

HENRIQUE HAYES HESSE

**Síntese e caracterização do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e
análogos: avaliação do potencial antitumoral em células
tumorais de mama triplo-negativo**

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

**São Paulo
2023**

HENRIQUE HAYES HESSE

**Síntese e caracterização do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e
análogos: avaliação do potencial antitumoral em células
tumorais de mama triplo-negativo**

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
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Hesse, Henrique Hayes

Síntese e caracterização do 2-aminoetil
dihidrogeno fosfato e análogos : avaliação do
potencial antitumoral em células tumorais de mama
triplo negativo / Henrique Hayes Hesse. -- São
Paulo, 2023.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Organofosfatos 2.Neplasias de
mama triplo negativo 3.Fosfolipídios
4.Antineoplásicos

USP/FM/DBD-018/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico esse trabalho,
aos meus pais Luiz e Carmen Hesse,
que sempre me apoiaram
e me ensinaram a superar meus desafios
e a nunca desistir dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luiz H. F. Hesse e Carmen M. W. Hesse, por sempre me apoiarem. Principalmente na minha carreira acadêmica. Que sempre estiveram ao meu lado, e que nunca me deixaram desistir dos meus sonhos.

Agradeço ao meu marido Matthew D. J. Hayes, por toda a paciência nessa jornada e pelo apoio e incentivo.

Agradeço meus amigos e colegas, Daniel A. Reis, Cristiano Almudi, Gizele Celante, Beatriz Cugnasca, Marcos, Lais, Monique, Thais, Daniel Rabelo, Rosely, Sérgio, Rosa, Dona Rosa e a todos aqueles que fizeram parte da minha vida.

Agradeço o Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, orientador e amigo. Sempre presente, apoiando e ensinando. Também me lembrando o porquê fazemos ciência e pesquisa.

Ao prof. Dr. Alcindo dos Santos, sem o qual esse projeto não seria o mesmo, pelos ensinamentos e reconhecimentos. E também por me acolher em seu grupo de pesquisa.

Agradeço a todos os que fazem parte da minha vida, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos do laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan pelo apoio.

A Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2017/26355-0).

*“The word “autism” still conveys a fixed
and dreadful meaning to most people
—they visualize a child mute, rocking,
screaming, inaccessible,
cut off from human contact.
And we almost always speak of autistic children,
never of autistic adults,
as if such children never grew up,
or were somehow mysteriously
spirited off the planet, out of society.”*

(Temple Grandin)

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. 2-aminoetil dihidrogeno fosfato ou fosfoetanolamina	26
1.2. Fosfolipídios antitumorais.....	27
1.3. Mecanismo de ação dos Fosfolipídios Antitumorais	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. Síntese do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH ₂ F).....	35
3.2. Síntese da N-(2-hidroxiethyl) Benzamida (N-2-HEB).....	35
3.3. Síntese do 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato (2-BEH ₂ F).....	36
3.4. Síntese de diésteres de fósforo: 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)	36
3.5. Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹ H e ¹³ C	38
3.6. Cultura Celular	38
3.7. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT	39
3.8. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por Citometria de Fluxo	40
3.9. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo	40
3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo.....	41
3.11. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser.....	41
3.11.1. Marcação das mitocôndrias com o MitoRed.....	41
3.11.2. Marcação do nuclear e de material genético com o DAPI.....	42
3.12. Análises Estatísticas	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1. Síntese do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato	44

4.2.	Síntese da <i>N</i> -(2-hidroxietil) Benzamida.....	49
4.3.	Síntese do 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato (2-BEH ₂ F).....	52
4.4.	Síntese de diésteres de fósforo: 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)	56
4.5.	Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT	64
4.6.	Análise das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo	87
4.7.	Avaliação da expressão de marcadores celulares envolvidas na morte celular das células tumorais humanas MDA-MB-231 por citometria de Fluxo	96
4.8.	Avaliação da expressão de marcadores celulares envolvidas na morte celular nas células tumorais murinas 4T1 por citometria de Fluxo.....	100
4.9.	Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo	108
4.10.	Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser em células normais fibroblastos humanos FN-1.	113
5.	CONCLUSÃO	120
6.	REFERÊNCIAS	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura 2-AEH₂F na sua forma zwitteriônica.

p. 27

Figura 2. Esquema reacional genérico para obtenção dos diésteres de fósforo e condições envolvidas.

p. 37

Figura 3. Espectro de RMN ¹H 300 MHz do 2-AEH₂F em D₂O/HOD (δ 4.79 ppm).

p. 44

Figura 4. Espectro de RMN ¹H 300MHz em D₂O/HOD (δ 4.79 ppm) da mistura de 2-AEH₂F e etanolamina.

p. 46

Figura 5. Espectros de RMN ¹H da amostra do composto 2-AEH₂F onde: (a) espectro da amostra bruta cristalizada, (b) resultado de uma recristalização e (c) resultado da segunda recristalização. O espectro (c) mostra resquícios mínimos de etanolamina.

p. 47

Figura 6. Comparação entre espectros de RMN ¹H: (a) 2-AEH₂F padrão sigma-aldrich e (b) amostra obtida e purificada.

p. 48

Figura 7. Reações de esterificação do fósforo: (a) representação da reação simplificada de fosforilação. (b) mecanismo de reação proposto para a formação do mono-álquil fosfato.

p. 49

Figura 8. Reação de simplificada de Schotten-Baumann entre cloreto de benzoíla e 2-aminoetanol.

p. 49

Figura 9. RMN ¹H 300 MHz em D₂O/HOD (δ 4,79 ppm) do produto N-2-HEB isolado.

p. 51

Figura 10. RMN ¹³C 125 MHz em D₂O/HOD do produto N-2-HEB isolado.

p. 52

Figura 11. Espectro de RMN ¹H 300MHz em D₂O/HOD (δ 4,79 ppm) do produto obtido (2-benzamidoetil fosfato de sódio).

p. 54

Figura 12. Espectro de RMN ¹³C 125MHz em D₂O/HOD do produto obtido (2-benzamidoetil fosfato de sódio).

p. 55

Figura 13. Mecanismo proposto para formação dos diésteres de fósforo, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. O qual a) representa a adição dos álcoois, b) mostra a adição do 2-aminoetanol e a formação do ciclo PNO, c) elucida a abertura do ciclo PNO e os produtos desejados na forma de sal e d) os substituintes utilizados (R-OH).

p. 58

Figura 14. RMN ¹H 300 MHz do composto 2-AE(C12)HF em CDCl₃ (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e D₂O/HOD (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

p. 59

Figura 15. RMN ¹H 300 MHz do composto 2-AE(C16)HF em CDCl₃ (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e D₂O/HOD (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

p. 60

Figura 16. RMN ^1H 300 MHz do composto 2-AE(C18)HF em CDCl_3 (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

p. 61

Figura 17. RMN ^{13}C 125 MHz do composto 2-AE(C12)HF em CDCl_3 (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ com proporção de 10:6:1.

p. 62

Figura 18. RMN ^{13}C 125 MHz do composto 2-AE(C16)HF em CDCl_3 (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ com proporção de 10:6:1.

p. 63

Figura 19. RMN ^{13}C 125 MHz do composto 2-AE(C18)HF em CDCl_3 (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ com proporção de 10:6:1.

p. 64

Figura 20. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de 2-AEH₂F e N-2-HEB, pelo período de 24 e 48 horas. (a) Média da viabilidade de células FN-1, L929, MDA-MB-231 e 4T1 após tratamento com o composto 2-AEH₂F. (b) Média da viabilidade de células FN-1, L929, MDA-MB-231 e 4T1 após tratamento com o composto N-2-HEB.

p. 68

Figura 21. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais de fibroblastos humanos FN-1 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 70

Figura 22. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos humanos FN-1 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 71

Figura 23. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos murinos L929 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 72

Figura 24. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos murinos L929 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 73

Figura 25. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 231 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 75

Figura 26. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 231 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 76

Figura 27. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1 tratadas com 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 77

Figura 28. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 78

Figura 29. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto 2-BEH₂F, pelo período de 24 e 48h.

p. 79

Figura 30. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-BEH₂F em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 80

Figura 31. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos 2-AE(C12)HF e 2-AE(C16)HF, pelo período de 24 e 48h. (a) Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1 após tratamento com o composto 2-AE(C12)HF. (b) Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1 após tratamento com o composto 2-AE(C16)HF.

p. 81

Figura 32. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C12)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 82

