

JOSÉ ARTUR MEDINA

**Efeitos das interações farmacológicas do composto 2 - amino etil
dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em linhagens tumorais de
glioblastoma humano**

São Paulo

2023

JOSÉ ARTUR MEDINA

**Efeitos das interações farmacológicas do composto 2 - amino etil
dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em linhagens tumorais de
glioblastoma humano**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Medina, José Artur

Efeitos das interações farmacológicas do composto 2 -amino etil
dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em linhagens tumorais de glioblastoma humano

/ José Artur Medina. -- São Paulo, 2023.

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

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Glioma 2.Glioblastoma 3.Fosfatase alcalina 4.Fosfoetanolamina
5.Etanolamina.

USP/FM/DBD-201/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A Deus e à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus professores e colegas por me ajudarem a desenvolver este trabalho.

"Aliás, sabemos que todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são os eleitos, segundo os seus desígnios."

Romanos 8,28

São Paulo, 8th May 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Effect of pharmacological interactions of 2 aminoethyl dihydrogen phosphate intumor lines of Human glioblastoma*", protocol number CEUAX 8463260521 (ID 000313), under the responsibility Durvanei Augusto Maria, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute of São Paulo, and was approved in the meeting of day June 21, 2021.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Efeito das interações farmacológicas do 2 aminoetil dihidrogeno fosfato em linhagens tumorais de Glioblastoma humano* ", protocolado sob o CEUAX nº 8463260521, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 21 de junho de 2021.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Fatores de risco para o desenvolvimento de tumores intracranianos.....	15
1.2 Origem dos gliomas	16
1.3 Sinusites, pólipos, tumores cerebrais e paranasais.....	18
1.4 Glioblastomas.....	20
1.5 Gliomas.....	26
1.6 Fosfatase Alcalina.....	28
2. OBJETIVO	50
2.1 Objetivos Específicos.....	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Cultura Celular.....	37
3.1.1 Cultivo de células tumorais de glioblastoma humano SF-295.....	37
3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
3.3 Agentes Empregados.....	38
3.3.1 2-AEH ₂ F Sigma Aldrich®.....	38
3.3.2 2-AEH ₂ F sintético.....	38
3.3.3 Monoetanolamina (MEA).....	39
3.4 Determinação da atividade Da Fosfatase Alcalina (ALP).....	39
3.5 Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT.....	39
3.6 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	40
3.7 Microscopia Eletrônica de varredura.....	41
3.8 Ensaio de proliferação celular utilizando o CFSE-DA	41
3.9 Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo	42

3.10	Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) por citometria de fluxo.....	43
3.11	Análises estatísticas	43
4.	RESULTADOS	45
4.1	Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	45
4.1.1	Avaliação da viabilidade celular após 72 horas com o tratamento do 2-AEH ₂ F Sigma em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295.....	49
4.1.2	Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do composto 2-AEH ₂ F Sigma mais pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295.....	51
4.1.3	Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do composto 2-AEH ₂ F sigma na presença dos cofatores (Mg ²⁺ e Zn ²⁺) em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295	52
4.1.4	Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do 2-AEH ₂ F sintético mais pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano SF-295.....	53
4.2	Avaliação da viabilidade celular e fotomicrografias após o tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético em células de astrócitos normais de ratos.....	54
4.2.1	Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do composto 2-AEH ₂ F Sigma em células de astrócitos normais de ratos	56
4.2.2	Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do pirofosfato de sódio em células de astrócitos normais de ratos.....	57
4.3	Determinação do potencial modulador da atividade enzimática da fosfatase alcalina.....	59
4.4	Efeitos cinéticos das diferentes concentrações do composto 2-AEH ₂ F na cinética enzimática da fosfatase alcalina.....	59
4.5	Avaliação dos efeitos dos compostos 2-AEH ₂ F Sintético, 2-AEH ₂ F Sigma e a monoetanolamina (MEA) nas fases do ciclo celular.....	61
4.6	Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do composto 2-AEH ₂ F Sintético em células tumorais de glioblastoma humano U-138.....	65
4.7	Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do quimioterápico temozolomida em células tumorais de glioblastoma humano U-138.....	71
4.8	Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do quimioterápico Temozolomida em células de astrócitos normais de ratos.....	76

4.9	Avaliação dos efeitos do composto 2-AEH ₂ F sintético nas fases do ciclo celular em células tumorais de glioblastoma humano U-138.....	79
4.9.1	Avaliação dos efeitos do quimioterápico Temozolomida nas fases do ciclo celular em células tumorais de glioblastoma humano U-138.....	81
4.9.2	Avaliação dos efeitos nas fases do ciclo celular após tratamento com a IC _{50%} dos compostos 2-AEH ₂ F sintético e da Temozolomida nas células tumorais de glioblastoma humano U-138.....	83
4.9.3	Avaliação dos efeitos do composto 2-AEH ₂ F sintético nas fases do ciclo celular em astrócitos normais de ratos.....	84
4.9.4	Avaliação dos efeitos do quimioterápico Temozolomida nas fases do ciclo celular em astrócitos normais de ratos.....	86
4.9.5	Avaliação dos efeitos das fases do ciclo celular após o tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético e IC _{50%} do quimioterápico Temozolomida em astrócitos normais de ratos	88
4.9.6	Avaliação da resposta proliferativa dos astrócitos normais de ratos após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético.....	89
4.9.7	Avaliação da expressão dos marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético por citometria de fluxo.....	90
4.10	Avaliação da expressão dos marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por citometria de fluxo	92
4.11	Avaliação da expressão dos marcadores em células normais de Astrócitos de ratos após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F Sintético.....	94
4.12	Avaliação da expressão dos marcadores em células normais de Astrócitos de ratos após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por citometria de fluxo.....	95
4.13	Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$) por citometria de fluxo das células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F Sintético e o quimioterápico Temozolomida.....	97
4.14	Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$) por citometria de fluxo das células de astrócitos normais de ratos após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F	

Sintético e o quimioterápicoTemozolomida.....	100
5 DISCUSSÃO.....	103
6 CONCLUSÕES.....	111
7 REFERÊNCIAS.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2 - AEH₂F	Aminoetil Dihidrogeno Fosfato
AD	Água destilada
ALP	Fosfatase alcalina
AMA	Anticorpo anti mitocondrial
CFTR	Condutância transmembrana da fibrose cística
CPRE	Colangiopancreatografia endoscópica retrógrada
CPRM	Colangiopancreatografia por ressonância magnética
Dexa	Dexametasona
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Etn	Etanolamina
GBM	Glioblastoma multiforme
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GGT	Gama glutamil transferase
IAP	Fosfatase alcalina intestinal
IDH	Isocitrato desidrogenase
IDH1/2	Isocitrato desidrogenase 1 e 2
IU	unidade internacional
Ki	constante inibitória
Km	Constante de Michaelis
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócito T
MAT	Microambiente tumoral
MGMT	O-6-metilguanina-DNA metiltransferase
MV	Microvesículas
MW	Peso molecular

NICD	Domínio intracelular da via Notch
NMDA	N-metil D-Aspartato
NSC	Células-tronco neurais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptors
Pi	Fosfato inorgânico
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitro fenil fosfato
PPi	Pirofosfato inorgânico
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina
RA	Ácido retinóico
RB	Retinoblastoma
RGLs	Glia radial tipo 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SGZ	Zona subgranular
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SNC	Sistema nervoso central
TNAP	Fosfatase alcalina tecido inespecífica
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TNSAP	Tissue non specific alkaline phosphatase
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
Vmax	Velocidade máxima de reação
VEGFR	Receptor Vascular endothelial growth factor

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano GBM SF- 295 pelo método colorimétrico MTT valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F Sintético	61
Figura 02 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano GBM SF- 295 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com o composto 2 - AEH ₂ F Sigma®.....	62
Figura 03 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano GBM SF- 295 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com Monoetanolamina	63
Figura 04 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano GBM SF- 295 após 24 horas de tratamento com o composto 2 - AEH ₂ F Sintético, obtido em microscopia óptica de inversão.....	64
Figura 05 - Eletromicrografia representativa obtida em microscopio eletrônico de varredura das células de glioblastoma humano GBM SF-295	65
Figura 06 - Avaliação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F Sigma em células tumorais de glioblastoma humano SF-295 pelo método colorimétrico MTT	66
Figura 07 - Avaliação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F Sigma mais adição de pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF- 295	67
Figura 08 - Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F Sigma mais cofatores em células tumorais de glioblastoma humano SF- 295 pelo método colorimétrico MTT	68
Figura 09 - Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F sintético mais o pirofosfato de sódio em células de glioblastoma humano SF-295 pelo método colorimétrico MTT	69
Figura 10 – Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F Sintético em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT, após 24 horas de tratamento	71
Figura 11 - Fotomicrografias representativas dos astrócitos normais de ratos, após 24 horas de tratamento com o composto 2-AEH ₂ F Sintético.....	72

Figura 12 – Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH ₂ F Sigma em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT, após 24 horas de tratamento	73
Figura 13 – Determinação da atividade citotóxica do composto P ₂ O ₇ ⁴⁻ (pirofosfato de sódio) em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT, após 24 horas de tratamento	74
Figura 14 - Curva da atividade enzimática da fosfatase alcalina no sobrenadante das células tumorais GBM SF-295 tratadas com os compostos 2-AEH ₂ F Sintético e 2-AEH ₂ F Sigma nas concentrações de 0,39 a 200 mM.....	75
Figura 15 - Avaliação da velocidade catalítica da enzima Fosfatase	77
Figura 16 - Distribuição das fases do ciclo celular das células de glioblastoma humano GBM SF-295, tratadas com o composto 2-AEH ₂ F sintético	79
Figura 17 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 nas fases do ciclo celular tratadas com o composto 2-AEH ₂ F Sigma, após 24 horas de tratamento	80
Figura 18 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto monoetanolamina (MEA).	83
Figura 19 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U138 pelo método colorimétrico MTT, para obtenção dos valores de concentração inibitória (IC ₅₀ %), após tratamento com o composto 2-AEH ₂ F Sintético.....	83
Figura 20 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano U-138 após 24 horas de tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético, obtido em microscopia óptica de inversão	84
Figura 21 – Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC ₅₀ %) após tratamento com o composto sintético 2-AEH ₂ F Sintético.....	85
Figura 22 – Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano U-138 após 48 horas de tratamento com o composto sintético 2-AEH ₂ F sintético, obtido em microscopia óptica de inversão	86
Figura 23 – Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores de concentração inibitória (IC ₅₀ %), após tratamento com Temozolomida	88

Figura 24 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano U-138 após 24 horas de tratamento com o composto temozolomida, obtido em microscopia óptica de inversão	89
Figura 25 – Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com temozolomida	90
Figura 26 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano U-138 após 48 horas de tratamento com o quimioterápico temozolomida, obtido em microscopia óptica de inversão	91
Figura 27 - Avaliação da atividade citotóxica em células de astrócitos normais de ratos, pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória IC50% após tratamento com temozolomida.....	93
Figura 28 - Avaliação da atividade citotóxica em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com temozolomida	94
Figura 29 – Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas fases do ciclo celular tratadas com o composto 2-AEH ₂ F sintético	96
Figura 30 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas fases do ciclo celular tratadas com o quimioterápico temozolomida	98
Figura 31 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH ₂ F sintético e o quimioterápico temozolomida	100
Figura 32 - Distribuição da população de células de astrócitos normais de ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH ₂ F sintético	101
Figura 33 - Distribuição da população de células de astrócitos normais de ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o quimioterápico Temozolomida	103
Figura 34 - Distribuição da população de células de astrócitos normais de ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH ₂ F sintético e o quimioterápico temozolomida	105
Figura 35 – Análise do índice proliferativo pela marcação com o primer CFSE-DA em células de astrócitos normais de ratos.....	106

Figura 36 - Análise da expressão de marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U138	108
Figura 37 - Análise da expressão de marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U138	110
Figura 38 - Análise da expressão de marcadores em astrócitos normais de ratos	111
Figura 39 -Análise da expressão de marcadores em astrócitos normais de ratos	113
Figura 40 — Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$), com a Rodamina-123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético	115
Figura 41 — Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$), com a Rodamina-123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o quimioterápico temozolomida	116
Figura 42 — Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$), com a Rodamina-123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o composto 2-AEH ₂ F sintético	118
Figura 43 — Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta M\Psi$), com a Rodamina-123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o quimioterápico temozolomida	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Anticorpos primários utilizados na marcação de células tumorais de glioblastoma humano U-138 e astrócitos de ratos normais.....	58
--	----

RESUMO

As fosfatases alcalinas são enzimas calcificantes ubíquas cuja concentração e funcionalidade são aumentadas no microambiente tumoral inflamatório sendo essenciais para a absorção celular de nutrientes fisiologicamente importantes, como precursores fosfolipídicos e vitamina B6. As fosfatases alcalinas são marcadores celulares de recorrência, indiferenciação e resistência em glioblastomas. A Temozolamida, o quimioterápico mais empregado, é tão tóxico às células neoplásicas quanto aos astrócitos do hospedeiro.

Desta forma, descrevemos a função enzimática de fosfatases do sobrenadante de linhagens de GBM SF295, como um possível alvo molecular para drogas fosfatadas anticâncer. O 2-AEH₂F, o pró-fármaco candidato, é um substrato natural para as fosfatases alcalinas, nutriente para formação de membranas, cujo produto etanolamina, favorece a redução da relação fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, e hidrólise das fosfatidiletanolaminas, que gerariam as N acil etanolaminas após ação de outras fosfolipases, via liberação de anandamidas, deflagadoras de apoptose em gliomas e, resistência á apoptose em astrócitos, via receptores canabinoides 1 e 2. Este estudo descreve a atividade catalítica de fosfatases alcalinas coletadas do sobrenadante de glioblastomas SF-295 sobre o nitrofenil fosfato na presença de 2-AEH₂F, realizados na presença de inibidores ou de cofatores enzimáticos. A presença de inibidores competitivos diminui a função enzimática das fosfatases alcalinas do GBM, enquanto os cofatores minerais, geralmente presentes no microambiente tumoral, aumentam a atividade enzimática sobre o substrato 2-AEH₂F, Km: 4,669 mM, V max: 60 uM/min/L. Astrócitos são menos resistentes á Temozolamida que linhagens de glioblastoma U138 e o 2-AEH₂F estimula a proliferação de astrócitos conforme teste de carboxifluoresceína. Proteínas vinculadas á apoptose como caspase 3, á indiferenciação como o CD90, e á supressão tumoral como a p53, foram mensuradas após exposição ao 2-AEH₂F e á Temozolamida em astrócitos e U138.

O 2-AEH₂F se comportou como substrato mostrando potencial para atingir seletivamente células-tronco de GBM e proteger os astrócitos do hospedeiro.

Palavras-chave: 2 Aminoetil Dihidrogeno Fosfato, glioblastoma, fosfatase alcalina

ABSTRACT

Alkaline phosphatases are ubiquitous calcifying enzymes whose concentration and functionality are increased in the inflammatory tumor microenvironment and are essential for cellular uptake of physiologically important nutrients such as phospholipids and B6 vitamins. Alkaline phosphatases are cellular markers of recurrence, undifferentiation and resistance in glioblastomas. Temozolamide, the most used chemotherapeutic, is as toxic to neoplasms as to host astrocytes.

Thus, we describe the enzymatic function of phosphatases from the supernatant of GBM SF295 strains, as a possible molecular target for phosphate-containing anticancer drugs. 2-AEH₂F, the candidate prodrug, is a natural substrate for alkaline phosphatases, nutrient for the formation of membranes, whose ethanolamine product, favors the reduction of the phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine ratio, and perhaps the hydrolysis of phosphatidylethanolamines, which would generate N acyl ethanolamines after the action of other phospholipases, via the release of anandamides, triggers of apoptosis in gliomas and, resistance to apoptosis, in astrocytes, via CB1/2 receptors.

This study describes the catalytic activity of alkaline phosphatases collected from the supernatant of SF-295 glioblastomas on nitrophenyl phosphate in the presence of 2-AEH₂F, carried out in the presence of enzyme inhibitors or cofactors. The presence of competitive inhibitors decreases the enzymatic function of GBM alkaline phosphatases, while mineral cofactors, usually present in the tumor microenvironment, increase enzymatic activity on the 2-AEH₂F substrate, Km: 4.669 mM, V max: 60 uM/min/ L. Astrocytes were as sensitive to Temozolamide as glioblastoma cell lines and 2-AEH₂F inhibited apoptosis in astrocytes. Proteins linked to apoptosis such as caspase 3, undifferentiation, such as CD90, and p53, the universal oncogenic suppressor, were also measured after exposure to 2-AEH₂F and Temozolamide. 2-AEH₂F behaved as a substrate showing potential to selectively target GBM stem cells and protect host astrocytes from Temozolamide.

Keywords: 2-Aminoethyl Dihydrogen Phosphate, glioma, glioblastoma, alkaline phosphatase

1 INTRODUÇÃO

O glioma grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor maligno cerebral mais frequente do sistema nervoso central (MACHADO, 2007; RAMACCIOTTI, 2017; ROCHA, 2021), provém de três tipos de células: as tronco neurais, astrócitos e de células precursoras de oligodendrócitos (PALMIERO, 2020; MORAES; HOLANDA; CAVALHEIRO, 2020). GBM eventualmente é secundário proveniente de gliomas menos agressivos (ISOLAN et al.,2020; SCARANO,2014). O GBM não emite metástases, ao contrário dos cânceres metastáticos, a letalidade do GBM está associada às suas características infiltrativas e recidivantes decorrentes da resistência celular induzida (UCHÔA,2020; UTIDA et al., 2002; FARIA; FARHAT,1999). Esse fenótipo infiltrativo é super expresso em um subtipo de células de GBM, as chamadas células-tronco GBM, indiferenciadas, ou seja, que exibem em sua membrana, proteínas consideradas marcadores de indiferenciação (ONYIKE et al., 2013, MEUSEL et al., 2019; SIEBEN et al., 2021).

As células-tronco provenientes de GBM são originárias de um micro ambiente tumoral (MAT) desnutrido, ácido, inflamatório e angiogênico (MAIA et al., 2018; ANDINO et al., 2019; BARRETO, 2016). Os estudos anatomopatológicos diferenciam o GBM de gliomas menos agressivos pelo achado de “pseudo paliçadas”, que são estruturas circulares compostas por células do GBM, cujo centro é ocupado por um processo de tromboflebite restringindo o fluxo sanguíneo. As células que compõem a "cerca" migraram do centro necrótico, estas células exibem a capacidade de invadir vasos abertos e percorrer longas distâncias através do parênquima do hospedeiro (KANDRATAVICIUS et al., 2007; TAKADA, 2013; LIU; EULER, 1999).

Apesar da importância do achado anátomo patológico das pseudo paliçadas, o prognóstico é melhor previsto pela presença ou não, de algumas mutações, como amplificação de Myc, ou mutações em genes IDH1-3, supressão da P53 dependente da amplificação de MDM2, entre muitas outras alterações na expressão de proteínas como VEGFR , PDGFR, PI3K, mTOR, MGMT (SCARANO, 2014, BARBOSA et al., 2015; FUCHS; CHEN, 2013; DE FILIPPIS; BINDA, 2012). As mutações da H3K27M são encontradas de forma típica no glioma pediátrico intrínseco difuso pontino, sua expressão fisiológica produz um processo geral de diminuição da metilação de histonas, especificamente no resíduo de lisina. A mutação da H3K27M produz uma onco histona que induz metilação global levando ao processo inflamatório inicial na

formação de gliomas (LASKY; WU, 2005). A infiltração de células-tronco GBM nos tecidos cerebrais do hospedeiro impede a ressecção tumoral total, contribuindo muito para o prognóstico reservado (IMAYOSHI et al., 2010; DONG et al., 2019; DING et al., 2016). Desta forma, a melhora no prognóstico, visto nos últimos anos com outros tipos de gliomas, não se estendeu aos pacientes com GBM (LAI et al., 2003; BERNAL; ARRANZ, 2018).

A temozolamida (TMZ) é o medicamento de primeira linha para o tratamento dos gliomas, trata-se de um agente alquilante administrado por via oral cujo metabólito ativo é conhecido pela sigla MTIC. TMZ confere 2 meses de sobrevida no GBM pois os gliomas grau IV desenvolvem resistência á TMZ via diferentes mecanismos antioxidantes, reguladores negativos da ferroptosis. Ferroptosis pode ser definida como a morte celular dependente do ferro, secundário a peroxidação lipídica pelas ROS, contraposta por diferentes mecanismos antioxidantes associados á ferroptosis e glutaciona entre outros.

ACLS4, o gene que transcreve a acetil colina sintase, estimula o acúmulo do fosfolípide fosfatidiletanolamina (PE), que é um determinante crítico á sensibilidade á ferroptosis. N acil etanolaminas, formadas pela hidrólise da PE, via receptores canabinoides 1 e 2 causam apoptose em células de gliomas e protegem os sensíveis astrócitos do hospedeiro da TMZ, que é tóxica aos astrócitos.

As células-tronco GBM são ricas em fosfatases alcalinas (ALP) (OSTROM et al., 2019; COSTANZA; FINOCCHIARO, 2019), essas enzimas são uma família de quatro ectoenzimas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol lipídeos (VECHT; KERKHOF; DURAN-PENA, 2014; PRESTON-MARTIN et al.,1982).

As ALP no GBM estão presentes em diferentes células que compõe o MAT, estão presentes no endotélio, fibroblastos e células-tronco entre outras. O encontro de ALP em célula-tronco GBM é considerado um marcador de indiferenciação, resistência e recorrência (OSTROM et al., 2019), ou seja, ela marca “a tropa de elite” tumoral.

A atividade da ALP parece ter várias funções: as ALP são fundamentais para a mineralização óssea e está relacionada também à captação de precursores da membrana fosfolipídica, como o 2-AEH₂F e também do fosfato de piridoxina-5 que é uma das várias formas que existem da vitamina B6 (YAN et al., 2009; LIU et al., 2016; SAKTHIKUMAR et al., 2020).

As ALP estão aumentadas na superfície das células endoteliais, secundariamente à indução de citocinas inflamatórias, como IL-6 (SHINYA; WOLFF, 1979) e TNF alfa (BACCIU et al., 2006; KAWAGUCHI et al., 2017), assim como a função catalítica é aumentada pela presença de cofatores intra celulares: Mg^{+} e Zn^{+} (DULGUEROV; ALLAL, 2006).

A importância clínica das ALP pode ser observada pela progressão natural de uma doença denominada hipofosfatasia neonatal, que se não tratada pela reposição da enzima, leva à morte secundária a epilepsias intratáveis e insuficiência cardiorrespiratória. Bioquimicamente, os recém-nascidos apresentam níveis urinários e sanguíneos elevados de 2-AEH₂F e de vitamina B6, especificamente o fosfato de piridoxina 5, que não consegue atingir o meio intracelular (NEWTON; AH-SEE, 2008). As fosfatases alcalinas podem ser saturadas por níveis milimolares do substrato 2-AEH₂F (BISHOP et al., 2013), inibindo, por competição, a captação de outros nutrientes importantes, como B6 e indiretamente a colina, uma vez que colina e etanolamina também competem pelos mesmos transportadores (PERRIN et al., 2019; HAYMAN et al., 1998) e, já no ambiente intracelular, competem pelas mesmas enzimas, como a colina e a etanolamina quinases (BERENHOLZ et al., 1998; PARMAR et al., 2009), cujo interesse pela terapia do câncer vem crescendo nos últimos anos (IOANNIDIS et al., 2015).

O 2-AEH₂F vem sendo estudado como agente anticâncer (GOWER et al., 2006; DAHLHAUS et al., 2017; BORCH et al., 2021; BATTU et al., 2018; WANSON, 1990; BASAK et al., 2012), e essa fosfatase alcalina é um alvo molecular passível de estudo e experimentação. A funcionalidade da enzima foi analisada através do ensaio de p nitrofenil fosfato, cuja perda do grupo fosfato produziu o marcador nitrofenol colorido. Diferentes formulações de 2-AEH₂F foram disponibilizadas, uma comercialmente adquirida da Sigma, e outra sintética contendo resíduos fosforilados. Foram medidas, através de anticorpos monoclonais, a expressão de proteínas vinculadas à indiferenciação como a CD90, à apoptose, como a caspase 3 e o P53, definido como supressor universal da oncogênese, além do impacto sobre o ciclo celular de cultivos celulares de U138 e SF295, via teste de propidium iodide. Testamos a sensibilidade de astrócitos de ratos à TMZ e ao 2-AEH₂F, assim como o impacto das duas substâncias no ciclo celular e na expressão de proteínas associadas ao prognóstico do GBM.

1.1 Fatores de risco para o desenvolvimento de tumores intracranianos

Exceto por algumas doenças de origem genética, a maioria das doenças apresenta importantes fatores de risco predisponentes. Os fatores que favorecem o desenvolvimento de tumores cerebrais são conhecidos: exposição a solventes voláteis e radiação ionizante, entretanto a maioria dos pacientes não exibe nenhum destes fatores de risco. Por outro lado, algumas pessoas mesmo apresentando inúmeros fatores potencialmente predisponentes, nunca desenvolvem os tumores cerebrais. Infelizmente não existem maneiras conhecidas de se prevenir um tumor cerebral, por meio de alterações no estilo de vida, de forma geral o gênero masculino têm maior probabilidade em desenvolver um tumor cerebral muito embora, alguns tipos específicos de tumores, como os meningiomas, são mais frequentes entre mulheres.

A exposição a tóxicos, intoxicações com substâncias químicas inorgânicas, tanto em casa como no trabalho, principalmente as substâncias derivadas de petróleo, borracha solventes, pesticidas, ou cloreto de vinila aumentam as chances de se encontrar tumores cerebrais. Existe uma maior incidência de tumores cerebrais, em indivíduos que apresentam a síndrome de Li-Fraumeni, neurofibromatose, síndrome do carcinoma basocelular nevíde, esclerose tuberosa, síndrome de Turcot e doença de von Hippel-Lindau e a fibrose cística. História familiar positiva é encontrada em aproximadamente 5% casos quase sempre ligados a fatores ou condições genéticas hereditárias. Algumas famílias exibem maior incidência de tumores cerebrais e sem uma ligação com doenças hereditárias conhecidas. Estudos estão em andamento para tentar encontrar uma causa para este fenômeno. Exposição a alérgenos, infecções bacterianas e virais e a infecção pelo vírus Epstein-Barr aumentam o risco de linfomas do SNC (OSTROM et al., 2019).

Vários tipos de vírus podem causar tumores cerebrais, entretanto mais dados são necessários para descobrir se a exposição a infecções, se outros vírus ou alérgenos aumentam ou não o risco de tumores cerebrais nas pessoas. Estudos recentes tem mostrado que os pacientes com histórico de alergias ou doenças de pele apresentam menor risco de tumores cranianos. Suspeita-se que a presença de campos eletromagnéticos possam favorecer a lesão ao genoma que caracteriza o efeito das ondas eletromagnéticas ou radioativas. A maioria dos estudos que os

campos eletromagnéticos, não mostram nenhuma ligação com um risco aumentado de se desenvolver um tumor cerebral em adultos, quando analisados moradores próximos de campos de transmissão. Entretanto alguns artigos propõe o contrário, responder se torres de transmissão são ou não um fator de risco ao desenvolvimento de gliomas pode adicionar uma nova e importante peça no quebra cabeças que é a origem dos gliomas (COSTANZA; FINOCCHIARO, 2019).

O tratamento do cérebro ou uso de radiação ionizante, incluindo raios-x, por exemplo, é um fator de risco para um tumor cerebral. Alguns estudos mostram uma ligação entre traumatismo crânio encefálico e meningioma, mas não entre traumatismo crânio encefálico e glioma. Uma história de convulsões também foi vinculada a tumores cerebrais, mas como um tumor cerebral pode causar convulsões, não se sabe se as convulsões aumentam o risco de tumores cerebrais, se as convulsões ocorrem por causa do tumor ou se a medicação anticonvulsivante aumenta o risco, ou se inflamações cerebrais inespecíficas sejam fatores predisponentes (VECHT; KERKHOF; DURAN-PENA, 2014). Compostos tóxicos nitrosos presentes em algumas dietas associadas a suplementação vitamínica poderiam indicar aumento de risco de neoplasias intracranianas na infância e entre adultos. Os compostos nitrosos dietéticos são formados no corpo a partir de nitritos ou nitratos encontrados em algumas carnes curadas como linguiças, carne secas, fumaça de cigarro e cosméticos. No entanto, pesquisas adicionais são fundamentais para que algum grau de confiança mínima seja estabelecido (PRESTON-MARTIN et al., 1982).

1.2 Origem dos Gliomas

Os gliomas são tumores malignos cerebrais que em 70 a 80% das vezes derivam de astrócitos, astrócitos são células gliais em forma de estrelas que tem funções em condições inflamatórias e fisiológicas (BERNAL; ARRANZ, 2018). Muitos gliomas apresentam mutações da isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1/2) enzimas vinculadas á adequada metabolização de hidratos de carbono e alfa ceto glutarato proveniente do aminoácido glutamina em citrato (YAN et al., 2009). Apesar dos esforços com o emprego de terapia multimodal, cirurgia, radiação e quimioterapia, a taxa de sobrevida geral em 5 anos de pacientes com glioma de alto grau permanece abaixo dos 15% enquanto os de baixo grau quando resecáveis são curáveis.

Estudos de genética molecular tem encontrado uma série de alterações genômicas nos gliomas grau IV, glioblastomas. Diferentes genes exibem mutação como a p53, a p16Ink4a, retinoblastoma proteína, fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) deleção no cromossomo 10 e/ou também amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que são achados secundários á instabilidade genética (LIU et al.,2016).

Dentre eles, alterações genéticas que atingem as vias EGFR e PI3K/PTEN/Akt aparecem em 88% dos gliomas malignos. A ativação aberrante da via PI3K/Akt/mTOR se correlaciona com mau prognóstico em pacientes com glioblastoma. A via PI3K/Akt/mTOR regula várias funções celulares, incluindo sobrevivência, metabolismo, proliferação e diferenciação por meio de vários efetores como: CREB, p27, FOXO, p70 e 4EBP1. Por outro lado, esta mesma via é antagonizada por vários fatores, incluindo PTEN e GSK3 β para reduzir sua hiperativação, uma vez que isto causaria uma perda no controle de ciclo. Uma vez desregulados conseguem evadir da apoptose e incrementam o crescimento celular descontrolado. (SAKTHIKUMAR et al., 2020)

A via PI3K/Akt/mTOR é super ativada em vários cânceres o que faz dela um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de anti neoplásicos. A via PI3K/Akt/mTOR é um ponto de convergência para estímulos divergentes de crescimento, regula os processos celulares que estão envolvidos tanto na iniciação quanto na manutenção do câncer.

O regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) é um canal iônico ativado por cAMP que permite influxos intracelulares de água e cloreto entre o citosol e a matrix extra celular. Mutações neste canal de íons de cloro e agua levam à doença genética mais comum do mundo. A correlação entre a disfunção do CFTR e a incidência de câncer é há muito tempo relatada. Estudos de coorte mostram um risco aumentado de câncer em pacientes com fibrose cística (FC)(ZHAO et al., 2020).

O nível de expressão reduzido de CFTR também foi observado em vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão, câncer de cólon e câncer de mama. Na verdade, os estudos revelaram que em uma variedade de carcinomas, CFTR funcionaria como um supressor tumoral, cuja perda promoveria as características malignas das células cancerosas. No entanto, a regulação positiva de CFTR também

foi relatada como promotora de neoplasias no sistema reprodutivo feminino (ZHAO et al., 2020).

O regulador da condutância transmembrana da fibrose cística foi originalmente encontrado expresso em vários tecidos epiteliais, como pulmão, pâncreas, trato gastrointestinal e trato reprodutivo. Ensaios de RT - PCR e imuno-histoquímica demonstraram a expressão abundante de CFTR nos neurônios - mas não em astrócitos - no cérebro humano. Da mesma forma, o mRNA do CFTR foi identificado em astrócitos isolados de cérebro de modelos animais. Embora o papel fisiológico do CFTR no cérebro ainda não seja claro, sabe-se já que o CFTR é crítico para a regulação da homeostase do cloreto no extracelular do SNC. A perda de função de CFTR causa disfunção das células de Schwann e no sistema nervoso periférico, muito semelhantes aos fenótipos manifestados na síndrome de Charcot- Marie-Tooth produzidas em modelos animais com deficiência de CFTR desde o nascimento (LIU et al., 2019).

1.3 Sinusites, pólipos, tumores cerebrais e paranasais

A sinusite crônica aumenta o risco de se desenvolver pólipos nasais, aproximadamente 20% das pessoas com sinusite crônica também têm pólipos nasais. Os pólipos nasais são caracterizados por serem moles, indolores e embora inicialmente não cancerosos podem sim malignizar (SHINYA; WOLFF, 1979). Os pólipos se fixam, pendem do seio da face como se fossem lágrimas ou uvas. Os pólipos são resultado de inflamação crônica no epitélio do nariz e de seios da face. Sinusites estão associadas a outras condições clínicas como asma, infecções recorrentes, alergias, sensibilidade a medicamentos e alterações imunes. Infecções sinusais crônicas, ou recorrentes, se vinculam a asma, rinite alérgica ou febre dos fenos, fibrose cística, síndrome de Churg-Strauss e uma sensibilidade maior para medicamentos anti-inflamatórios não esteróides, como ibuprofeno ou aspirina (BACCIU et al., 2006).

Imagens de rotina do cérebro, tanto de ressonância quanto de tomografia, permitem a visualização da cavidade nasal, ouvido médio, base do crânio e seios paranasais. Diante de um tecido polipoide o diagnóstico final é na maioria das vezes, só confirmado pela histopatologia. Pólipos nasais extensos podem mimetizar lesões agressivas do nariz e dos seios paranasais. Os pólipos nasais costumemente não

crecem de maneira muito veloz, não reabsorvem osso tampouco estendem-se para tecidos adjacentes (KAWAGUCHI et al., 2017).

No entanto, mesmo pólipos nasais sem estas características de malignidade deveriam ser incluídas no diagnóstico diferencial de tumores nasais, principalmente se apresentarem comportamentos suspeitos, como os agora descritos. De modo geral são infreqüentes as neoplasias malignas da cavidade nasal ou dos seios da face.

A cada ano diagnostica-se cerca de 2.000 casos nos Estados Unidos, aproximadamente entre 60 a 70% desses tumores acometem o seio maxilar, enquanto 20 a 30% estão na cavidade nasal e 10 a 15% estão nos seios etmoidais bilateralmente (DULGUEROV; ALLAL, 2006).

Tumores são extremamente incomuns nos seios esfenoidais, atrás dos seios etmoidais, ou nos seios frontais da testa.

Diferentes tipos de tumores podem ocorrer na cavidade nasal ou nos seios da face destes, 70% ocorrem no trato respiratório a partir de células escamosas, o adenocarcinoma responde por 10 a 20% das neoplasias do seio da face, ocorrendo no revestimento do tapete mucoso. Os rino neuroblastomas crescem a partir de nervos na base do crânio, onde estes feixes nervosos afloram na cavidade nasal, que em condições normais permite a subjetiva percepção da matéria em suspensão gasosa: o olfato. Existem vários tipos de neoplasias não cancerosas que, embora não se espalhem, podem causar danos se não forem tratados. Os osteomas geralmente não causam sintomas, mas podem impedir os seios frontais, etmóides ou maxilares de adequadamente drenarem seu muco causando infecções secundárias. Se um osteoma causar essa obstrução, será necessário removê-lo cirurgicamente. Diferentes infecções virais podem causar papilomas, com crescimento semelhante a verrugas no nariz ou nos seios da face. Embora 10% sejam cancerígenos, a grande maioria dos pólipos é benigna (NEWTON; AH-SEE, 2008). Os homens desenvolvem cânceres de seio nasal mais frequentemente do que as mulheres. O diagnóstico da doença é realizado mais comumente entre 50 e 60 anos. Tabagismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer no nariz e seios da face. Muitos cânceres nasais ou não nasais, não apresentam sintomas, entretanto, certos sintomas prolongados podem indicar câncer, incluindo: congestão nasal persistente, especialmente de um lado, dor na testa, bochecha, nariz ou ao redor dos olhos ou orelha, gotejamento pós nasal nas posterior da faringe, epistaxe frequente e/ou persistentes, visão dupla ou turva, perda do olfato ou paladar, dor ou parestesia

na face ou nos dentes, um tumor na face, nariz, palato ou pescoço, olhos lacrimejantes, dificuldade em abrir a boca ou infecções de ouvido recorrentes ou perda auditiva (PDQ, 2019).

