênica pode ser definida como a morte celular mediada pela ação de células efectoras do sistema imune estimuladas por células apresentadoras de antígeno maturadas por sinais de células em processo de morte (KROEMER et al., 2013). Dentre as células apresentadoras de antígenos profissionais estão as células dendríticas (DCs), que são mediadoras da relação entre as respostas imunes inatas e adaptativas (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN, 2007).

As DCs podem processar os antígenos tumorais de células tratadas em processo de morte, os quais passam a ser expostos na superfície celular no contexto de moléculas codificadas pelo MHC (*Major Histocompatibility Complex*), ao mesmo tempo em que sinalizam efetivamente para linfócitos T *naïve*, de maneira a induzir sua ativação e resposta (Figura 2). Conseqüentemente, estas células tumorais em processo de morte imunogênica produzem sinais para as DCs que culminam na geração de linfócitos T efetores (auxiliares e citotóxicos) e de memória, voltados especificamente para o combate das células tumorais e, portanto, capazes de contribuir para a prevenção da recidiva da doença (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; RAMOS et al., 2013; STEINMAN, 2012). Portanto, as DCs podem ser consideradas peças-chave, que, dependendo do estado funcional, podem levar tanto à imunidade quanto à tolerância (DE JONG, SMITS; KAPSENBERG, 2005; SPONAAS et al., 2006; ZARNANI et al., 2007). O estado funcional das DCs está estreitamente correlacionado com os sinais recebidos pelo microambiente tumoral. Estes sinais incluem citocinas, mediadores inflamatórios e moléculas portadoras de padrões moleculares

capazes de ativar seus receptores tipo *pattern recognition receptors* (PRR) (DZOPALIC et al., 2012).

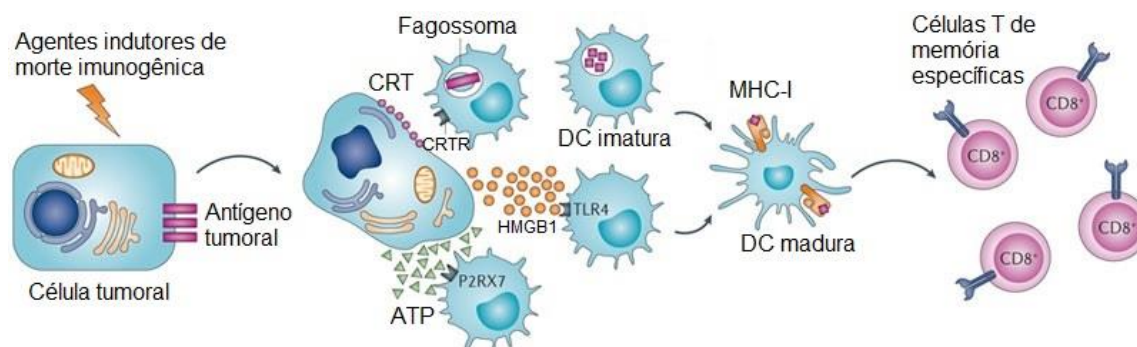


Figura 2 - Esquema dos processos envolvidos na morte imunogênica. Após o estresse causado pelo agente indutor de morte imunogênica, as células pré-apoptóticas expõem ou liberam sinais que facilitam sua fagocitose pelas DCs. Dentre os sinais que levam à indução deste processo estão a calreticulina (CRT), o ATP e a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1). Esses sinais podem ser reconhecidos como sinais para fagocitose pelas DCs através de sua interação com receptores de calreticulina (CRTR), purinérgico P2X7 (P2RX7) e do tipo *Toll-like 4* (TLR4), respectivamente. Em sequência, as DCs ativadas interagem com os receptores de células T (TCRs) dos linfócitos, gerando uma resposta imunogênica T *helper 1* (TH1) ou linfocítica T citotóxica (CTL) (adaptado de KROEMER et al., 2013).