Figura 33. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C16)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 83

Figura 34. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto 2-AE(C18)HF, pelo período de 24 e 48h. Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1.

p. 84

Figura 35. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C18)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

p. 85

Figura 36. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos humanos FN-1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas obtidos em citômetro de fluxo representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo

p. 88

Figura 37. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos humanos FN-1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} com os compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF

e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores de p significativos * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo

p. 89

Figura 38. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos murinos L929. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo

p. 90

Figura 39. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos murinos L929. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos por citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 91

Figura 40. Análise das fases do ciclo celular nas células de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer sendo considerados valores significativos p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 92

Figura 41. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 93

Figura 42. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 94

Figura 43. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média ± DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 95

Figura 44. Modulação da expressão dos marcadores p53, Bcl-2, citocromo-c e Bad, para linhagem tumoral MDA-MB-231 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 97

Figura 45. Modulação da expressão dos marcadores caspase 3, caspase 8 e TRAIL-DR4, para linhagem tumoral MDA-MB-231 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 98

Figura 46. Modulação da expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2, uPAR e TGF-β para linhagem tumoral MDA-MB-231 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 99

Figura 47. Modulação da expressão dos marcadores p53, Bcl-2, citocromo-c e Bad, para linhagem tumoral 4T1 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 102

Figura 48. Modulação da expressão dos marcadores caspase 3, caspase 8 e TRAIL-DR4, para linhagem tumoral 4T1 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 102

Figura 49. Modulação da expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2, uPAR e TGF-β para linhagem tumoral 4T1 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de p= * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ****p <0,0001. ns= não significativo.

p. 103

Figura 50. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células normais fibroblastos humanos FN-1 e murinos L929 obtido por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF nos valores de IC_{50%} por um período de 24h. **(a)** $\Delta\Psi_m$ das células normais fibroblastos humanos FN-1 e **(b)** $\Delta\Psi_m$ das células normais fibroblastosmurinos L929. Gráfico de barras das médias e ±DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas de Variância ANOVA e seguido pelo teste Tukey-Kramer. Foram

considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$. Ns= não significativo.

p. 109

Figura 51. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e células de adenocarcinoma de mama murino 4T1 obtido por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF nos valores de IC_{50%} por um período de 24h. **(a)** $\Delta\Psi_m$ das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e **(b)** $\Delta\Psi_m$ das células de adenocarcinoma de mama murino 4T1. Gráfico de barras das médias e \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas de Variância ANOVA e seguido pelo teste Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$. Ns= não significativo.

p. 110

Figura 52. Fotomicrografias representativas das células normais de fibroblastos humanos FN-1 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul- DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células normais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH 2 F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC_{50%} por um período de 24h. Aumento barra de 20um.

p. 114

Figura 53. Fotomicrografias representativas das células normais de fibroblastos murinos L929 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul- DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células normais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH 2 F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC_{50%} por um período de 24h. Aumento barra de 20um.

p. 115

Figura 54. Fotomicrografias representativas das células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul-DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH 2 F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC_{50%} por um período de 24h. Aumento barra de 20um.

p. 117

Figura 55. Fotomicrografias representativas das células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo-negativo murino 4T1 por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul - DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC_{50%} por um período de 24 horas. Aumento barra de 20um.

p. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados para a reação de formação dos diésteres de fósforo.

p. 38

Tabela 2. Valores de IC_{50%} para células de fibroblasto humano normal FN-1, células de fibroblasto murino L929, células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231 e células tumorais de adenocarcinoma de mama murino triplo negativo 4T1, tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-BEH₂F, nos períodos de 24 e 48 horas.

p. 86

Tabela 3. Dados da distribuição das porcentagens médias e SD das populações celulares normais e tumorais tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF.

p. 96

Tabela 4. Descrição resumida da expressão dos marcadores de membrana celular, nucleares e citoplasmáticos em células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo negativo humana MDA-MB-231, após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF obtidos por citometria de fluxo.

p. 100

Tabela 5. Descrição resumida da expressão dos marcadores de membrana celular, nucleares e citoplasmáticos em células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo negativo murina 4T1, após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF obtidos por citometria de fluxo.

p. 104

RESUMO



Hesse HH. *Síntese e caracterização do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e análogos: avaliação do potencial antitumoral em células tumorais de mama triplo-negativo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) é um monofosfoéster de cadeia curta. Quimicamente o 2-AEH₂F é zwitterion, eletricamente neutro, porém possui cargas opostas em diferentes átomos. Neste estudo, foi sintetizado utilizando o 2-aminoetanol e ácido fosfórico. O 2-AEH₂F tem efeitos no *turnover* de fosfolipídios da membrana celular e apresenta efeitos antiproliferativos em uma variedade de linhagens de células tumorais. Desta forma, foram sintetizados 5 compostos análogos, o *N*-(2-hidroxietil)benzamida (N-2-HEB), o 2-bezamidoetil dihidrogeno fosfato (2-BEH₂F), o 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), o 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e o 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF), sendo os últimos três diésteres de fósforo. Todos os compostos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. As caracterizações foram capazes de determinar as estruturas devido aos acoplamentos heteronucleares do núcleo de fósforo com núcleos de hidrogênio e carbono. Para todos os compostos sintetizados, foram avaliados os efeitos de citotoxicidade e obtidas as concentrações inibitórias (IC_{50%}). Modificações no ciclo celular, expressão de marcadores envolvidos na morte celular e o potencial elétrico da membrana mitocondrial foram avaliadas por citometria de fluxo. As alterações morfológicas proveniente do processo de morte celular programada, apoptose, foram avaliadas com o uso do marcador MitoRed para marcação das mitocôndrias e o DAPI para DNA e núcleo celular. Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF foram os que apresentaram efeitos citotóxicos específicos para a linhagem tumoral de mama triplo negativo humano (MDA-MB-231) e murino (4T1). O 2-AEH₂F e o N-2-HEB modularam o ciclo celular da célula tumoral MDA-MB-231 ocasionando a parada na fase G2/M, o 2-AE(C18)HF não mostrou mudanças significativas no ciclo celular. Para a linhagem 4T1 o 2-AEH₂F promoveu a parada na fase G2/M, os demais compostos não causaram nenhuma alteração no ciclo desta linhagem. A expressão dos marcadores envolvidos na morte celular das células tumorais MDA-MB-231 foram modificadas pelos três compostos estudados. Estes promoveram o aumento na expressão dos marcadores de caspases 3 e 8 ativas, p53, liberação do citocromo c e Bad. O 2-AEH₂F e N-2-HEB causaram uma redução na expressão de Bcl-2, contrário do 2-AE(C18)HF. O marcador Trail-DR4 teve sua expressão aumentada pelos compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB e não houve alteração para o 2-AE(C18)HF. Esses dados sugerem a ativação das vias intrínsecas e extrínsecas de morte celular, uma vez que aumentam a fosforilação de proteínas de morte via mitocondrial. A expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2 e

uPAR apresentaram modulações após o tratamento das células tumorais humanas MDA-MB-231 com os compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB o que pode sugerir o efeito na inibição da angiogênese e invasão tumoral. Com exceção do marcador VEGF-R2, envolvido principalmente na linfogênese, o composto 2-AEH₂F não alterou sua expressão. O receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase μ PAR teve uma diminuição quando expostos aos tratamentos com 2-AEH₂F e N-2-HEB. As análises de microscopia confocal a laser das células tumorais MDA-MB-231, tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF promoveram modificações importantes no arranjo e na distribuição das mitocôndrias. Houve modificações morfológicas decorrente da despolarização e reorganização nuclear para região pericelular e redução potencial elétrico. Os tratamentos com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF se mostraram efetivos na modulação dos marcadores de morte celular e assim como na especificidade citotóxica para as linhagens tumorais estudadas, quando comparadas a linhagens de células não tumorais.

Descritores: Organofosfatos; Neoplasias de mama triplo negativas; Fosfolipídios; Antineoplásicos.