A prevenção para diminuir o risco de desenvolvimento de tumores nasais e paranasais basicamente consiste em campanhas anti tabagismo. Seguir as regras de segurança do local de trabalho para se proteger de vapores nocivos e irritantes no ar, como usar uma máscara facial (The American Cancer Society, 2019)

1.4 Glioblastomas

Glioblastoma ou astrocitoma grau IV apesar de poderem surgir em qualquer idade são muito mais frequentes nos adultos do que entre crianças. Os gliomas são pouco mais prováveis de ocorrer entre os homens do que nas mulheres, e são mais comuns em caucasianos do que em afro-americanos. Os diferentes graus histológicos de um glioma apontam para um determinado potencial de crescimento e possível padrão de agressividade (PERRIN et al., 2019).

Os tumores do SNC apresentam uma distribuição que poderia ser condizente com uma possível migração de centros neurais tronco, como a zona sub ventricular granulosa justaposta ao plexo coroide. O plexo coroide permanece acima do hipocampo e é ricamente vascularizado. O hipocampo especificamente nas regiões CA2, CA3 e CA4, no giro denteado tem-se justaposto ao plexo coroide. A vascularização do hipocampo termina no seio cavernoso que se comunica inferiormente com o seio pterigoide (HAYMAN et al., 1998).

O seio cavernoso é uma rede venosa vascular para a qual drena todo o sangue venoso do SNC e também da face que por fim são tributárias da veia jugular interna, através de uma rede de pequenos vasos. A veia oftálmica superior recebe sangue da veia supra orbital e da veia angular que é superficial na face. A veia facial profunda é tributária do seio pterigoideo que se comunica com o seio cavernoso. A veia oftálmica superior e orbitária recebem sangue proveniente de áreas adjacentes ao seio da face que via de regra é colonizado por diferentes agentes (BERENHOLZ et al., 1998), como os fisiológicos firmicutes e bacteroides, assim como por agentes patogênicos envolvidos tanto em sinusites quanto nas otites (PARMAR et al., 2009). Eventualmente bactérias e vírus vinculados a doenças sexualmente transmissíveis podem acometer o pavimento mucoso que compõe a faringe e os seios da face, como

o papiloma vírus (IOANNIDIS et al., 2015). A clamídia é um agente epidemiologicamente importante, pois tanto produz uretrites assintomáticas como contaminam a conjuntiva de neonatos, obrigando ao nascimento utilizar colírios de nitrato de prata como forma de prevenir conjuntivite neo natal e a cegueira subsequente (GOWER et al.,2015). Crianças com baixo peso 1500 apresentam uma proteção em relação às nascidas com bom peso de 3500; talvez fosse o antibiótico prescritos aos neonatos instáveis em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (DAHLHAUS et al., 2017).

A neoplasia mais comum do SNC, contando os benignos e os malignos, é o meningioma, sendo mais comum nas mulheres. O meningioma acomete com frequência ao longo do revestimento dural dos seios venosos do cérebro e da base do crânio, locais onde as células da capa aracnoide são mais abundantes. Locais de estase sanguínea e em contato com os colonizados e cheios de vida seios maxilares e frontais (BORCH et al., 2021).

As mutações mais comuns associadas aos meningiomas são: em primeiro lugar a deleção 22q11.2, esta mutação determina mal formações cardiológicas e faciais, e também produzem imunodeficiência via disfunção de linfócitos T (BORCH et al., 2021). Além da deleção do 22q11.2 outra mutação importante no desenvolvimento de meningioma são as mutações inativadoras do NF2: o gene NF2 transcreve uma proteína chamada merlin, que ajuda a regular várias vias de sinalização chave que são importantes para controlar a forma celular, o crescimento e a ligação das células, umas às outras via adesão celular. Essa proteína funciona como um supressor de tumor, evitando que as células cresçam e se dividam muito rápido ou de forma descontrolada. Outras alterações são as mutações em TRAF7, AKT1, KLF4, SMO e PIK3CA foram identificadas por sequenciamento (BATTU et al., 2018).

Sinusites eventualmente podem provocar meningites, embora a contaminação de um seio paranasal possa ser subclínica e assim provocar uma reação defensiva local e sistêmica por parte do organismo. O seio cavernoso recebe sangue da veia oftálmica superior, que drena os seios da face. O seio cavernoso está localizado em ambos os lados da fossa pituitária e do corpo do osso esfenoidal entre as camadas endosteal e meníngea da dura-máter. Ele se estende do ápice da órbita ao ápice do osso petroso temporal. Os seios cavernosos têm esse nome por apresentarem estrutura reticulada e por serem atravessados por inúmeros filamentos

entrelaçados. Eles são de forma irregular, maiores atrás do que na frente, e estão colocados em cada lado do corpo do osso esfenoide, estendendo-se da fissura orbitária superior ao ápice da porção petrosa do osso temporal. Cada um abre para trás nos seios petrosos. Na parede medial de cada seio está a artéria carótida interna, acompanhada por filamentos do plexo carotídeo; perto da artéria está o nervo abducente; na parede lateral estão os nervos oculomotor e troclear e as divisões oftálmica e maxilar do nervo trigêmeo. Essas estruturas são separadas do sangue que flui ao longo do seio pela membrana de revestimento dentro do seio. O seio cavernoso recebe sangue da veia oftálmica superior através da fissura orbitária superior, algumas das veias cerebrais e também o pequeno seio esfenoparietal, que segue ao longo da superfície inferior da pequena asa do esfenoide. Comunica-se com o seio transversal por meio do seio petroso superior; com a veia jugular interna através do seio petroso inferior e um plexo de veias na artéria carótida interna; com o plexo venoso pterigóide através do forame Vesalii, forame oval e forame lacerum, e com a veia angular através da veia oftálmica. Os dois seios também se comunicam por meio dos seios intercavernosos anterior e posterior (WANSON, 1990).

A concentração e a função de fosfatases alcalinas estão aumentadas na inflamação, as ALP diferenciam-se basicamente em quatro subtipos, que tem como uma das funções catalíticas retirar grupos fosfato de vitamina B6 e de precursores da formação das membranas, fosfocolina e fosfoetanolamina, disponibilizando carbonos ao ciclo do carbono celular. A realocação de carbonos no DNA reativa genes protetores assim como pode silenciar os genes vinculados ao processo inflamatório tumoral, esse mecanismo é dependente de vitaminas do complexo B, assim como dos carbonos fornecidos pela colina, do folato e da metionina, existindo entretanto outros marcadores de membrana que caracterizam indiferenciação como o CD-133, CD-144, fosfatases alcalinas (WALCHER et al., 2020).

Os centros germinativos expostos à inflamação Th17 são repletos de células tronco, que exibem capacidade de ativar mecanismos de self renewal, ou seja, são capazes de produzir uma célula idêntica a si e outra parcialmente diferenciada. Estas células são consideradas por boa parte da comunidade científica envolvida no estudo das neoplasias como a tropa de elite tumoral, uma vez que seriam elas as responsáveis pela invasividade, resistência e pelo prognóstico reservado de qualquer tumor agressivo, não sendo os GBM uma exceção. A invasividade de um GBM por vezes é vinculável à presença de uma estrutura histológica chamada de pseudo

palisadas. O que são estas palisadas? Basicamente são estruturas celulares circulares, como de uma aldeia tupinambá como descrito por Hans Staden, uma cerca circular com um centro necrótico, encontradas em diferentes tipos de inflamação tumoral ou não. Quando as células da “cerca” exibem aspecto de quadrático, cúbicas, são chamadas de palisadas, quando esta “cerca” é composta por células alongadas denominam-se pseudo palisadas (RONG et al., 2006). Estas células que compõem a “cerca” circular das “pseudo palisadas” são provenientes - migraram do centro necrótico hipóxico e ácido onde se encontra um vaso trombosado. Nestas células a expressão de proteínas que são marcadoras de indiferenciação se dá de forma proporcional ao pH, menor justaposto ao centro necrótico, menor quanto mais próximos um vaso aberto, no qual estas células penetram e migram grandes distâncias no SNC, fazendo com que recidiva seja a marca dos GBMs operados (WIPPOLD et al., 2006). Níveis baixos de pH, portanto de grande concentração de prótons, determina na célula tumoral a expressão de proteínas de indiferenciação e resistência como as fosfatases alcalinas, cuja função é chave para a nutrição celular no tocante a precursores fosfolipídicos e absorção de vitâmeros da vitamina B6.

A importância das alcalinas fosfatases pode ser visualizada na hipofosfatase neonatal, uma anomalia congênita causada pela mutação de um dos subtipos de fosfatase alcalina, caracterizada por neonatos exibindo sinais de osteomalácia e elevados níveis séricos tanto de B6 quanto de fosfoetanolamina, ou seja de AEH₂F. Tais crianças falecem ainda no período neonatal, se não tratadas, por insuficiência cardíaca e crise convulsivas (SALLES, 2020).

Existem centenas de marcadores de indiferenciação, receptores cuja estimulação por proteínas associadas a lesão tecidual, como hialuronas, beta glucanas que produzem inibição da diferenciação e manutenção do estado tronco, além de aumentar a carga de interferons, antivirais importantes para o controle da população endêmica de herpes via TLR4/2 (MLCOCHOVA et al., 2020). O próprio processo de epitelial mesenquimal diferenciação é regulado via NF-κB, uma proteína que inibe a apoptose programada de LB, e que portanto, elevam a concentração de auto anticorpos, via ativação da Relb e Olig2 (HUBER et al., 2004).

As células de GBMs possuem grande capacidade de deslocamento por meio de metaloproteinases, que abrem caminho entre os tecidos fisiológicos, além do emprego de substâncias neurotóxicas excitatórias, como o glutamato, que abrem poros celulares como os canais NMDA, causando a morte dos tecidos fisiológicos e

as crises convulsivas, que marcam alguns pacientes com estes tipos de neoplasia (RAMASWAMY et al.,2014).

Os astrócitos, as células que muitas vezes iniciam gliomas que secundariamente venham a se tornar um GBM, controlam a barreira hematoencefálica ao mesmo tempo que também circundam terminações sinápticas, modulando a neurotransmissão participando dos eventos neurobiológicos, tendo sido nos últimos anos relacionados a doenças psiquiátricas, como é o caso da esquizofrenia (CHANG et al.,2021). Alguns autores tem proposto o uso de anti-diabéticos, como a metformina, nestes pacientes pois muitos deles desenvolvem obesidade e diabetes tipo II, também em decorrência do crônico uso de antipsicóticos, de forma que muitos clínicos tem descrito, ainda de forma anedótica, melhora clínica psiquiátrica, por meio de dietas cetogênicas, e por meio do uso de antidiabéticos, como a metformina.

Os astrócitos exibem propriedades antioxidantes, uma vez que degeneração de astrócitos se associa ao quadro demencial, frequentemente é secundária á presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), que sucede a crônica evolução demencial da esquizofrenia (ROTERMUND; MACHETANZ; FITZGERALDI, 2018).

Vasculopatias são comorbidades frequentes associadas aos glioblastomas, os pacientes exibem riscos maiores de doenças cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca e a doença arterial coronariana. Apesar destes dados epidemiológicos, o diabetes mellitus não tratado ou dislipidemias apresentam condições inversas ao surgimento de gliomas, o uso de estatinas vincula-se de forma fracamente positiva ao desenvolvimento de gliomas; outras condições associadas ao processo aterosclerótico não apresentaram forte vínculo mensurável relacionável (TONG et al.,2012). Pacientes portadores de GBM, ou mesmo de gliomas, apresentam maior incidência de hipertensão arterial que se eleva progressivamente, além de maior incidência de trombose do seio cavernoso, o que sugere que a vasculite que caracterizam os tumores cerebrais talvez tenham origem local. Ou seja, as vasculites são relacionadas aos tumores cerebrais e talvez possam ser secundários á vasculites do seio cavernoso, uma vez que somente uma pequena porção destas vasculites chegam a causar trombos – detectáveis - neste território venoso após a invenção dos antibióticos. O seio cavernoso por sua vez é contíguo aos vários centros germinativos que mantém o SNC e também contíguo ao seio etmoidal (LOMBARDI et al., 2013).

A epidemiologia das sinusites aponta para uma incidência muito maior em brancos caucasianos, nórdicos, 2 vezes maior que em negros, exatamente da mesma forma que ocorre com os gliomas. Sinusites são amplamente reconhecidas como causadoras de pólipos nasais e por sua vez, o achado de um pólipo nos seios paranasais é sugestivo de diferentes tipos de tumores intracerebrais, determinando a solicitação de exames de imagem com o objetivo de se afastar neoplasias (SOLER et al., 2012).

As sinusites crônicas acompanham os casos de fibrose cística, esta trata-se de uma doença que acomete mais os brancos do norte da Europa, do que outros povos, de modo geral a fibrose cística ocorre quando existe o encontro de duas mutações em genes alelos no gene que transcreve canais de cloreto. Estes canais permitem o influxo de Cloreto e de água, sua disfunção altera de tal modo as propriedades do muco que facilitam o processo de contaminação bacteriana. Este gene apresenta mutação em 66% das pessoas do planeta, mas como não há mutação concomitante dos 2 alelos, não há fibrose cística. Entretanto, a mutação heterozigótica, talvez possa predispor este gene, caso seja excessivamente transcrito, como ocorre em sinusites bacterianas por exemplo, causar mutações na longa via metabólica que é ativada contiguamente á abertura dos canais de cloreto. A abertura deste canais de cloreto, que tem ação fisiológica anti tumoral, uma vez que mutações deste gene se vinculem a inflamação crônica e subsquente formação de tumores, ao permitir o influxo de cloreto não há infecção tampouco ativação de EPGFR, PTEN/ PI3K/AKT/mTOR que são vias comumente mutadas nos tumores intracranianos. A supressão do gene CFTR, ou seja o gene da fibrose cística, leva ao desenvolvimento de carcinomas que em 85% dos gliomas, apresentam alterações, deleção especificamente, do gene EPGFR/PI3K/AKT/mTOR (The American Cancer Society, 2021; KANG et al., 2015).

O mTOR, ou seja “mammalian target of rapamicina”, um agente imunodepressor que controla importantes processos celulares como a atividade metabólica, a proliferação celular, a sobrevivência e a diferenciação tecidual. O CFTR é super expresso em tecidos tumorais e necessita de cofatores como a AMPs para sua abertura, por sua vez a elevação da concentração citosólica de cloreto determina ativação de PI3K/AKT, de forma que a inibição do canal de cloreto também inibe a PI3K/AKT/Bcl2 expressão. A concentração tecidual tumoral da CFRT é proporcional

ao grau do glioma, sendo então muito mais expresso nos gliomas de maior grau, como os GBMs, portanto mais indiferenciados (KRAMER et al., 2020).

Não basta uma única mutação para a gênese de um glioma, as células iniciadoras de tumores cerebrais necessitam de no mínimo 3 eventos, são eles: grande ativação de receptores de tirosina kinase, mutações na p53 e também de proteínas controladoras do ciclo celular, como é o caso da proteína Rb (ZHAO et al., 2020),

A cefaleia causada por um glioblastoma, provavelmente começará a ser percebida logo após acordar. A dor é persistente e com frequência piora com a tosse, muda-se de posição ou ao exercício, latejamento, embora isso dependa de onde o tumor está localizado, bem como vômito (AKHAVAN; CLOUGHESY; MISCHER, 2010).

1.5 Gliomas

Gliomas são relativamente incomuns, menos de 150 mil casos anuais no Brasil, dentre os portadores de tumores cerebrais, benignos ou malignos, por volta de 1/3 deles são diagnosticados como gliomas. Dentre os tumores cerebrais primários, os gliomas respondem quase metade dos casos. Gliomas de grau IV recebem a denominação de glioblastoma (GBM) sendo o tipo mais maligno de astrocitoma, 90% das vezes são primários e já em estágio IV, enquanto que apenas 10% dos GBM provém de gliomas menos agressivos, de menor grau. Os sintomas destes agressivos gliomas grau IV, podem ser comuns a outros tipos de gliomas bem menos agressivos (ZHENG et al., 2008).

A maioria dos pacientes apresenta algum grau de cefaleia, embora alguns gliomas possam ser assintomáticos, apresentando sintomas somente ao pressionar estruturas adjacentes, como o cérebro ou a medula espinhal, dentre os sintomas mais recorrentes dos gliomas estão além das dores de cabeça; as convulsões; as mudanças de personalidade; fraqueza nos braços, na face ou pernas; dormência; tontura; problemas na fala; náusea e vômito, mostram como alguns pacientes apresentam muitos sintomas sistêmicos; apesar de uma origem celular definitiva ainda não ser clara, no caso dos gliomas os vários estudos populacionais e os esforços de sequenciamento em modelos animais geneticamente modificados contribuíram para um melhor entendimento dos eventos precursores da formação dos gliomas.

O conhecimento sobre a epidemiologia dos gliomas, os fatores de risco genéticos hereditários, da mesma maneira que os eventos somáticos descritos em modelos animais, podem ser a chave para a revitalização de nossa compreensão acerca da interação entre os tecidos suscetíveis e os fatores desencadeantes, que determinam a transformação maligna, essa compreensão mais ampla nos permitiria projetar opções de tratamentos mais eficientes e de controlar o desenvolvimento neoplásico, ou mesmo de ajudar no desenvolvimento de novas formas de triagem (ZHENG et al., 2008).

Os gliomas são diagnosticados através de exames como ressonância magnética ou tomografias. Por meios cirúrgicos determinamos o tipo e o grau de diferenciação e tipo histológico que norteia o tratamento e o prognóstico.

Temozolamida é o antitumoral mais empregado para a condição, cirurgia, terapia com radiação, quimioterapia e combinações destas diferentes abordagens fazem parte da terapêutica (TANRIKULU; ÖZEK, 2020).

Não existem fatores desencadeantes óbvios os tumores cerebrais podem ocorrer em pessoas de todas as idades, embora sejam muito mais comuns entre adultos do que entre as crianças. As células gliais, que formam os gliomas, são células que tanto protegem quanto nutrem, no sentido de que controlam a fluxo sanguíneo e portanto de nutrientes ao tecido nervoso enquanto dão sustentação aos próprios neurônios além das funções imunes; os gliomas ocorrem no encéfalo, na medula espinhal ou mesmo junto a nervos periféricos, sendo classificados pela OMS conforme o tipo de célula glial afetada, desta forma os tumores do SNC são classificados em: 1) Astrocitomas; 2) Ependimomas; 3) Oligodendrogliomas; 4) Oligoastrocitomas ou 5) Schwannomas (GONDIM et al., 2018).

Como seu diagnóstico requer caros exames de imagem, costumeiramente eles são mais diagnosticados em regiões socioeconomicamente desenvolvidas, entre brancos idosos, dificultando o diagnóstico no terceiro mundo. Isto não significa que o subdiagnóstico no terceiro mundo seja responsável pelas diferenças na incidência, mas são peculiaridades do diagnóstico de tumores intracranianos (GONDIM et al., 2018).

O tratamento inicial de imediato inclui cirurgia, radio e quimioterapia além de poder valer-se de terapias moleculares direcionadas para cada tipo de tumor, conforme sua assinatura bioquímica ou genética, sendo o melhor tratamento possível para os tumores intracerebrais levar em consideração, além da topografia tumoral, os

sintomas e potenciais benefícios do procedimento, além dos riscos inerentes das diferentes formas de abordagem terapêutica (GODOY, 2018).

A craniotomia estereotáxica, ou seja a cirurgia com a retirada do tumor é o tratamento inicial para gliomas. A craniotomia tem sua precisão aumentada se orientada por meio de computadores ou mesmo imagens de ressonância magnética para dar maior sensibilidade e poder discriminativo ao bisturi do cirurgião. Caso o tumor esteja próximo ou seja adjacente de áreas eloquentes cerebrais a cirurgia dá-se com uma ressonância magnética intraoperatória ou até mesmo com um mapeamento intraoperatória cerebral. O mapeamento é, por vezes, feito com o paciente inconsciente ou, se acordado, previamente sedado. Durante o ato cirúrgico, naqueles em que o paciente permanece acordado, pede-se para que o operado siga instruções, permitindo a retirada do tumor minimizando os potenciais danos ao tecido fisiológico, causando menos sequelas neurológicas secundárias ao bisturi do cirurgião. As mutações mais comuns nos gliomas são: IDH1/2; p53; PI3K, PTEN, Ciclina D1, Rb, além de mutações no gene vinculado a fibrose cística (GODOY, 2018).

1.6 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é conhecida em humanos sob quatro formas: um restrito ao intestino, à placenta, outro restrito a células germinativas e teratomas, e o outro amplamente distribuído (fígado, osso, rim) chamado de tecido inespecífico. As fosfatases alcalinas funcionam hidrolisando grupos fosfato de um amplo espectro de substratos fisiológicos. As fosfatases alcalinas foram originalmente descritas em estudos de histoquímica, como um marcador para vários tecidos, especialmente no que se refere a formação de tumores osteogênicos em camundongos. Encontrando-se fosfato de cálcio no local de ação das enzimas em 1973, a ALP foi relatada como marcadora histoquímica em células de carcinomas embrionários com alcalinas diferentes fosfatases localizadas nas populações de células-tronco e nas células embrionárias ectodérmicas. A ALP é usada como um marcador para células-tronco pluripotentes, células-tronco embrionárias, induzidas células-tronco pluripotentes e células germinativas embrionárias. (ZHANG et al., 2018; SHARMA; PAL; PRASAD, 2017; RADER, 2017)

O mecanismo de ação da fosfatase alcalina envolve a coordenação geométrica do substrato entre os íons Zn^{2+} nos sítios ativos, enquanto o sítio Mg^{2+} não parece

estar próximo o suficiente para participar diretamente do mecanismo de hidrólise, entretanto, pode contribuir para a forma do potencial eletrostático em torno do centro ativo. A ALP tem um Km de $8,4 \times 10^{-4}$.

As ALP são proteínas ancoradas ao fosfatidilinositol com ampla especificidade de substratos, amplamente distribuídas incluindo procariotos e eucariotos superiores. Muito embora as fosfatases alcalinas estejam amplamente distribuídas pelos órgãos e tecidos e exibam diferentes propriedades físico-químicas (FONTA et al., 2004; HOWARD et al., 1987).

As ALP estão em concentrações decrescentes na placenta, mucosa do íleo, rim, osso e fígado. Mais de 80% das fosfatases alcalinas no sorosão do fígado ou dos ossos e, apenas pequenas quantidades, são liberadas do intestino. Embora as fosfatases alcalinas sejam encontradas em muitos tecidos biológicos, sua função precisa ainda é motivo de debate.

Mudanças nos níveis de ALP podem ser usadas para detectar determinadas células malignas especificamente as altamente refratárias. Ao rastrear diferentes cânceres sanguíneos, a atividade da ALP nem sempre se restringe às células inflamatórias como as leucêmicas $CD34^+$, podendo ser expressadas também em leucêmicos $CD34$ negativas. As células $CD34^+/ALP$ sustentam a leucemogênese, desta forma a ALP torna-se um potencial valiosíssimo alvo molecular para o desenvolvimento de anti neoplásicos (RICO et al., 2016; CIGNETTI et al., 1999).

Devido à localização da enzima e à estrutura da proteína enzimática, a enzima que está em solução é cercada por uma concentração menor de proteínas do que em outra porção celular. A funcionalidade da ALP pode ser testada por meio do teste de p-nitrofenil fosfato. Embora algumas células possam viver bem sem a ação das fosfatases alcalinas, mutações nas ALP tecido inespecíficas produzem uma doença genética chamada de hipofosfatase, doença na qual um recém-nascido apresentando sinais de osteomalácia, se não tratado com a reposição enzimática, falece de insuficiência cardiopulmonar e/ou epilepsias intratáveis, associadas a incrementos sistêmicos nos níveis de vitâmeros da B6 e de fosfoetanolamina. Algumas complexidades da regulação e do metabolismo bacteriano sugerem outras finalidades mais sutis uma vez que a *Escherichia coli* mutante, sem fosfatase alcalina, sobrevive muito bem, assim como os mutantes incapazes de interromper a produção de fosfatase alcalina (RICO et al., 2016; CIGNETTI et al., 1999).

Na *Escherichia coli* o pH ótimo para a atividade da enzima é alcalino, por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo bovino é de 8,5. A fosfatase alcalina é responsável por 6% de todas as proteínas ativas das células. As fosfatases alcalinas encontradas no intestino, placenta e tecido germinativo são específicas. Isso significa que eles são encontrados apenas nos tecidos onde são expressos em condições fisiológicas. Apenas em situações específicas eles também podem contribuir para o pool circulante de fosfatase alcalina sérica, quando há maior criação da enzima. As fosfatases alcalinas tecidos não específicas constituem a maior parte da fração que circula no soro e, portanto são de grande interesse na clínica médica (KEWAN et al., 2017).

Um único gene codifica todas as fosfatases alcalinas que são expressas no fígado, ossos e rins. Exceção é a fosfatase alcalina intestinal que é codificada por um gene diferente dos genes que codificam a fosfatase alcalina da placenta e a isoenzima Regan, um marcador produzido em grandes quantidades no linfoma de Hodgkin (KEWAN et al., 2017).

Todas as fosfatases alcalinas tecido inespecíficas têm as mesmas sequências de aminoácidos, contudo diferentes cadeias laterais de carboidratos e lipídios. Estas modificações pós-transcrição proteica conferem as propriedades físico-químicas únicas que caracteriza o ambiente funcional das ALP, na *Escherichia coli* existem porinas nas membranas externas que permitem penetração de compostos fosforilados, enquanto a membrana interna não contém estas porinas. Os compostos fosfatados não conseguem atravessar a membrana interna e atingir o citosol uma vez que há uma forte carga aniônica dos grupos fosfato junto com o restante do composto, que impede que os compostos fosfatados atravessem a região apolar da bicamada lipídica que compõe a membrana celular (JIN et al., 2019).

A clivagem do grupo fosfato do composto via ALP permite que os substratos dentro do espaço intermembranar das porinas atravessem a bicamada lipídica e atinjam o citosol. Estas enzimas produzem também fosfato inorgânico que é direcionado pelo sistema transportador de fosfato, também chamado de sistema Pst. O sistema Pst transporta o fosfato para o citosol (COX et al., 1981).

Desta forma o objetivo principal da desfosforilação pela fosfatase alcalina seria o de aumentar a taxa de difusão de moléculas para as células e inibi-las de se difundirem livremente (SASLOWSKY et al., 2002, WORMAN et al., 1986).

A fosfatase alcalina é semelhante a qualquer outra proteína sérica, exibe meia-vida de 7 dias sendo depurada do soro, sua elevação é independente da

permeabilidade do ducto biliar ou do metabolismo hepático. Não se sabe onde a fosfatase alcalina é degradada. Mesmo após a resolução de uma obstrução biliar os níveis de fosfatase alcalina sérica podem permanecer elevados por 1 semana. A causa ambulatorial mais comum de elevação das fosfatases são as inflamações hepáticas. Elevações da atividade osteoblástica, tal qual é observado em distúrbios ósseos ou durante períodos de crescimento fisiológico, são a segunda causa mais comum de elevação. Durante a gestação, o influxo de fosfatase alcalina placentária que ocorre no final do terceiro trimestre contribui para a elevação da ALP em mulheres gestantes, outras causas de elevação das ALP nas doenças hepatobiliares tem sido motivo de debate, a investigação demonstrou de forma convincente de que a elevação das ALP se deve ao aumento da síntese enzimática e não à redução da excreção hepatobiliar da enzima (SEETHARAM et al., 1986).

O aumento da atividade das enzimas hepáticas é comprovadamente paralela ao aumento da atividade da ALP sérico; isso ocorre principalmente devido ao aumento da tradução do mRNA da fosfatase alcalina, mediada pela concentração crescente de ácido biliar, e aumento da secreção de fosfatase alcalina no soro via vazamento canalicular para o sinusóide hepático. O mecanismo que precipita sua liberação na circulação não foi elucidado. Estudos relatam que vesículas contendo fosfatase alcalina e muitas dessas enzimas ligadas às membranas sinusoidais são encontradas no soro de pacientes com colestase. Como a fosfatase alcalina é recentemente sintetizada em resposta à obstrução biliar, seu nível sérico pode ser normal na fase inicial da obstrução biliar aguda, mesmo quando as aminotransferases séricas já estão em seu pico (LIMDI; HYDE, 2003).

Quando a ALP é o único teste bioquímico hepático elevado, exemplificando, quando TGO/TGP estão dentro dos limites de normalidade e a fosfatase alcalina está desproporcionalmente elevada em comparação com os demais testes bioquímicos hepáticos, a avaliação clínica deve se concentrar na identificação da causa e a origem para a elevação da ALP (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).

Em indivíduos assintomáticos, com elevação isolada da fosfatase alcalina sérica, é essencial se identificar a origem da anormalidade. As fosfatases alcalinas derivadas do fígado, osso, placenta e intestinos têm diferentes propriedades físico-químicas. A grande importância da medição da ALP está vinculada ao diagnóstico de doença hepática colestática. Elevações ocorrem na obstrução biliar devido ao câncer colangiocarcinoma, adenocarcinoma da cabeça do pâncreas ou adenocarcinoma

ampolar, coledocolitíase, estenose biliar, colangite esclerosante ou causas de colestase intra-hepática, como colangite biliar primária, lesão hepática induzida por drogas, rejeição crônica do fígado em aloenxertos, doença hepática infiltrativas: sarcoidose, amiloidose, tuberculose e metástase hepática, hepatite alcoólica grave causando esteatonecrose. Pacientes com AIDS também podem ter níveis particularmente altos, devido à colangiopatia de infecções oportunistas, como citomegalovírus, criptosporidiose ou envolvimento granulomatoso do fígado por tuberculose (CHEN; LARUSSO, 1999).

A elevação moderada ou seja de até quatro vezes o limite superior de normalidade da ALP sérica é inespecífico, pois pode ocorrer em uma variedade de condições que afetam o fígado, incluindo cirrose, hepatite crônica, hepatite viral, insuficiência cardíaca congestiva e colangiopatia isquêmica causadas por infecções intestinais ou disbioses. Distúrbios que não envolvem principalmente o fígado, como infecções intra-abdominais, colestase de sepse, linfoma de Hodgkin, metaplasia mieloide e osteomielite, também podem causar elevação moderada da ALP (PÄÄKKÖNEN et al., 2013).

Tumores primários ou metastáticos aumentam os níveis de fosfatase alcalina sérica pela obstrução local do ducto biliar incrementando o vazamento desta isoenzima hepática. O câncer extra-hepático primário não precisa necessariamente envolver o fígado ou o osso; raramente tumores produzem sua própria fosfatase alcalina como no caso do linfoma de Hodgkin que secreta a isoenzima Regan ou que exerce um efeito paraneoplásico causando vazamento da isoenzima hepática para a circulação, como ocorre na síndrome de Stauffer devido ao carcinoma de células renais (SHARMA et al., 2019).

Níveis anormalmente baixos podem ser úteis clinicamente, pois são observados na doença de Wilson, especialmente quando se apresentam em uma forma fulminante com hemólise. O zinco é um cofator da fosfatase alcalina, que é substituído pelo cobre na doença de Wilson - um distúrbio do excesso de cobre - levando aos baixos níveis de ALP encontrados. Outras causas de níveis baixos de fosfatase alcalina são deficiência de zinco, anemia perniciosa, hipotireoidismo e hipofosfatasia congênita, a atividade da fosfatase alcalina é alterada em alguns estados de doença. Infecções bacterianas aumentam a atividade da ALP de neutrófilos, assim como na policitemia vera, na leucemia mielóide crônica e na hemoglobinúria paroxística noturna. A fosfatase alcalina também foi mostrada como

um marcador citoquímico para linfócitos e alguns tipos de linfoma e de leucemia linfóide, e mais recentemente, tem sido usado para a confirmação de leucemia mieloide aguda em cães (STOKOL et al., 2015).

As neoplasias hemáticas são caracterizados por diferentes sintomas, tipos, estágios e tratamentos. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma expansão agressiva de um clone maligno no sistema hematopoiético que, se não for tratada, pode ser fatal em poucos meses. LLA é o câncer hematogênico mais comum da infância e a principal causa de morte por polimitóticos antes dos 20 anos de idade. Contagens elevadas de leucócitos ao diagnóstico são preditivos de mau prognóstico, entretanto há também relevância prognóstica para outros exames (OKUN; TANAKA, 1978).

Nos pacientes que apresentam apenas uma elevação leve da fosfatase alcalina sérica, inferior a 50%, eles podem ser observados clinicamente com monitoramento periódico de testes bioquímicos séricos do fígado. Sempre que os níveis de fosfatase alcalina estão anormalmente elevados, uma avaliação adicional deve ser realizada para determinar se a elevação da ALP é hepática ou não hepática. Uma fonte hepática para um nível elevado de fosfatase alcalina é sugerida se existe elevação também da GGT. Se GGT for negativo e ALP positivo, a avaliação do distúrbio subjacente não diagnosticado é o próximo passo. Uma ALP óssea elevada pode vir de uma metástase óssea, doença de Paget, sarcoma osteogênico, cicatrização de fraturas, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo e osteomalacia (DEFTOS; WOLFERT; HILL, 1991).

A fração intestinal elevada ocorre após uma refeição gordurosa e em indivíduos geneticamente predispostos. Na suspeita de que o fígado seja a origem da elevação da ALP, imagens da árvore biliar serão necessárias para diferenciar entre colestase extra-hepática ou intra-hepática, além de revisar a lista de medicamentos.

Ultrassonografias são excelentes exames para análise do parênquima hepático. Se o ducto biliar está dilatado, a colangiopancreatografia endoscópica retrógrada (CPRE) ou a colangiopancreatografia por ressonância magnética (CPRM) poderia ser realizada.

Entretanto caso o ducto biliar não esteja dilatado, aplica-se o teste de anticorpo anti-mitocondrial (AMA) para avaliar se há colangite biliar primária (PBC). Se a AMA sérica for normal, a avaliação das causas de colestase intra-hepática, PBC AMA-

negativo, sarcoidose e várias outras doenças descritas anteriormente são necessários. A biópsia hepática costuma ser o último exame empregado (YOUNOSSI et al., 2019).

Uma marcada indução sinérgica de atividade ALP é observada quando células tumorais são incubadas com ambos os agentes simultaneamente. Duas isozimas ALP, tecido inespecífica (TNAP) e intestinal (IAP) são super expressas em células MCF-7 (TSAI et al., 2000).

A atividade TNAP é induzida pelo ácido retinóico enquanto a atividade IAP é induzida pela dexametasona. A dexametasona não tem efeito significativo sobre a atividade de TNAP e o ácido retinóico inibe a atividade de IAP em menos de 50%. A coestimulação da dexametasona com o ácido retinoico superestimula apenas as TNAP (TSAI et al., 2000).

Os níveis de mRNA da TNAP sugerem que a superindução é regulada também nos níveis de transcrição ou pós-transcrição. Na presença do antagonista do receptor de glicocorticoide - RU486 - a indução da atividade de IAP causada pela dexametasona foi totalmente bloqueada. No entanto, a capacidade do RU486 de antagonizar a ação do glicocorticoide é perdida após a superindução da atividade de TNAP mediada por dexametasona (ZHOU et al., 1994).

Na presença de ácido retinóico o inibidor do receptor de corticoide, RU486, comporta-se como um corticoide e confere superindução da expressão do gene TNAP da mesma forma que dexametasona também o faz (ZHOU et al., 1994).

Essas observações, tomadas em conjunto, sugerem que a indução funcional da IAP e da TNAP pela dexametasona é mediada por vias regulatórias distintas e que o ácido retinóico tem um papel essencial na superindução da expressão do gene TNAP. A funcionalidade dos sais de cálcio são verificáveis na estabilidade ultraestrutural permitida pela cartilagem articular, que consiste em cartilagem hialina e uma zona subjacente de cartilagem calcificada. A zona calcificada é uma interface entre a cartilagem e o osso subcondral subjacente e está envolvida na distribuição das forças de suporte de carga. Os condrócitos formam o tecido cartilaginoso e in vitro sintetizam agregan, colágenos tipos II, I e X, desfosforilação e ALP. Numerosas moléculas são implicadas no processo de mineralização de outros tecidos, como no osso e na placa epifiseal. Regula-se a mineralização aumentando-se os níveis locais de cálcio ou fosfato, por atuação de fosfatases, modulando proteínas da matriz através da desfosforilação local (ORIMO,

2010) podendo desempenhar um papel importante na mineralização (RATTNER et al., 2000). As proteoglicanos também foram implicados, quantidades diminuídas de proteoglicanos podem inibir a mineralização (EANES et al., 1992) enquanto Boskey et al. (1997) mostraram que a mineralização poderia ocorrer na ausência de proteoglicanos e que os proteoglicanos podem inibir a mineralização (BOSKEY; DICK, 1991). Mudanças na expressão do colágeno tipo X e II são detectadas na cartilagem epifisária mineralizante, (JUBECK et al., 2009).