Nowak e colaboradores, em 2003, demonstraram que a quimioterapia pode induzir a apoptose associada à morte imunogênica. Nesta conjuntura, dentre as moléculas expostas pelas células no início da morte imunogênica, a calreticulina se insere como uma proteína que, quando co-translocada junto à ERp57 para a superfície celular serve de sinal de fagocitose para as DCs através do CD91 (ZENG et al., 2006). Essa exposição de calreticulina é intimamente relacionada ao estresse do retículo endoplasmático, posto que esta proteína está presente no lúmen do retículo endoplasmático e sua exposição na superfície celular ocorre em decorrência de perturbações nesta organela, podendo, por consequência, ser associada a este tipo de morte celular (RAJENDRAN; SIMONS, 2005). Ademais, as células em processo de morte imunogênica liberam, dentre outros sinais, a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e ATP para o meio extracelular, que é capaz de interagir com os receptores do tipo *Toll-like 4* e os receptores purinérgicos P2X7, respectivamente, das DCs (APETOH et al., 2007; KROEMER et al., 2013).

A ativação de receptores de morte, que dependem dos *lipid rafts*, também está relacionada à exposição de calreticulina com consequente morte

imunogênica (PANARETAKIS et al., 2009). De acordo com os dados descritos anteriormente, a edelfosina mostra-se capaz de induzir apoptose em células malignas de forma dependente dos *lipid rafts* e do retículo endoplasmático (GAJATE; MOLLINEDO, 2001; GAJATE; MOLLINEDO, 2007; MOLLINEDO et al., 1997; MOLLINEDO; GAJATE, 2006). Em adição, a miltefosina também apresenta atividade modulatória dos *lipid rafts* e maior afinidade por esses microdomínios (VAN DER LUIT et al., 2007; WELLER et al., 2009). Portanto, esses dados apontam para uma possível ativação da morte imunogênica pelos fosfolipídios antineoplásicos, posto que o estresse do retículo endoplasmático e alterações nos *lipid rafts* relacionam-se à indução desse tipo de morte.

1.5 Desenvolvimento do CHY-1 como novo candidato a fármaco

Dado o foco do nosso grupo em buscar novos alvos para desenvolvimento racional de novos fármacos e o potencial da enzima Pcyt2 no contexto tumoral, foram utilizadas abordagens de planejamento de novos fármacos auxiliadas por computador para desenvolver uma quimioteca de novas entidades químicas como potenciais inibidores da enzima Pcyt2. Através de métodos de modelagem molecular e de quimiometria, dezenas de derivados de éter fosfolípides foram selecionados e submetidos a análises de métodos de agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis*) e de componentes principais (PCA, do inglês: *Principal Components Analysis*) a fim de descobrir quais eram as propriedades moleculares, dependentes da estrutura química, mais relevantes no processo de discriminação dos compostos. Ao final da análise exploratória, os compostos foram separados em dois grandes grupos e, no grupo onde estavam os fosfolipídios antineoplásicos (dentre eles a miltefosina), estava também um composto ainda não comercializado, o qual denominamos CHY-1. Por fim, foram procedidos testes de ancoragem de CHY-1 no sítio de interação da enzima Pcyt2 (código de entrada 3ELB no *Protein Data Bank*; BERMAN et al., 2000), os quais evidenciaram uma afinidade calculada favorável que incentivou a síntese e escolha deste composto para a avaliação dos seus efeitos biológicos.

A atividade inibitória *in vitro* da enzima Pcyt2 por CHY-1 foi avaliada e confirmada em um estudo prévio em colaboração a Profa. Dra. Marica Bakovic da *University of Guelph*. O estudo utilizando o isótopo radioativo [¹⁴C] da fosfoetanolamina mostrou que o CHY-1 é capaz de inibir a enzima de forma não

competitiva, levando a redução da produção de PE, porém, o CHY-1 também inibe o transporte de etanolamina para a célula (dados ainda não publicados).