ABSTRACT



Hesse HH. *Synthesis and characterization of 2-aminoethyl dihydrogen phosphate and analogues: evaluation of antitumour potential in triple-negative breast tumour cells* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

The 2-aminoethyl dihydrogen phosphate (2-AEH₂F) is a short-chain monophosphoester. Chemically, 2-AEH₂F is zwitterion, electrically neutral, but it has charges placed on different atoms. In this study, it was synthesized using 2-aminoethanol and phosphoric acid. The 2-AEH₂F has effects on the phospholipidic cell membrane turnover and exhibits antiproliferative effects on a variety of tumour cell lines. In such manner, 5 analogous compounds were synthesised, *N*-(2-hydroxyethyl)benzamide (N-2-HEB), 2-bezamidoethyl dihydrogen phosphate (2-BEH₂F), 2-aminoethyl dodecyl hydrogen phosphate (2-AE(C12) HF), 2-aminoethyl hexadecyl hydrogen phosphate (2-AE(C16)HF) and 2-aminoethyl octadecyl hydrogen phosphate (2-AE(C18)HF), the last three being phosphorus diesters. All compounds were characterized by hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance. The characterizations were able to determine the structures of the molecules due to the heteronuclear couplings of the phosphorus nucleus with hydrogen and carbon nuclei. For all synthesised compounds, the cytotoxicity effects were evaluated and the inhibitory concentrations (IC_{50%}) were acquired. Changes in the cell cycle, expression of markers involved in cell death and the electrical potential of the mitochondrial membrane were evaluated by flow cytometry. Morphological alterations resulting from the process of programmed cell death, apoptosis, were evaluated using the MitoRed marker for the mitochondria and DAPI for DNA and cell nucleus. The compounds 2-AEH₂F, N-2-HEB and 2-AE(C18)HF were the ones that showed specific cytotoxic effects for human triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) and murine (4T1). Therefore, further experiments were conducted with the compounds 2-AEH₂F, N-2-HEB and 2-AE(C18)HF. 2-AEH₂F and N-2-HEB modulated the cell cycle of the MDA-MB-231 tumour cell line, causing the arrest in the G₂/M phase however 2-AE(C18)HF did not show significant changes in the cell cycle. For the 4T1 cell line, 2-AEH₂F promoted the arrest in the G₂/M phase, the other compounds did not cause any change in the cycle of this cell line. The expression of markers involved in cell death of MDA-MB-231 tumour cells were modified by the three studied compounds. These compounds promoted an increase in the expression of active caspase 3 and 8 markers, p53, cytochrome c release and Bad. 2-AEH₂F and N-2-HEB caused a reduction in Bcl-2 expression, contrary to 2-AE(C18)HF. The Trail-DR4 marker had its expression increased by the compounds 2-AEH₂F and N-2-HEB and there was no alteration for 2-AE(C18)HF. These data suggest the activation of intrinsic and extrinsic pathways of cell death, as they increase the phosphorylation of proteins involved in mitochondrial cell death. The expression of VEGF-R1, VEGF-R2 and uPAR markers showed modulations after

the treatment of human tumour cells MDA-MB-231 with the compounds 2-AEH₂F and N-2-HEB, which may suggest the effect on the inhibition of angiogenesis and tumour invasion. With the exception of the VEGF-R2 marker, mainly involved in lymphangiogenesis, the compound 2-AEH₂F did not alter its expression. The urokinase-type plasminogen μ PAR had a reduction in its expression when exposed to treatments with 2-AEH₂F and N-2-HEB. The confocal laser microscopy analyses of MDA-MB-231 tumour cells, treated with the compounds 2-AEH₂F, N-2-HEB and 2-AE(C18)HF promoted important changes in the arrangement and distribution of mitochondria. There were morphological changes due to depolarization and nuclear reorganization to the pericellular region and reduced electrical potential. The treatments with the compounds 2-AEH₂F, N-2-HEB and 2-AE(C18)HF were effective, modulating cell death markers and as well as in the cytotoxic specificity for the studied tumour cell lines, when compared to non-tumour cell lines.

Descriptors: Organophosphates; Triple negative breast neoplasms; Phospholipids; Antineoplastic agents.

1. INTRODUÇÃO

Fármacos para tratamento do câncer originalmente eram análogos de moléculas naturais e posteriormente sintetizados. Independente do tipo de molécula, o tratamento visava a interação do fármaco com o DNA e a ele causando danos irreparáveis, assim evitando a replicação de novo material genético¹. Uma das principais dificuldades no uso da quimioterapia no tratamento câncer é que o tumor geralmente se encontra em estágio avançado por ocasião do diagnóstico, muitas vezes com lesões metastáticas. Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os que são citotóxicos, afetam, em sua maioria, apenas uma das características das células tumorais, o processo de divisão celular ou do controle de sua progressão, sendo, portanto, apenas antiproliferativos^{2,3}. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, afetam em sua maioria os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos colaterais. Ressalta-se ainda que os próprios agentes antineoplásicos podem também, em certas circunstâncias, serem carcinogênicos^{4,5}.

Atualmente, há diversas metodologias consolidadas para a síntese de moléculas bioativas. As técnicas auxiliam o aumento da probabilidade de um composto desenvolver atividades biológicas desejadas. Avanços das tecnologias nas áreas da bioquímica, biologia molecular, química computacional, auxiliam na simulação de alguns grupos de compostos e seu comportamento biológico. Novas moléculas com bioatividade geralmente são derivações de substâncias naturais, as quais são alteradas e testadas *in vitro* e *in vivo* para a comprovação de seus efeitos⁶. Assim o design molecular e a biomimética são fortemente aliados a química de produtos naturais para criação de novos fármacos com amparo de artifícios como o desenho racional e *high throughput screening*⁷.

Desta forma, a síntese de compostos derivados de fosfolípidios conhecidos pelas suas ações antitumorais torna-se relevante. Tais compostos podem ter suas ações potencializadas pelo aumento da biodisponibilidade, melhor conformação molecular e estrutural, grupos químicos com maior

interação biológica, ou por terem uma melhor interação metabólica e agindo como agonistas ou antagonistas de receptores específicos⁸⁻¹⁰.

1.1. 2-aminoetil dihidrogeno fosfato ou fosfoetanolamina

A importância bioquímica de ésteres fosfóricos em tecidos normais foi assunto no encontro Annual Reviews of Biochemistry, que ocorreu em 1935 na Alemanha. Outhouse, E. T., chamou atenção em especial para a presença dos ésteres fosfóricos em tumores malignos. Ele relatou a presença de um éster fosfórico chamado de 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) ou fosfoetanolamina, encontrado em abundância em tecidos malignos tumorais. Em continuidade ao seu estudo, a próxima questão levantada por ele foi se os 2-AEH₂F estão predominantes em tumores malignos ou também eram peculiares em tecidos normais¹¹.

O 2-AEH₂F endógeno é sintetizado por duas rotas biológicas, a primeira corresponde à via clássica de Kennedy utilizando colina e a etanolamina quinase, que são amplamente presentes em eucariotos. Estas enzimas catalisam o passo da via Kennedy, que é a fosforilação ATP-dependente na etanolamina ou colina, formando fosfoetanolamina e ou fosfocolina. A formação do 2-AEH₂F pode ocorrer por um processo enzimático e não clássico, utilizando como substrato a esfingosina-1-fosfato (S1P) e com a ação da S1P lyase, leva a formação do produto final 2-AEH₂F e o hexadecanol⁸. Os estudos com alquilfosfolípidos antitumorais têm mostrado que a longa cadeia alquila e a molécula de fosfocolina pode ser suficiente para os efeitos antineoplásicos. Apesar do 2-AEH₂F, do ponto de vista químico, ser considerada uma estrutura simples comparada aos análogos Lisofosfatidilcolina, nosso grupo de pesquisa demonstrou que ela é capaz de exercer atividade apoptótica em tumores malignos¹².

Em 1937, Outhouse, E. T., publicou o que seria a base para o início dos estudos de metabolismo de tumores ao descrever que o 2-AEH₂F era peculiarmente encontrado em tumores malignos, sendo inexpressiva sua presença em tecidos normais como fígado, pâncreas e placenta de embrião.

Além, de mostrar que os ésteres são encontrados em grandes quantidades em tumores malignos, ele também descreveu sua rota de síntese¹³.

Com base nos estudos realizados por Outhouse, a fosfoetanolamina, se tornou uma molécula de interesse e com isso a necessidade de ser estudada. A molécula corresponde a uma estrutura simples formada por uma região de cabeça polar de fosfato, seguido de uma cadeia etílica e uma amina terminal.