A calcificação vascular é causada pela deposição de hidroxapatita nas camadas íntima e medial da parede vascular, condições presentes na fisiopatologia de eventos cardiovasculares graves em pacientes com hipertensão, doença renal crônica e diabetes mellitus. A calcificação vascular se associa a produção de vesículas ou exossomos a partir da matriz, diferenciação osteogênica, redução da viabilidade celular e senescência (ZHANG et al., 2018).

Ácidos graxos fosfolípidos nas microvesículas facilitam a nucleação destes nanocristais intravesiculares, conforme o mineral intravesicular cresce além dos limites da micro vesícula, rompendo-a, em uma matriz colágena auxiliada por uma série de promotores, ou dificultada, por inibidores da calcificação.

O substrato não específico p-nitrofenil fosfato ao ser desfosforilado pelas ALP produzem o colorido p-nitrofenol (PNP) e fosfato inorgânico. A cor amarela do PNP e seu λ_{max} em 410 permitem que a espectrofotometria mostre informações importantes sobre a atividade enzimática e a ALP em GBM, considerada um marcador de indiferenciação, resistência, recidiva tumoral, portanto de mal prognóstico (IWADATE et al., 2017).

2 OBJETIVO

Determinar os efeitos da temozolamida e da PO4-Etn em astrócitos e na linhagem U138 na sobrevivência, no ciclo celular, no potencial de membrana mitocondrial e em marcadores tumorais

2.1 Objetivos Específicos

Verificar se existe relação entre a função catalítica da alcalina fosfatase com a citotoxicidade da PO4-Etn na linhagem de multiresistente de GBM SF295.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

O cultivo de células neurais é uma ferramenta metodológica amplamente utilizada no estudo de propriedades celulares e teciduais por inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo. A partir de uma suspensão de células contadas por meio da câmara de Neubauer, semea-se 300- 500 mil células/cm², em placas com poços de 15mm de diâmetro, contendo poli-L-lisina. DMEM/F12 é um meio de cultivo adequado, SFB a 10%,(Gibco, Invitrogen), empregou-se nas primeiras duas semanas e 20% na semana seguinte. As células foram cultivadas em incubadora umidificada a 37°C numa atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% de ar. As células apresentaram morfologia poligonal caracteristicamente astrocitária visualizada ao microscópio.

3.1.1 Cultivo de células tumorais de Glioblastoma Humano SF-295 e U-138

As células da linhagem de glioblastoma humano, SF-295 e U-138, foram mantidas como monocamadas de cultura em meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen), para a linhagem SF-295 e DMEM para alinhagem U-138, ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal, 100 µg/ml de estreptomicina e 100 unidades/ml de penicilina, a 37°C em incubadora com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e quando atingida a confluência de 80%, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio da adição de solução de tripsina 0.05% e foram então repicadas.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Alíquotas de células tumorais de glioblastoma (5×10^4 células) foram plaqueadas em lâminas de vidro estéril. Após a adesão, as células foram expostas a uma formulação de 2-AEH₂F Sintético, fixadas adicionando 3% de glutaraldeído, incubadas durante 1 hora a 4 ° C e pós-fixadas em Tetróxido de Osmio a 1% (OsO₄ - Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas várias vezes com cacodilato de sódio 0,005 M, pH

7,2, e passaram gradualmente através de soluções de acetona de concentrações crescentes variando de 30% a 100% durante 10 minutos. As amostras foram completamente secas em um aparelho de secagem de ponto crítico (EMS 850 WM - Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19449- EUA), usando CO₂ líquido como meio de permuta. Os espécimes desidratados foram montados sobre telas de alumínio, revestidos com carbono / ouro e revestidos de ouro, utilizando um Balteers SCD 030 Sputter Coater (Balzers Union Ltda.) e visualizados em FEI Quanta 250 (FEI Company).

3.3 AGENTES EMPREGADOS

3.3.1 2 - AEH₂F Sigma Aldrich®

A amostra adquirida de 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH₂F-Sigma), de PM de 141.063 g/mol foi empregada para determinação do valor da concentração inibitória (IC₅₀%) após 24 e 72h como também, a avaliação das fases do ciclo celular. O composto (2-AEH₂F) Sigma foi dissolvido em diferentes concentrações molares e teve seu pH corrigido para 7,2 por meio de uma solução de Na(OH) 0,01 M.

3.3.2 2 - AEH₂F Sintético

O composto 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato Sintético (2-AEH₂F - Sintético) é uma composição de sais obtidos por esterificação contendo aproximadamente as seguintes proporções 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato: 32,2% de 2 - AEH₂F; 18,2% de Etn; 34,9% de fosfatos e 3,6% de pirofosfatos, Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Na⁺ e Ba²⁺, 2,3% de fosfo bi etanolamina e 3,9% de H₂O. O composto 2-Aminoetil Dihidrogeno Fosfato Sintético, foi diluído a uma concentração de 200 mM, com base no peso molecular em pH 7.2.

3.3.3 Monoetanolamina - (MEA)

MEA, é um amino álcool com grau, uma base fraca, utilizado como tampão, sob forma de pó branco, exibindo pka de 9,5. MEA apresenta PM de 61,08 g / mol, foi diluída em água destilada na concentração final de 100 mM.

3.4 Determinação da atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade enzimática da ALP em células tumorais da linhagem de GBM SF-295 foi determinada colorimetricamente usando o reativo dinitrofenil fosfato. Este experimento mede a velocidade de hidrólise do substrato p-nitro fenilfosfato (pNPP) por meio da velocidade de produção do corante amarelo, p-nitro fenol, no sobrenadante das culturas celulares a 37 °C. As células tumorais foram lavadas com solução fisiológica 0,9% estéril e coletadas em solução tampão (20 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂). As células tumorais foram solubilizadas pela adição de Triton X-100 1% por 20 min, centrífugados por 12 minutos. Os sobrenadantes foram testados quanto à atividade de ALP e a leitura realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm. Foram avaliadas as atividades da ALP das seguintes preparações da Sigma Aldrich e do composto Sintético: 2 - AEH₂F; 2 - AEH₂F mais pirofosfato e 2 - AEH₂F mais cofatores Mg²⁺ 600µM; Zn²⁺ 400 µM; em pH de 6.0. Os parâmetros cinéticos da ALP foram determinados sobre os seguintes critérios: constante inibitória (Ki), velocidade máxima de reação (V max), constante de Michaelis (Km). Os resultados foram apresentados em medida de unidade internacional (IU), ou seja, a concentração de coenzima que oferece a velocidade de geração de 1 µM / min de produto.

3.5 Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

O ensaio colorimétrico 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) é um teste de viabilidade celular que nos permite calcular o valor da concentração inibitória (IC50%). Os valores de densidade óptica são normalizados e analisados no eixo y, e os valores de concentração do fármaco testado, após transformação logarítmica, no eixo X. O gráfico exhibe uma curva logarítmica. A

densidade óptica corresponde à equação: densidade óptica = $\log(I_0/I)$, onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através do meio celular. O valor do eixo x, em relação aos 50% padronizados de y, é descrito como concentração inibitória (IC50%). Ou seja, a concentração que inibe 50% da viabilidade celular. Realizou-se os ensaios de MTT com os seguintes compostos sais de 2 - AEH₂F Sigma e Sintético, 2 - AEH₂F mais pirofosfato e o 2 - AEH₂F pH de 6 na presença μM de Mg²⁺ [600 μM] e Zn²⁺ [400 μM] e determinação dos valores de IC50%, pH fisiológico após 24 e 72h de tratamento.

Após a tripsinização das células tumorais e inativação da tripsina, com soro fetal bovino, foram plaqueadas em 96 poços, mantendo densidade de 2×10^4 células/ml,

permanecendo incubadas por 1 dia a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após a densidade celular atingir 80-90% de confluência as células foram tratadas e incubadas com 5 mg/mL do MTT por 3h, e os cristais de formazan solubilizados pela adição de dimetilsulfóxido (Sigma- Aldrich Co®). A absorção medida a 570 nm em um leitor de microplacas, determinando os valores de densidade óptica (Thermo Plate; Ray to Life e Analytical Sciences Co., Ltda, Shenzhen, República Popular da China).

As células tumorais foram pré-cultivadas por 48 horas na presença de dexametasona [10^{-6}] M e ácido retinóico [10^{-5}] M e novamente realizado o ensaio de MTT na presença ou ausência de 140 μM de pirofosfato de sódio.

3.6 Análise das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo

O iodeto de propídio é um marcador nucleico estequiométrico, ou seja, liga-se em proporção à quantidade de DNA presente na célula. Portanto, as células que estão na fase S terão mais DNA do que as células na fase G1. As células irão absorver proporcionalmente mais marcador e apresentarão fluorescência mais intensa até que tenham dobrado seu conteúdo de DNA. As células na fase G2 serão aproximadamente duas vezes mais fluorescentes que as células na fase G1. As análises das fases do ciclo celular foram realizadas após 12h de exposição, os dados foram obtidos por citômetro de fluxo.

Após 12h de tratamento, as células tumorais foram lavadas com solução fosfato salina tamponado, ressuspensas em 1 ml de tampão GM gelado contendo glicose 6,1

mM, NaCl 137 mM, KCl 4,4 mM, NaH₂PO₄ 1,5 mM, KH₂ PO₄ 0,9 mM, 0,5 etileno di-
amina ácido tetraacético mM, e fixados pela adição de 3 mL de etanol gelado a 70%.

Antes do tratamento, as células foram incubadas com uma solução de 1,8 µg/ml de iodeto de propídio no escuro e por 30 minutos. A análise realizada pelo citômetro de fluxo foi realizada por citômetro de fluxo BD Biosciences, FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Cerca de 10.000 eventos foram coletados. O contingente de DNA por fase do ciclo celular (Sub-haplóide ou DNA fragmentado, G₀/G₁, S e G₂/M) foi medido pelo software Mod Fit LT 3.2 (Becton Dickinson).

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Alíquotas das células tumorais de glioblastoma (5×10⁴ células) foram plaqueadas em lâminas de vidro estéril. Após a adesão, as células foram expostas a uma formulação de 2-AEH₂F Sintético, fixadas adicionando-se 3% de glutaraldeído, incubadas durante 1 hora à 4°C e pós-fixadas em Tetróxido de Osmio a 1% (OsO₄ - Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas várias vezes com cacodilato de sódio 0,005 M, pH 7,2, e passaram gradualmente através de soluções de acetona de concentrações crescentes variando de 30% a 100% durante 10 minutos. As amostras foram completamente secas em aparelho de secagem de ponto crítico (EMS 850 WM - Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19449- EUA), usando CO₂ líquido como meio de permuta. Os espécimes desidratados foram montados sobre telas de alumínio, revestidos com carbono / ouro e revestidos de ouro, utilizando um Balteers SCD 030 Sputter Coater (Balzers Union Ltda.) e visualizados em microscopio eletrônico FEI Quanta 250 (FEI Company).

3.8 Ensaio de proliferação celular utilizando o CFSE-DA

Para caracterizar a atividade proliferativa da célula de astrócitos normal de ratos, tratadas com o composto 2-AEH₂F nas concentrações 6 ,12 e 24 mM e 57 não tratadas, foi realizado um ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE - Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester) no período de 24 horas. O CFSE-DA (Molecular Probes, C34554, EUA), foi diluído 200 vezes em dimetilsulfoxido e adicionado ao meio com as células dos grupos tratados e controles para a

marcação. O tempo de marcação foi de 15 minutos à 37°C. Após a marcação foram adicionados cinco vezes o volume de meio RPMI 10% SFB e incubados por 5 min em gelo e no escuro. As células foram lavadas três vezes com 20 ml de RPMI 10% de SFB e ressuspensas em 1 ml de RPMI 10% de SFB para contagem em câmara de Neubauer. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE-DA no dia da marcação (dia zero) em citômetro de fluxo e analisado pelo programa Flowjo. O programa forneceu os índices utilizados para avaliação da proliferação espontânea das células marcadas com CFSE, sendo porcentagem de células divididas e índice de divisão de celular. A porcentagem de células divididas é a porcentagem de células da amostra original que dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura. O índice de divisão é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram.

3.9 Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Após o tratamento por 24 horas com o composto 2-AEH2F Sintético e temozolomida, nas células tumorais de glioblastoma humano U-138 e normais de astrócitos de ratos, em diferentes concentrações, as células foram fixadas em tampão FAC's Flow com paraformaldeído 4% por 1 hora e as membranas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1%, por 30 minutos, a 4°C. As suspensões celulares foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FAC's Flow BD. Em seguida, adicionou-se 1 µg do anticorpo primário específico para as proteínas e receptores discriminados abaixo (Tabela 1). Após 2 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e adicionou-se o anticorpo secundário marcado, seguido da incubação com o anticorpo anti-IgG humano (Alexa-Fluor® 488 – Life Technologies Cód. Z25402) com albumina do soro bovino (BSA) 0,2%, por 24 horas, a 4°C protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FAC's Flow. A aquisição dos eventos celulares foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur da BD® (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA), no canal de fluorescência FL2-H (Alexa Fluor 488).

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na marcação de células tumorais de glioblastoma humano U-138 e astrócitos de rato normais

Anticorpo Primário	Fabricante
Anti - caspase-3	Abcam Cód. ab13847
Anti - p53	Abcam Cód. ab1101
Anti - ciclin D1	Abcam Cód. ab134175
Anti - CXCR4	Abcam Cód. ab181020
Anti - CD-44	Abcam Cód. ab6124
Anti - CD-90	Abcam Cód. ab92574

3.10 Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$) por citometria de fluxo

Para a avaliação do potencial elétrico mitocondrial as células tumorais de glioblastoma humano U-138 e astrócitos normais de ratos foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 106 células por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com 2-AEH2F Sintético (6- 24 mM), Temozolomida (1,25 – 5,0 mM) por 24 horas. Após o período de tratamento as células foram recolhidas, centrifugadas à 1500 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 200 μ L de tampão FAC's Flow e incubadas por 30 minutos a 37°C com 15 μ g/mL de rodamina-123 (Sigma Aldrich Cód. R8004). Após o período de incubação as células foram centrifugadas à 1500 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão FAC'sFlow. A análise foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur da BD® (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA).

3.11 Análises estatísticas

Os dados numéricos foram obtidos e determinada média \pm dp. Os valores da (IC50%), concentrações dos fármacos, valores de densidade óptica e porcentagens das células nas fases do ciclo celular e debris foram analisados por meio de estatística descritiva. Histogramas e tabelas foram empregadas para visualizar o impacto de distribuição do ciclo celular em função do composto analisado. As comparações

diretas foram realizadas pela análise de variância unilateral (ANOVA) e do teste Tukey Kramer, com ou sem correspondência de dados, com variâncias iguais ou diferentes, por característica e adequação aos dados. Análises de regressão linear com determinação do R² e as comparações estatísticas foram obtidas pelos Softwares Excel 2007 e Graph Pad Prism versão 5.0 (CEO e fundador, La Jolla, CA, EUA) e MoD Fit versão 3.2 (Verity Software House, Topsham, ME, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes.

4 RESULTADOS

4.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

O tratamento das células tumorais de glioblastoma humano SF-295 foi realizado após 24 horas de adesão e confluência superior a 80%, em placa de 96 orifícios. As células tumorais foram incubadas com os compostos 2-AEH2F sintético e da Sigma nas concentrações de 5 a 100 mM por 24 horas. Após o tratamento foram observados aspectos morfológicos e a toxicidade com a presença de lise e a formação de debris celulares, a partir da concentração de 20 mM. O valor calculado pela equação da reta IC50% para o composto 2-AEH2F sintético foi de 44,7 mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,955$ (Figura 1-A). As demais concentrações de tratamento mostraram efeitos citotóxicos significativos, com aumento percentual da mortalidade celular, perda da aderência celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda da progressão e projeção dos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 2), que foram comprovadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3).

Após o tratamento com o composto 2-AEH2F Sigma foram observados aspectos morfológicos de acentuados de toxicidade com a presença de lise e a formação de debris celulares, perda da adesão celular e diminuição da densidade celular a partir da concentração de 30 mM. O valor calculado pela equação da reta IC50% para o composto 2-AEH2F Sigma foi de 69,89 mM, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,912$ (Figura 1 -B).

Nas mesmas condições de cultura celular foram avaliados os efeitos citotóxicos dos compostos pirofosfato de sódio, como indicador de inibição da fosfatase alcalina e da adição sinérgica dos cofatores Mg e Zn. Os dados obtidos mostraram efeitos citotóxicos do pirofostato de sódio, com valor de IC50% de 10,31mM e dos cofatores de 32,2mM.

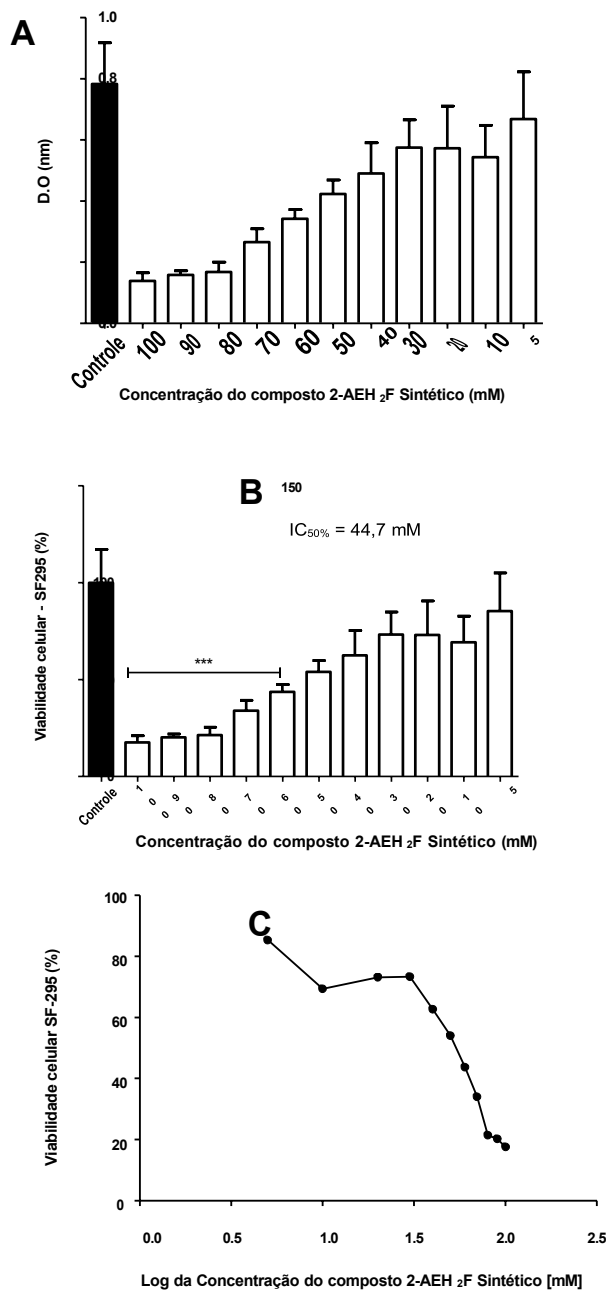


Figura 1 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano GBM SF- 295 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC_{50%}) após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético.

(A) Dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas, valor da concentração inibitória (IC_{50%} = 44,7 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F sintético após 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (***)p<0.001).

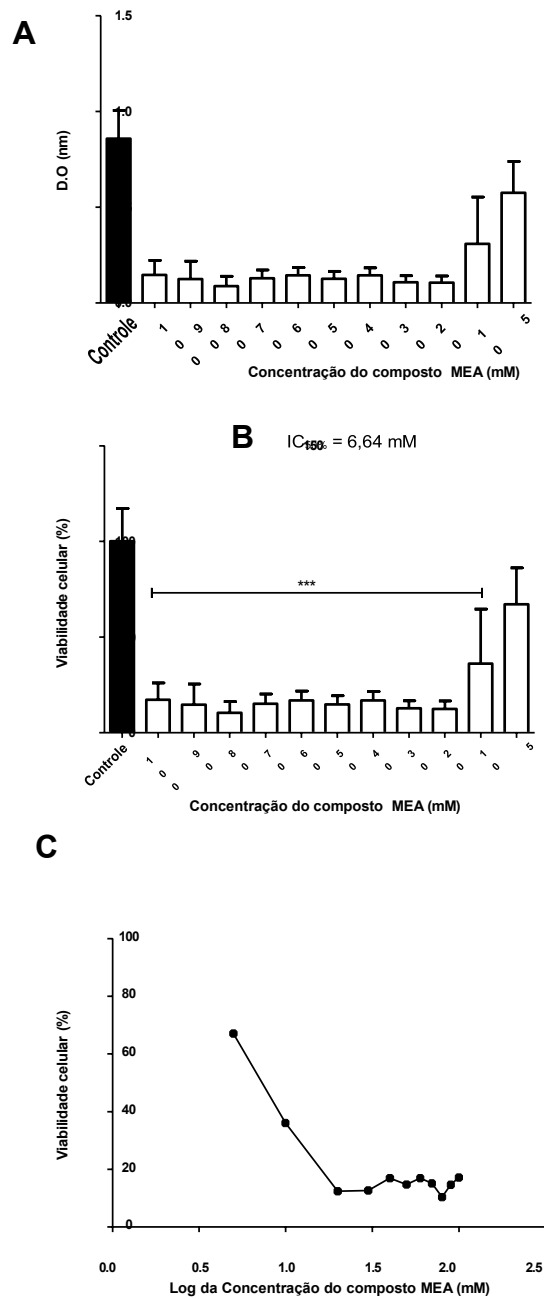


Figura 3 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano GBM SF- 295 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC50%) após tratamento com Monoetanolamina.

(A) Dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas, valor da concentração inibitória ($IC_{50\%} = 6,64 \text{ mM}$). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de MEA após 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (***) $p < 0.001$.

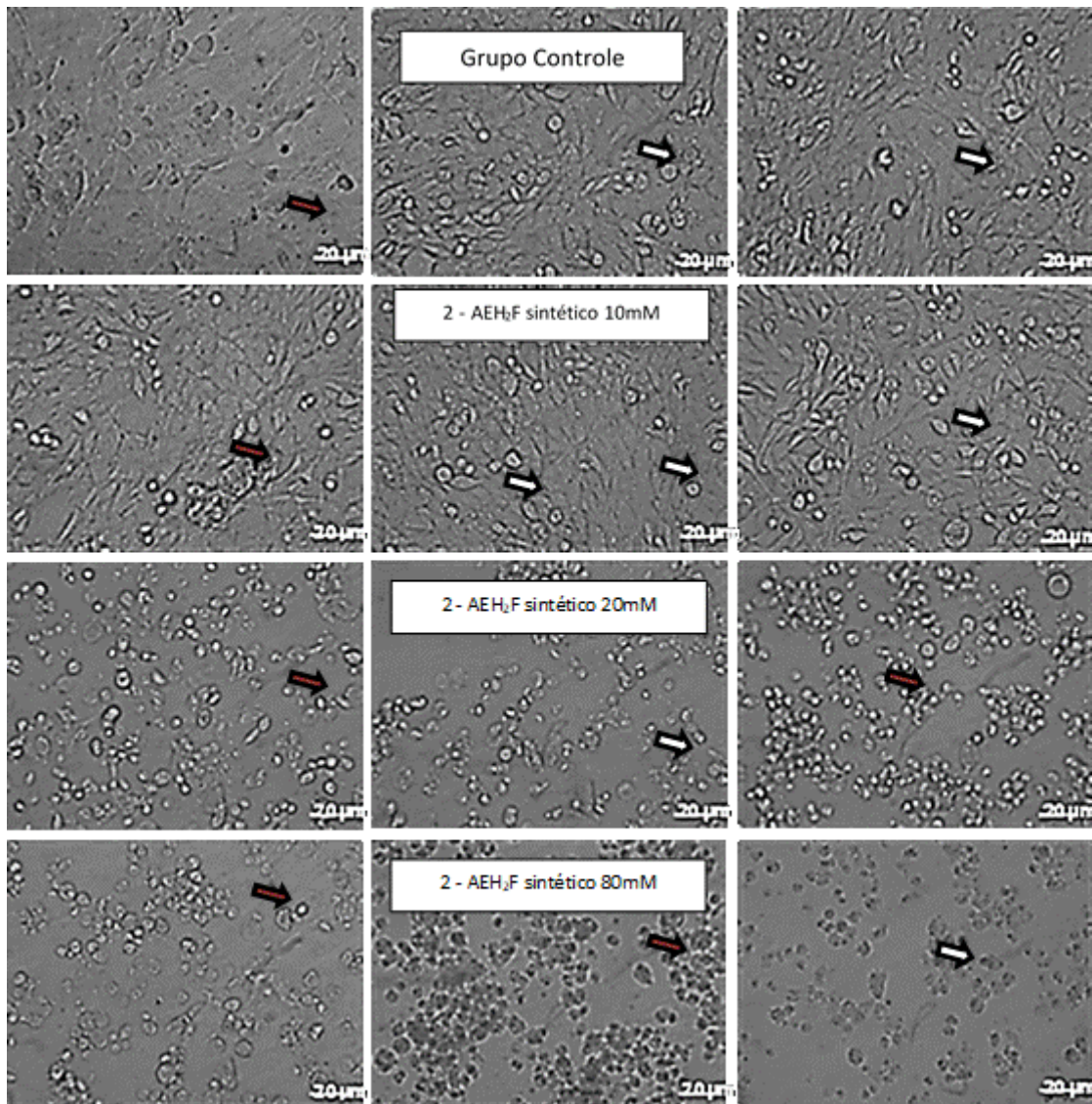


Figura 4 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma humano GBM SF-295 após 24 horas de tratamento com o composto 2 - AEH₂F Sintético, obtido em microscopia óptica de inversão.

(A) Células tumorais SF-295 do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central, projetando interconexões citoplasmáticas (seta branca); detalhes no arranjo e conexões celulares (seta vermelha); (B) Células tumorais SF-295 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético destacam-se redução da densidade celular, presença de células apoptóticas e redução de conexões intercelulares. Detalhes da presença de corpos apoptóticos (seta branca); (C) Células tumorais SF-295 tratadas com 20 mM do composto 2-AEH₂F Sintético observam-se, perda da densidade celular das expansões citoplasmáticas e modificações da morfologia tornando-se arredondadas (seta branca). Presença de células picnóticas (seta vermelha). (D) Células tumorais SF-295 tratadas com 80mM do composto 2 - AEH₂F Sintético observa-se acentuada e significativa diminuição da densidade celular e perda completa da morfologia, ausência de expansões citoplasmáticas e junções célula-célula (seta vermelha). Canto inferior direito barra de aumento em μm.

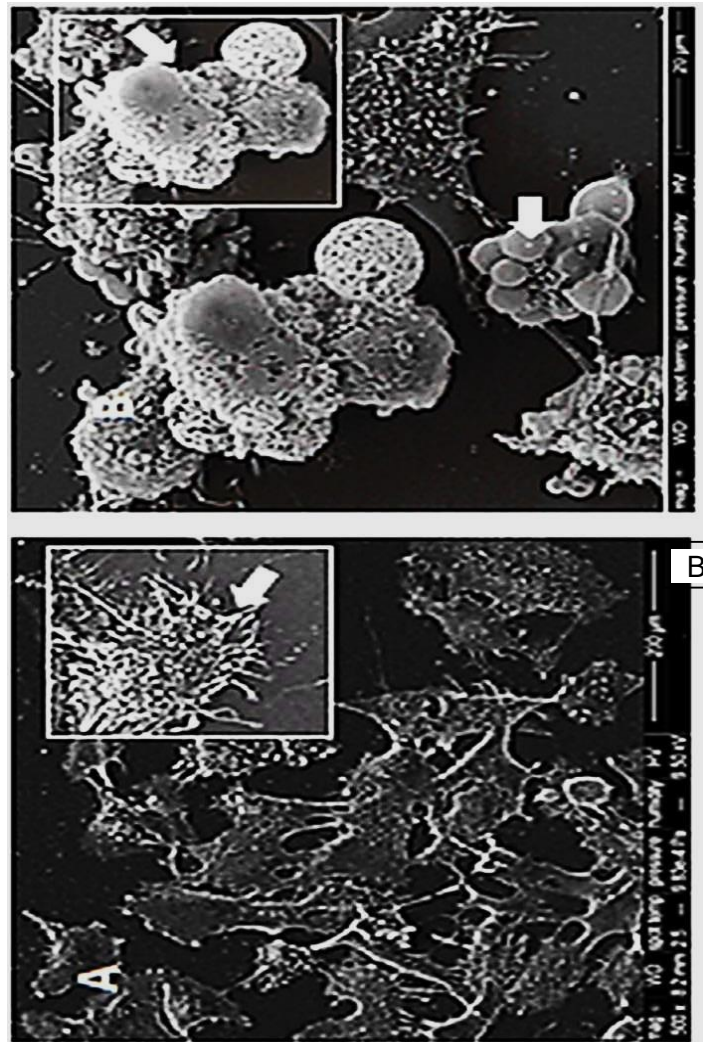


Figura 5 - Eletromicrografia representativa obtida em microscópio eletrônico de varredura das células tumorais de Glioblastoma humano GBM SF-295.

(A) Grupo controle: Células aderidas à superfície da placa, com várias projeções do tipo filópodo, destacando-se projeções citoplasmáticas e microvilosidades; (B) Grupo tratado com o composto 2-AEH₂F Sintético: redução da densidade celular e presença de células apoptóticas. A seta destaca a presença de bolhas (bubbles) na superfície da célula.

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular após 72 horas com o tratamento do 2-AEH₂F Sigma em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295

Com o tratamento do composto 2-AEH₂F Sigma após 72 horas, as células tumorais de glioblastoma humano SF-295 mostraram aspectos morfológicos de lise e formação de debris celulares, a partir da concentração de 30 mM 2-AEH₂F, com valor de IC₅₀% de 43,4 mM (Figura 06), bem como redução significativa da densidade celular, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,8432$.

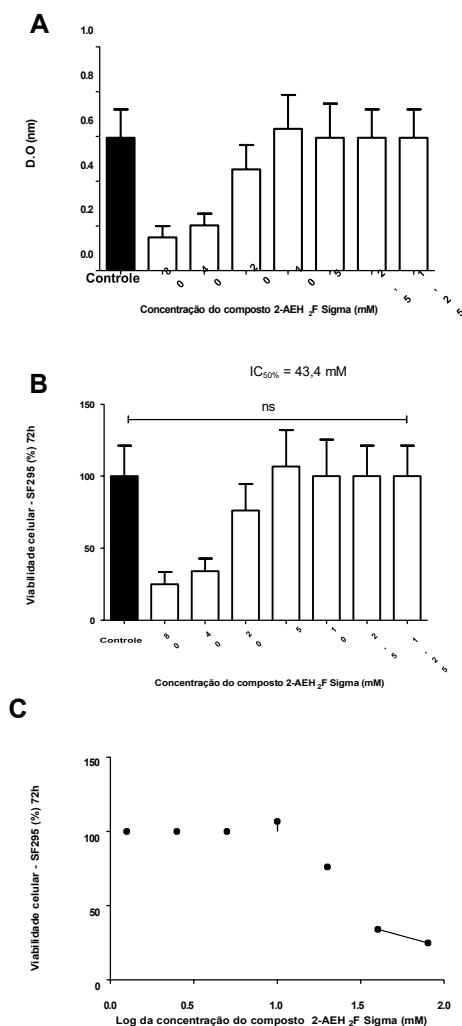


Figura 6 – Avaliação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F Sigma em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 obtido pelo método colorimétrico MTT.

Gráfico de barras dos valores da média \pm dp da viabilidade celular, após 72 horas de tratamento com o composto 2-AEH₂F Sigma em diferentes concentrações. (A) Dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células SF-295 após 72 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células SF-295 após 72 horas, valor da concentração inibitória ($IC_{50\%}$ = 43,4 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F Sigma após 72 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. Não houve diferenças estatísticas calculadas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer

4.1.2 Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do 2-AEH₂F Sigma mais pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295

Tratamento após 24 horas das células tumorais de glioblastoma SF-295 Humano com 2-AEH₂F Sigma mais pirofosfato em concentrações micromolares foi observada uma diminuição da citotoxicidade elevando o valor da IC₅₀% para 56,03 mM,(figura 7) , com o coeficiente de correlação de R² = 0,7932.

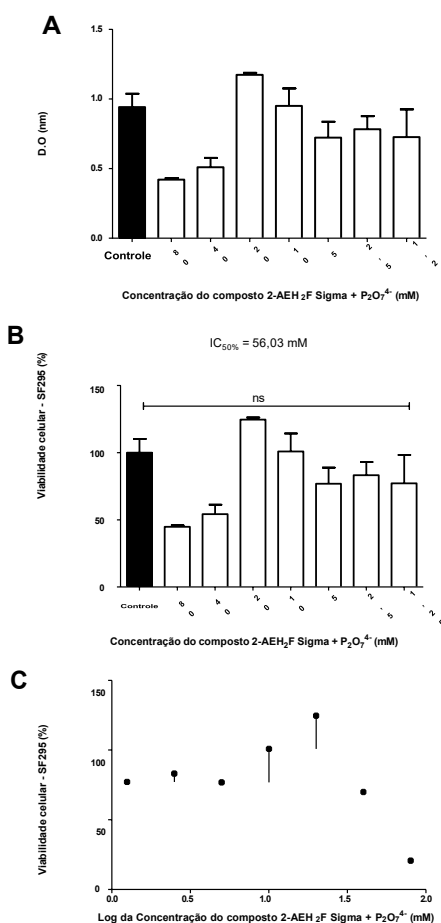


Figura 7: Avaliação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F Sigma mais adição de pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295.

O acréscimo de pirofosfato [140µM], inibidor das fosfatases alcalinas, mesmo em concentrações micromolares, diminui a citotoxicidade do composto 2-AEH₂F Sigma de 43,4 mM para 56,03 mM, proporcionando uma redução de toxicidade na ordem de 20%.(A) Dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas, valor da concentração inibitória (IC₅₀% = 56,03 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F Sigma® após 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. Não houve diferenças estatísticas calculadas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer

4.1.3 Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do composto 2-AEH₂F sigma na presença dos cofatores (Mg²⁺ e Zn²⁺) em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295

Foi observada um IC_{50%} de 33,2 mM com o coeficiente de correlação de R² = 0,9660 (Figura 08).

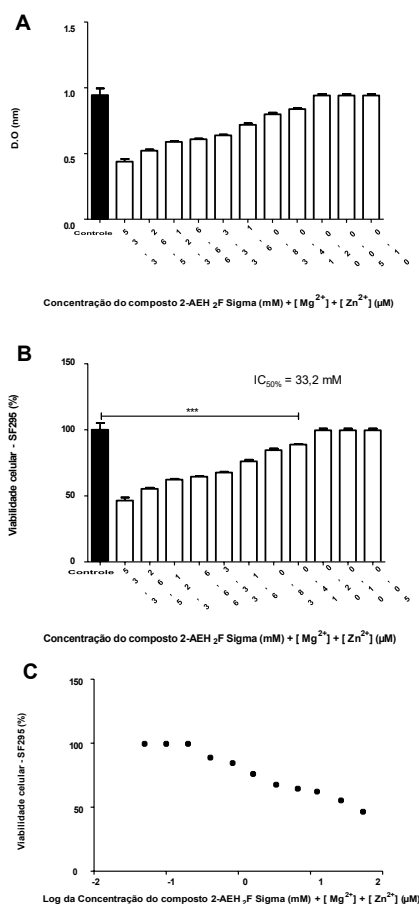
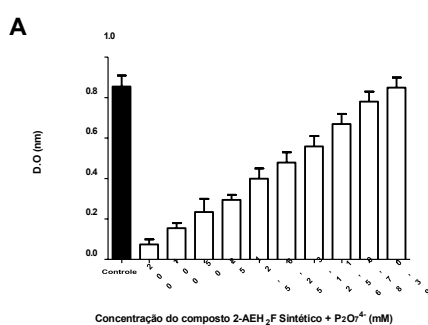


Figura 8: Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F sigma mais cofatores em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 pelo método colorimétrico MTT.

As células tumorais foram tratadas com o composto 2-AEH₂F Sigma na presença dos co-fatores Mg²⁺ [600 μM] e Zn²⁺ [400 μM] na concentrações de 53 a 0.78 mM, de 2-AEH₂F por 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. (A) Dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas, valor da concentração inibitória (IC_{50%} = 33,2 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F Sigma® após 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (**p < 0.001).

4.1.4 Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do 2-AEH2F Sintético mais pirofosfato em células tumorais de glioblastoma humano SF-295

Após 24 horas de adesão, em placa de 96 orifícios, as células tumorais de glioblastoma humano SF-295 foram incubadas com o composto 2-AEH2F Sintético nas concentrações de (0,39 a 200 mM) com a adição de pirofosfato (140 μ M) nas mesmas concentrações do experimento realizado com o composto comercial da Sigma e foi observado IC50% de 10,31 mM com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,8260$ (Figura 09).