Consistente com esta hipótese, foram iniciadas as análises para elucidar se o CHY-1 apresenta ação antitumoral pela inibição da enzima Pcyt2 e se este é capaz de alterar o estado funcional das DCs, levando à morte das células tumorais não só devido à sua toxicidade direta, mas também pela morte imunogênica. Assim, este trabalho visa avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de CHY-1 em células de CPNPC bem como os mecanismos de ação. Ademais, pretende-se analisar a capacidade do CHY-1 induzir morte imunogênica mediada por DCs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico de CHY-1, um análogo da miltefosina desenvolvido como novo inibidor da enzima Pcyt2, e investigar os mecanismos inerentes à sua atividade antitumoral em modelo de CPNPC.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos citotóxicos da miltefosina e de CHY-1 em células de linhagem de fibroblasto pulmonar (LL-24) e de CPNPC (A549, NCI-H460 e LL/2), em cultura bidimensional (2D) e tridimensional (3D);
- Determinar *in vitro* os mecanismos de morte celular produzidos pela miltefosina e o CHY-1;
- Avaliar a presença de alterações celulares relacionadas a mecanismos de morte imunogênica causadas pela miltefosina e pelo CHY-1 *in vitro*;

3 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- O CHY-1 é um novo protótipo de inibidor da enzima Pcyt2 e candidato a fármaco para o tratamento de CPNPC;
- O CHY-1 mais potente na indução de morte celular de células de CPNPC que seu protótipo, a miltefosina, e que outro inibidor da enzima Pcyt2 (a meclizina);
- O CHY-1 tem atividade preferencial em células malignas, quando comparado à miltefosina;
- O CHY-1 nas linhagens humanas A549 e NCI-H460 apresenta a apoptose como um mecanismo secundário de citotoxicidade, sendo a morte independente de caspases possivelmente a principal via de morte celular;
- Nas células humanas, o tratamento com CHY-1 resultou em alterações morfológicas e funcionais das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, bem como o estabelecimento de um ambiente com acúmulo de EROs;
- O CHY-1 altera a produção de surfactante da célula A549;
- Na linhagem murina, LL/2, a apoptose induzida pela via mitocondrial apresenta maior importância;
- O aumento da externalização de calreticulina nas células A549 e LL/2 é um indicativo de que o CHY-1 gera um dos sinais que pode induzir estas células à morte imunogênica;

REFERÊNCIAS*

ACKERSTAFF, E.; GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z.M. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? **J Cell Biochem.**, v. 1590, n. 3, p. 525-533, 2003.

ADKINS, I.; FUCIKOVA, J.; GARG, A.D.; AGOSTINIS, P. et al. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 12, p.e968434, 2015.

ALAM, M.M.; JOH, E.H.; PARK, H.; KIM, B. et al. Synthesis, characterization and Akt phosphorylation inhibitory activity of cyclopentanecarboxylate-substituted alkylphosphocholines. **Bioorg Med Chem.**, v. 21, n. 7, p. 2018-2024, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015. **Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures 2015-2016.** Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-045101.pdf>. Acesso em: 31, ago, 2015.

APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F. TESNIERE, A. OBEID, M. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat Med.**, v. 13, n. 9, p. 1050-1059, 2007.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BAKOVIC, M.; FULLERTON, M.D.; MICHEL, V. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Biochem Cell Biol.**, v. 85, n. 3, p. 283-300, 2007.

BECKER, T.; HORVATH, S.E.; BÖTTINGER, L.; GEBERT, N. et al. Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 6, p. 4158-4173, 2013.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BEZU, L.; GOMES-DE-SILVA, L.C.; DEWITTE, H.; BRECKPOT, K. et al. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. **Front Immunol.**, v. 6, n.187, p. 1-11, 2015.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASKY, T.M.; DARKE, A.K.; SONG, X. et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. **J Natl Cancer Inst.**, v. 105, n. 15, p. 1132-1141, 2013.