Algumas moléculas multifuncionais possuem grupos que podem receber ou doar prótons, assim como, há grupos anfóteros que podem desempenhar ambas as funções. Quando uma molécula tem grupos capazes de receber e doar prótons, há chances da formação de um zwitteríon. Um zwitteríon é uma molécula que tem grupos positivamente e negativamente carregados em sua estrutura, mas mantém uma carga neutra. Estruturas zwitteriônicas existem mais comumente em sistemas biológicos como amino ácidos e peptídeos¹⁴. Desta forma, o 2-AEH₂F é uma molécula zwitteriônica, que possui uma amina terminal em sua estrutura que é capaz de receber prótons e ficar carregada positivamente, e o grupo fosfato presente é capaz de doar até dois prótons (Figura 1).

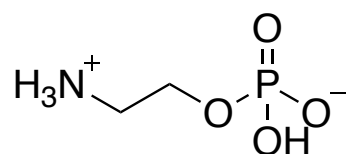


Figura 1. Estrutura 2-AEH₂F na sua forma zwitteriônica.

Experimentos realizados por Pakkanen et al., 2013, demonstram que o 2-AEH₂F realmente é um zwitteríon neutro em sua forma sólida e em solução aquosa/meio biológico em um intervalo de pH de 1 a 5, e a carga zwitteriônica máxima é encontrada em pH 2. Em pH neutro o 2-AEH₂F ainda se encontra na forma de zwitteríon, quando o pH é elevado o grupo fosfato se mantém carregado (pK_a) e a amina desprotonada (pK_b)¹⁴.

1.2. Fosfolipídios antitumorais

Membranas biológicas são compostas basicamente por três componentes fundamentais: os fosfolipídios (FLs), o colesterol e as proteínas. De maneira geral os fosfolipídios de membrana são estruturas formadas por cadeias

hidrofóbicas no interior da bicamada lipídica e com cabeça polar situada no espaço citoplásmico aquoso. Os FLs de membrana podem formar ligações não covalentes com proteínas periféricas de membrana, muitas vezes por atrações eletrostáticas, estabelecendo o modelo conhecido de mosaico fluído. Exercem diversas funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma ampla variedade de processos catalíticos e atuando como doadores para a síntese de macromoléculas. Além de ativamente influenciar na comunicação entre o meio intra e extracelular pela transdução de sinal celular e a interação lipídeo/proteína¹⁵.

Os FLs participam de processos que influenciam as propriedades das proteínas associadas à membrana e servem como precursores de importantes segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. Há evidências de que a distribuição de diferentes FLs na bicamada membrana não é aleatória, e que as consequências físicas da sua redistribuição podem ser importantes na estrutura e na sinalização celular. Com base nesta abordagem, um grupo de pesquisadores no final da década de 1960, Eibl, Arnold, Weltzien e Westphal em busca de novas moléculas imunomoduladoras, proveniente dos FLs, identificaram o primeiro análogo metabolicamente estável da Lisofosfatidilcolina (LisoFC)¹⁶.

Desde então, a utilização dos lisofosfolipídios (LSs) como fonte de novos compostos bioativos tem sido baseada na conhecida atividade biológica, atuando como reguladores de diversas atividades enzimáticas celulares, tais como a ativação de macrófagos peritoneais e ao aumento da resposta imunológica¹⁷. Porém, como os LSs são instáveis metabolicamente e rapidamente metabolizados na membrana celular, esforços foram realizados na tentativa de aumentar a estabilidade química destes compostos, potencializando a capacidade imunomoduladora. Modificações estruturais na LisoFC, como a substituição da ligação éster por éter na região que conecta o glicerol a cadeia de hidrocarbonetos são realizadas, tornando as estruturas análogas metabolicamente resistentes à acetiltransferases e as isofosfolipases, responsáveis pelo metabolismo dos fosfolipídios¹⁶. No decurso do desenvolvimento, Munder e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que

entre alguns destes análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquil-derivados, apresentavam efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais^{18,19}. Atualmente, estes éteres derivados da LisoFC pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade citostática. Em contraste, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os alquilfosfolípídeos antitumorais não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto celular, e sim, seus efeitos tumorais estão relacionados com a modificação do *turnover* na membrana celular²⁰.

Os lipídios antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes subtipos: O primeiro grupo é composto pelos alquil fosfolípídios, coletivamente chamados de lipídios antitumorais ou análogos alquilfosfolípídeos antitumorais (AFTs). O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina (AFC), que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formado por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (HefC; Miltefosina)^{21,22}. Dos lipídios antitumorais mais comuns estão a Edelfosina e a Mitelfosina. A Edelfosina destaca-se na prática clínica sendo eficaz no tratamento de leucemia aguda, capaz de induzir apoptose o que permitiu tornar-se o protótipo para a elaboração de novos derivados. A Miltefosina apresenta potente atividade antitumoral *in vitro*, entretanto, tem sua utilização clínica limitada à aplicação tópica e oral, devido ao alto grau de hemólise. Atualmente, tem sido utilizada na clínica para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo, sendo também amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose tropical^{23,24}.

1.3. Mecanismo de ação dos Fosfolípídios Antitumorais

O mecanismo de ação dos AFTs é direcionado a membrana celular, em especial das células tumorais. Embora seu mecanismo não esteja totalmente compreendido, é demonstrado que seus efeitos são dependentes da incorporação na membrana celular, devido a sua longa cadeia apolar de hidrocarbonetos que facilita sua inserção na membrana celular²⁵. Uma das primeiras hipóteses para explicar a seletividade dos AFTs em células tumorais é levantada com base que, as células tumorais não apresentavam a enzima alquil-

mono-glicerol oxidase, que é uma oxidase de função mista que hidrolisa o átomo do carbono α da cadeia de carbonos do grupo gliceril, envolvida no metabolismo dos glicolipídios²⁶.

Não é claro se todos os AFTs realmente compartilham os mesmos mecanismos de ação, porém, há evidências substanciais que todos atuam por algum mecanismo que envolve sua incorporação na membrana celular. Quando inseridos na membrana, os AFTs interferem com o *turnover* dos fosfolipídios, podendo alterar as propriedades físicas das membranas, além de interferir na geração de segundos mensageiros, como o ácido fosfatídico, diacilglicerol e outros. Sendo que, alterações em alguns destes sistemas metabólicos podem gerar um nível de estresse celular iniciando eventos que induzem morte celular por apoptose²⁷.

O desenvolvimento de novas drogas antitumorais com amplo espectro e ação terapêutica permanece sendo o maior obstáculo da medicina moderna no tratamento contra o câncer. Os AFTs como, Miltefosina, Edelfosina e Perifosina, são um grupo de AFTs estruturalmente semelhantes, que atuam sobre a membrana das células tumorais. Considerando que os fosfolipídios como a Edelfosina, apresentam na sua estrutura o grupo químico éster, esses formam ligações estáveis com a membrana celular bloqueando o turnover de membrana interrompendo vias de sinalização dependente de lipídios, e induzindo a morte celular²⁸.

Entretanto, o uso dos AFTs como uma classe de drogas anti-tumorais é utilizado de forma limitada devido seus efeitos colaterais graves e indesejáveis, especificamente na administração oral da Miltefosina, que induz toxicidade gastrointestinal e em particular, náuseas, anorexia, vômitos e diarreia. Devido a estes graves efeitos colaterais e a impossibilidade da administração injetável dos AFTs, tem-se buscado a síntese de novos fosfolipídios ou análogos com maior seletividade e menores efeitos adversos²⁹.

Assim, foram determinados os efeitos antitumorais e citotóxicos do 2-AEH₂F em células de fibroblasto humano normais FN-1 e no adenocarcinoma de mama humano MCF-7 e adenocarcinoma de mama murino 4T1, pelo grupo de

pesquisa utilizando o 2-AEH₂F anteriormente obtido. Os resultados demonstraram que nas concentrações em que o 2-AEH₂F induz citotoxicidade para as células tumorais, não é capaz de alterar a viabilidade das células normais. Os efeitos no ciclo celular observados neste estudo, como redução da capacidade de síntese de DNA, além de inibição da proliferação celular com redução das células em G1, estão relacionados com os efeitos apoptóticos, que reflete no aumento do pico apoptótico Sub-G1, bem como, a ativação da caspase-3. Os estudos comparativos *in vivo* entre o 2-AEH₂F e o Taxol no modelo experimental, suportam o uso do 2-AEH₂F como um novo agente no tratamento de tumores malignos, uma vez que os efeitos terapêuticos foram de redução do volume tumoral e da metastase foram superiores ao Taxol¹².