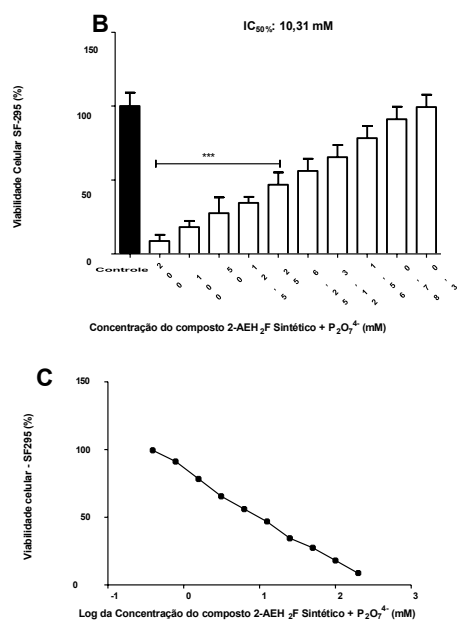


Figura 9: Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F sintético mais o pirofosfato de sódio em células de glioblastoma humano GBM SF-295 pelo método colorimétrico MTT.

As células tumorais foram tratadas com o composto 2-AEH₂F sintético mais pirofosfato de sódio por 24 horas. (A) Dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados ópticos da Média ± DP da viabilidade das células SF-295 após 24 horas, valor da concentração inibitória ($IC_{50\%} = 10,31 \text{ mM}$). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F mais pirofosfato de sódio após 24 horas. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (** $p < 0.001$).

4.2 Avaliação da viabilidade celular e fotomicrografias após o tratamento da 2-AEH₂F Sintético em astrócitos normais de ratos

O tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético de astrócitos normais de ratos foi realizado após 24 horas de adesão e confluência acima de 80%, em placa de 96 orifícios. Os astrócitos foram incubados com o composto 2-AEH₂F Sintético nas concentrações de (0,39 a 200 mM) por 24 horas. Após o tratamento não foram observados aspectos morfológicos indicativos de toxicidade, sem a presença de lise e a formação de debris celulares. O valor da $IC_{50\%}$ não foi determinado não houve correlação da concentração e o efeito de toxicidade (Figura 10). A concentração de 200 mM reduziu significativamente a viabilidade celular, provavelmente pelo desbalanço da osmolaridade do meio de cultura e a concentração do composto. As fotomicrografias representativas dos astrócitos normais após 24 horas do tratamento

com 2- AEH₂F Sintético, estão apresentados na (Figura 11).

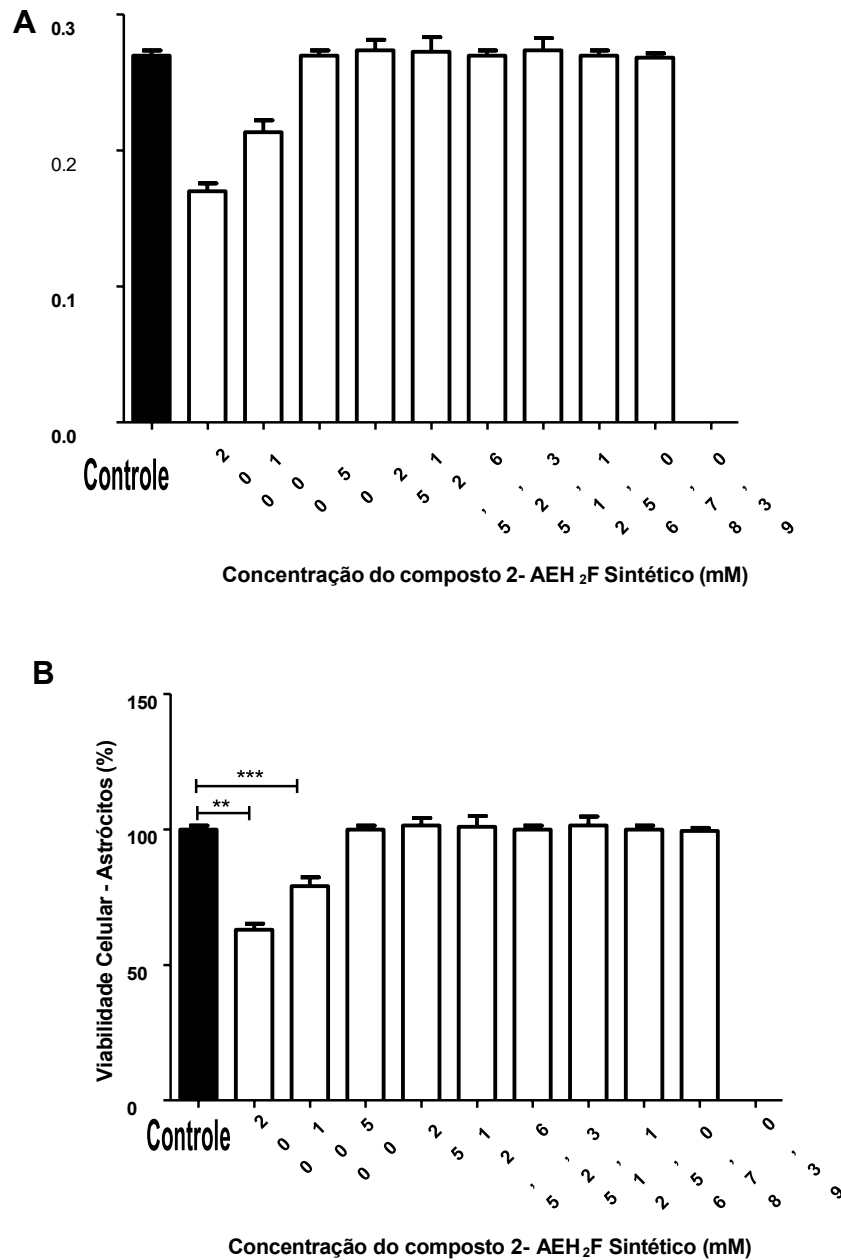


Figura 10: Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F Sintético em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT, após 24 horas de tratamento.

Os astrócitos foram incubadas com o composto 2-AEH₂F sintético nas concentrações de (0,39 a 200) mM por 24 horas. (A) Dados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade das células astrócitos normais de ratos após 24 horas. (B) Resultados normalizados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade das células de astrócitos normais de ratos após 24 horas. Após o tratamento não foram observados aspectos morfológicos sem a presença de lise e a formação de debri celular. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer ** p <0,01 e *** p <0,001.

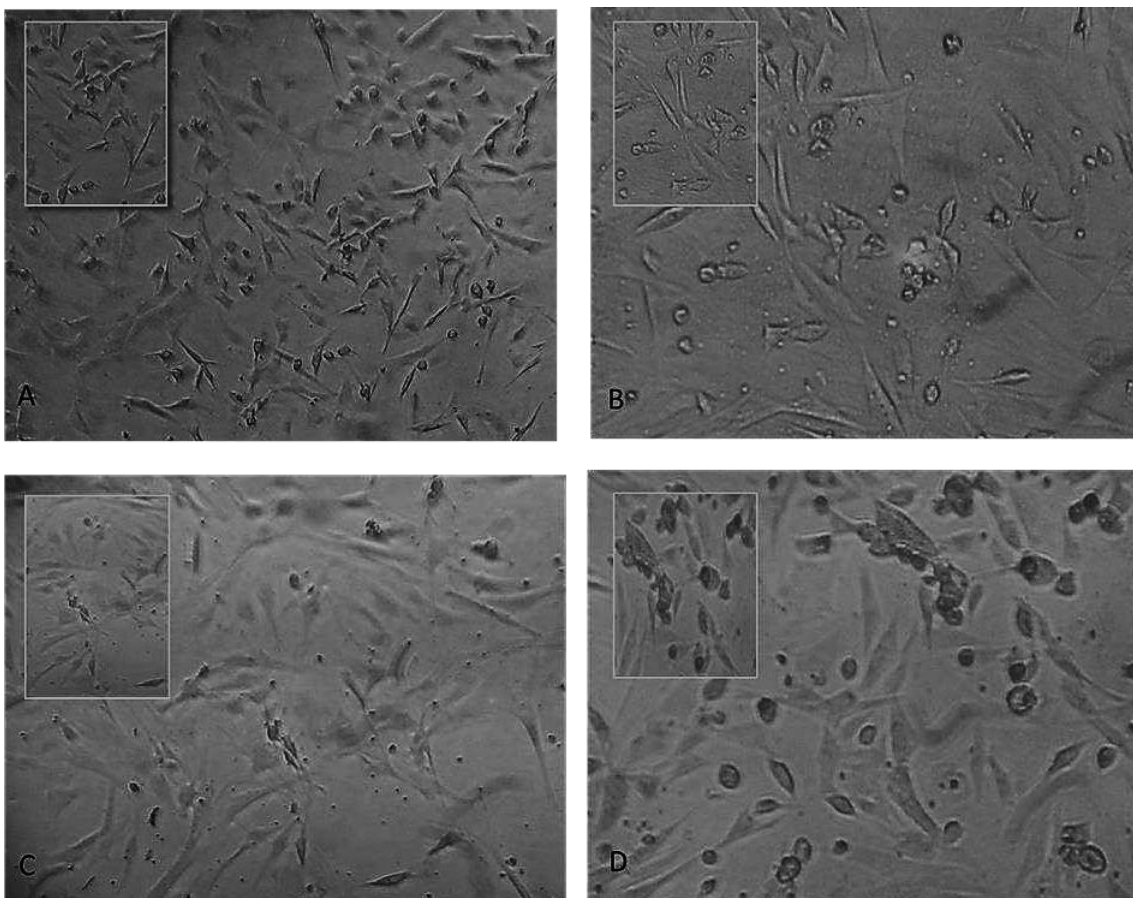


Figura 11: Fotomicrografias representativas das células de astrócitos normais de ratos após 24 horas de tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético.

(A) Células do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central e arranjos de suas projeções citoplasmáticas. Inset detalhe o arranjo e conexões celulares; (B) Astrócitos tratados com o composto 2-AEH₂F sintético (100 mM) destaca-se aumento da densidade celular e células em divisão (inset); (C) detalhe da cultura de astrócitos tratados com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 40 mM aumento da densidade celular e conservação da morfologia e (D) tratados com 100mM do composto 2-AEH₂F sintético, aumento significativo da densidade celular, das expansões citoplasmáticas e manutenção do arranjo celular, presença de várias células em divisão celular. Fotomicrografia obtida no microscópio óptico invertido em aumento de 20x.

4.2.1 Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do composto 2-AEH₂F Sigma em células de astrócitos normais de ratos

O tratamento com o composto 2-AEH₂F sigma de astrócitos normais de ratos foi realizado após 24 horas de adesão e confluência acima de 80%, em placa de 96 orifícios. Os astrócitos foram incubados com o composto 2-AEH₂F sigma nas concentrações de (0,39 a 200 mM) por 24 horas. Após o tratamento não foram observados indicativos de toxicidade (Figura 12).

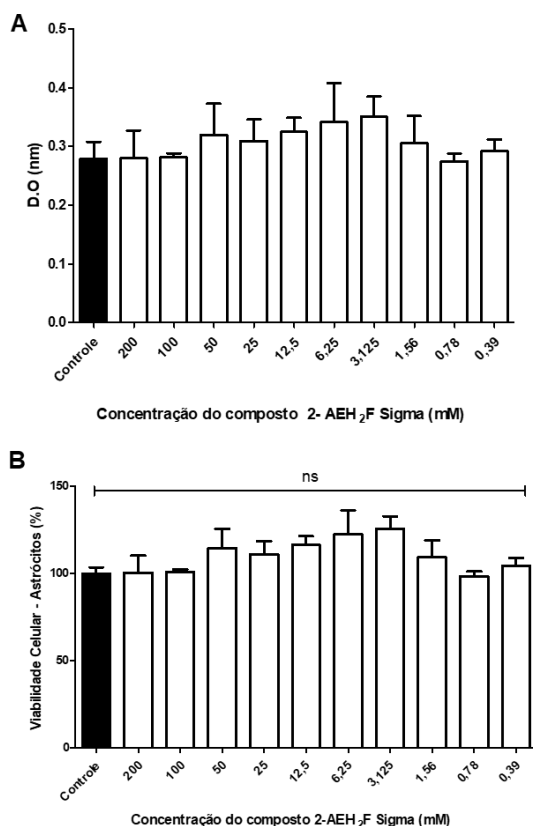


Figura 12: Determinação da atividade citotóxica do composto 2-AEH₂F sigma em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT após 24 horas de tratamento.

Os astrócitos normais foram incubadas com o composto 2-AEH₂F sigma nas concentrações de (0,39 a 200) mM por 24 horas. (A) Densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células de astrócitos murinos normais. (B) Resultados normalizados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células normais de astrócitos de ratos após 24 horas. Após o tratamento não foram observados alterações nos aspectos morfológicos, sem a presença de lise e a formação de debri celular. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (ns= não significativo).

4.2.2 Avaliação da viabilidade celular com o tratamento do Pirofosfato de Sódio em células de a strócitos normais de ratos

O tratamento com o composto pirofosfato de sódio nos astrócitos normais de ratos foi realizado após 24 horas de adesão e confluência acima de 80%, em placa de 96 orifícios. Os astrócitos normais foram incubados com o composto pirofosfato nas concentrações de (0,039 a 2 mM) por 24 horas. Após o tratamento não foram

observados indicativos de toxicidade. O valor da IC50% não foi determinada, sem correlação da concentração e o efeito de toxicidade (Figura 13).

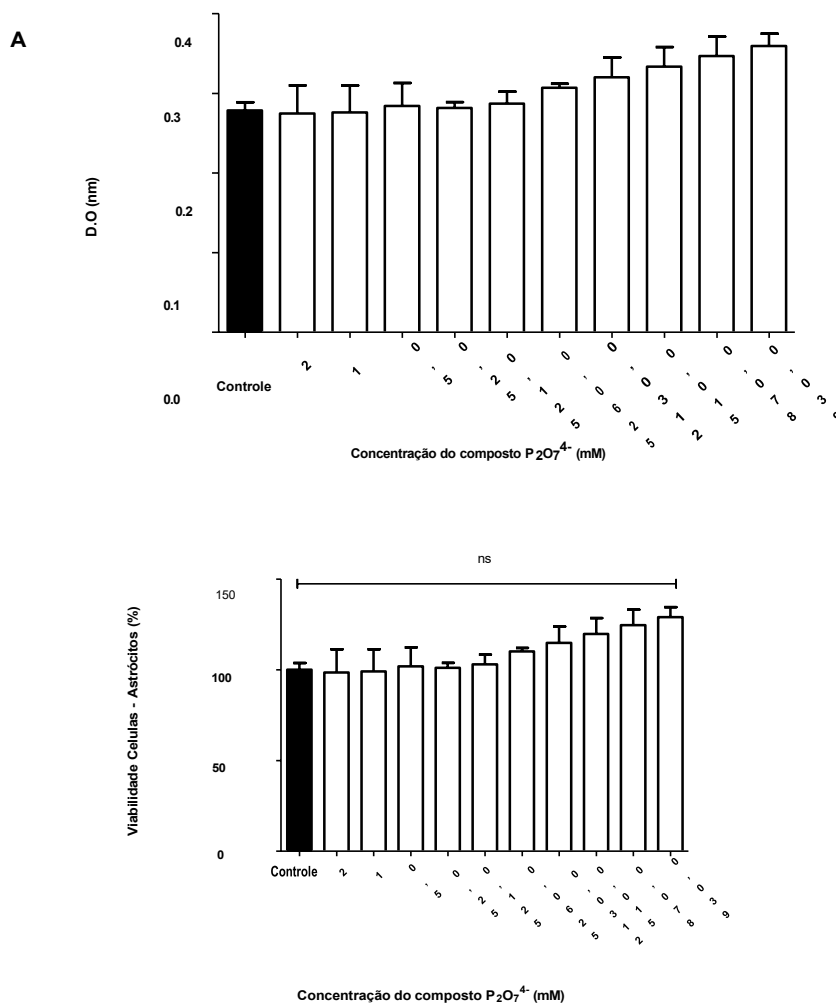


Figura 13: Determinação da atividade citotóxica do composto $P_2O_7^{4-}$ (Pirofosfato de sódio) em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT após 24 horas de tratamento.

Os astrócitos normais foram incubadas com o composto pirofosfato de sódio nas concentrações de (0,0039 a 2) mM. (A) Dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células de astrócitos normais de ratos após 24 horas. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade dos astrócitos normais de ratos após 24 horas. Após o tratamento não foram observados alterações nos aspectos morfológicos, sem a presença de lise e a formação de debris celular. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (ns= não significativo).

4.3 Determinação do potencial modulador da atividade enzimática da fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina em células tumorais de glioblastoma humano SF-295 foi determinada no sobrenadante das culturas celulares tratadas com diferentes concentrações do composto 2-AEH₂F sintético e comercial Sigma nas concentrações de 0.39 à 200mM, por 24 horas. Nossos resultados mostraram que a atividade enzimática foi bloqueada completamente após o tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético, enquanto o tratamento com o composto comercial 2-AEH₂F sigma houve inibição dose dependente (Figura 14).

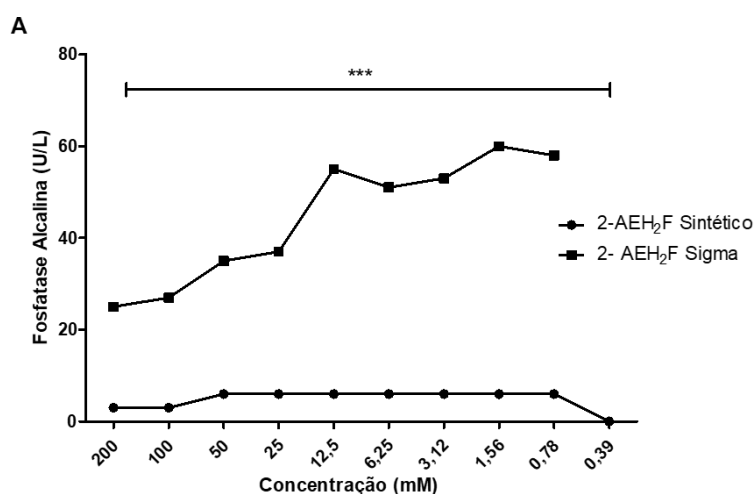


Figura 14: Curva da atividade enzimática da fosfatase alcalina no sobrenadante das células tumorais GBM SF-295, tratadas com os compostos 2-AEH₂F Sintético e o 2-AEH₂F Sigma nas concentrações de 0,39 a 200 mM.

As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (**p<0,001).

4.4 Efeitos cinéticos das diferentes concentrações do composto 2-AEH₂F na cinética enzimática da fosfatase alcalina

O Km (velocidade catalítica) e Ki (constante de inibição) para os complexos de fosfatases alcalinas/2-AEH₂F foram calculados usando o programa GraphPad Prism 5.0 medindo várias curvas de velocidade do substrato de formação do composto de nitro fenol pela presença de fosfatase alcalina. A velocidade máxima obtida nas células tumorais humanas GBM-SF 295 do grupo controle não tratado, foi de 59,65 μ M/min,

pH: 9,5 e na presença de 1 mM de Mg^{2+} . A concentração da fosfatase alcalina estimada foi de 0,6454 $\mu M/L$. O composto 2-AEH₂F sintético não bloqueou a atividade enzimática por completo, mesmo em concentrações superiores à 80 mM, que foi capaz de produzir aproximadamente 10 $\mu M/min$ de nitro fenol. A adição dos cofatores envolvidos na potencialização da cinética enzimática como o Mg (1660 μM), Zn⁺ (400 μM) e do inibidor pirofosfato, respectivamente, interferiu no Km necessário para ativação da atividade enzimática. O aspecto da curva do gráfico Line Weaver- Burk confirma que o composto 2-AEH₂F sintético é um inibidor competitivo de nitro fenil para ações catalíticas da fosfatase alcalina, pois os cofatores esperados aumentam a eficiência enzimática e os inibidores diminuem. As curvas das cinéticas enzimáticas estão apresentadas nas figuras 15 A, B e C.

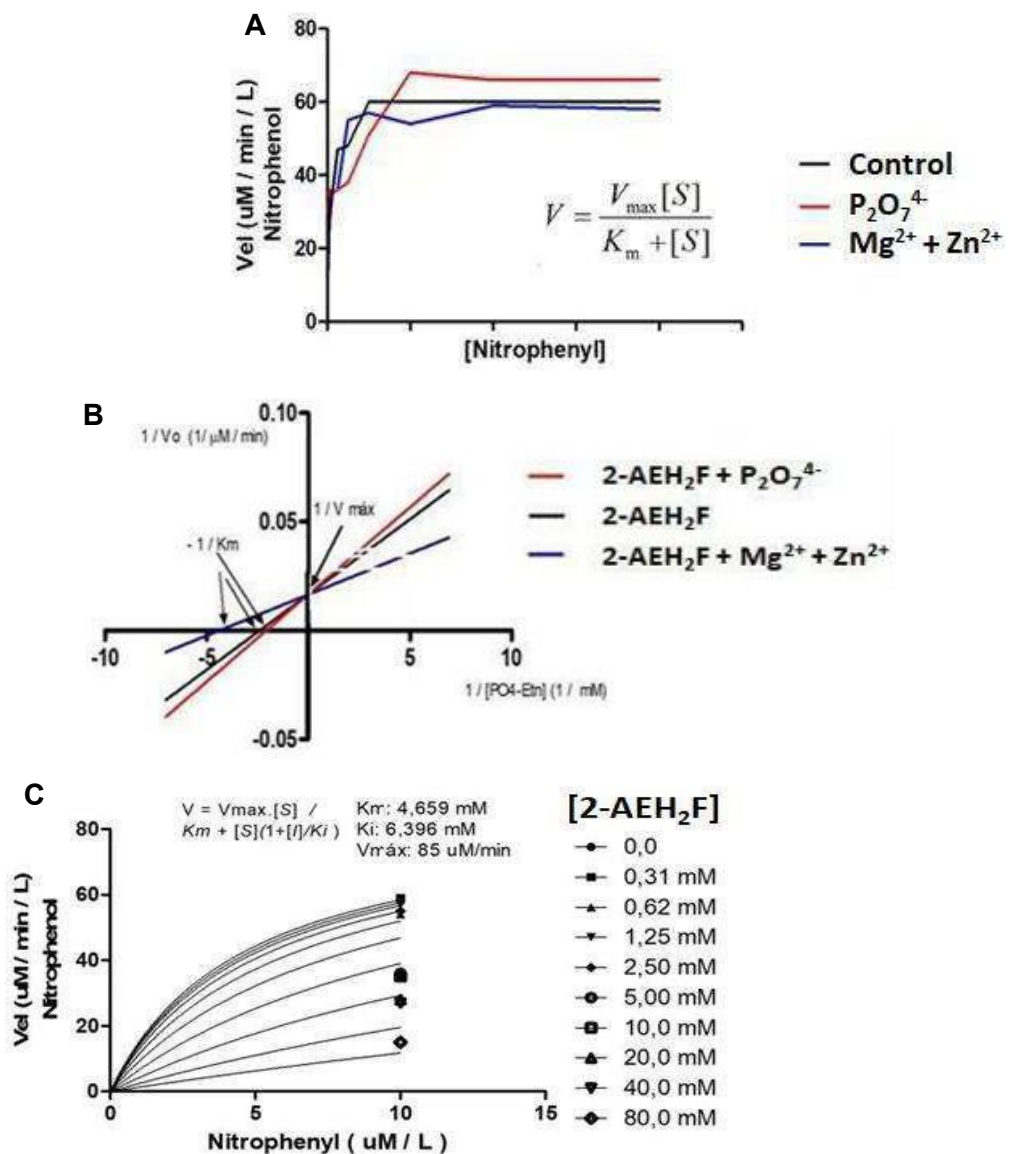


Figura 15: Avaliação da velocidade catalítica da enzima Fosfatase Alcalina em células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295

(A) Velocidade enzimática de formação de nitrofenol a partir da fosfatase alcalina, a curva em preto, na presença apenas do composto 2-AEH₂F sintético, na cor vermelha, além do composto 2-AEH₂F sintético foi acrescido pirofosfato e, na cor azul, ao composto 2-AEH₂F Sigma adicionou-se os cofatores enzimáticos Mg²⁺ [600 µM] e Zn²⁺ [400 µM]. (B) Valores linearizados pelo teste de Lineweaver Burk Plott mostram redução da afinidade enzima substrato na presença do inibidor competitivo pirofosfato, reta vermelha, e aumento da afinidade, (reta azul), experimento realizado na presença de Mg²⁺ e Zn²⁺. (C) Curva da velocidade de reação da atividade enzimática em diferentes concentrações do composto 2-AEH₂F sintético. V_{máx} média foi 59,89 µM/min, o Km enzimático da ALP, coletada das células tumorais SF-295, para o 2-AEH₂F foi de 4,6 mM e Ki: 6.3 mM.

4.5 Avaliação dos efeitos dos compostos 2-AEH₂F Sintético, 2-AEH₂F Sigma e a monoetanolamina (MEA) nas fases do ciclo celular

Com a finalidade de avaliar os efeitos inibitórios dos compostos 2-AEH₂F sintético, 2-AEH₂F Sigma, monoetanolamina (MEA), as mudanças na distribuição das populações nas fases do ciclo celular das células tumorais GBM- SF295, analisadas utilizando a citometria de fluxo, das células marcadas com iodeto de propídio.

As células tumorais de glioblastoma humana SF-295 foram tratadas com 2-AEH₂F sintético nas concentrações 25, 50, 100 e 200 mM. Os resultados da análise do ciclo celular são mostrados na Figura 16. As células tumorais tratadas com 2-AEH₂F Sintético apresentaram significativa parada na fase G₂/M. As populações de células Sub-G₁ (DNA fragmentado), aumentaram significativamente após o tratamento.

Por outro lado, o tratamento com o composto comercial 2-AEH₂F Sigma induziu em todas as concentrações induziu aumento significativo da proporção de células tumorais com DNA fragmentado, e diminuição nas concentrações de 100 e 200 mM a população de células na fase G₀/G₁, indicativo de não haver especificidade antiproliferativa. Os dados estão apresentados na figura 17.

O tratamento com a monoetanolamina (MEA), não revelou especificidade em modificar as fases do ciclo celular, somente foi capaz de aumentar a proporção de células com DNA fragmentado (Figura 18).

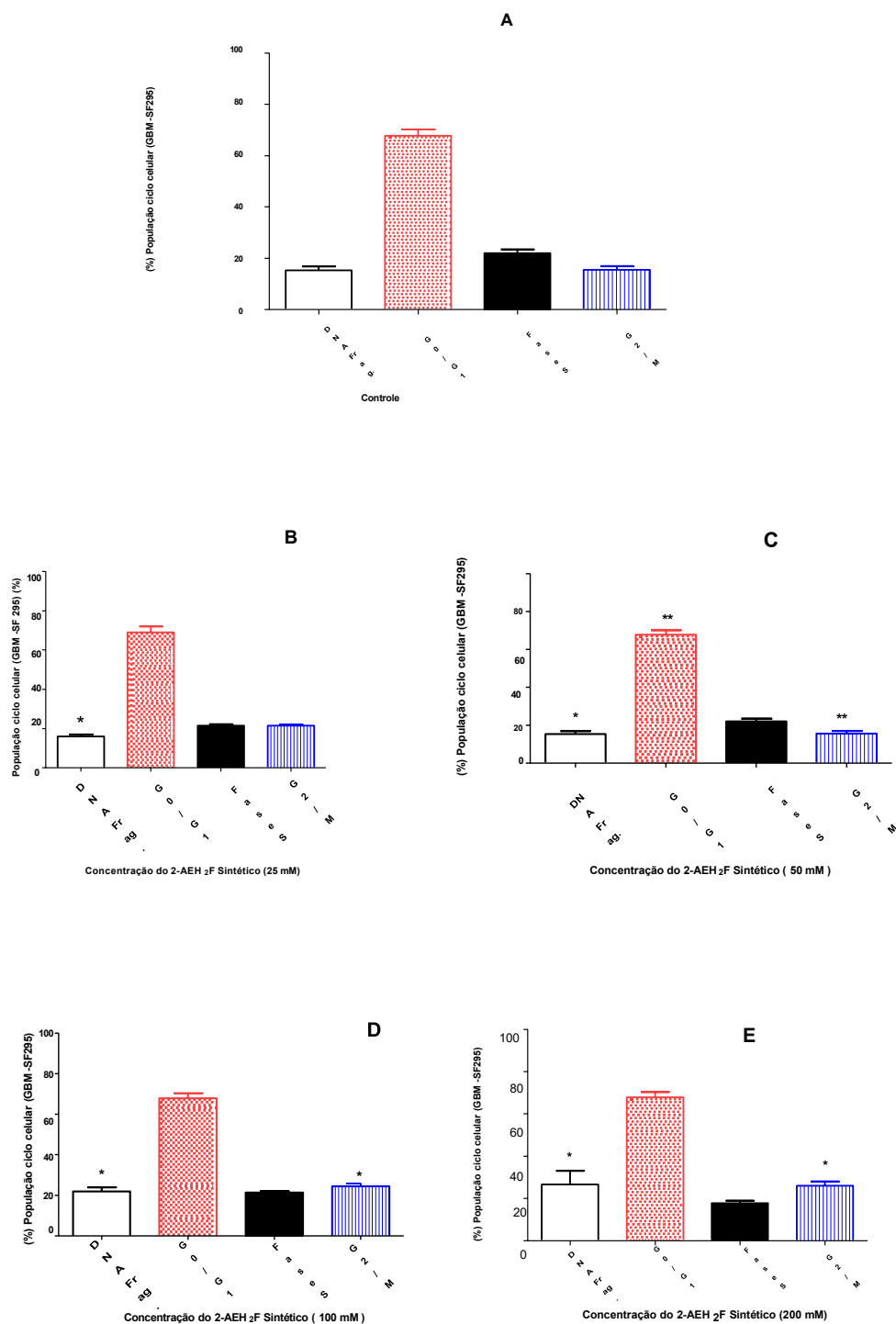


Figura 16: Distribuição das fases do ciclo celular das células de glioblastoma humano GBM SF-295 tratadas com o composto 2-AEH₂F Sintético.

Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do Glioblastoma humano SF-295 dos grupos controle (A) e tratados com 25 mM de 2-AEH₂F sintético (B) tratados com 50 mM de 2-AEH₂F sintético (C) tratados com 100 mM de 2-AEH₂F sintético (D) tratados com 200 mM de 2-AEH₂F sintético (E) , após 24 horas de tratamento ocorreu aumento no progresso celular em todas as concentrações testadas. As concentrações além de auxiliar DNA fragmentado produzem parada na fase G2M e diminuição na fase G1. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA , seguido do teste de comparações de Tukey Kramer .Valores de significância com ($p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$).

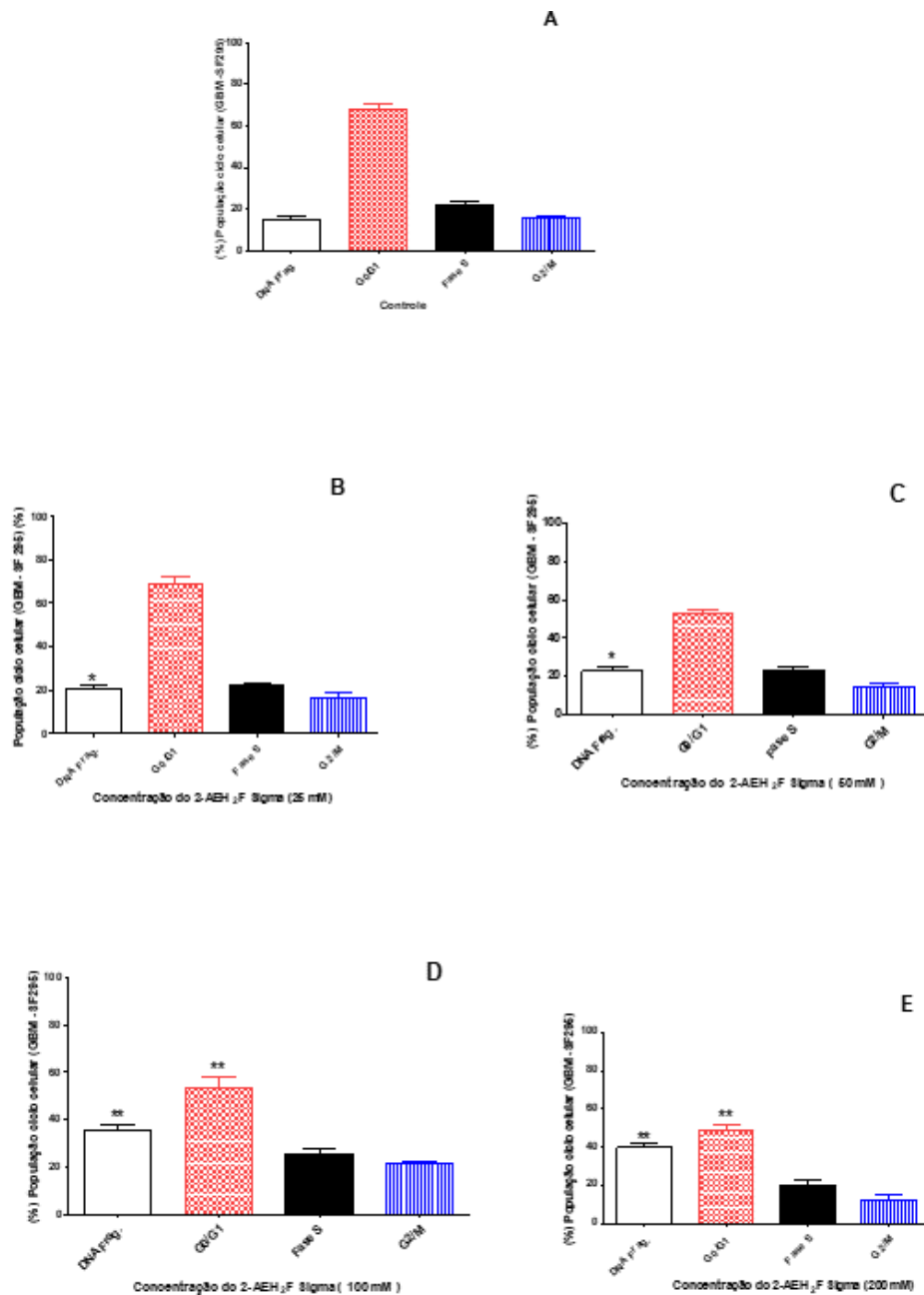


Figura 17: Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH₂F Sigma, após 24 horas de tratamento.

O composto 2-AEH₂F Sigma nas menores concentrações próximas as fisiológicas produziu aumento celular com DNA fragmentado. Nas concentrações entre 100 e 200 mM produziu diminuição na fase G1 sem parada da fase G2M. Diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e grupo tratado, pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey-Kramer * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

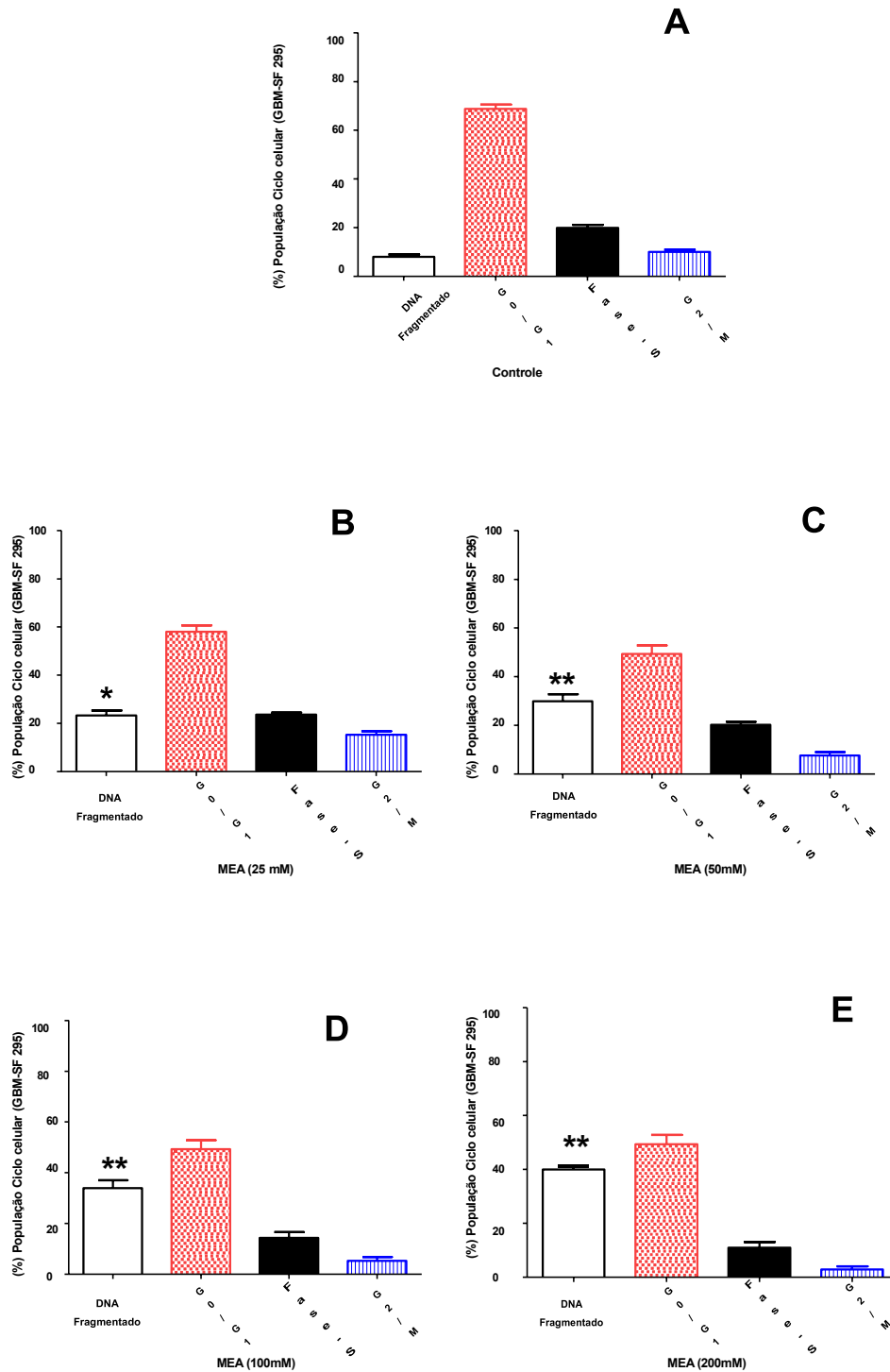


Figura 18: Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano GBM SF-295 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto monoetanolamina (MEA).