BRECHBUHL, H.M.; GOULD, N.; KACHADOURIAN, R.; RIEKHOF, W.R. et al. Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-binding Cassette Protein ABCG2. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 22, p. 16582-16587, 2010.

CHANDRASEKARAN, S.; MARSHALL, J.R.; MESSING, J.A.; HSU, J.W. et al. TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells cultured as 3D spheroids. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111487, 2014.

COURAGE, C.; BUDWORTH, J.; GESCHER, A. Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. **Br J Cancer**, v. 4, p. 697-704, 1995.

COURCOT, E.; LECLERC, J.; LAFITTE, J.J.; MENSIER, E. et al. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. **Drug Metab Dispos.**, v. 40, n. 10, p. 1953-1965, 2012.

CULLIS, P.R.; DE KRUIJFF, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 559, p. 399-420, 1979.

DAMIÃO, M.C.F.C.B.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, A.K.; TEIXEIRA, S.F. et al. Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Approach. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 347, n.12, p. 885-895, 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. 5, suppl. 5, p. S463-S478, 2013.

DECLERCK, S.; VANSTEENKISTE, J. Immunotherapy for lung cancer: ongoing clinical trials. **Future Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 91-105, 2014.

DE JONG, E.C.; SMITS, H.H.; KAPSENBERG, M.L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. **Springer Semin Immunopathol.**, v. 26, n. 3, p.289-307, 2015.

DEVAUX, P.F. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v. 21, p. 417-439, 1992.

DZOPALIC, T.; RAJKOVIC, I.; DRAGICEVIC, A.; COLIC, M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. **Immunol Res.**, v. 52, n. 1-2, p. 20-33, 2012.

EMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; YAMAJI, A. 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. 12867-12872, 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, n. 2, 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, n. 6, p. 1215-1224, 2000.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1831, n. 3, p. 523-532, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.** Disponível em: www.globocan.iarc.fr. Acesso em: 31, ago, 2015.

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.; FREITAS, V.M.; LEVY, D.; RUIZ, J.L. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **PLoS One**, v. 8, n. 3 p. e57937, 2013.

FULLERTON, M.D.; HAKIMUDDIN, F.; BAKOVIC, M. Developmental and metabolic effects of disruption of the mouse CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase gene (Pcyt2). **Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 27, p. 3327-3336, 2007.

FULLERTON, M.D.; HAKIMUDDIN, F.; BONEN, A.; BAKOVIC, M. The development of a metabolic disease phenotype in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice. **Biol Chem.**, v. 284, n. 38, p. 25704-2513, 2009.

GAJATE, C.; MATOS-DA-SILVA, M.; DAKIR, EL-H.; FONTERIZ, R.I., et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. **Oncogene**, v. 31, n. 21, p. 2627-2639, 2011.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3860-3863, 2001.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Curr Drug Metab.**, v. 3, n. 5, p. 491-525, 2002.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 711-719, 2007.

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.

GLUNDE, K.; JIE, C.; BHUJWALLA, Z.M. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. **Cancer Res.**, v. 64, n. 12, p. 4270-4276, 2004.

GLUNDE, K.; ACKERSTAFF, E.; MORI, N.; JACOBS, M.A. et al. Choline phospholipid metabolism in cancer: consequences for molecular pharmaceutical interventions. **Mol Pharm.**, v. 3, n. 5, p. 496-506, 2006.

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.

GUBIN, M.M.; ZHANG, X.; SCHUSTER, H.; CARON, E. et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 577-581, 2014.

HUANG, C.; FRETTER, 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, p. 1509-1515, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2014. **Ministério da Saúde, Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>. Acesso em: 31, ago, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2013. **Atlas On-line de Mortalidade.** Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 31, ago, 2015.