O composto que ficou conhecido como fosfoetanolamina sintética, foi utilizado para comparação com as novas rotas de síntese, o mesmo foi fornecido pelo Dr. Gilberto Orivaldo Chierice do instituto de química da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos. A síntese realizada foi descrita na patente PI0800460-9 A2, e uma investigação pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) foi encomendada para a avaliação do composto. No relatório consta análise por ressonância magnética nuclear de ¹H, onde mostra que existem três espécies, etanolamina, 2-AEH₂F e bis(2-aminoetil) hidrogeno fosfato (bis2-AEH₂F) em uma proporção de 35%, 50% e 15% respectivamente^{30,31}.

Desta forma, este projeto visou a síntese do composto 2-AEH₂F, na sua forma isolada dos demais compostos, para a avaliação da atividade antitumoral. O 2-AEH₂F foi modificado no âmbito de aumentar a capacidade antiproliferativa e antitumoral.

A avaliação das moléculas sintetizadas foi realizada em comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os resultados gerados por estudos anteriores, realizados pelo grupo de pesquisa, com linhagens de células tumorais de mama humano triplo-negativo humano MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama murino 4T1 e grupo controle de células de fibroblastos humano normais FN-1 e células de fibroblastos murino normais L929.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Neste projeto o objetivo principal foi sintetizar e caracterizar o composto 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e seus análogos, *N*-(2-hidroxietil)benzamida, 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato, 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato, 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato. Avaliar o potencial antitumoral, citotóxico e pró-apoptótico dos compostos sintetizados em células de câncer de mama triplo-negativo humano MDA-MB-231 e murino 4T1 em comparação às células não tumorais normais fibroblastos humanos FN-1 e murinos L929.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e isolar o 2-aminoetil dihidrogeno fosfato;
- Sintetizar análogos do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato: *N*-(hidroxietil)benzamida, 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato; 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato, 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato;
- Caracterizar as moléculas sintetizadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono;
- Determinar a citotoxicidade nas linhagens celulares tratadas com os compostos sintetizados;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens celulares após os tratamentos para a obtenção dos valores de IC_{50%};
- Determinar a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Analisar a expressão de marcadores do controle do ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo;
- Avaliar alterações morfológicas nas linhagens celulares após tratamento com 2-AEH₂F e análogos por microscopia confocal a laser.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F)

A reação foi realizada em um balão de duas bocas, a primeira para adição e a segunda para nitrogênio (N₂) para auxiliar na eliminação da água. O balão foi acondicionado em banho de gelo e foi adicionado ácido fosfórico (H₃PO₄, 97,99 g, 1 eq, 1 mol) sob agitação e atmosfera nitrogênio. Posteriormente se adicionou, gota-a-gota, 2-aminoetanol (61,08 g, 1 eq, 1 mol) com auxílio de um funil de adição. A taxa de adição foi monitorada para que a temperatura interna não ultrapassasse 80 °C. Terminada a adição, o balão foi aquecido até que a temperatura interna atingisse 180 °C. A reação foi conduzida por 8 horas, com o cuidado que o nitrogênio borbulhasse pelo meio reacional. Após, o produto bruto reacional foi resfriado a 70 °C, e transferido para um becker contendo 1,5 L de etanol (EtOH) 90% e deixado em repouso por 12 horas.

Decorrido o tempo de descanso, pequenos cristais na interface entre o produto bruto sólido e o etanol foram formados. O EtOH foi removido e o bruto reacional foi dividido em pequenas frações. Cada fração foi diluída com a menor quantidade possível de água, com auxílio de calor e agitação, e foi adicionado EtOH 100% e centrifugado. O sólido obtido pela centrifugação passou 3 vezes pelo processo de solubilização e adição de EtOH. Posteriormente, o material sólido branco obtido das frações foi unido e foi feita uma solução saturada, com ajuda de aquecimento e agitação. A solução foi resfriada até temperatura ambiente e posteriormente refrigerada (aproximadamente 10 °C), por 72 horas para cristalização do 2-AEH₂F. Em seguida a cristalização, o sobrenadante foi descartado e os cristais lavados com etanol absoluto a quente. O procedimento de cristalização foi repetido 3 vezes. Por fim, uma última filtração e lavagem com etanol a quente, o sólido branco resultante foi macerado e seco em alto vácuo.

3.2. Síntese da *N*-(2-hidroxi-etil) Benzamida (N-2-HEB)

Em um balão de 250 mL em banho de gelo e agitação, foram adicionados, água (50 mL), tetrahidrofurano (THF, 100 mL), trietilamina (Et₃N, 8,0006g, 0,079 mol, 1,1 eq) e 2-aminoetanol (7,0028 g, 0,114 mol, 1,6 eq), a mistura foi agitada e resfriada a 13 °C. Lentamente foi adicionado cloreto de benzoíla (PhCOCl, 9,7254 g, 0,069 mol, 1 eq), mantendo a temperatura interna menos que de 20

°C. A temperatura da reação foi mantida em 13 °C e agitação por 20 horas. A reação foi terminada rotaevaporando o THF e parte da água. Na mistura restante foram adicionados 50 mL de acetato de etila (AcOet) e as fases foram separadas. A fase aquosa foi lavada 3 vezes com 50 mL de AcOEt. As fases orgânicas foram unidas e seca com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e posteriormente rotaevaporada. O sólido resultante foi purificado em sílica utilizando AcOEt como fase móvel. As frações contendo o produto foram coletadas e o solvente removido. O produto obtido foi seco em alto vácuo e submetido para análise.

3.3. Síntese do 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato (2-BEH₂F)

A reação de formação do 2-BEH₂F procedeu de maneira similar a da N-2-HEB, com modificação na temperatura e na equivalência da base Et₃N. Em um balão de 125 mL foram adicionados THF (25 mL) e água (12,5 mL) e 2-AEH₂F (2 g, 14,18 mmol, 1,5 eq) foi solubilizado nesse meio e Et₃N (5,74 g, 56,72 mmol, 6 eq). Por fim, lentamente foi acrescido o cloreto de benzoíla (PhCOCl, 1,323g, 9,45 mmol, 1 eq). Sob agitação a reação procedeu por 20h. A reação foi finalizada rotaevaporando o THF. Na mistura restante foi adicionado acetato de etila (AcOet) e as fases foram separadas. A fase aquosa foi lavada 3 vezes com AcOet. O pH da solução aquosa foi ajustado para 10 com hidróxido de sódio (NaOH, 1 molL⁻¹) e foi realizada novamente uma extração com AcOet. A fração aquosa foi concentrada e purificada em coluna de sílica com fase móvel de EtOH absoluto. As frações com o produto desejado foram isoladas, concentradas e secas, resultado em um sólido branco.

3.4. Síntese de diésteres de fósforo: 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)

A metodologia utilizada foi adaptada de Eibl, H. e Engel, J., 1992, que propuseram uma rota de síntese, que consiste em uma reação de múltiplas etapas, porém sem a necessidade de isolar e purificar todos os intermediários formados³². A metodologia descrita foi modificada e utilizada para a síntese de

três diésteres diferentes, 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)^{16,33,34}. A Figura 2 elucida a rota de síntese simplificada.

Foram utilizados álcoois como material de partida para cada reação, para a obtenção das cadeias longas dos diferentes diésteres, como o dodecanol, hexadecanol e octadecanol, o que resultou em cadeias de 12, 16 e 18 carbonos, respectivamente. Os álcoois são representados de forma genérica como ROH, onde R representa docecil (C12), hexadecil (C16) ou octadecil (C18). As massas, mols e equivalências de cada reação podem ser observados na Tabela 1 para cada produto obtido.

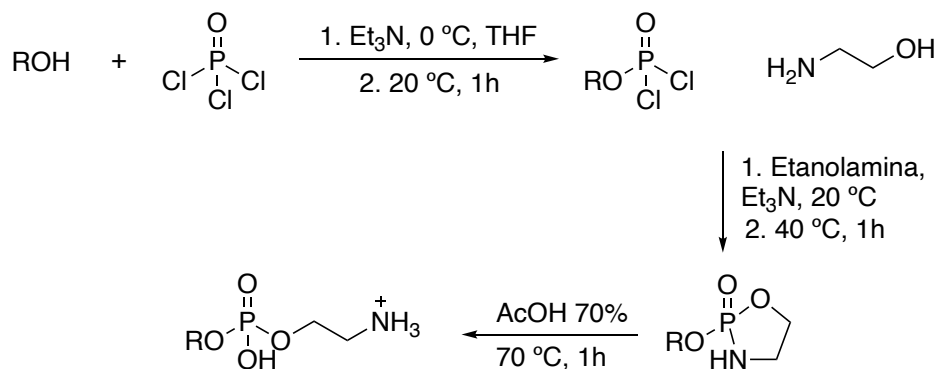


Figura 2. Esquema reacional genérico para obtenção dos diésteres de fósforo e condições envolvidas.