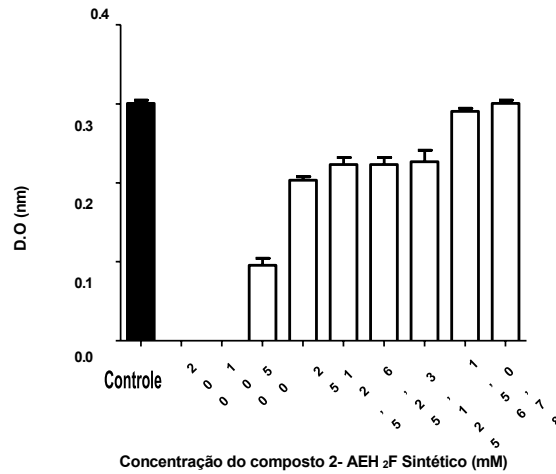
O tratamento com MEA induziu aumento da população de células com DNA fragmentado, sem produzir nenhum efeito sobre o ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey-Kramer * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.6 Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do composto 2-AEH2F Sintético em células tumorais de glioblastoma humano U-138

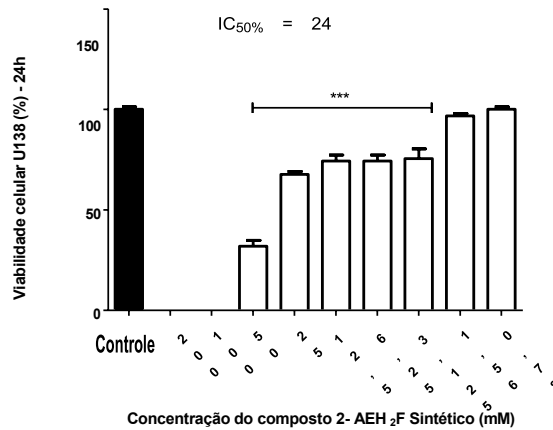
O ensaio colorimétrico MTT foi realizado no intuito de determinar a concentração inibitória IC50% nas células tumorais de glioblastoma humano U-138, após o tratamento por 24 e 48 horas com o composto 2-AEH2F sintético na faixa de concentração variável de 0,78 - 200 mM. Os resultados mostraram que a partir da concentração de 20 mM obtivemos redução da viabilidade celular, no período de 24 horas com valor de IC50% de 24 mM com coeficiente de correlação linear de $R^2 = 0,9337$. As fotomicrografias demonstradas na Figura 20 mostram que nas maiores concentrações houve perda significativa de densidade celular e mudança conformacional das células tumorais de glioblastoma humano U-138. Na concentração próxima do valor da IC50%, observam-se mudanças na morfologia da célula e redução da densidade celular.

No tratamento após 48 horas obteve-se uma IC50% de 20 mM com coeficiente de correlação linear de $R^2 = 0,9118$, sem relevância na toxicidade dos tratamentos, mas com uma maior redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao tratamento realizado por 24 horas. As fotomicrografias apresentadas na Figura 22, destacam que nas maiores concentrações uma evidente redução da densidade celular e mudança na morfologia celular, e nas concentrações próxima a concentração inibitória de 50% células em picnose e redução da densidade celular.

A



B



C

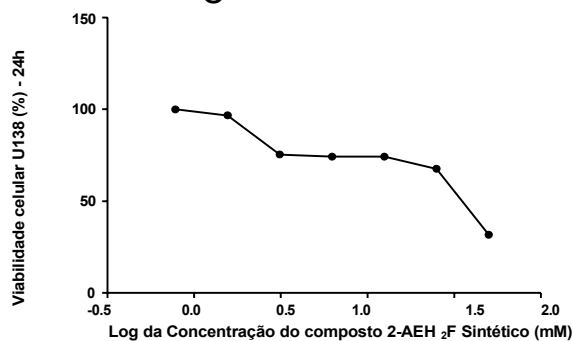


Figura 19 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC₅₀) após 24h de tratamento com 2-AEH₂F Sintético.

(A) Dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células U-138. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células U-138, valor da concentração inibitória (IC₅₀ = 24 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de 2-AEH₂F Sintético. Os valores da viabilidade celular

foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

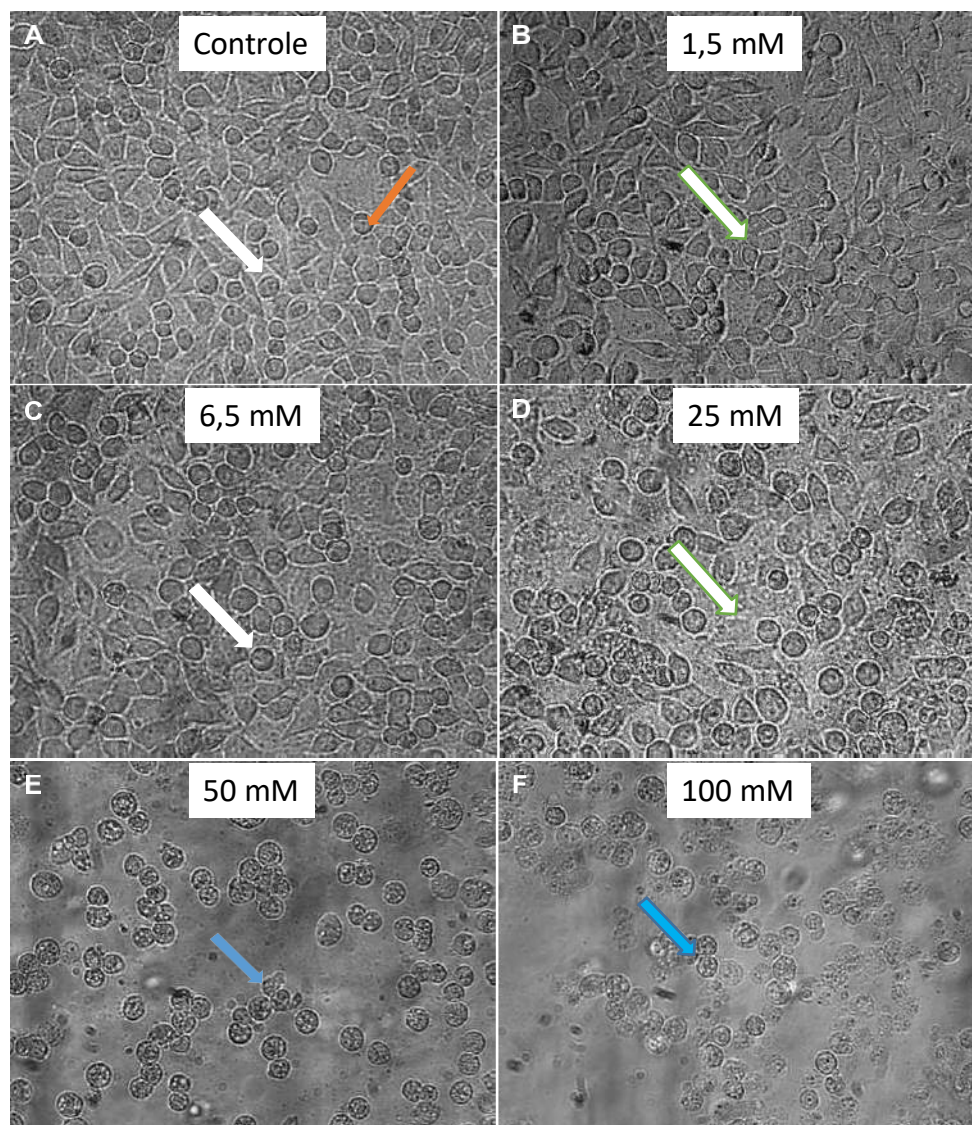
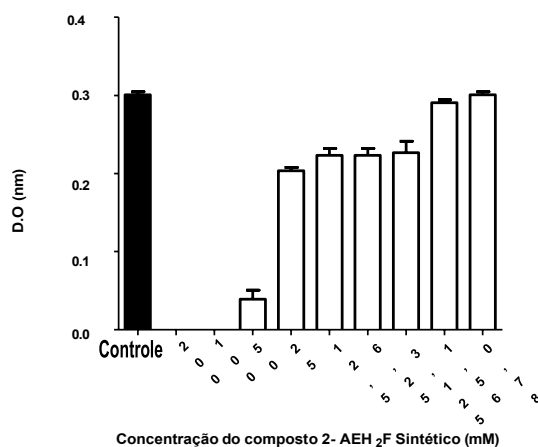


Figura 20 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma U-138 após 24 horas de tratamento com o composto 2 - AEH₂F Sintético, obtido em microscopia óptica de inversão.

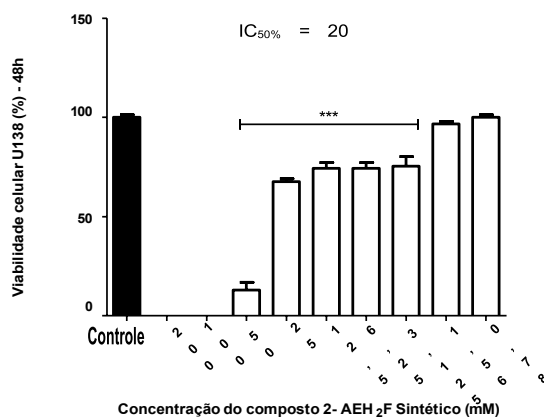
(A) Células tumorais humana U-138 do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central, projetando interconexões citoplasmáticas (seta branca); detalhes no arranjo e conexões celulares (seta vermelha); (B) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 1,5 mM, não há redução da densidade celular, sem a presença de células apoptóticas e redução de conexões intercelulares (seta branca); (C) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 6,5 mM (seta branca). (D) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 25 mM (seta branca); (E) Células

tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 50 mM (seta azul);
(F) Células tumorais U- 138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 100 mM, observa-se redução da população celular e mudança na conformação morfológica das células (seta azul).

A



B



C

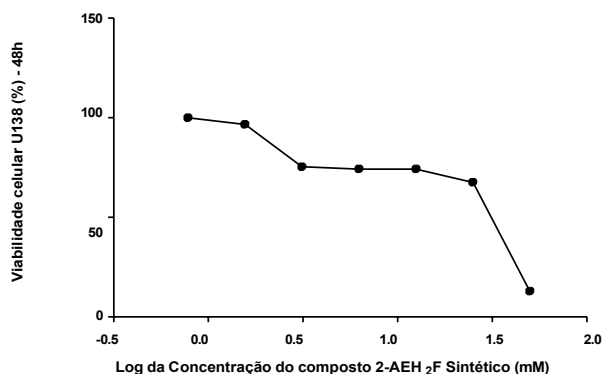


Figura 21 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC_{50%}) após tratamento com 2-AEH₂F Sintético.

(A) Dados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade das células U-138. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade das células U-138, valor da concentração inibitória (IC_{50%} = 20 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração do composto 2-AEH₂F Sintético. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

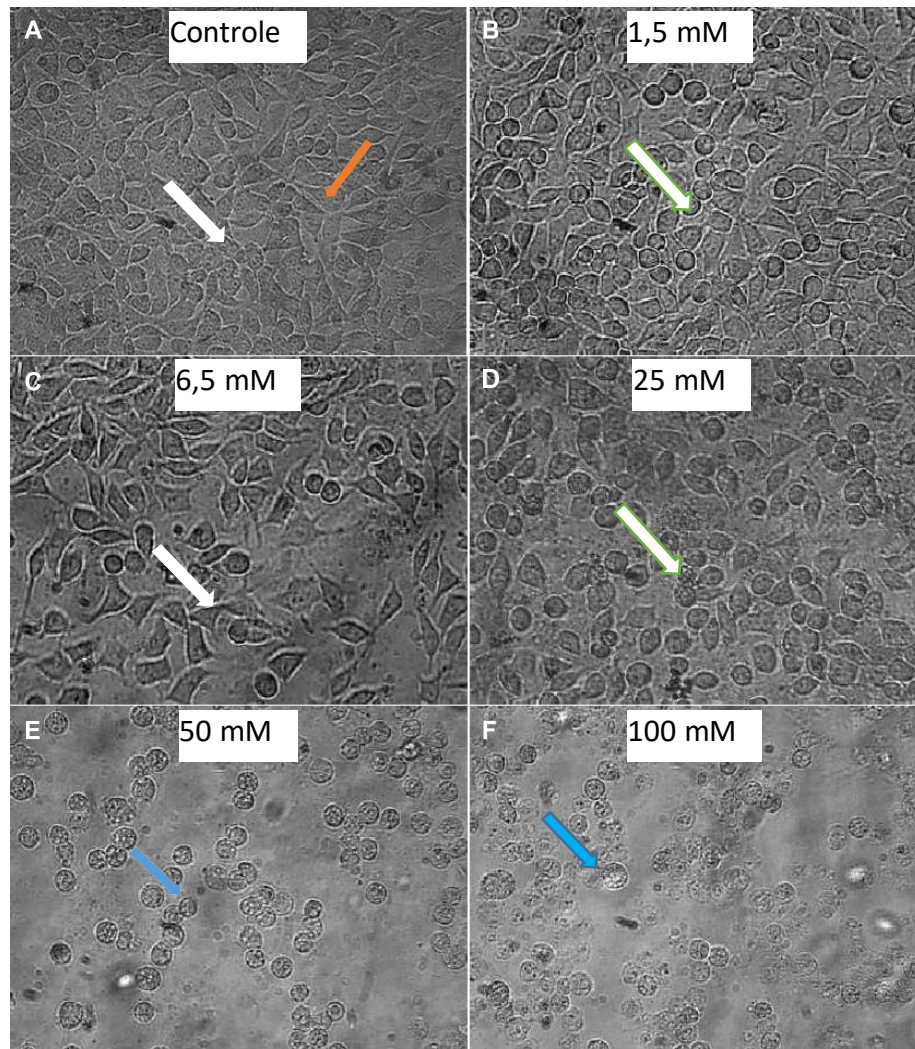


Figura 22 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma U-138 após 48 horas de tratamento com o composto 2 - AEH₂F Sintético, obtido em microscopia óptica de inversão

(A) Células tumorais U-138 do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central; detalhes no arranjo e conexões celulares (seta vermelha); (B) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 1,5 mM, não há redução da densidade celular, sem a presença de células apoptóticas e redução de conexões intercelulares (seta branca); (C) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 6,5 mM por (seta branca). (D) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 25 mM (seta branca); (E) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 50 mM por, observa-se mudança conformacional e menor densidade populacional (seta azul); (F) Células tumorais U-138 tratadas com o composto 2 - AEH₂F Sintético na concentração de 100 mM, observa-se redução da população celular e mudança na conformação morfológica das células (seta azul).

4.7 Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do quimioterápico Temozolomida, em células tumorais de glioblastoma humano U-138

Após tratamento do quimioterápico Temozolomida em células tumorais de glioblastoma humano U-138 por 24 e 48 horas, foi realizado o teste colorimétrico MTT com o objetivo de determinar o valor de IC_{50%}. No período de 24 horas de tratamento foi observado que a partir da concentração de 1 mM ocorre redução da viabilidade celular e o cálculo obtido da IC_{50%} foi de 2,9 mM com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9010$. As fotomicrografias representativas apresentadas na figura 24 demonstram que nas maiores concentrações evidencia-se intensa redução da densidade celular e mudanças morfológicas. Após o tratamento por 48 horas o valor calculado foi de uma IC_{50%} de 2,4mM com coeficiente de correlação linear de $R^2 = 0,9116$, as fotomicrografias apresentadas na Figura 26 demonstram que nas maiores concentrações há uma evidente redução da população celular e significativa mudança morfológica.

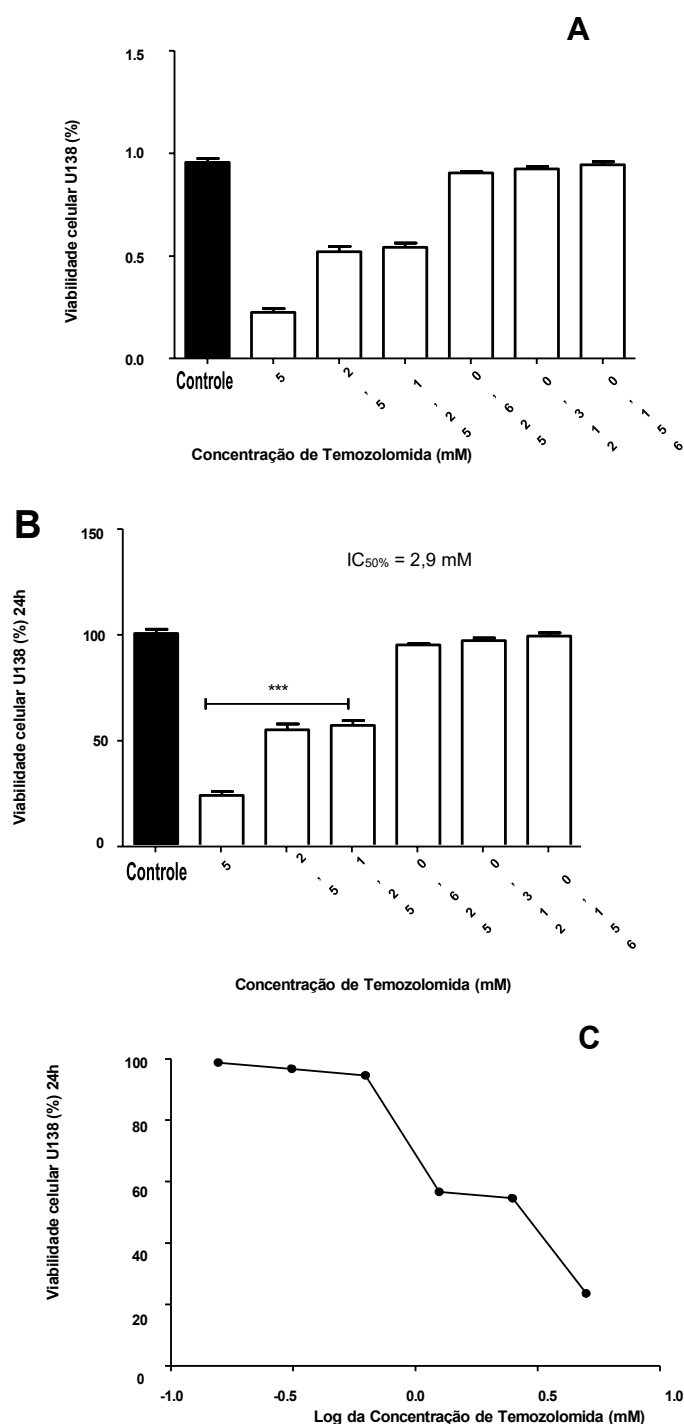


Figura 23 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC₅₀) após tratamento com Temozolomida.

(A) Dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células tumorais U-138 após. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células tumorais U-138, valor da concentração inibitória (IC₅₀ = 2,9 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de Temozolomida. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

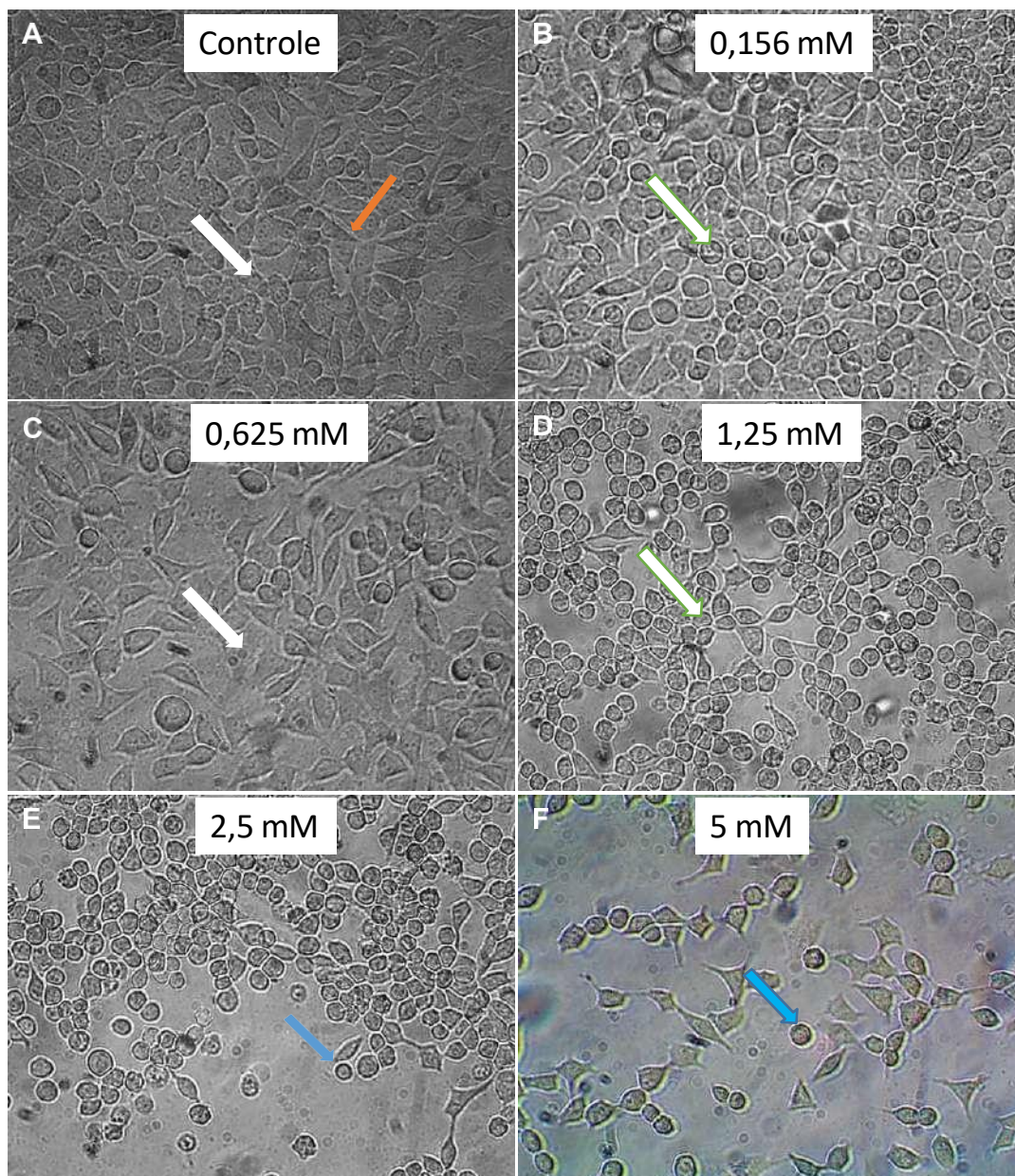


Figura 24 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma U-138 após 24 horas de tratamento com o composto Temozolomida, obtido em microscopia óptica de inversão.

(A) Células tumorais U-138 do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central, detalhes no arranjo e conexões celulares (seta vermelha); (B) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 0,156 mM, não há redução da densidade celular, sem a presença de células apoptóticas e redução de conexões intercelulares (seta branca); (C) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 0,625 mM (seta branca). (D) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 1,25 mM (seta branca); (E) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 2,5 mM (seta azul); (F) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 5 mM, observa-se redução da população celular e mudança na conformação morfológica das células (seta azul).

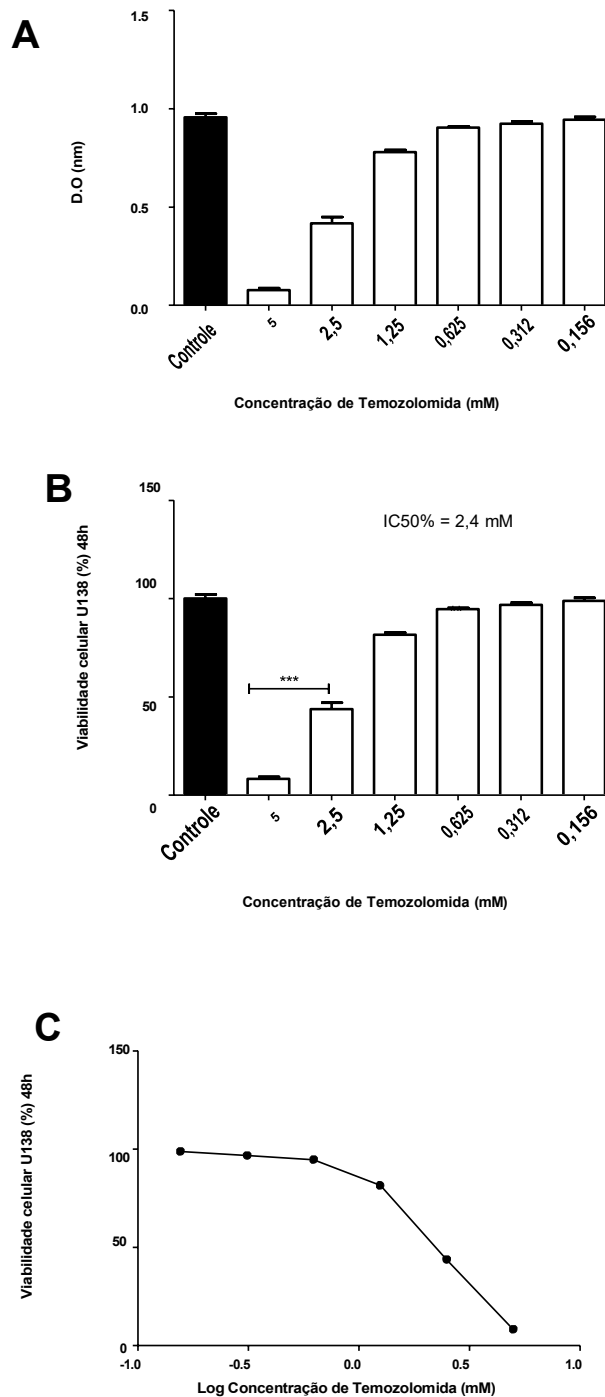


Figura 25 - Avaliação da atividade citotóxica em células de glioblastoma humano U-138 pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC₅₀) após tratamento com Temozolomida.

(A) Dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células tumorais U-138. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células tumorais U-138, valor da concentração inibitória (IC₅₀ = 2,4 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de Temozolomida. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

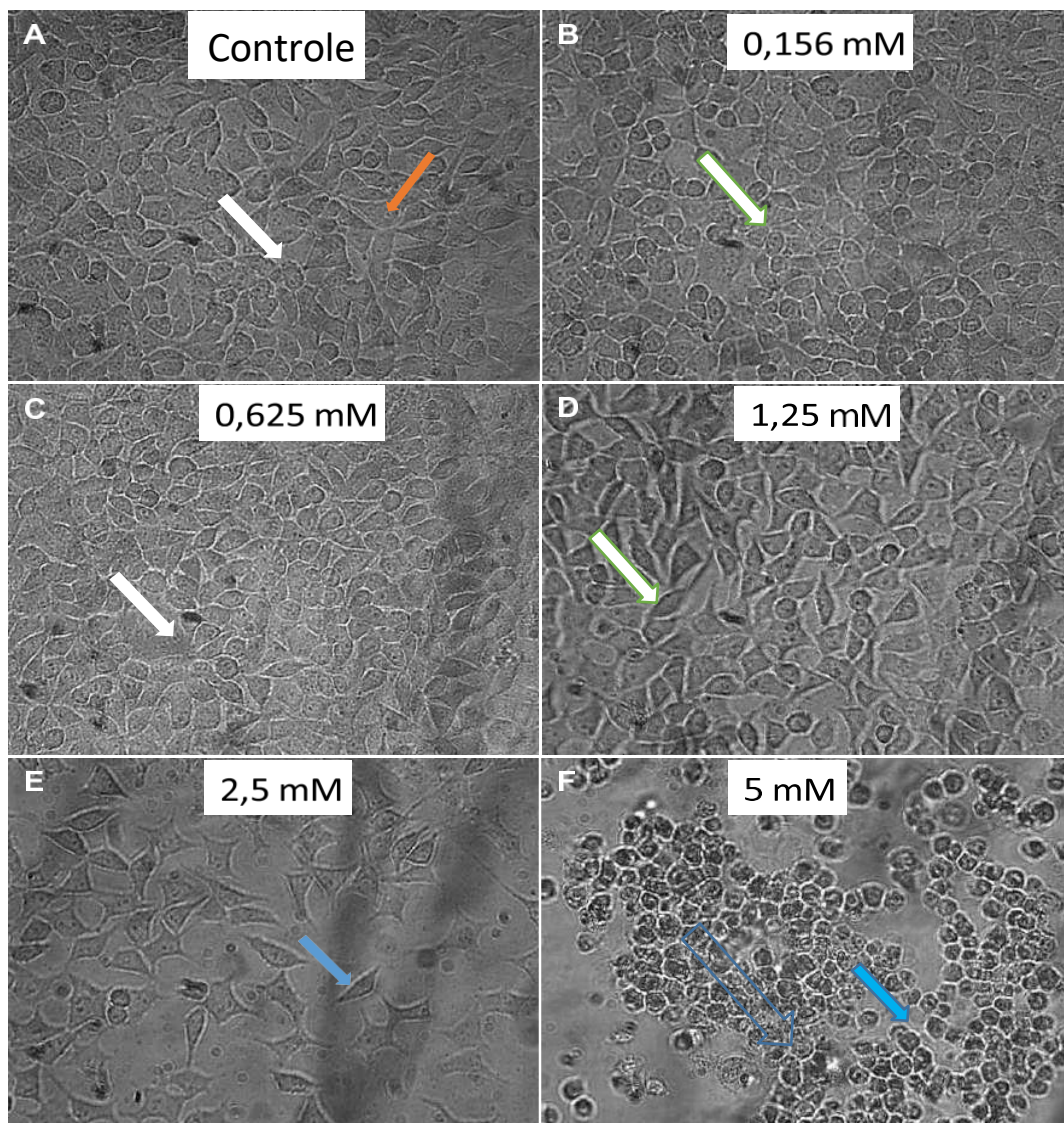


Figura 26 - Fotomicrografias representativas das células de glioblastoma U-138 após 48 horas de tratamento com o quimioterápico Temozolomida, obtido em microscopia óptica de inversão.

(A) Células tumorais U-138 do grupo controle em monocamada, composta por células com núcleo central, detalhes no arranjo e conexões celulares (seta vermelha); (B) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 0,156 mM, não há redução da densidade celular, sem a presença de células apoptóticas e redução de conexões intercelulares (seta branca); (C) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 0,625 mM (seta branca). (D) Células tumorais U-138 tratadas com o quimioterápico Temozolomida na concentração de 1,25 mM (seta branca); (E) Células tumorais U-138 tratadas com o composto Temozolomida na concentração de 2,5 mM (seta azul); (F) Células tumorais U-138 tratadas com o quimioterápico Temozolomida na concentração de 5 mM por, observa-se redução da população celular e mudança na conformação morfológica das células (seta azul).

4.8 Avaliação da viabilidade celular após o tratamento do quimioterápico Temozolomida, em células de astrócitos normais de ratos

As células de astrócitos normais de ratos também foram tratadas com o quimioterápico Temozolomida a fim de obter o valor de IC50% , pelo ensaio do método colorimétrico MTT. Após 24 horas de tratamento com o quimioterápico foi observado que a partir de 0,5 mM há evidências da redução da viabilidade celular, o que sugere que o quimioterápico pode apresentar maior potencial de toxicidade para as células normais. O valor obtido de IC50% de 2,1 mM de tratamento com coeficiente de correlação linear de $R^2 = 0,9554$ após 24 horas e de IC50% de 1,4 mM com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9638$ após 48 horas. Os dados estão apresentados nas figuras 27 e 28.

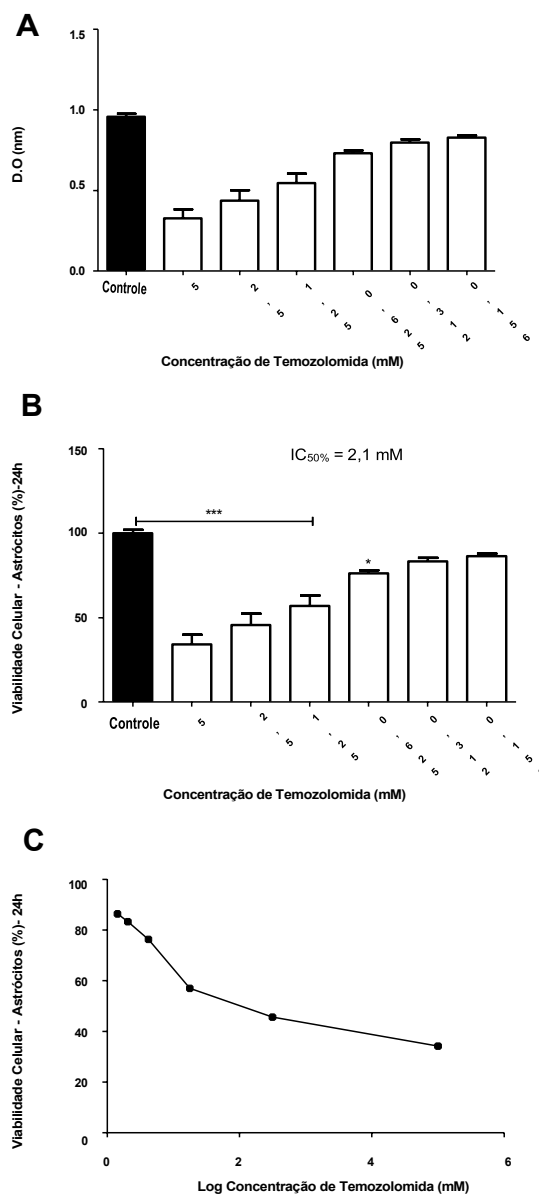


Figura 27 - Avaliação da atividade citotóxica em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC_{50%}) após tratamento com Temozolomida.