IORIO, E.; MEZZANZANICA, D.; ALBERTI, P.; SPADARO, F. et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. **Cancer Res.**, v. 65, n. 20, p. 9369-9376, 2005.

JØRGENSEN, A.; YOUNG, J.; NIELSEN, J.E.; JOENSEN, U.N. et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche. **Br J Cancer**, v.110, n. 10, p. 2604-2614, 2014.

KAMINSKY, R. Miltefosine Zentaris. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 3, n. 4, p. 550-554, 2002.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; ZITVOGEL, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annu Rev Immunol.**, v. 31, p. 51-72, 2013.

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.

LEE, E.; LIM, S.J. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. **Arch Pharm Res.**, v. 29, n. 11, p. 1018-1023, 2006.

LEMJABBAR-ALAOUI, H.; HASSAN, O.; YANG, Y.W.; BUCHANAN, P. Lung cancer: Biology and treatment options. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1856, n. 2, p. 189-210, 2015.

LIEBER, M; SMITH, B; SZAKAL, A et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **Int. J. Cancer**, v. 17, p. 62-70, 1976.

LI, Z.; AGELLON, L.B.; ALLEN, T.M.; UMEDA, M. et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. **Cell Metab.**, v. 3, n. 5, p. 321-31, 2006.

MARIEN, E.; MEISTER, M.; MULEY, T. 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.

MARCONESCU, A.; THORPE, P.E. Coincident exposure of phosphatidylethanolamine and anionic phospholipids on the surface of irradiated cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1778, n.10, p. 2217-2224, 2008.

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

MOLLINEDO, F.; FERNÁNDEZ-LUNA, J.L.; GAJATE, C.; MARTÍN-MARTÍN, B. et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Cancer Res.**, v. 57, n. 7, p. 1320-1328, 1997.

MOLLINEDO, F.; GAJATE, C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. **Drug Resist Updat.**, v. 9, n. 1-2, p. 51-73, 2006.

NARANG, A.S.; DESAI, D.S. Anticancer drug development. In *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. **Springer**: Berlin, Germany, p. 49–92, 2009.

NOWAK, A.K.; ROBINSON, B.W.; LAKE, R.A. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 15, p. 4490-4496, 2003.

OSMAN, C.; VOELKER, D.R.; LANGER, T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. **J Cell Biol.**, v. 192, n. 1, p. 7-16, 2011.

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

PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K.F.M.; JORGE, S.D.; ZINGALES, B. et al. Designing and exploring active N--[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three Trypanosoma cruzi strains more prevalent in Chagas disease patients. **Eur J Med Chem.**, v. 96, p. 330-339, 2015.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265-277, 2012.

PANARETAKIS, T.; KEPP, O.; BROCKMEIER, U.; TESNIERE, A. et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. **EMBO J.**, v. 28, n. 5, p. 578-590, 2009.

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

PARIS, C.; BERTOGLIO, J.; BRÉARD, J. Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells. **Apoptosis**, n. 12, v. 7, p. 1257-1267, 2007.

PLANTING, A.S.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. **Eur J Cancer**, v. 29, p. 518-519, 1993.

RAGHAVAN, S.; WARD, M.R.; ROWLEY, K.R.; WOLD, R.M. et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. **Gynecol Oncol.**, v. 138, n. 1, p. 181-189, 2014.

RAJENDRAN, L.; SIMONS, K. Lipid rafts and membrane dynamics. **J Cell Sci.**, v. 118, n. Pt 6, p. 1099-1102, 2005.

RAMOS, B.; EL MOUEDDEN, M.; CLARO, E.; JACKOWSKI, S. Inhibition of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by C(2)-ceramide and its relationship to apoptosis. **Mol Pharmacol.**, v. 62, n. 5, p. 1068-1075, 2002.