A reação foi conduzida em um balão de 3 saídas, acoplados com dois funis de adição em condições anidra e em atmosfera de N₂. Em um dos funis foi preparada uma mistura do álcool (ROH, 1 eq) e Et₃N (1,2 eq) em 25 mL de THF. No segundo funil foi adicionada etanolamina (1,2 eq) e Et₃N (2,4 eq) em 50 mL THF. No balão foi adicionado cloreto de fosforila (POCl₃) (1,2 eq) em 20 mL de THF. O balão foi acomodado em um banho de gelo com agitação vigorosa.

Em um primeiro momento a solução contendo ROH foi adicionada gota-a-gota na solução contendo POCl₃, cuidando para que a mistura não ultrapasse a temperatura de 15 °C. Após a adição, a temperatura foi elevada para 20 °C e foi deixado reagindo por 1 hora. Depois deste período foi iniciada a adição da solução de etanolamina, também adicionada gota-a-gota cuidando para que a temperatura não excedesse 40 °C. Finalizada a segunda adição, a reação foi

conduzida por mais 1 hora e aquecida a 40 °C, ainda sob atmosfera de N₂. Passado o tempo de reação, o conteúdo foi filtrado á vácuo e concentrado em pressão reduzida. Ao bruto reacional obtido foi adicionado 5 mL de uma solução de ácido acético 70% (AcOH) e aquecido a 70 °C por 1 hora para a abertura do anel PN formado. Subsequente a abertura do anel, o aquecimento foi removido até atingir temperatura ambiente, no qual foi adicionado 40 mL de acetona e resfriado a 10 °C para cristalização do produto. O produto cristalizado e puro foi isolado por filtração e seco em alto vácuo.

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados para a reação de formação dos diésteres de fósforo.

	ROH	Et ₃ N	Etanola- mina	Et ₃ N	POCl ₃
2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato 2-AE(C12)HF	2,000 g, 10,7 mmol 1 eq	1,303 g 12,8 mmol 1,2 eq	0,786 g 12,8 mmol 1,2 eq	2,606 g 25,7 mmol 2,4 eq	1,974 g 12,8 mmol 1,2 eq
2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato 2-AE(C16)HF	2,000 g, 8,2 mmol 1 eq	1,476 g 9,9 mmol 1,2 eq	0,604 g 9,9 mmol 1,2 eq	2,953 g 19,8 mmol 2,4 eq	1,517 g 9,9 mmol 1,2 eq
2-aminoetil octadecanol hidrogeno fosfato 2-AE(C18)HF	2,000 g, 7,4 mmol 1 eq	0, 897 g 8,8 mmol 1,2 eq	0,541 g 8,8 mmol 1,2 eq	1,795 g 17,7 mmol 2,4 eq	1,360 g 8,8 mmol 1,2 eq

3.5. Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C

As análises por RMN ¹H e ¹³C foram realizadas em um equipamento Varian, Inova de 300 MHz, Bruker 300 MHz e 500 MHz. Para as análises foram utilizados 10 mg de cada composto/amostra em 700 µL de solvente deuterado (D₂O Sigma-aldrich, CDCl₃ sigma-aldrich).

3.6. Cultura Celular

Foram utilizadas células tumorais de adenocarcinoma de mama murino 4T1 (ATCC® CRL2539™), células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231 (ATCC® HTB-26™), células de fibroblasto murino L929 (ATCC®

CCL-1 CCL-1™), ambas originárias da ATCC e células fibroblasto humano normal FN-1 (CAPPesq HCFMUSP nº 921/06). Todas as células são mantidas e estocadas no banco de células do Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células dispostas em monocamada foram submetidas a dissociação enzimática com solução de tripsina (0,2%) + EDTA (0,02%) (Etilenodiamino tetra-acético), para que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi feita utilizando o mesmo meio de cultura RPMI contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

3.7. Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células tumorais e normais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 1x10⁵ células/mL durante 24 e 48h e tratadas em diversas concentrações. Após 24h de tratamento o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 µL da solução de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, as células foram incubadas por 3h em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e foi acrescentado 100 µL de álcool metílico para dissolver os cristais de Formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração inibitória das células (IC_{50%}) foi determinada no tratamento após 24 e 48h em diferentes concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

3.8. Análise das fases do ciclo celular e DNA fragmentado por Citometria de Fluxo

As células tumorais e normais foram submetidas aos tratamentos por período de 12 e 24h. As células tratadas e do grupo controle foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em solução de etanol absoluto gelado com RNase e armazenado no freezer -20°C por 24h. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e ressuspenso em 200 µL de tampão Facs, 20 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), mantidas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o pellet foi ressuspenso em tampão Facs Flow e transferidas para tubos de citometria e levadas para análise em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.9. Avaliação da Expressão de marcadores celulares por Citometria de Fluxo

Alíquotas de 100 µL das suspensões de células tumorais obtidas dos tratamentos *in vitro* foram incubadas por 1h a 4°C, com 1 µg de anticorpo específico caspase 3 e 8 ativa conjugado com ficoeritrina (PE) na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH. Foram utilizados diversos marcadores envolvidos na morte celular, reguladores da progressão do ciclo celular, adesão e angiogênese (Bcl-2, p53, Citocromo-c, Bad, TRAIL-DR4, TGF-β, VEGF-R1, VEGF-R2 e uPAR). Após este período as células foram centrifugadas a 1200 rpm e lavadas com tampão PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 200 µL de Tampão Facs Flow contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície celular das células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FL-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

A rodamina-123 (Rho-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorescendo em verde. Alterações em nível de integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Rho-123 da mitocôndria para o citosol (Johnson, 1980). As amostras das células tumorais e controles foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 5 μL de Rho-123 (5 mg/mL^{-1} diluídos em etanol) (Molecular Probes, EUA). Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% CO_2 a 37°C por 30 min. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 100 μL de tampão FACS Flow. A leitura e análise da marcação da Rho-123 nas células foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto (BD) em intensidade de fluorescência FLH-1 e os histogramas adquiridos e analisados pelo programa Cell-Quest - BD.

3.11. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

3.11.1. Marcação das mitocôndrias com o MitoRed

As alíquotas das culturas de adenocarcinoma de mama murino 4T1, câncer de mama triplo negativo humano MDA MB-231, células de fibroblasto murino normal L929 e células de fibroblasto humano normal FN-1 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas com meio de cultura RPMI a 10% de SFB mantida na estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 24h. As amostras controle e tratadas foram submetidas ao processo de remoção do meio de cultura e lavadas com próprio meio de cultura RPMI. Em seguida, foi acrescentado 200 μL da solução de MitoRed em meio de cultura RPMI a 10% de SFB (MitoRed a 200 nML^{-1}) (Sigma-Aldrich, USA), durante 1h no escuro a 37°C . Após a incubação, o excesso de MitoRed foi removido e as células lavadas com PBS. Após a incubação com o MitoRed para fixação foi adicionado 100 μL

de paraformaldeído a 2% por 30 min, e em seguida lavadas com PBS para posterior marcação com DAPI.

3.11.2. Marcação do nuclear e de material genético com o DAPI

Após a marcação das mitocôndrias com MitoRed e fixação com paraformaldeído a 2%, as células foram permeabilizadas em Triton X-100 por 20 min em temperatura ambiente, e posteriormente acrescentado 100 μ L de DAPI (Sigma-Aldrich, USA), e permaneceram durante 1h no escuro em temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de DAPI foi removido e as células lavadas com meio de cultura. As lamínulas foram colocadas em lâminas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview™ 300) e as imagens fotodocumentadas e analisadas.

3.12. Análises Estatísticas

Todos os valores obtidos das diferentes linhagens celulares foram expressos em média \pm desvio padrão. Após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle, os resultados foram tabelados e analisados no programa Graphpad Prism, Version 9.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de três ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER, considerando como nível crítico para significância valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese do 2-aminoetil dihidrogeno fosfato

Inicialmente foi realizada uma análise por RMN ^1H (300 MHz Inova, Varian) de uma amostra de 2-AEH₂F (sigma-aldrich) para obtenção do seu perfil espectral (Figura 3) para a comparação com os espectros dos produtos das reações exploradas. Para tanto foi utilizado 10 mg de padrão (2-AEH₂F) em 700 μL de água deuterada (D_2O , óxido de deutério, sigma-aldrich).