(A) Dados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade dos astrócitos normais de ratos. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média ± DP da viabilidade das células de astrócitos normais de ratos, valor da concentração inibitória (IC_{50%} = 2,1 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de Temozolomida. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer * p<0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

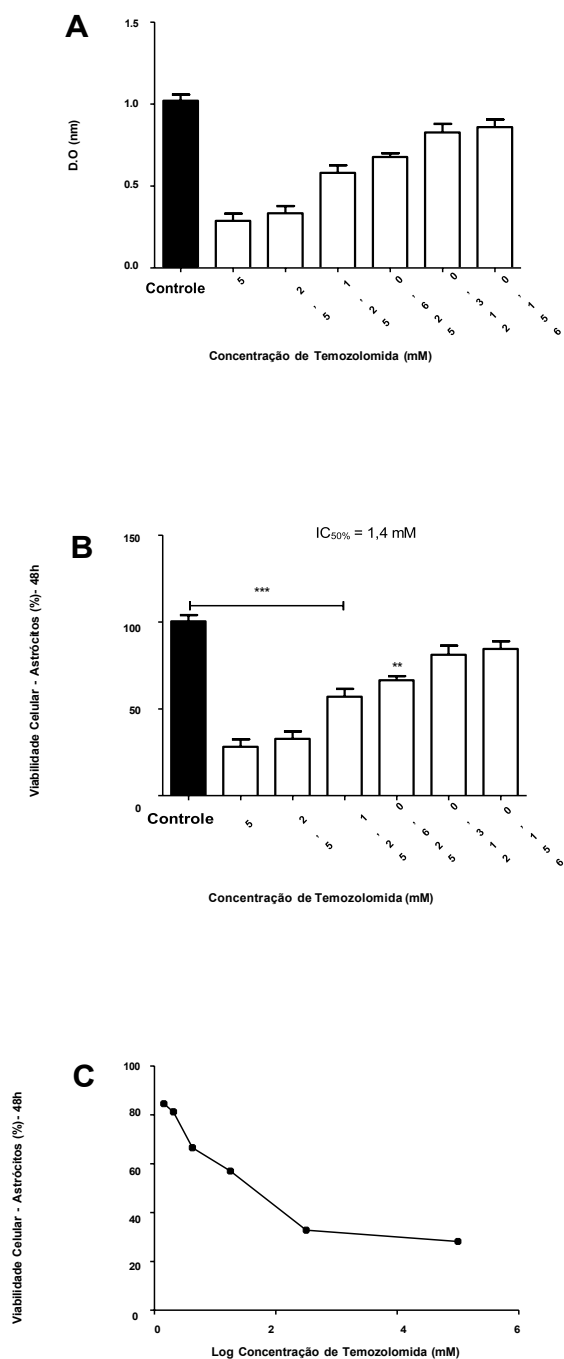


Figura 28 - Avaliação da atividade citotóxica em células de astrócitos normais de ratos pelo método colorimétrico MTT para obtenção dos valores da concentração inibitória (IC_{50%}) após tratamento com Temozolomida.

(A) Dados ópticos da Média \pm DP da viabilidade das células de astrócitos normais de ratos. (B) Resultados normalizados dos dados da densidade óptica da Média \pm DP da viabilidade das células de astrócitos normais de ratos, valor da concentração inibitória (IC_{50%} = 1,4 mM). (C) Gráfico da curva de concentração com os dados normalizados pelo logaritmo da concentração de Temozolomida. Os valores da viabilidade celular foram normalizados e expressos em escala logarítmica. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer (**p<0.001; **p<0,01; *p<0,05).

4.9 Avaliação dos efeitos do composto 2-AEH2F sintético nas fases do ciclo celular em células tumorais de glioblastoma humano U-138

A análise da distribuição das células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH2F sintético por 24 horas, demonstrou que o número de células na fase G2/M diminuíram significativamente em todos os tratamentos e a proporção de células com DNA fragmentado aumentou, quando comparamos os valores com as células controle (não tratada). Esse dado sugere que o composto 2-AEH2F sintético promove uma parada em G2/M e leva as células a apoptose. Os dados estão apresentados na Figura 29.

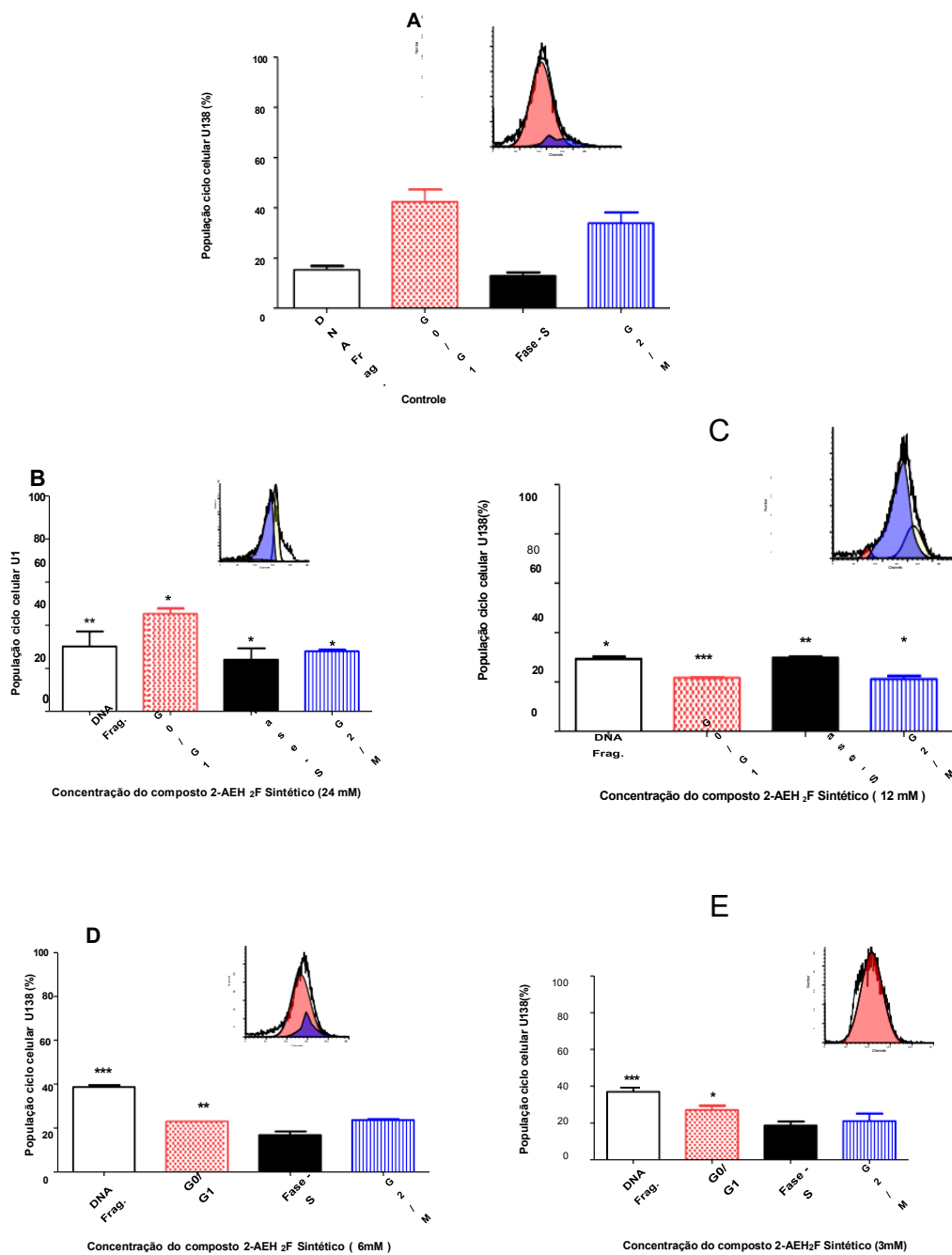


Figura 29 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano U- 138 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH₂F Sintético.

Gráficos representativos das médias \pm dp das diferentes fases do ciclo celular da célula tumoral de Glioblastoma humano U-138 após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético em diversas concentrações. (A) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do controle. (B) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 24 mM; (C) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 12 mM; (D) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 6 mM; (E) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo após tratamento com 2-AEH₂F sintético na concentração de 3 mM. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle x tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey-Kramer. Valores de significância com ($p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $p^{****} < 0.001$).

4.9.1 Avaliação dos efeitos do quimioterápico Temozolomida nas fases do ciclo celular em células tumorais de glioblastoma Humano U-138

A análise das porcentagens de células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por 24 horas, demonstrou que o número de células na fase G0/G1 diminuíram significativamente nos tratamentos de maiores concentrações (2,5 e 5 mM), enquanto que o número percentual de células com DNA fragmentado aumentou em todas as concentrações de tratamento quando comparamos os valores com as células do grupo controle (não tratada). O percentual da população da fase G2/M não apresentou diferenças quantitativas significativas. Esse perfil de ciclo celular é característicos de drogas alquilantes que promovem necrose tumoral e morte não específica. Os dados estão apresentados na figura 30.

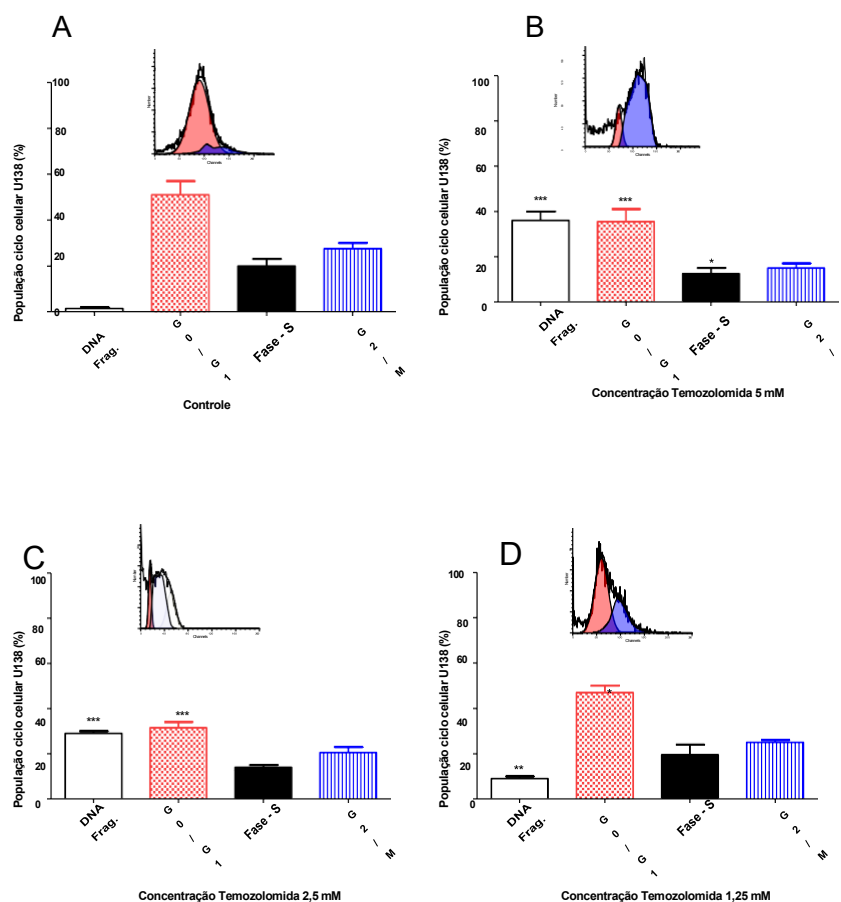


Figura 30: Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma humano U-138 nas fases do ciclo celular, tratadas com o quimioterápico Temozolomida.

Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do Glioblastoma humano U-138 após tratamento com Temozolomida em diversas concentrações por 24 horas. (A) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do controle. (B) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 5 mM; (C) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 2,5 mM; (D) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 1,25 mM. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer. Valores de significância com ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$).

4.9.2 Avaliação dos efeitos das fases do ciclo celular após tratamento com a IC50% dos compostos 2-AEH2F sintético e da Temozolomida na células tumorais de glioblastoma Humano U-138

Os percentuais das fases do ciclo celular em células de glioblastoma humano U-138 foram avaliados após 24 horas de tratamento com o composto 2-AEH2F sintético e do quimioterápico Temozolomida com os valores das concentrações 24 mM e 2,9 mM. Na figura 31A, observa-se diminuição da fase G0/G1 e aumento dos percentuais das fases S, G2M e DNA fragmentado com o composto 2-AEH2F sintético. Na figura 31B, após o tratamento com o quimioterápico Temozolomida também houve diminuição do percentual da fase G0/G1 e aumento do percentual de DNA fragmentado, o que denota que ambos os tratamentos promovem o processo de morte celular.

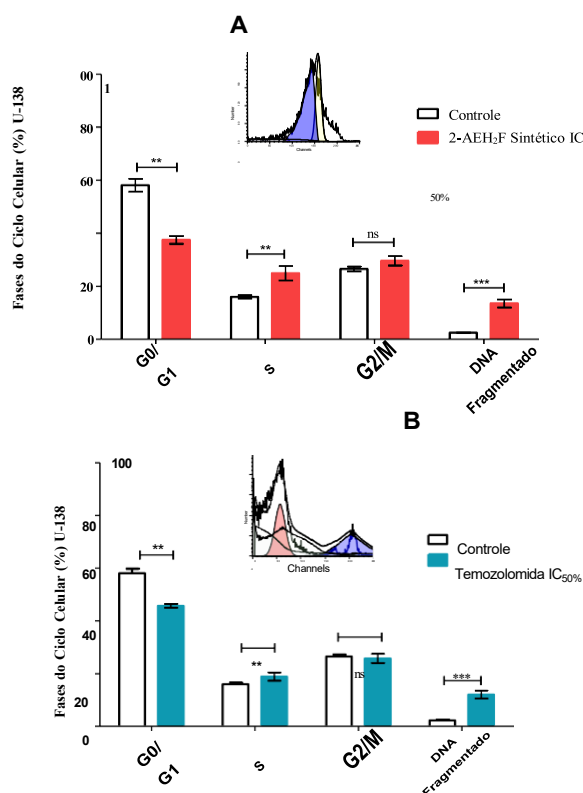


Figura 31 - Distribuição da população de células tumorais de glioblastoma Humano U-138 nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH2F Sintético e o quimioterápico Temozolomida.

Gráficos de barras representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com valor de IC50% = 24 mM do composto 2-AEH2F sintético (A). Gráficos de barras representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular da célula após tratamento com a IC50% = 2,9 mM do composto Temozolomida (B). As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e

tratado pelo teste não paramétrico ANOVA , seguido do teste de comparações de Tukey-Kramer. Valores de significância com ($p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $^{**}p < 0.001$).

4.9.3 Avaliação dos efeitos do composto 2-AEH2F sintético nas fases do ciclo celular em células de astrócitos normais de ratos

As análises das porcentagens das células de astrócitos normais de ratos nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH2F sintético por 24 horas, demonstraram que não houve alterações nos percentuais das fases do ciclo celular quando comparados ao grupo controle (não tratado), mesmo nos tratamentos de maiores concentrações, demonstrando não haver efeitos citotóxicos.

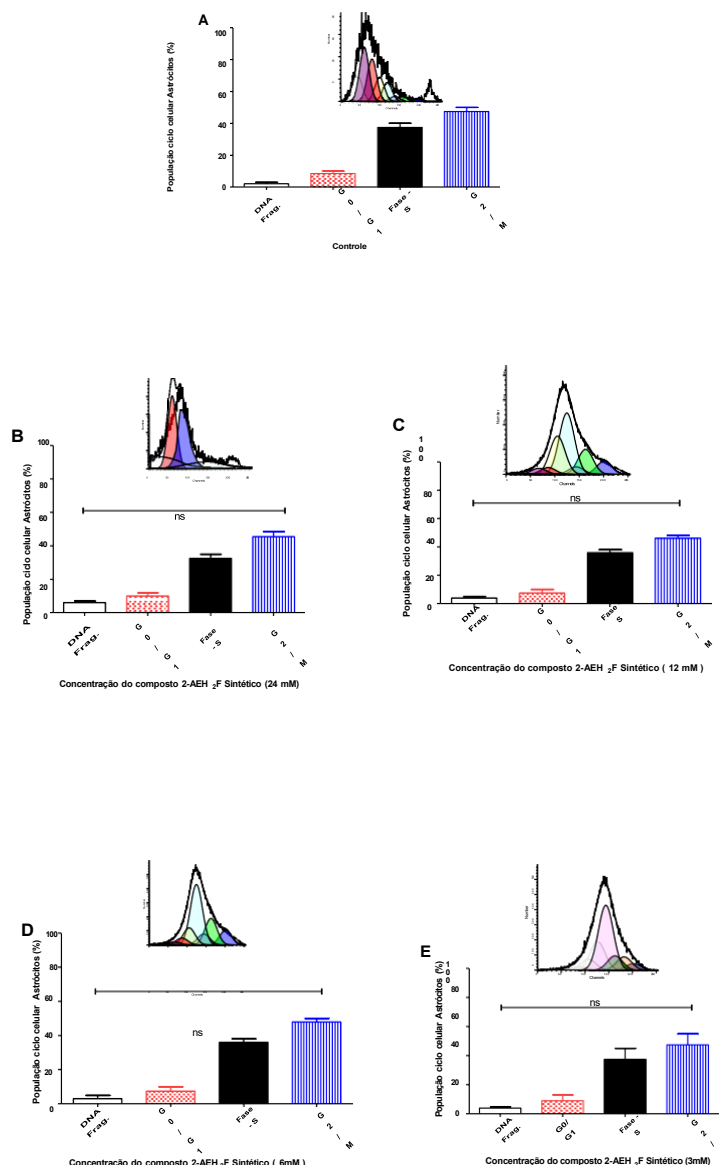


Figura 32 - Distribuição da população de células normais de Astrócitos de ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH₂F Sintético.

Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular de astrócitos normais de ratos após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético em diversas concentrações por 24 horas. (A) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do controle. (B) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 24 mM; (C) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 12 mM; (D) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com 2-AEH₂F sintético na concentração de 6 mM; (E) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético na concentração de 3 mM. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer. Valores de significância com ($p < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $***p < 0.001$).

4.9.4 Avaliação dos efeitos do quimioterápico temozolomida nas fases do ciclo celular em células de astrócitos normais de ratos

As análises das porcentagens de células de astrócitos normais de ratos nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por 24 horas, demonstraram que o número de células na fase G0/G1 aumentaram em todos os tratamentos e o número percentual de DNA fragmentado aumentou nas maiores concentrações, quando comparamos os valores com as células controle (não tratada). O percentual da população da fase G2M apresentou diminuição percentual nas maiores concentrações. Esse perfil de ciclo celular é característico de drogas alquilantes que promovem morte celular não específica. Os resultados estão expressos na figura 33.

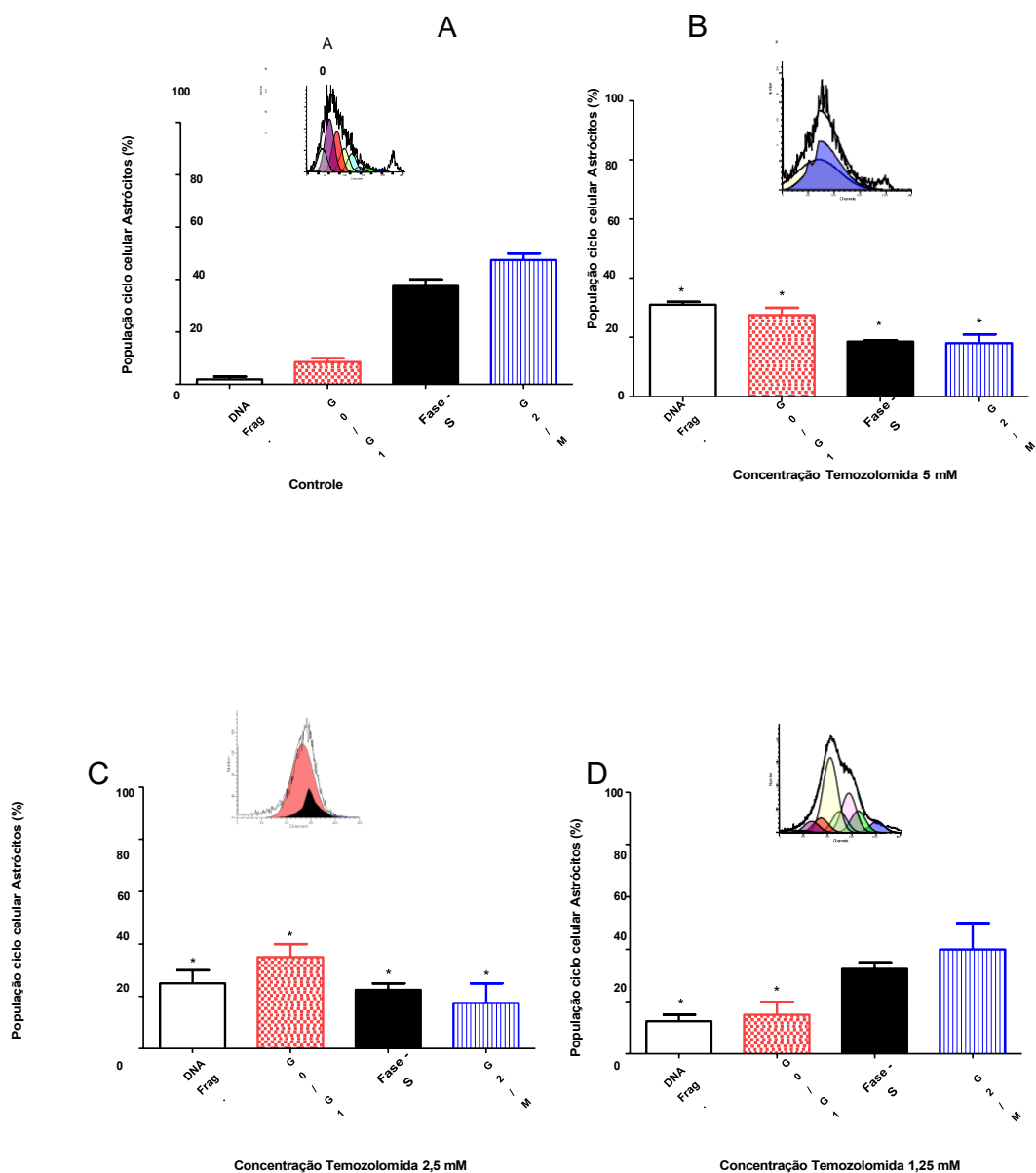


Figura 33 - Distribuição da população de células de astrócitos normais de ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o quimioterápico Temozolomida.

Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular da célula de astrócitos normais de ratos após tratamento com Temozolomida em diversas concentrações por 24 horas. (A) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular do controle. (B) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 5 mM; (C) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 2,5 mM; (D) Gráficos representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com Temozolomida na concentração de 1,25 mM. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey Kramer. Valores de significância com($p < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$).

4.9.5 Avaliação dos efeitos das fases do ciclo celular após tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético e IC₅₀% do quimioterápico Temozolomida em células de astrócitos normais de ratos

Os percentuais das fases do ciclo celular em células de astrócitos normais de ratos foram avaliados com o tratamento do composto 2-AEH₂F sintético e na concentração da IC₅₀% do quimioterápico temozolomida após 24 horas. Na figura 34 A, observa-se que não houve alteração significativa das fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle, mesmo nas concentrações que apresentaram toxicidade, para as células tumorais de glioblastoma humano U-138. Na figura 34 B, após o tratamento com o quimioterápico temozolomida houve diminuição do percentual das fases S, G₂/M e aumento significativo do percentual de DNA fragmentado, o que denota que o composto 2-AEH₂F sintético não apresenta toxicidade para os astrócitos diferentemente do quimioterápico temozolomida.

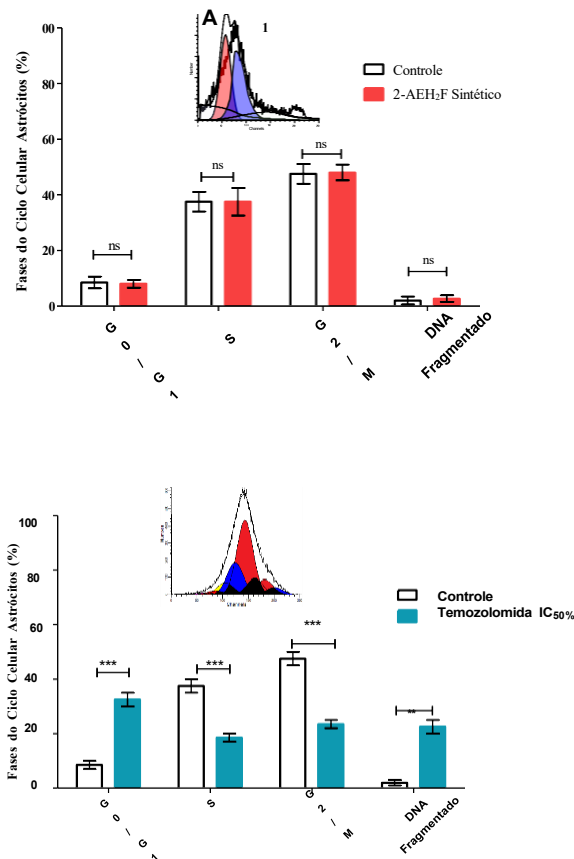


Figura 34 - Distribuição da população de células de astrócitos normais ratos nas fases do ciclo celular, tratadas com o composto 2-AEH₂F Sintético e o quimioterápico Temozolomida.

Gráficos de barras representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com a concentração de 24 mM do composto 2-AEH₂F sintético (A). Gráficos de barras representativos das médias \pm dp das fases do ciclo celular após tratamento com a IC₅₀% = 2,1 mM do composto Temozolomida (B). As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido do teste de comparações de Tukey-Kramer, valores de significância com ($p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$, $***p < 0.001$).

4.9.6 Avaliação da resposta proliferativa nos astrócitos normais de ratos após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético

Para caracterizar a atividade proliferativa dos astrócitos normais de ratos, grupos controle e tratado com 2-AEH₂F sintético, foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE-DA), por citometria de fluxo. Os astrócitos foram tratados com 2-AEH₂F sintético nas concentrações de 24, 12 e 6 mM por 24 horas. Nas duas maiores concentrações houve um aumento significativo da proliferação celular, quando comparado ao grupo controle não tratado (Figura 35).

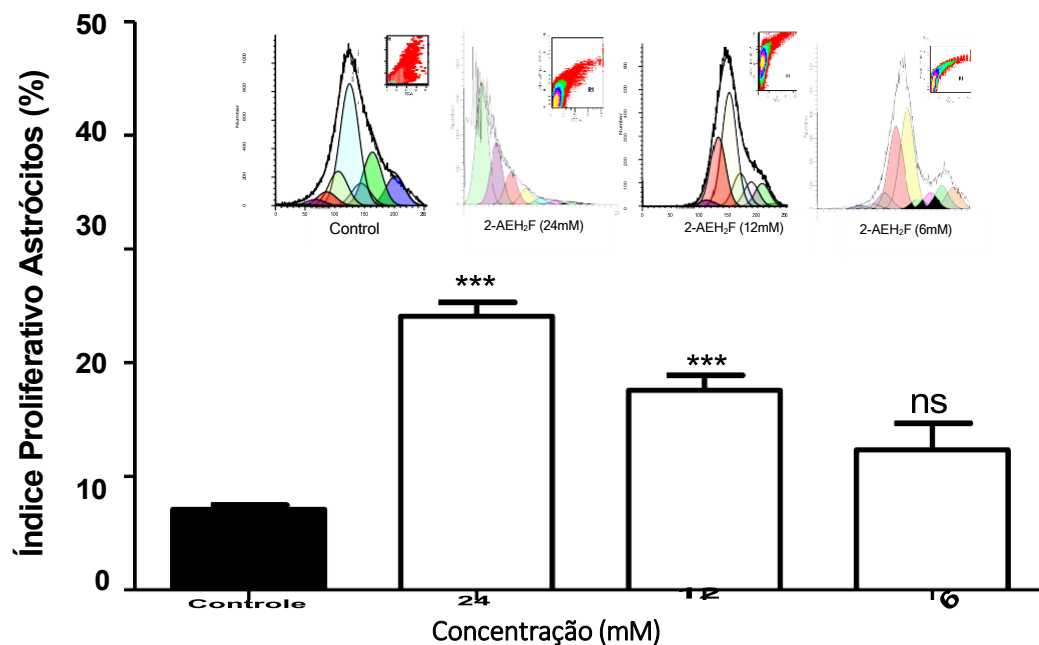


Figura 35 - Análise do índice proliferativo pela marcação com o primer CFSE-DA em células de astrócitos normais de ratos.

Gráfico de barras dos valores da média \pm dp do índice proliferativo de astrócitos normais de ratos tratados com 2-AEH₂F Sintético nas concentrações 6,12 e 24 mM. Índice de proliferação celular foi quantificado por citometria de fluxo no canal de fluorescência FL-1H (488 nm), após tratamento por 24 horas com o composto 2-AEH₂F Sintético. As diferenças estatísticas foram obtidas entre os valores dos grupos controle e tratado pelo teste estatístico não paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer em quatro experimentos independentes (n=4), como valores de significância de ***p<0.001 e ns = não significativo.

4.9.7 Avaliação da expressão dos marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético por citometria de fluxo

Após o tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético, foi possível observar que a expressão das proteínas Caspase-3 fosforilada, P-53 aumentaram significativamente, após o tratamento por 24 horas quando comparado ao grupo controle (não tratado). Em contrapartida, a ciclina D1 diminuiu sua expressão no tratamento de maior concentração. As demais proteínas não apresentaram percentuais significativos de alteração. Esses resultados são pontuais quando discutimos os mecanismos de morte celular que o composto está promovendo. Os dados estão apresentados na figura 36 (A,B,C e D), os gráficos de barras das médias e desvio padrão e a figura 36 E estão os dos platos obtidos no citometro Muse^{BD}. Os demais marcadores CXCR4, Cd-44 e CD-90 não mostraram diferenças significativas.

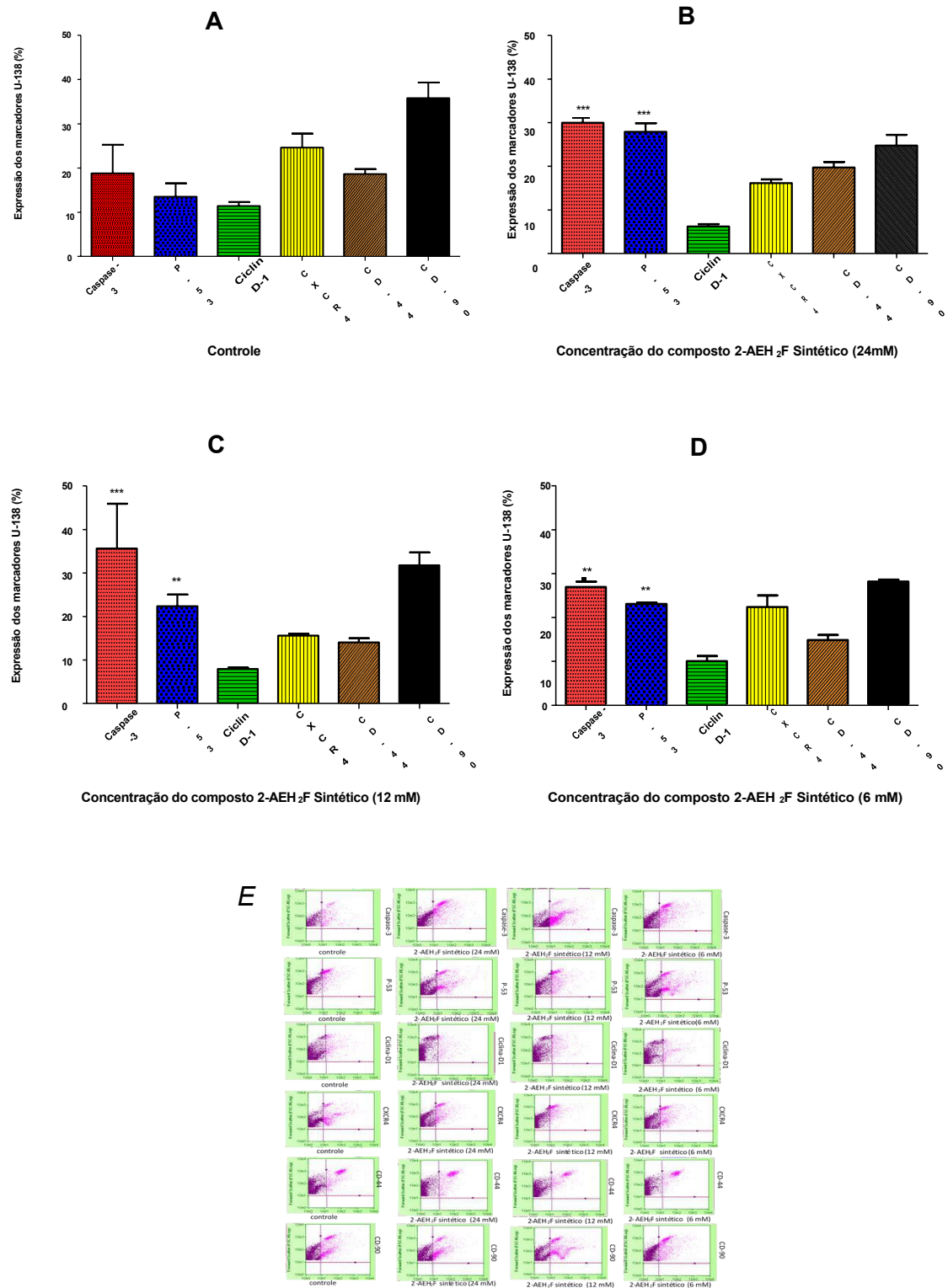


Figura 36- Análise da expressão de marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138.

A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético.(a) Expressão dos marcadores Caspase 3, P-53,Ciclin D1, CXCR4, CD44

e CD90 nas células controle; (b) Expressão dos marcadores Caspase 3, P-53, Ciclin D1, CXCR4, CD44 e CD90 na concentração de 24 mM; (c) na concentração de 12 mM; (d) na concentração de 6 mM. Os valores foram expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste não paramétrico de ANOVA seguido pelas comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados entre as diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle x tratado (e) Gráficos de densidade (dot plot) representativos adquiridos no citômetro MUSE^{BD}® mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência e a expressão do marcador.

4.10 Avaliação da expressão dos marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por citometria de fluxo

Após o tratamento com o quimioterápico Temozolomida, foi possível observar que a expressão das proteínas Caspase-3 fosforilada, P-53, CXCR-4, CD-44 e CD-90 aumentaram significativamente após o tratamento por 24 horas nas maiores concentrações quando comparado ao grupo controle (não tratado). Em contrapartida, a expressão de ciclina D1 não apresentou alterações significativas. Os resultados nos ajudam a sugerir que o tipo de morte celular que o quimioterápico temozolomida promove é a necrose tumoral por expressar o marcador CXCR-4 juntamente com as proteínas apoptóticas P53 e Caspase-3. Os dados estão apresentados na figura 37 (A,B,C e D) média e desvio padrão, os dot plots estão representados e adquiridos no citômetros FACS CANTO na figura 37 E.

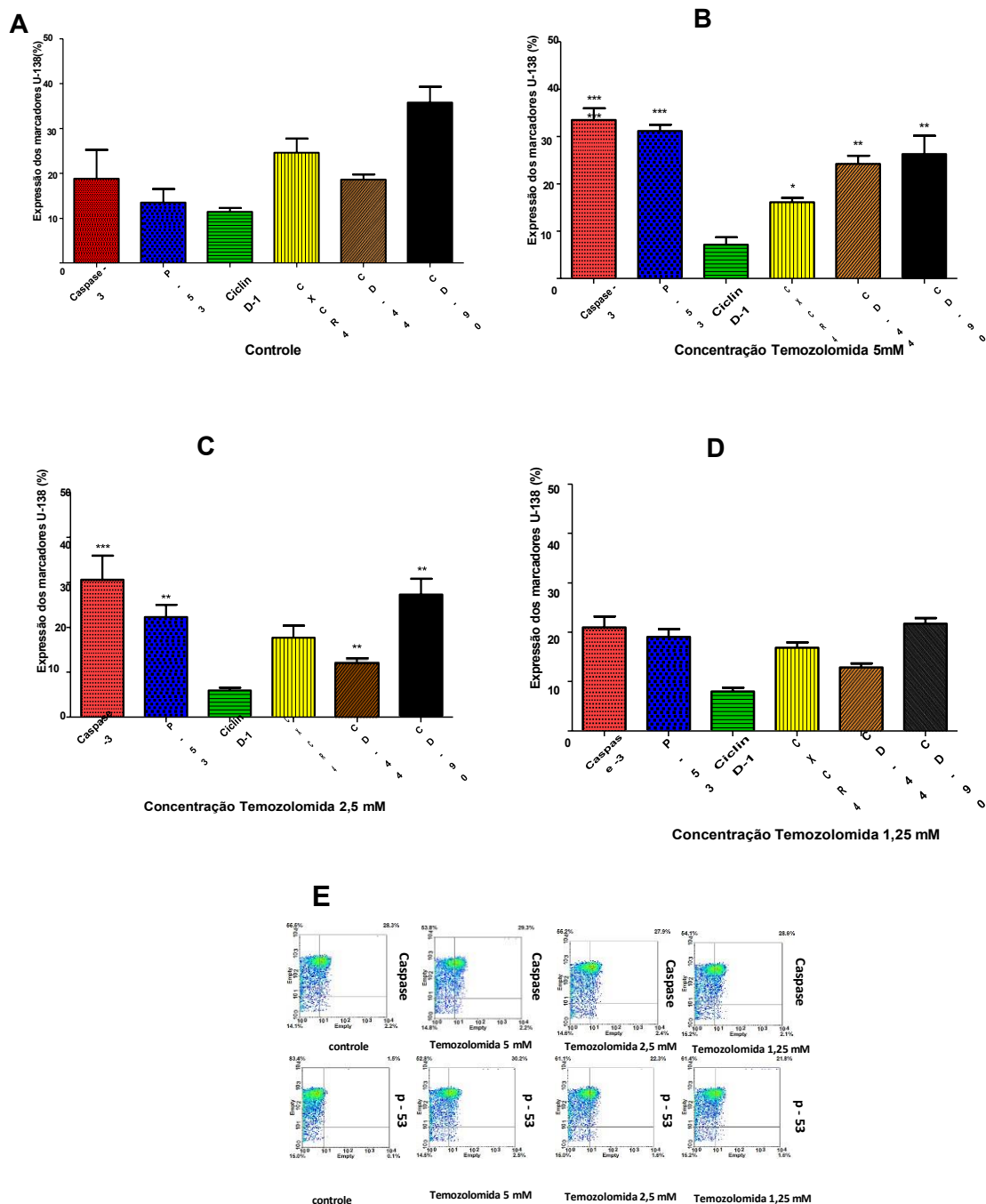


Figura 37 - Análise da expressão de marcadores em células tumorais de glioblastoma humano U-138.