RAMOS, R.N.; DE MORAES, C.J.; ZELANTE, B. et al. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? **Clin Dev Immunol.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

RIDSDALE, R.; TSEU, I.; WANG, J.; POST, M. Functions of membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in alveolar type II cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 43, n. 1, p. 74-87, 2010.

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

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

SCOTT, K.F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J. et al. Emerging roles for phospholipase a2 enzymes in cancer. **Biochimie**, v. 92, p. 601-610, 2010.

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, p. 1068-1079, 2009.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin.**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SPONAAS, A-M.; CADMAN, E.T.; VOISINE, C.; HARRISON, V. et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 6, p. 1427-1433, 2006.

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

STAFFORD, J.H.; THORPE, P.E. Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium. **Neoplasia**, v. 13, n. 4, p. 299-308, 2011.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, v. 37, supplement 1, p. S53-S60, 2007.

STEINMAN, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol.**, v. 30, p. 1-22, 2012.

TASSEVA, G.; BAI, H.D.; DAVIDESCU, M.; HAROMY, A. et al. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 3, p.273-277, 2004.

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

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

TEIXEIRA, S.F.; DE AZEVEDO, R.A.; SALOMON, M.A.C.; 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 Pharm.** v. 68, p. 1-8, 2014.

VAN BLITTERSWIJK W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. **Curr Pharm Des.** v. 14, n. 21, p. 2061-74, 2008.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, n. 3, p. 663-74, 2013.

VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res.** v. 49, n. 7, p.1377-87, 2008.

VANCE, D.E.; VANCE, J.E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. **J Lipid Res.** v. 50, Suppl:S132-7, 2009.

VANCE, J.E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, n. 3, p. 543-54, 2013.

VAN DER LUIT, A.H.; VINK, S.R.; KLARENBEK, J.B.; PERRISSOUD, D. et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Mol Cancer Ther.** v. 6, n. 8, p. 2337-45, 2007.

VANSTEENKISTE, J.; DE RUYSSCHER, D.; EBERHARDT, W.E.; LIM, E. 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, Suppl 6, p. vi89-98, 2013.

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

VOORTMAN, J.; RESENDE, T.P.; ABOU, E.L.; HASSAN, M.A. et al. TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. **Mol Cancer Ther.**, v. 6, n. 7, p. 2103-2112, 2007.

WANG, M.; CAO, J.X.; LIU, Y.S.; XU, B.L. et al. Evaluation of tumour vaccine immunotherapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic meta-analysis. **BMJ Open**, v. 5, n. 4, p. e006321, 2015.

WEINHOLD, P.A.; ROUNSIFER, M.E.; CHARLES, L.; FELDMAN, D.A. Characterization of cytosolic forms of CTP: choline-phosphate cytidylyltransferase in lung, isolated alveolar type II cells, A549 cell and Hep G2 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1006, p. 299-310, 1989.

WELLER, K.; ARTUC, M.; JENNINGS G.; FRIEDRICHSON, T. et al. Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. **J Invest Dermatol.**, v. 129, n. 2, p.496-498, 2009.

YOSIFOV, D.Y.; KALOYANOV, K.A.; GUENOVA, M.L.; PRISADASHKA, K. et al. Alkylphosphocholines and curcumin induce programmed cell death in cutaneous T-cell lymphoma cell lines. **Leuk Res.**, v. 38, v. 1, p. 49-56, 2014.

ZARNANI, A.H.; MOAZZENI, S.M.; SHOKRI, F.; SALEHNIA, M. et al. Kinetics of murine decidual dendritic cells. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 275-283, 2007.

ZENG, G.; ALDRIDGE, M.E.; TIAN, X.; SEILER, D. Dendritic cell surface calreticulin is a receptor for NY-ESO-1: direct interactions between tumor-associated antigen and the innate immune system. **J Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3582-9, 2006.

ZIMMERMANN, L.J.; HOGAN, M.; CARLSON, K.S. et al. Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. **Am J Physiol.**, v. 264, p. L575-L580, 1993.

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