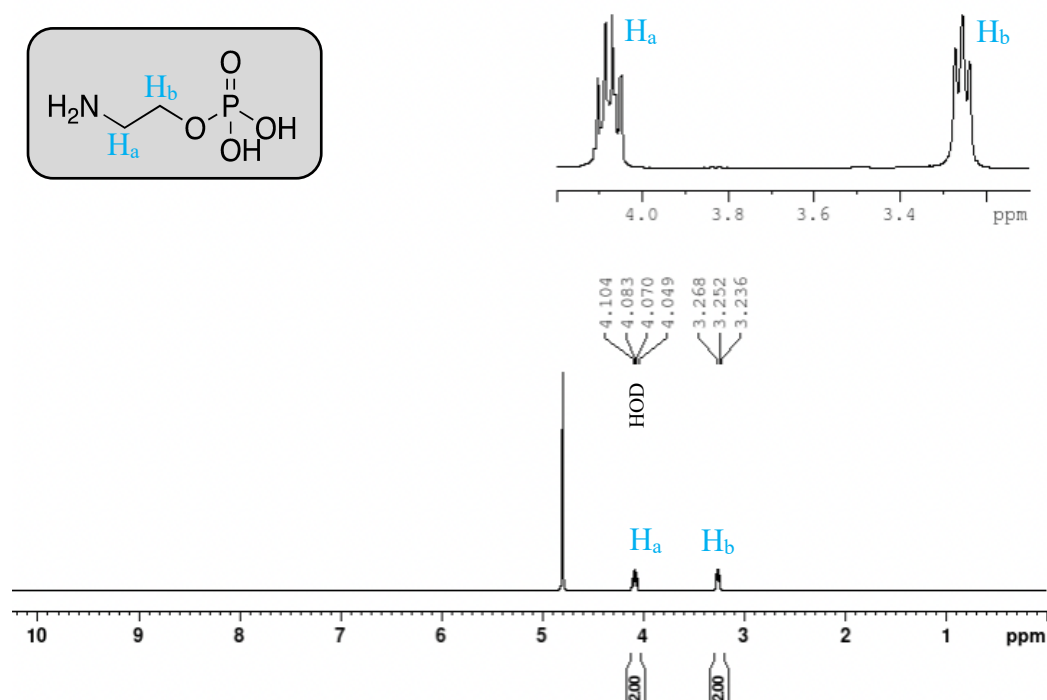


Figura 3. Espectro de RMN ^1H 300 MHz do 2-AEH₂F em $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 4.79 ppm).

O espectro mostra dois sinais referentes aos núcleos de hidrogênios ligados aos átomos de carbono, e um relativo ao solvente D_2O ou HOD, pois a água deuterada tem uma troca de átomos de deutério e hidrogênio estabelecendo um equilíbrio no meio. O sinal dos hidrogênios H_b apresenta um deslocamento químico (δ) de 3,25 ppm (t, H_b, 2H)¹ e é um tripeto devido a constante de acoplamento (J) com hidrogênios vicinais H_a, a integral do sinal mostra que existem dois hidrogênios equivalentes (CH_2). Os hidrogênios do átomo H_a apresentam um δ de 4,07 ppm e integral de dois hidrogênios (CH_2), no

¹ (multiplicidade (s, singlete; d, dublete; t, tripeto; q, quarteto; m, multipeto), núcleo, quantidade do núcleo (integração de sinal))

entanto, este é observado como um quarteto, pois existe o acoplamento com os hidrogênios do átomo H_b e acoplamento com o átomo de fósforo, pois o isótopo de fósforo tem uma abundância natural próxima a do hidrogênio. O aspecto de um quarteto do hidrogênio H_a, é produto de um acoplamento heteronuclear, o qual tem diferentes *J*, um para o acoplamento entre os núcleos de hidrogênio e outro para o acoplamento entre os núcleos de hidrogênio e fósforo, assim, este deve ser considerado um multiplete, devido ao fato de não ser possível fazer a distinção dos *J* de cada acoplamento. O efeito do acoplamento heteronuclear que ocorreu permitiu que as reações fossem monitoradas por RMN ¹H, indicando a formação de produtos ligados ao fósforo. Os hidrogênios dos grupos amina, hidroxila e fosfato não apresentam sinais no espectro de RMN ¹H, pois, acontece uma troca entre os átomos de deutério da água deuterada e hidrogênios específico desses grupos e por terem um tempo relaxamento muito rápido.

A metodologia foi desenvolvida baseada em um estudo de outras reações de fosfoesterificação, exceto as etapas de purificação^{14,30,35-41}. Dentre as metodologias encontradas na literatura foi optado pela metodologia mais direta para a obtenção do 2-AEH₂F. O procedimento se deu pela adição da etanolamina no ácido fosfórico em banho de gelo sob agitação. A atmosfera de nitrogênio empregada neste método foi de passar o gás inerte pela mistura reacional para que houvesse um maior contato entre a água formada e a atmosfera, removendo a água formada de maneira mais eficiente. Durante a adição foi observado a formação de um sólido branco durante o início da adição da etanolamina, o qual foi solubilizado espontaneamente no meio reacional.

Durante a etapa de aquecimento a mistura reacional não apresentava mais o sólido suspenso. A mistura apresentava uma cor amarela translúcida e com o passar do tempo o meio reacional se tornou cada vez mais viscoso. Após seis horas com uma temperatura de 180 °C o aquecimento foi removido e o bruto reacional foi transferido para um Becker de 2 L. Foi depositado no recipiente formando uma fina camada no fundo do Becker e quando a temperatura do material depositado atingiu 70 °C foi adicionado 1 L de etanol 90%. A introdução do álcool nessas condições foi para facilitar a migração de etanolamina não reagida. O bruto reacional foi deixado em contato com etanol por 12 horas.

Posterior a este período foi notada a formação de cristais na superfície do material depositado. O etanol foi removido e o material contendo os cristais foi submetido a uma análise de RMN ^1H (Figura 4)

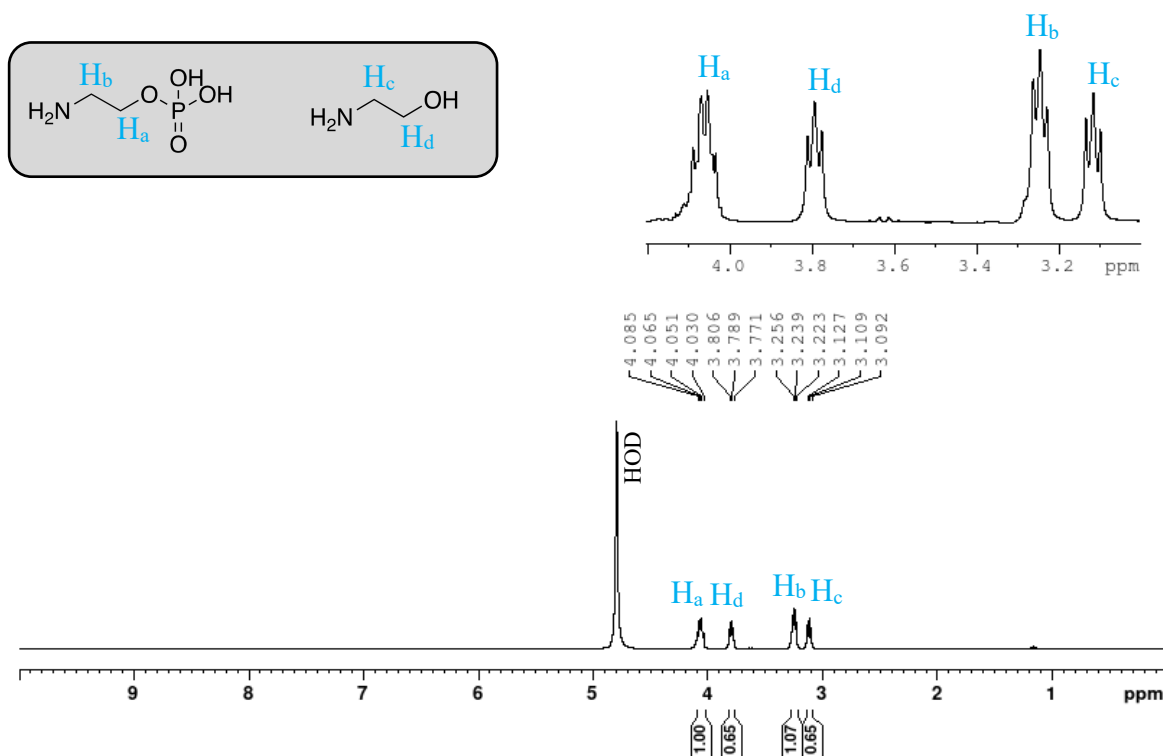


Figura 4. Espectro de RMN ^1H 300MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 4.79 ppm) da mistura de 2-AEH₂F e etanolamina.