A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com o quimioterápico Temozolomida. (A) Expressão dos marcadores Caspase 3, P-53, Ciclin D1, CXCR4, CD44 e CD90 nas células controle; (B) na concentração de 5mM; (C) na concentração de 2,5 mM; (D) na concentração de 1,25 mM. (E) Gráficos de densidade (dot plot) representativos adquiridos no citômetro FACS CANTO BD® mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência e a expressão do marcador. Os valores são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle x tratado

4.11 Avaliação da expressão dos marcadores em células normais de Astrócitos de ratos após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético

Não houve alteração da expressão das proteínas apoptóticas após o tratamento por 24 horas com o composto 2-AEH₂F sintético, quando comparado ao grupo controle. Todos os tratamentos não apresentaram percentuais significativos de alteração. Esses resultados são relevantes para este tipo celular e fazendo possivelmente efeito benéfico, em que o composto 2-AEH₂F sintético poderia estar promovendo para os astrócitos em efeito para neuroproteção. Os dados estão apresentados na figura 38.

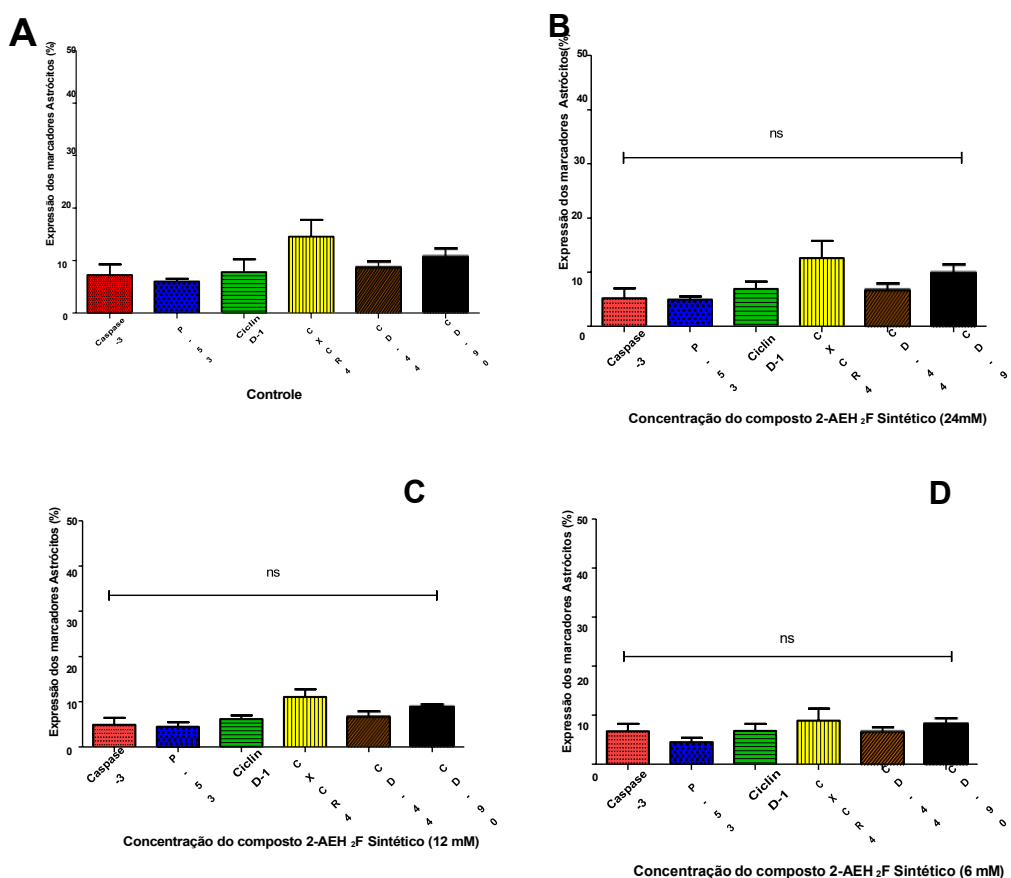


Figura 38 - Análise da expressão de marcadores em células de astrócitos normais de ratos.

A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético. **(a)** Expressão dos marcadores Caspase 3, P- 53, Ciclin D1, CXCR4, CD44 e CD90 nas células controle; **(b)** na concentração de 24 mM ; **(c)** na concentração de 12 mM; **(d)** na concentração de 6 mM. Os valores são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA não paramétrico e teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer. ns= não significativo, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle x tratado

4.12 Avaliação da expressão dos marcadores em células normais de Astrócitos de ratos após tratamento com o quimioterápico Temozolomida por citometria de fluxo

Após o tratamento com o quimioterápico Temozolomida, foi possível observar que a expressão das proteínas Caspase-3 fosforilada, P-53, Ciclin D-1 e CXCR-4, aumentaram significativamente após o tratamento por 24 horas na maior concentração quando comparado ao grupo controle. Em contrapartida, na menor concentração não houve alterações significativas das expressões das proteínas. Observando esses resultados e comparando com as células tumorais de glioblastoma humano U-138, sugere-se que a Temozolomida não apresenta especificidade e seletividade entre as células normais e tumorais, apresentando o mesmo mecanismo de morte celular para ambas com significativo grau de toxicidade. Os dados estão representados na figura 39.

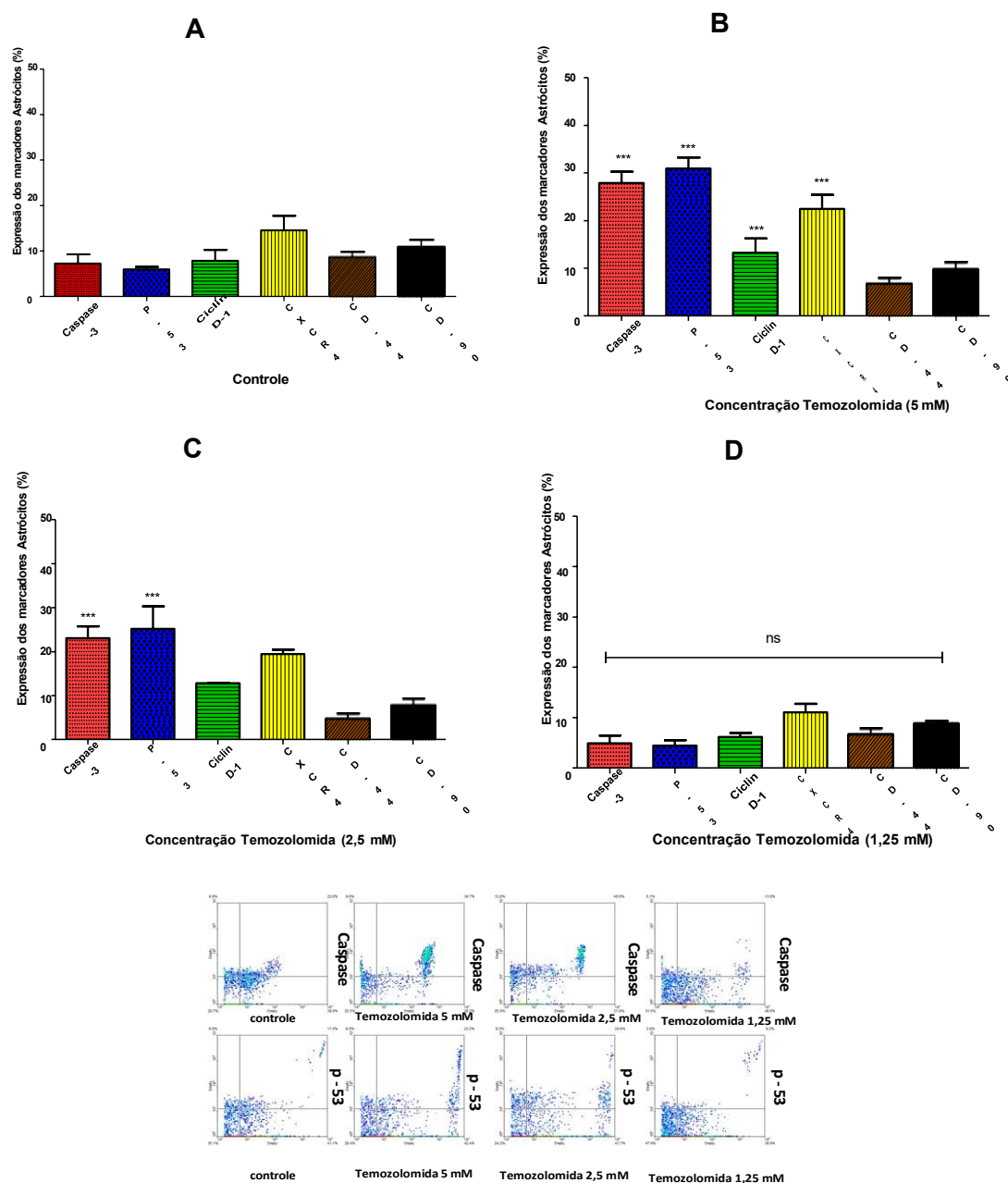


Figura 39 - Análise da expressão de marcadores em células de astrócitos normais de ratos.

A expressão dos marcadores foi quantificada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com o quimioterápico Temozolomida. **(a)** Expressão dos marcadores Caspase 3, P- 53, Ciclin D1, CXCR4, CD44 e CD90 nas células controle ; **(b)** na concentração de 5 mM; **(c)** na concentração de 2,5 mM; **(d)** na concentração de 1,25 mM. **(E)** Gráficos de densidade (dot plot) representativos adquiridos no citômetro FACS CANTO BD® mostram a distribuição do número de células com a intensidade de fluorescência e a expressão do marcador Os valores são expressos como média ± DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas por ANOVA não paramétrico e teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

* p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 e ns= não significativo, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle x tratado

4.13 Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\psi$) por citometria de fluxo das células tumorais de glioblastoma humano U-138 após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético e o quimioterápico Temozolomida

As células de glioblastoma humano U-138 foram tratadas por um período de 24 horas com o composto 2-AEH₂F sintético, observa-se na figura 40 que o tratamento na concentração de 24 mM reduziu o potencial de membrana mitocondrial aumentando significativamente o percentual de despolarização. Nos tratamentos com menores concentrações não houve mudanças significativas comparadas ao grupo controle (figura 40).

No tratamento com o quimioterápico Temozolomida, por 24 horas, as células tumorais de glioblastoma U-138 apresentaram alterações no potencial elétrico mitocondrial mesmo nos menores níveis testados (figura 41).

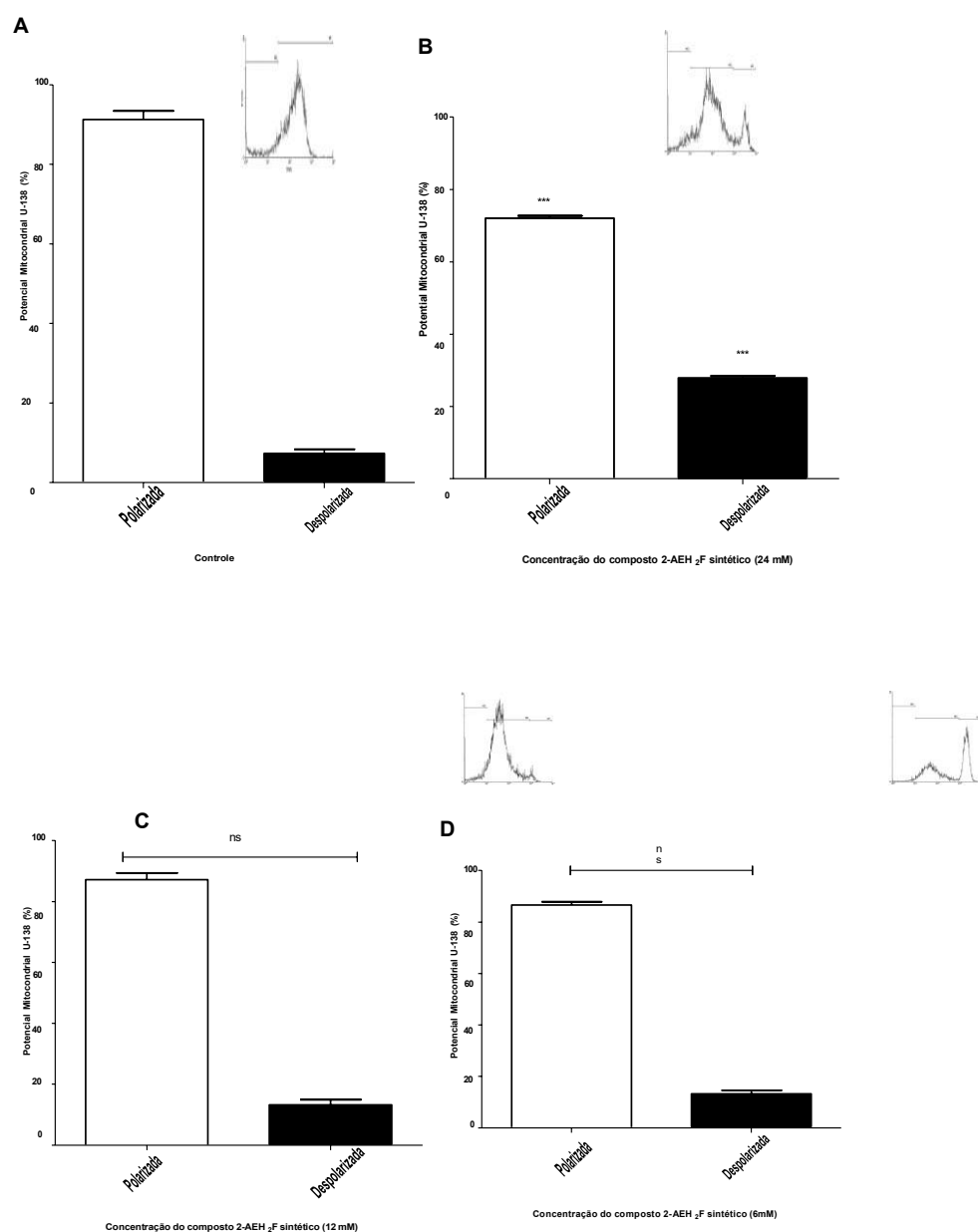


Figura 40. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial com a Rodamina 123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético.

(A) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial em células de glioblastoma humano (U-138); (B) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com 2-AEH₂F Sintético na concentração de 24 mM. (C) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético na concentração de 12 mM. (D) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético na concentração de 6 mM. Diferenças estatísticas obtidas entre os grupos não tratados e tratados pelo teste de Variância de ANOVA não paramétrico, seguido pelo teste de múltiplas vias de Tukey- Kramer. *** $p < 0.001$ e ns (não significativo).

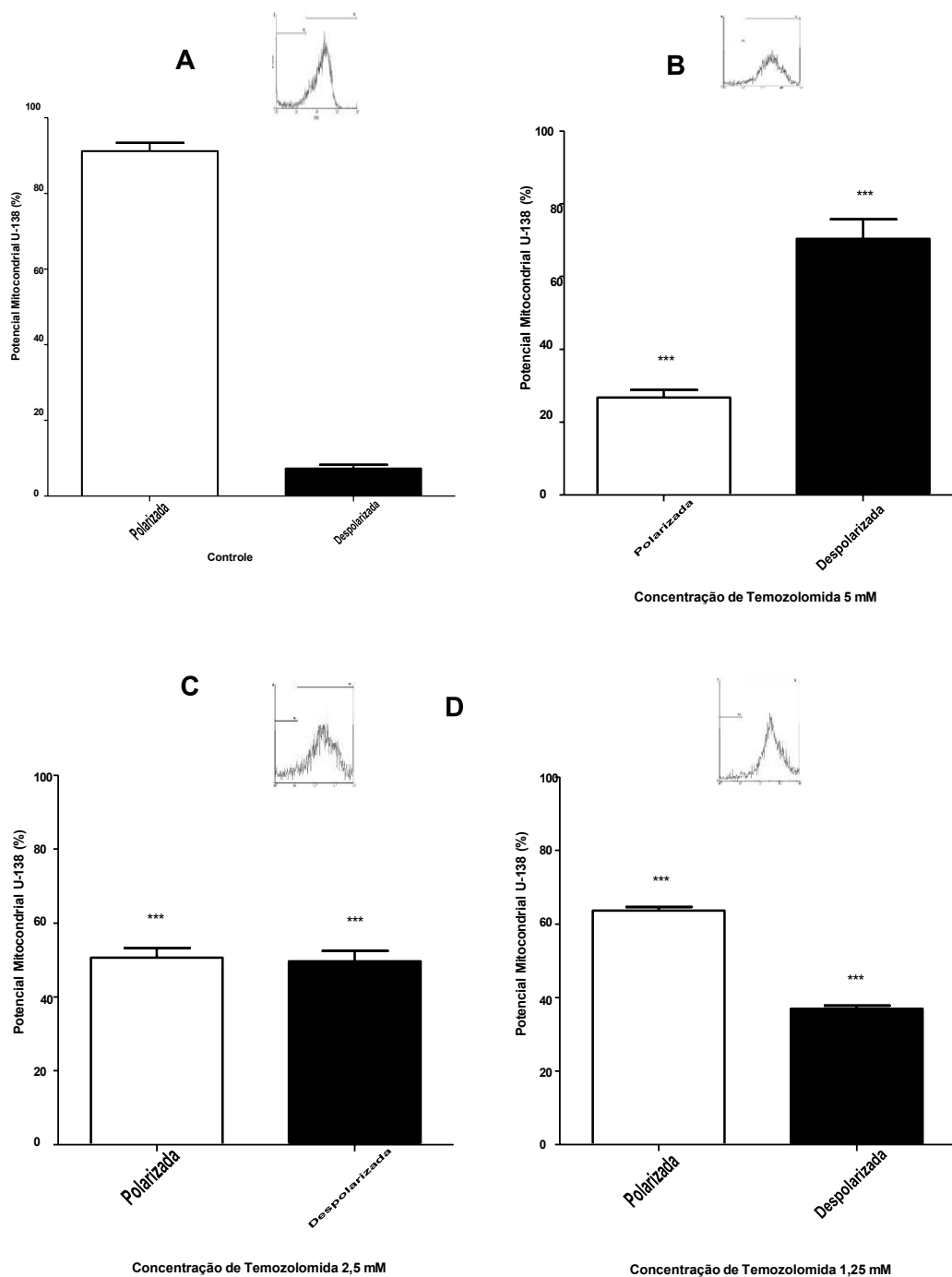


Figura 41 - Avaliação do potencial elétrico mitocondrial com a Rodamina 123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o quimioterápico Temozolomida.

(A) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial em células de glioblastoma humano (U-138); (B) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com Temozolomida na concentração de 5 mM. (C) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com Temozolomida na concentração de 2,5 mM. (D) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com Temozolomida na concentração de 1,25 mM. Diferenças estatísticas obtidas entre os grupos não tratados e tratados pelo teste de Variância de ANOVA não paramétrico, seguido pelo teste de múltiplas vias de Tukey-Kramer.

*** $p < 0.001$ e ns (não significativo).

4.14 Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi$) por citometria de fluxo das células de astrócitos normais de ratos após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético e o quimioterápico Temozolomida

As células de astrócitos normais de ratos foram tratadas por um período de 24 horas com o composto 2-AEH₂F sintético, observa-se na figura 42 que não houve redução do potencial mitocondrial e nem alteração significativa do percentual de despolarização. Todos os tratamentos não apresentaram alterações significativas quando comparamos ao grupo controle.

Pelo obtido no tratamento com o quimioterápico Temozolomida por 24 horas, observa-se na figura 43, que as células de astrócitos normais de ratos apresentaram maiores reduções do potencial elétrico e despolarização nos tratamentos de maiores concentrações e sem alterações significativas no tratamento de menor concentração quando comparado ao grupo controle.

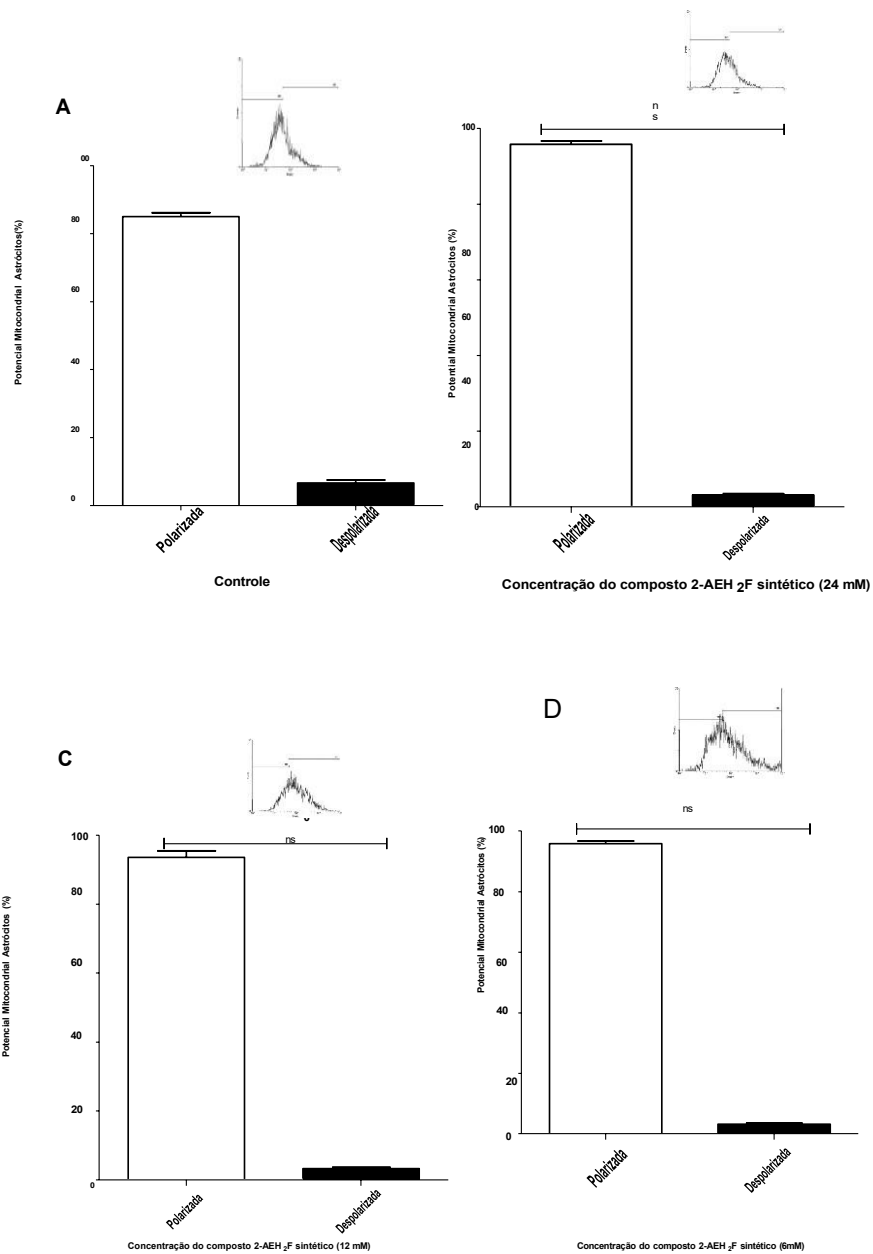


Figura 42 - Avaliação do potencial elétrico mitocondrial com a Rodamina 123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o composto 2-AEH₂F sintético.

(A) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial em células de astrócitos normais de ratos; (B) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético na concentração de 24 mM s. (C) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético na concentração de 12 mM. (D) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com o composto 2-AEH₂F Sintético na concentração de 6 mM. Diferenças estatísticas obtidas entre os grupos não tratados e tratados pelo teste de Variância de ANOVA seguido pelo teste de múltiplas vias de Tukey- Kramer. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ e ns (não significativo).

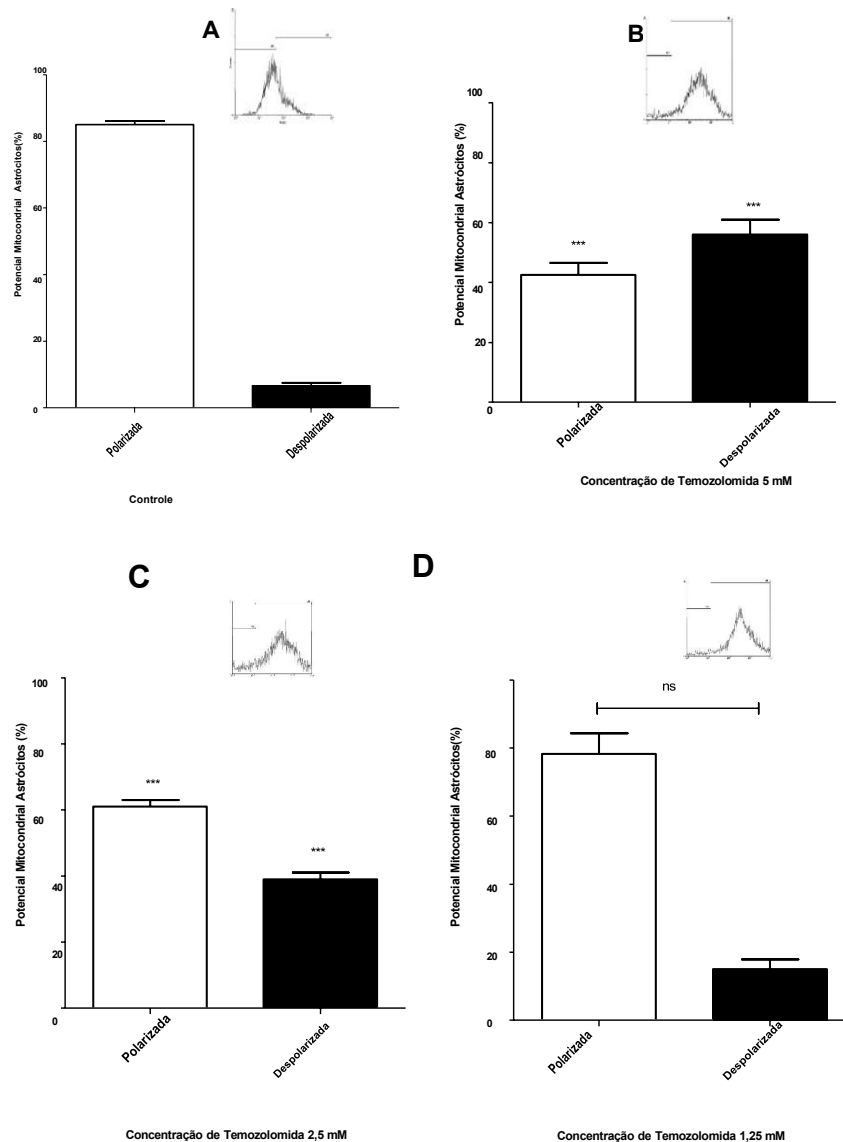


Figura 43 - Avaliação do potencial elétrico mitocondrial com a Rodamina 123 obtida por citometria de fluxo após o tratamento com o quimioterápico Temozolomida.

(A) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial em células de astrócitos normais de ratos; (B) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com Temozolomida na concentração de 5 mM. (C) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico mitocondrial após tratamento com Temozolomida na concentração de 2,5 mM. (D) Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão do potencial elétrico após tratamento com Temozolomida na concentração de 1,25 mM. Diferenças estatísticas obtidas entre os grupos não tratados e tratados pelo teste de Variância de ANOVA não paramétrico, seguido pelo teste de múltiplas vias de Tukey-Kramer. *** $p < 0.001$ e ns (não significativo).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas drogas antitumorais com alvos específicos, que sejam eficientes contra o tumor e minimizem os efeitos colaterais dos quimioterápicos convencionais, ainda hoje continua sendo o maior desafio da medicina moderna. Nossos resultados são semelhantes aos descritos por outros autores acerca das propriedades anti tumorais do 2-AEH₂F, o que demonstra a capacidade da sua citotoxicidade.

O monofosfoester 2-AEH₂F é uma molécula envolvida no turnover de fosfolipídios, agindo como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana, entre eles fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, ambos participam das vias de sinalização lipídica atuando como ligantes ou gerando substratos intermediários. Nosso grupo de pesquisa utiliza o 2-AEH₂F, e vem relatando seus efeitos antiproliferativos em uma ampla variedade de linhagens de células tumorais. In vivo o tratamento de camundongos com o 2-AEH₂F exibe efeitos antiproliferativos em modelo de leucemia promielocítica aguda (APL) reduzindo o número de células mieloides imaturas CD117 e Gr-1 na medula óssea, baço e fígado. O 2-AEH₂F reduz a expansão de clones com expressão de CD34'/ CD117', CD34'e Gr-1' na medula óssea. Além disso, 2-AEH₂F induz a apoptose de células imaturas no baço e no fígado.

O 2-AEH₂F apresenta efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos nas células do melanoma induzindo uma parada na fase G2/M do ciclo celular com a perda do potencial mitocondrial e aumento da atividade da caspase-3 fosforilada. O modelo de carcinoma renal murino é mais sensível a 2-AEH₂F quando comparado às células normais do túbulo proximal imortalizadas de ratos (IRPTC) e células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC), também induzem a fragmentação nuclear e afetam a organização do citoesqueleto através da ruptura dos filamentos de actina, potencializando inibição da formação de metástase pulmonar em camundongos nude, com uma eficácia superior quando comparado ao Sunitinibe.

O 2-AEH₂F é citotóxico para células tumorais de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, já para células de mama humano normal MCF10, apenas em concentrações muito mais altas. Induziu agregados de mitocôndrias no citoplasma e fragmentação de DNA, bem como apoptose seguido por um aumento na expressão da liberação do citocromo c e atividade da capase-3 fosforilada, induzindo uma parada do ciclo celular na fase G1, através da inibição da ciclina D1 e estimulando fosforilação da p53. Um destaque adicional deste estudo foi a descoberta de que 2-AEH₂F modula a expressão de Bcl-2, inibindo-a. Outros trabalhos mostram alterações nas distribuições das populações celulares nas fases do ciclo celular, apresentando um aumento do DNA fragmentado após 48 h e parada na fase G2/M após 24 h, e modulação da apoptose tardia (Ferreira et al. 2012; Santana-Lemos 2012; Freitas, Levy, Ruiz, 2014). A forma sem fosfato do 2-AEH₂F, a MEA, monoetanolamina ou etanolamina, cuja absorção independe da ação catalítica da ALP, foi a substância mais citotóxica e necrotizante entre as testadas, exibindo IC₅₀% de 24h de 6,64 mM no GBM SF- 295.

A formulação sintética do 2-AEH₂F produziu valores de IC₅₀% após 24h de 44 mM enquanto que a formulação de 2-AEH₂F da Sigma Aldrich, produziu IC₅₀% de 24h de 69,89mM. Fotomicrografia representadas mostra a redução da adesividade celular e aumento de células arredondadas, além da formação de debris proporcional a concentração do composto 2-AEH₂F. A eletromicroscopia eletrônica de varredura mostra que algumas das células tumorais de glioblastoma humano de U-138 apresentam expansão citoplasmática com a formação de corpos apoptóticos após exposição ao 2- AEH₂F sintético por 24h.

Os testes de viabilidade celular, realizados por períodos de 72h, mostraram valores menores aos descritos após 24h de exposição, exibindo um valor de IC₅₀% para o 2-AEH₂F de 43,4 mM. O acréscimo de 140 µM de pirofosfato ao experimento reduz em 20% a toxicidade ao 2-AEH₂F, que sobe para 56,03 mM do valor da IC₅₀%. O pH ácido e a presença de cofatores enzimáticos minerais aumentaram significativamente a toxicidade do 2-AEH₂F ao SF-295, IC₅₀% de 33 mM.

Nos astrócitos normais as concentrações acima de 80 mM do

composto 2-AEH₂F, foram muito bem toleradas não apresentando efeitos citotóxicos e são estimulados à mitose e ao aumento da densidade celular após exposição ao 2-AEH₂F, fato comprovado após o ensaio de proliferação celular.

Quanto à funcionalidade da ALP sobre o composto 2-AEH₂F, verifica-se que como substrato competitivo ao 2 nitrofenil fosfato, reduz de forma proporcional a criação de nitrofenol de maneira concentração dependente, enquanto que a formulação sintética do 2-AEH₂F bloqueia de forma muito mais efetiva a ALP, mesmo com concentrações baixas.

O inibidor competitivo da fosfatase alcalina — pirofosfato de sódio - funciona como um bloqueador competitivo, o bloqueio parcial aumenta a velocidade de fluxo, conforme o diagrama de Lineweaver Burk Plott, que é uma maneira de descrever a função enzimática sobre um substrato de forma linearizada; o grau de angulação das retas mostra o grau de afinidade enzima substrato e permite comparar diferentes tipos de inibidores enzimáticos, se são competitivos ou não. O diagrama de fornece um gráfico de dupla recíproca é criado após a plotagem da a velocidade inicial inversa ($1/V_0$) em função do inverso da concentração do substrato ($1/[S]$). A V_{max} pode ser determinado com precisão e, portanto, o K_m é determinado em função linear. O K_m do composto 2-AEH₂F para a atividade da ALP coletada do sobrenadante de células tumorais GBM SF- 295 mostrou um valor de 4.6 mM e K_i de 6.3.

O 2-AEH₂F sintético produz diminuição em G1 e parada em G2M, além de produzir DNA fragmentado e debris celulares em todas as concentrações testadas. O 2-AEH₂F Sigma, não produziu parada na fase do ciclo celular mas causou diminuição das células na fase G1, de forma semelhante à formulação sintética, causou necrose em todas as concentrações testadas. A Monoetanolamina, foi a que mais induziu morte das células, mas não produziu nenhum efeito significativamente mensurável sobre o ciclo celular, talvez por que prodizisse lise celular, uma vez que tem forte poder osmótico. Linhagens tumorais de glioblastoma humano U-138 expostos ao 2-AEH₂F, por 24h, exibem um valor de $IC_{50\%}$ de 24 mM e redução adesiva conforme se eleva a concentração de 2-AEH₂F. Por outro lado o tratamento por 48 horas, houve aumento de toxicidade, valor da $IC_{50\%}$: 20 mM, embora tenha causado os mesmos efeitos deletérios e citotóxicos como observado nas fotomicrografias.

O quimioterápico TMZ por 24 horas resultou no valor de $IC_{50\%}$ de 2,9 mM,

apresentando efeitos citotóxicos e deletérios, semelhantes aos causados pelo composto 2-AEH₂F embora algumas células ainda se mantenham aderentes e com formato semelhante aos grupos não tratados.

Da mesma forma que o observado com o composto 2-AEH₂F, o maior tempo de exposição á TMZ por 48h, em células tumorais de glioblastoma humano U-138, também reduziu o valor de IC_{50%} para 2,4 mM.

Astrócitos normais de rato expostos a TMZ por 24h resultam no valor de IC_{50%} de 2,1 mM, e por 48h o valor da IC_{50%} foi reduzida para 1,4 mM. O 2- AEH₂F sintético, no ciclo celular das células de tumorais de glioblastoma humano U-138, causou redução de G1 e G2M além de parada na fase S, e conforme eleva-se a concentração progressivamente há aumento no próprio DNA fragmentado. O quimioterápico TMZ também produziu aumento proporcional de necrose e redução nas fases G1 e S.

O impacto sobre o ciclo celular das células tumorais de glioblastoma humano U138 foram testados usando-se os valores de IC_{50%} de 24h do 2- AEH₂F e do quimioterápico TMZ, mostraram diminuição da fase G1, parada na fase S e progressivamente aos seus níveis o aumento do DNA fragmentado. O efeito destas concentrações de 2-AEH₂F e TMZ em astrócitos normais de ratos não demonstram nenhum efeito com relação ao 2-AEH₂F, entretanto houve importante impacto da TMZ no ciclo celular dos astrócitos, ocorrendo parada na fase G1, redução da fase S, e nas concentrações mais elevadas, parada em G2/M. Ao contrário, astrócitos proliferam no valor de IC_{50%} do composto 2- AEH₂F sintético.

Avaliamos a expressão de marcadores do ciclo celular em células tumorais de glioblastoma humano U138 após exposição por 24h ao 2- AEH₂F, havendo aumento da proteína p53 e de caspase 3 fosforilada, conforme a concentração de 2-AEH₂F. O quimioterápico TMZ elevou a expressão de vários marcadores na célula tumoral de glioblastoma humano U-138, como caspase 3, p53, CD44 e diminuição da expressão do marcador CD-90 nas concentrações de 2,5 e 5 mM, sem efeito mensurável a 1,25 mM. Em astrócitos normais o composto 2-AEH₂F após 24h de exposição, não produziu nenhum efeito significativo sobre a expressão destes marcadores. O quimioterápico TMZ em astrócitos causou, conforme a concentração, elevação da proteína p53

e da caspase 3 fosforilada, e nas concentrações mais elevadas, 5 mM, houve aumento adicional da Ciclina D1 e expressão de CXCR4, a concentração de 1,25 mM de TMZ não mostrou nenhum efeito significativo.

O impacto do composto 2-AEH₂F no potencial de membrana mitocondrial nas células tumorais de glioblastoma humano U-138 foi alterado, encontrando-se no valor de IC₅₀% de 2-AEH₂F, alteração significativa no potencial elétrico, da mesma forma que encontramos com a TMZ, nas concentrações de 5 mM, 2,5 mM e 1,25 mM. Os astrócitos normais de rato não sofrem qualquer alteração na polarização da membrana mitocondrial na concentração referente ao IC₅₀% das células tumorais de glioblastoma humano U138 com respeito ao 2-AEH₂F, o contrário do que se observa com a TMZ que modifica significativamente o potencial mitocondrial nas concentrações de 1,25 mM, 2,5 mM e 5 mM.

A toxicidade do composto 2-AEH₂F poderia se dar por meio da ação da ALP, um marcador de indiferenciação e resistência, não só em GBMs mas também em outros microambientes tumorais (MAT) como nas metástases ósseas, leucemias e hepatocarcinomas (Metwally, Zuhdy, Hamdy, Ezzat, 2020). Segundo propõe a teoria da presença de stem cells tumorais o prognóstico é proporcional à capacidade do micro MAT em produzir células tumorais indiferenciadas, (Wang Ke, et al) ou seja que exibam marcadores de

indiferenciação, como a ALP (Metwally, Zuhdy, Hamdy, Ezzat, 2020).

Inibidores da ALP diminuem a toxicidade do composto 2-AEH₂F enquanto cofatores minerais em pH ácido, que em parte mimetizam o MAT, não apenas aumentaram a toxicidade ao 2-AEH₂F como aumentaram a função catalítica da enzima se comparado ao 2-AEH₂F na presença do inibidor competitivo pirofosfato.

Os dados da literatura sobre as propriedades antitumorais da 2-AEH₂F mostraram que o mecanismo de morte tumoral se deve a necrose decorrente da ruptura de membrana, devido seu poder osmótico fazendo-as circulares, e também ao seu efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial com subsequente extravasamento de proteínas pró apoptóticas, como o citocromo C, que é ativador das caspases 3 (Elena-Real, Díaz-Quintana, 2018). Para que esse mecanismo de morte tumoral ocorra seletivamente dentro do MAT, além da prévia ação da ALP, há a necessidade da absorção ao intracelular do composto 2-AEH₂F e subsequente

incorporação ao diacil glicerol e formação da fosfatidiletanolamina (PE) através da via Kennedy, 1956).

A formação de PE pela via Kennedy inibe a outra via de biosíntese de PE, que se dá por meio das fosfatidilserinas (PS) descaboxilases, que transformam PS em PE no retículo endoplasmático, PSD2 localizada em uma região chamada de mitocondrial associação membranas e a PSD1 que é mitocondrial. A maior parte da PE mitocondrial é proveniente destas duas enzimas PSDs são fundamentais para a funcionalidade do citocromo bc1 também conhecido como complexo III da cadeia respiratória (Calzada, Avery, Sam, Modak, Wang, 2019). Uma característica comum dos MATs é hipóxia, inflamação e a desnutrição, ativadoras de mecanismos de autofagia mTOR dependentes, que guardam correlação direta com o prognóstico reservado em neoplasias (M Paquette, L El- Houjeiri, A Pause 2018). De forma específica, a desnutrição tem impacto direto na disfunção do gene Pcyt2 que transcreve 3 iso enzimas responsáveis pela incorporação do 2-AEH₂F á cabeça hidrofílica da PE (Osawa et al., 2019). Disfunções da Pcyt2 levam ao acúmulo intra tumoral especificamente nas regiões pouco vascularizadas do MAT, da substância que aqui testamos como anti tumoral, o 2-AEH₂F. Como o 2-AEH₂F não é incorporado para a formação dos fosfolípides de membrana, acumula-se de forma patológica junto com o outro substrato enzimático, o diacil glicerol, cuja presença se associa á peroxidação lipídica/inflamação (Griner, Kazanietz, 2007). Os níveis intra tumorais de 2-AEH₂F guardam correlação direta com o mal prognóstico em diferentes tipos de tumores agressivos (Osawa et al., 2019). O estudo do MAT mostra que as células desnutridas e conseqüentemente falência da incorporação do 2-AEH₂F á PE, se caracterizam por circundarem tecidos necróticos e microvasos sanguíneos, que também guardam correlação positiva com o mal prognóstico em diferentes tipos de neoplasias agressivas (Osawa et al, 2019). A sensibilidade da Pcyt2 á desnutrição ocorre pela especificidade que o gene exhibe ás variações nas concentrações teciduais de glutamina (Osawa et al, 2019). Glutamoptose é a indução de morte celular apoptótica por oferta de glutamina como conseqüência da ativação aberrante da glutaminólise e da sinalização mTORC1 secundário ao desequilíbrio nutricional nas células em proliferação dentro do MAT (Rabanal-Ruiz et al, 2017).

Glutamina é um aminoácido não essencial precursora da glutatona cujo maquinário proteico responsável pela sua transformação em alfa ceto glutarato exhibe

ativação aberrante em células tumorais. Tumores são ávidos e deficientes de glutamina e o uso em suplementos contendo glutamina para pacientes oncológicos parece ter efeito positivo (Bodineau et al., 2021).

Embora exista a possibilidade deste amino ácido estimular ainda mais o crescimento tumoral, basicamente por fornecer energia ou seja ATP, quando se fornece glutamina, exclusivamente em uma condição de desnutrição, ocorre a ativação de um mecanismo de morte celular mTORC1 dependente, definido como glutamoptosis; indução de apoptose por inibição da autofagia (Bodineau et al., 2021).

Desta forma, a toxicidade do composto testado 2-AEH₂F é dependente das concentrações de glutamina, via Pcyt2, garantem que o composto 2-AEH₂F ofertado vá para a biosíntese de membranas, da PE reduzindo o DAG tecidual e por consequência sua expressão, considerada fundamental no desenvolvimento de diferentes tumores (Griner, Kazanietz, 2007) .

A biosíntese de PE pode estimular a apoptose por outras formas como por exemplo, pela hidrólise da PE por fosfolipases, formando N acil etanolaminas como a anandamida que induz apoptose ou anti inflamação ao interagir com receptores canabinóides específicos em gliomas (Schmid et al., 2002). A ligação da anandamida extracelular aos receptores canabinóides tipo 1 ou 2 (CB1R ou CB2R) gera várias vias de transdução de sinal, conforme o tipo de célula. A ativação de CB1R ou CB2R incrementa a concentração intracelular de ceramida, que ativa a cascata Raf1/ERK, ativando a via JNK/p38 MAPK levando à apoptose. A ligação da anandamida ao CB1R pode produzir ROS e inibição da proteína quinase A e do produto do oncogene K-ras p21ras ativando a p42/p44 ERK, todos levando à apoptose. Ademais a anandamida pode ativar VR1 intracelular, produzindo eventos pró-apoptóticos, como a elevação do cálcio intracelular e ativação da cascata de araquidonato por meio das vias COX e LOX, redução no potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), aumento da liberação de citocromo C e ativação de caspase-3 e caspase-9, (Maccarrone, Finazzi-Agro, 2003) exatamente como descrito com o uso de 2-AEH₂F (Ferreira et al.,2012; Ruiz, 2014). Esses efeitos citotóxicos da anandamida em VR1 são inibidos pela ativação simultânea de CB1R, em células neuronais, ou CB2R, em células imunes, já em astrócitos, a ativação do CB1R pela anandamida também pode estimular a via PI3K/PKB, produzindo proteção contra a apoptose (M Maccarrone, Finazzi-Agro., 2003). Ou seja, o segundo mensageiro lipídico anandamida, resultante da hidrólise da PE por meio da ação de fosfolipases, é tóxica para gliomas e inibidor da apoptose

em astrócitos e em células imunes. Nossos resultados com astrócitos mostram que o 2-AEH₂F poderia ter um efeito inibidor sobre a morte de astrócitos produzidas por quimioterápicos de primeira linha como a TMZ, uma vez que o 2-AEH₂F favorece a proliferação celular de astrócitos nas doses tóxicas às linhagens de GBM.

As etanolaminas no intracelular tem um reconhecido efeito anti-envelhecimento (Rockenfeller, Carmona-Gutierrez, 2016) são indutoras da autofagia (Rockenfeller, Koska, Pietrocola, 2015) e inibem a biosíntese de proteínas priônicas que formam as placas amilóides características de doenças neurodegenerativas (Uchiyama, Hara, Chida, Pasiana, 2021)

A administração intraperitoneal de 1000 mg/kg do composto 2-AEH₂F aumenta a sobrevivência dos camundongos xenotransplantados com tumores no dorso, Hela, da mesma forma que 100 mg/kg de etanolamina também o fazem (Osawa et al., 2019). A dose administrada de 1000 mg/kg eleva a concentração tecidual em 0.35 mM. A concentração fisiológica tecidual de 2-AEH₂F oscila entre (0.8- 1.4)mM. Em humanos, a concentração necessária para produzir semelhante aumento tecidual de 0.35 mM é da ordem de 700-500 mg, aparentemente factível, diante do peso molar do 2-AEH₂F que é de 141 g/mol.

Acreditamos que mais estudos pré-clínicos devem ser realizados, associando-se glutamina e outros compostos moduladores do metabolismo ao composto 2-AEH₂F, com objetivo de verificar se há ou não sinergia aditiva citotóxica ou anti-inflamatória. Talvez a glutamina seja tão seletiva no desnutrido micro ambiente tumoral quanto o 2-AEH₂F é seletivo por meio da função catalítica do marcador de indiferenciação e agressividade, que são as ALPs, cuja concentração e função catalítica estão aumentadas no MAT inflamatório. Potencialmente a ALP é um interessante alvo molecular ao 2-AEH₂F e mais estudos pré clínicos deveriam ser conduzidos.

6 CONCLUSÕES

- Os compostos comerciais e sintéticos do composto aminofosfoéster 2- AEH₂F foram citotóxicos para as células de glioblastoma humano e favorecendo a proliferação em células de astrócitos normais, diferente do quimioterápico TMZ que se mostrou tóxico aos astrócitos, alterando o potencial de membrana mitocondrial, a distribuição das fases do ciclo celular e a expressão de proteínas vinculadas á apoptose e resistência;

- Inibidores enzimáticos reduziram a toxicidade do composto 2-AEH₂F em células GBM SF295 e cofatores enzimáticos em pH ácido favoreceram a morte celular;

- Inibidores enzimáticos competitivos de fosfatases alcalinas, pirofosfato de sódio, reduziu a produção de nitrofenol à partir do substrato nitrofenil fosfato, enquanto cofatores enzimáticos em pH ácido reduziram o Km enzimático;

- Neste trabalho, foram determinadas a velocidade da fosfatase alcalina na presença do composto 2-AEH₂F que exibiu Km de 4,6 mM nos tratamentos da células de glioblastoma humano SF-295;

- O composto 2-AEH₂F sofre ação da fosfatase alcalina, sendo um dos possíveis mecanismos de controle da proliferação celular em glioblastomas;

- As fases do ciclo celular foram modificadas, redução da fase G₀/ G₁ seletivamente com parada nas fases S e G₂/M com aumento do DNA fragmentado, dependente da concentração do composto 2-AEH₂F Sintético ou da Sigma ou mesmo da monoetanolamina, da mesma forma que o quimioterápico TMZ com diferentes perfis de seletividade e concentrações;

- O tratamento das células tumorais de glioblastoma humano SF-295, com os compostos 2-AEH₂F Sintético, mostrou positivamente à modulação do potencial antiproliferativo e pró-apoptótico.

7 REFERÊNCIAS

Abbasian, nima *et al.* Inorganic phosphate (pi) signaling in endothelial cells: a molecular basis for generation of endothelial microvesicles in uraemic cardiovascular disease. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n.19. 6993 p, sep 2020.

Abrahão v.m., teixeira v. N., kuwabara t., amaral g. F., buonfiglio d.,peres r., vendrame f.,silveira s. F.,neto c. J., afeche c. S.identificação da aminopeptidase regulada pela insulina (irap) na glândula pineal de ratos e modulação da síntese de melatonina pela angiotensina iv. **Science direct**, p. 40-46, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.015>

Akhavan, david; cloughesy, timothy f ; mischel, paul s . Mtor signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. **Neuro-oncology**, v. 12, n.8, p. 882-9, aug 2010.

Andino, aguilar *et al.* Carcinoma de plexo coroideo em paciente pediátrico: reporte de caso / choroid plexus carcinoma in pediatric patient: case report. **Acta pediátrica hondureña**, v. 10, n. 2, p. 1069-1074, 2019.

Bacciu, andrea *et al.* Ear, nose and throat manifestations of churg-strauss syndrome. **Acta oto-laryngologica**, v. 126, n. 5, p. 503-509, 2006.

Barbosa, joana s *et al.* Neurodevelopment. Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain. **Science**, new york, v. 348, n.6236, p. 789-793, 15 maio 2015.

Barreto, davi drieskens carvalho de castro sá. **A área hipocampal ca1 é essencial para a memória similar à episódica**. 2016 dissertação (mestrado em neurociência cognitiva e comportamental) - universidade federal da paraíba, João Passoa, 2016.

Basak, onur *et al.* Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are notch1-dependent in their active but not quiescent state. **Journal of neuroscience** , v. 32, n. 16, p. 5654-5666, apr 2012.

Battu, sudha *et al.* Clinicopathological and molecular characteristics of pediatric meningiomas. **Neuropathology**, v. 38, n. 1, p. 22-33, 2018.

Berenholz, I *et al.* Superior ophthalmic vein thrombosis: complication of ethmoidal rhinosinusitis. **Arch otolaryngol head neck surg**, v. 124, n. 1, p. 95-97, jan 1998.

Bernal, aurora ; arranz, lorena . Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. **Cellular and molecular life sciences**, v.75. 2177–2195 p, jun 2018.

Bishop, justin a *et al.* Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. **The american journal of surgical pathology** , v. 37, n. 2, p. 185-192, feb 2013.

Bodineau, clément *et al.* Two parallel pathways connect glutamine metabolism and mtorc1 activity to regulate glutamoptosis. *Nature communications*, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2021.

Borch, josefine de stricker *et al.* Meningioma-brain crosstalk: a scoping review. **cancers (basel)**, v. 13, n. 17. 4267 p, aug 2021.

Boskey, a l; dick, b l . Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter invitro hydroxyapatite crystal proliferation and growth. **Matrix** , v. 11, n. 6, p. 442- 6, dec1991.
Calzada, elizabeth *et al.* Phosphatidylethanolamine made in the inner mitochondrial membrane is essential for yeast cytochrome bc1 complex function. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

Chang, chia-yuan *et al.* Not just a bystander: the emerging role of astrocytes and research tools in studying cognitive dysfunctions in schizophrenia. **International journal of molecular sciences** , v. 22, n. 10. 5343 p, may 2021.

Chen, xian-ming; lorusso, nicholas f. Human intestinal and biliary cryptosporidiosis. **World j gastroenterol**, v. 5, n. 5. 424–429 p, oct 1999.

Cignetti, a *et al.* Cd34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. **Blood, the journal of the american society of hematology** , v. 94, n. 6, p. 2048-55, sep 1999.

Costanza, massimo; finocchiaro, gaetano. Allergic signs in glioma pathology: current knowledge and future perspectives. **Cancers** , v. 22, n. 11. 404p, mar 2019.

Cox, g b *et al.* Genetic analysis of mutants affected in the pst inorganic phosphatetransport system. **Journal of bacteriology**, v. 148, n. 1, p. 1-9, oct 1981.

Crawford, jeffrey *et al.* Relationship between changes in hemoglobin level and quality of life during chemotherapy in anemic cancer patients receiving epoetin alfa therapy. **Cancer**, v. 95, n. 4, p. 888-95, aug 2002.

Dahlhaus, anne *et al.* Birth weight and subsequent risk of childhood primary brain tumors: an updated meta-analysis. **Pediatr blood cancer** , v. 64, n. 5, may 2017.

De filippis, lidia; binda, elena. Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult. **Stem cells transl med**, v. 1, n. 4, p. 298-308, abril 2012.

Deftos, I j ; wolfert, r l; hill, c s. Bone alkaline phosphatase in paget's disease. **Horm metab res** , v. 23, n. 11, p. 559-61, nov 1991.

Ding, xue-feng *et al.* Postnatal dysregulation of notch signal disrupts dendrite development of adult-born neurons in the hippocampus and contributes to memory impairment. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

Dong, jian *et al.* A neuronal molecular switch through cell-cell contact that regulates quiescent neural stem cells. **Science advances**, v. 5, n. 2. Eaav4416 p, february 2019.

Dulguerov, pavel ; allal, abdelkarim s . Nasal and paranasal sinus carcinoma: how can we continue to make progress?. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, v. 14, n. 2, p. 67 - 72, apr 2006.

Eanes, e d *et al.* Proteoglycan inhibition of calcium phosphate precipitation in liposomal suspensions. **Glycobiology**, v. 2, n. 6, p. 571-8, dec 1992.

Faria, sonia m. De; farhat,calil k. Meningites bacterianas-diagnóstico e conduta. **Jornal de pediatria**, rio de janeiro, v. 99. 75-supl 1, p. S46-s56, 1999

Ferreira, a. K. Et al. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British journal of cancer**, v. 109, n. 11, p. 2819-2828, 2013.

Ferreira, adilson kleber et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. E57937, 2013.

Fonta, caroline *et al.* Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission. **Cerebral cortex**, v. 14, n. 6, p. 595-609, jun 2004.

Fuchs, elaine ; chen, ting. A matter of life and death: self-renewal in stem cells.**embo reports**, v. 14, n. 1, p. 39-48, jan 2013.

Godoy, antonio carlos cavalcante. **Estudo de genes preditores de radiosensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida**. 2018 tese (doutorado em diferenciação celular normal e neoplásica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Gondim, caio César vaz lacet *et al.* Análise epidemiológica de gliomas operados em hospital de referência em combate ao câncer na paraíba entre 2015 e 2018: **Revista saúde & ciência online**, v. 7, n. 2, maio- agosto 2018.

Gower, emily west *et al.* Chlamydial positivity of nasal discharge at baseline is associated with ocular chlamydial positivity 2 months following azithromycin treatment. **Investigative ophthalmology & visual science** , v. 47, n. 11, p. 4767- 71, nov 2006.

Griner, erin m.; kazanietz, marcelo g. Protein kinase c and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature reviews cancer**, v. 7, n. 4, p. 281-294, 2007.

Hayman , I a *et al.* The hippocampus: normal anatomy and pathology. **American journal of roentgenology**, v. 171, n. 4, p. 1139-1146, oct 1998.

Howard, a d *et al.* Characterization of the phosphatidylinositol-glycan membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. **Proceedings of the national academy of sciences** , v. 84, n. 17, p. 6055-9, sep 1987.

Hu, zhifang *et al.* A potential mechanism of temozolomide resistance in glioma-ferroptosis. **Frontiers in oncology**, v. 10, p 897, 2020.

Huber, margit a *et al.* Nf-kappab is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. **J clin invest**, v. 114, n. 4, p. 569-81, aug 2004.

Imayoshi, itaru *et al.* Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brain. **Journal of neuroscience** , v. 30, n. 9, p. 3489 - 3498, 3 march 2010.

Ioannidis, dimitrios *et al.* Herpes viruses and human papilloma virus in nasal polyposis and controls. **Brazilian journal of otorhinolaryngology** , v. 81, n. 6, p. 658-662, nov–dec 2015.

Isolan, gustavo rassier *et al.* Parte i: anatomía microquirúrgica tridimensional de la ínsula / part i: three-dimensional microsurgical anatomy of the insula. **Rev argent neurocir**, v. 34, n. 2, p. 100-115, jun 2020.

Iwadate, yasuo *et al.* The pluripotent stem-cell marker alkaline phosphatase is highly expressed in refractory glioblastoma with dna hypomethylation. **Neurosurgery**, v. 80, n. 2, p. 248-256, feb 2017.

Jin, cheng jin *et al.* Phosphorylated lipid-conjugated oligonucleotide selectively anchors on cell membranes with high alkaline phosphatase expression. **Nature communications**, v. 10, p. 1-7, 2019.

Jubeck, brian *et al.* Type ii collagen levels correlate with mineralization by articular cartilage vesicles. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 9. 2741–2746 p, sep 2009.

Kandratavicius, ludmyla *et al.* Neurogênese no cérebro adulto e na condição epiléptica. **Journal of epilepsy and clinical neurophysiology**, v. 13, n. 3, p. 119-123, 2007.

Kang, suzie hyeona *et al.* Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis in cystic fibrosis: update on diagnosis and treatment. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 41, n. 1, p. 65-76, jan-feb 2015.

Karachi aida, changlin yang , farhad dastmalchi , elias j sayour , jianping huang, hassan azari , yu long , catherine flores , duane a mitchell , maryam rahman. Affiliations expand modulation of temozolomide dose differentially affects t-cell response to immune checkpoint inhibition. **Neuro oncology**, p. 760-741. Jun 2018. Doi: 10.1093/neuonc/noz015

Kawaguchi, masaya *et al.* Imaging characteristics of malignant sinonasal tumors. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 12. 116 p, dec 2017.

Kewan, tariq zuheir *et al.* Alkaline phosphatase serum level at time of diagnosis is a prognostic marker in patients with hodgkin lymphoma. **Blood** , v. 130, n. 1. 5187 p, dec 2017.

Kramer, elizabeth I *et al.* Subacute tgfb β exposure drives airway hyperresponsiveness in cystic fibrosis mice through the pi3k pathway. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 62, n. 5, p. 657-667, may 2020.

Lai, karen *et al.* Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 1. 21–2 p, jan 2003.

Lasky, joseph; wu, hong. Notch signaling, brain development, and human disease. **Pediatric research**, v. 57. 104–109 p, may 2005.

Limdi, j k; hyde, g m. Evaluation of abnormal liver function tests. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 932. 307–312 p, 2003.

Liu, aizhen *et al.* Genetics and epigenetics of glioblastoma: applications and overall incidence of idh1 mutation. **Frontiers in oncology**, v. 6, n. 16, jan 2016.

Liu, kaisheng *et al.* Cftr interacts with hsp90 and regulates the phosphorylation of akt and erk1/2 in colorectal cancer cells. **Febs open bio**, v. 9, n. 6, p. 1119- 1127, jun 2019.

Liu, y; euler, gabriel von. Na⁺, k⁺ and ca²⁺ antagonize the glutamate- and glycine-induced decrease of [3h]mk-801 binding observed in the presence of mg²⁺ at low ph. **Neurochemistry international**, v. 34, p. 291-301, 1999.

Lombardi, giuseppe *et al.* Hypertension as a biomarker in patients with recurrent glioblastoma treated with antiangiogenic drugs: a single-center experience and a critical review of the literature. **Anticancer drugs**, v. 24, n. 1, p. 90-7, jan 2013.

Maccarrone, m.; finazzi-agro, a. The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. **Cell death & differentiation**, v. 10, n. 9, p. 946-955, 2003.

Machado, angelo b. M.. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. São paulo: atheneueditora, 2007. 363 p.

Maia, luana pereira *et al.* Trombose de seio cavernoso e aneurisma micótico como complicações de rinossinusite aguda. **Arq asma alerg imunol**, v. 2, n. 2, p. 290- 294, abril-junho 2018.

Metwally, islam h. Et al. Evaluation of serum alkaline phosphatase as a marker of metastasis in early breast cancer. **Revista de senología y patología mamaria**, v. 33, n. 2, p. 45-49, 2020.

Meusel, liesel-ann c *et al.* Cardiovascular risk and encoding-related hippocampal connectivity in older adults. **Bmc neuroscience**, v. 20, n. 1. 37 p, 31.jul 2019.

Mlcochova, petra *et al.* Tlr4-mediated pathway triggers interferon- independenttg0 arrest and antiviral samhd1 activity in macrophages. **Cell reports**, v. 30, n.12, p. 3972-3980.e5, mar 2020.

Moraes, v m de; holanda, k r de; cavalheiro, v m de. Relação anatômica entre a arquitetura interna e as zonas de segurança externas do tronco encefálico . **Jornal brasileiro de neurocirurgia**, p. 293-304, 2020.

Moriconi s. Papel da interação parácrina entre astrócitos e pinealócitos na mediação do efeito potencializador da angiotensina ii sobre a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica na glândula pineal de ratos. 2008

Newton, jonathan ray ; ah-see, kim wong. A review of nasal polyposis. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 4, n. 2, p. 507 - 512, apr 2008.

Okun, d b ; tanaka, k r. Leukocyte alkaline phosphatase. **Am j hematol**, v. 4, n.3, p. 293-9, 1978.

Onyike, chiadi u *et al.* Demência com esclerose hipocampal: variante amnésica dadegeneração frontotemporal. **Dementia & neuropsychologia**, v. 7, n. 1. 83 to 87 p,jan/fev/mar 2013.

Orimo, hideo. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. **Journal of nippon medical school**, v. 77, n. 1, p. 4-12, 2010.

Osawa, tsuyoshi, Shimamura Teppei, Kioko Sayto, Hasegawa Yoko, Naoko Ishii, Myuki Nishi Phosphoethanolamine accumulation protects cancer cells under glutamine starvation through downregulation of pcyt2. **Cell reports**, v. 29, n. 1, p. 89-103. E7, 2019.

Ostrom , quinn t *et al.* Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. **Neuro-oncology**, v. 21, n. 11. 1357–1375 p, nov 2019.

Palmiero, helbert de oliveira manduca . **Avaliação anatômica, qualitativa equantitativa das variantes do acesso infratentorial supracerebelar para o**

tálamo pósteroinferior. São paulo, 2020 tese (doutorado em neurologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de SãoPaulo, São Paulo, 2020.

Parmar , hemant *et al.* Restricted diffusion in isolated superior ophthalmic vein thrombosis. **Journal of neuro-ophthalmology**, v. 29, n. 1, p. 16-20, mar 2009.

Pdq, adult treatment editorial board. **Paranasal sinus and nasal cavity cancer treatment (adult) (pdq®) patient version**: in: pdq cancer information summaries [internet]. **National institute cancer (us)**. Bethesda (md), 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk66003/>. Acesso em: 31 out. 2021.

Perrin, sally l *et al.* Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. **Biochemical society transactions** , v. 47, n. 2, p. 625- 638, apr 2019.

Preston-martin , s *et al.* N-nitroso compounds and childhood brain tumors: a case- control study. **Cancer research**, v. 42, n. 12, p. 5240 - 5245, dec 1982.

Pääkkönen, markus *et al.* Repeated serum alkaline phosphatase measurements in the treatment of childhood acute bone and joint infections with high doses of antibiotics. **Ann lab med**, v. 33, n. 5. 375–378 p, sep 2013.

Paquette, mathieu; el-houjeiri, leeanna; pause, arnim. Mtor pathways in cancer and autophagy. **Cancers**, v. 10, n. 1, p. 18, 2018.

Rabanal-ruiz, yoana; otten, elsje g.; korolchuk, viktor i. Mtorc1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry*, v. 61, n. 6, p. 565-584, 2017. Rader, bethany a . Alkaline phosphatase, an unconventional immune protein. **Front. Immunol**, v. 3, n. 8. 897 p, aug 2017.

Ramacciotti, mirela . **Nossa neuroanatomia funcional**. 2017. Disponível em: <http://neuromi.com.br/wp-content/uploads/2017/03/nossa-neuroanatomia-funcional.pdf>. Acesso em: 31 out. 2021.

Ramaswamy, palaniswamy *et al.* Activation of nmda receptor of glutamate influences mmp-2 activity and proliferation of glioma cells. **Neurological sciences**, v. 35, n. 6, p. 823-9, jun 2014.

Rico, laura g *et al.* Is alkaline phosphatase the smoking gun for highly refractory primitive leukemic cells?. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 72057-72066, nov 2016.

Rockenfeller, patrick *et al.* Ethanolamine: a novel anti-aging agent. **Molecular & cellular oncology**, v. 3, n. 1, p. E1019023, 2016.

Rockenfeller, patrick *et al.* Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. **Cell death & differentiation**, v. 22, n. 3, p. 499-508, 2015.

Rocha, marco antonio. **Neuroanatomia**. Thieme revinter publicações ltda, v. 3, 2019.

Rong, yuan *et al.* 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. **Jneuropathol exp neurol**, v. 65, n. 6, p. 529-39, jun 2006.

Rotermund, carola ; machetanz, gerrit ; fitzgerald, julia c. . The Therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases. **Front. Endocrinol**, v. 9. 400 p, jul 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00400>. Acesso em: 6 abr. 2022.

Sakthikumar, sharadha *et al.* Whole-genome sequencing of glioblastoma reveals enrichment of non-coding constraint mutations in known and novel genes. **Genome biology**, v. 21, n. 127, p. 1-22, 2020.

Salles, jean pierre. Hypophosphatasia: biological and clinical aspects, avenues for therapy. **Clin biochem rev**, v. 41, n. 1, p. 13-27, 2020.

Saslowsky, david e *et al.* Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 30, p. 26966-70, jul 2002.

Scarano, wellerson rodrigo. **Desenvolvimento do sistema nervoso central**. 2014. 53 slides. Disponível em: <https://www1.ibb.unesp.br/home/departamentos/morfologia/snc-ld.pdf>. Acesso em: 31 out. 2021.

Schnepf, patricia m *et al.* Gad1 upregulation programs aggressive features of cancer cell metabolism in the brain metastatic microenvironment. **Cancer res**, v. 77, n. 11, p. 2844-2856, jun 2017.

Schmid, patricia c. Et al. Anandamide and other n-acyl ethanolamines in human tumors. **Lipids**, v. 37, n. 9, p. 907-912, 2002.

Seetharam, s *et al.* The mechanism of elevated alkaline phosphatase activity after bile duct ligation in the rat. **Hepatology** , v. 6, n. 3, p. 374-80, may-jun 1986.

Sharma, neha *et al.* Stauffer syndrome: a comprehensive review of the icteric variant of the syndrome. **Cureus**, v. 11, n. 10. E6032 p, oct 2019.

Sharma, ujjawal; pal, deeksha ; prasad, rajendra . Alkaline phosphatase: an overview. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 29, n. 3. 269–278 p, jul 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>. Acesso em: 6 abr. 2022.

Shinya, h ; wolff, w i. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. **Annals of surgery**, v. 190, n. 6, p. 679 -683, 1979.

Siddique, asma ; kowdley, kris v. Approach to a patient with elevated serum alkaline phosphatase. **Clinics in liver disease** , v. 16, n. 2. 199–229 p, may 2012.

Sieben , anne *et al.* Hippocampal sclerosis in frontotemporal dementia: when vascular pathology meets neurodegeneration. **Journal of neuropathology & experimental neurology**, v. 80, n. 80. 313–324 p, apr 2021.

Soler, zachary m. *Et al.* Chronic rhinosinusitis, race, and ethnicity. **American journal of rhinology & allergy**, v. 26, n. 2. 110–116 p, mar-apr 2012.

Stokol, tracy *et al.* Alkaline phosphatase is a useful cytochemical marker for the diagnosis of acute myelomonocytic and monocytic leukemia in the dog. **Vet clin pathol**, v. 44, n. 1, p. 79-93, mar 2015.

Takada, silvia honda . **Morte neural e neurogênese no hipocampo de ratos após anóxia neonatal**. 2013 tese (doutorado em ciências morfofuncionais - instituto de ciências biomédicas) - universidade de são paulo, são paulo, 2013.

Tanrikulu, bahattin ; özek, m. Memet . Clinical presentation and assessment for brainstem tumors. *In*: jallo, george ; noureldine, mohammad hassan a; shimony, nir . **Brainstem tumors: diagnosis and management**. Springer, v. 1, 2020. 400 p, p. 95-108.

The american cancer society. **Nasal cavity and paranasal sinus cancer causes, risk factors, and prevention**. American cancer society . 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/crc/pdf/public/8749.00.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2022.

Tong, jiao jian *et al.* Diabetes mellitus and risk of brain tumors: a meta-analysis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 4, n. 5. 877–882 p, nov 2012.

Tomar manendra , kumar ashok , srivastava chhitij , shrivastava ashutosh. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. **Biochimica et biophysica acta (bba) - reviews on cancer**, vol .2, 2021.

Tsai, I c *et al.* Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer mcf-7 cells. **Eur j biochem**, v. 267, n. 5, p. 1330-9, mar 2000.

Tsujioka hiroshi. Utilization of ethanolamine phosphate phospholyase as a unique astrocytic marker. **Front cell neuroscience**. Vol 17, 2023. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1097512>

Uchiyama, keiji *et al.* Ethanolamine is a new anti-prion compound. **International Journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11742, 2021

Uchôa, roseanne da cunha. **Caminhos da anatomia**. João pessoa: instituto medeiros de educação avançada, f. 299, 2020. Disponível em: <https://docplayer.com.br/200422345-roseanne-da-cunha-uchoa-caminhos-da-anatomia-imea-joao-pessoa-pb-2020.html>. Acesso em: 31 out. 2021.

Utida, hélio *et al.* **Trombose séptica de seios cavernosos, transverso e sigmóide e de veia jugular, associada à meningite, secundária a furúnculo nasal: relato de caso**. Arquivosbrasileiros de oftalmologia [online]. 2002, p. 359- 362. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0004-27492002000300015>. Acesso em: 31 out. 2021.

Vecht, charles j ; kerkhof, melissa; duran-pena, alberto . Seizure prognosis in brain tumors: new insights and evidence-based management. **Oncologist**, v. 19, n. 7, p. 751-759, jul 2014.

Walcher, lia *et al.* Cancer stem cells—origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. **Frontiers in immunology** , v. 11. 1280 p, aug 2020.

Wang, ke et al. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 899, 2013.

Wang, wei *et al.* Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization. **Molecular and cellular biology** , v. 25, n. 1, p. 312-323, 2005.

Wanson, mark w. Neuroanatomy of the cavernous sinus and clinical correlations. **Optometry and vision science**, v. 67, n. 12, p. 891-897, dec 1990.

Weiss, samuel b.; kennedy, eugene p.; kiyasu, john y. The enzymatic synthesis of triglycerides. **Journal of biological chemistry**, v. 235, n. 1, p. 40-44, 1960.

Wippold , f j 2nd *et al.* Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades. **Ajnr. American journal of neuroradiology**, v. 27, n. 10. 2037–2041 p, nov 2006.

Worman, h j *et al.* Relationship between lipid fluidity and water permeability of bovine tracheal epithelial cell apical membranes. **Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1549-55, apr 1986.

Yan, hai *et al.* Idh1 and idh2 mutations in gliomas. **New england journal of medicine** , v. 360, p. 765-773, february 2009.

Younossi, zobair m *et al.* Diagnosis and management of primary biliary cholangitis: am j gastroenterol . **Am j gastroenterol** , v. 114, n. 1, p. 48-63, jan 2019.

Zhang, chao *et al.* Exosomes, the message transporters in vascular calcification. **journal of cellular and molecular medicine** , v. 22, n. 9. 4024–4033 p, sep 2018.

Zhao, mingyue *et al.* Cftr promotes malignant glioma development via up- regulation of akt/bcl2-mediated anti-apoptosis pathway. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 13, p. 7301-7312, jul 2020.

Zheng, hongwu *et al.* P53 and pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. **Nature** , v. 455, n. 7216, p. 1129-33, oct 2008.

Zhou, h *et al.* Novel action of retinoic acid. Stabilization of newly synthesized alkaline phosphatase transcripts. **J biol chem**, v. 269, n. 35, p. 22433-9, sep 1994.