Pelo espectro obtido da amostra bruta (Figura 4), se observa que a reação formou o produto em uma relação 1:0,65 de 2-AEH₂F e etanolamina. Isso é observado pela as integrais obtidas do espectro. Existe traço de etanol na amostra (solvente da etapa da primeira cristalização) em 1,20 e 3,61 ppm. A partir dessas informações foram realizadas recristalizações e a cada foi realizada uma análise por RMN ^1H dos cristais obtidos. A Figura 5 mostra os espectros adquiridos, onde o espectro (a) é a amostra cristalizada bruta, espectro (b) resultado obtido da primeira recristalização e o espectro (c) mostrando a segunda recristalização. Cabe destacar no espectro (c) a ausência dos sinais referente a etanolamina (3,10 e 3,78 ppm), mostrando que as recristalizações foram capazes de eliminar o amino álcool.

Quando comparados os espectros de RMN ^1H do 2-AEH₂F padrão da Sigma-Aldrich (97% de pureza) e da amostra obtida, ambos mostraram o mesmo perfil espectral (Figura 6). Assim, esta amostra foi selecionada para os testes *in vitro* com o código 2-AEH₂F.

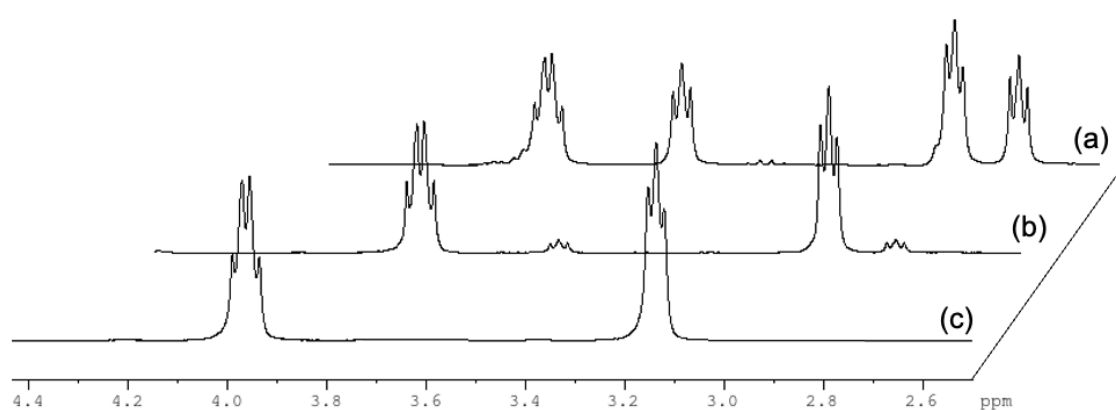


Figura 5. Espectros de RMN ^1H da amostra do composto 2-AEH₂F onde: (a) espectro da amostra bruta cristalizada, (b) resultado de uma recristalização e (c) resultado da segunda recristalização. O espectro (c) mostra resquícios mínimos de etanolamina.

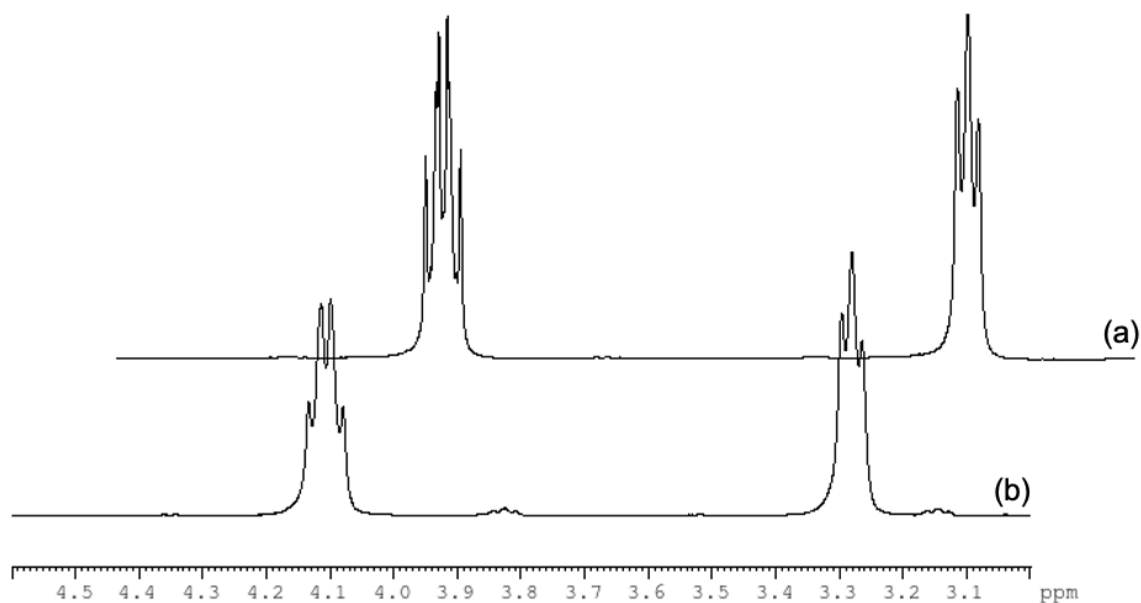


Figura 6. Comparação entre espectros de RMN ^1H : (a) 2-AEH₂F padrão sigma-aldrich e (b) amostra obtida e purificada.

Nas reações envolvendo etanolamina e ácido fosfórico acreditasse que estas apresentam um mecanismo como descrito na Figura 7, onde o oxigênio do grupo hidroxila da etanolamina ataca o fósforo e o oxigênio do grupo fosfato acomoda o par de elétrons da dupla ligação (P=O) e forma um intermediário, no qual acontece um rearranjo dos hidrogênios intermoleculares, seguido de uma abstração de um hidrogênio por uma base (o grupo amina da própria etanolamina) e a eliminação de um agrupamento hidroxila formando o monoalquil fosfato respectivo⁴².

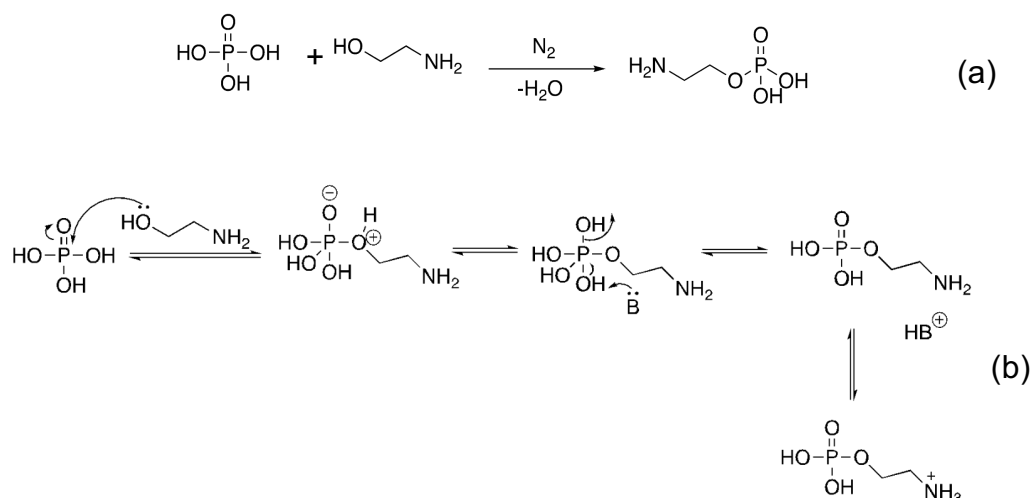


Figura 7. Reações de esterificação do fósforo: (a) representação da reação simplificada de fosforilação. (b) mecanismo de reação proposto para a formação do mono-álquil fosfato.

4.2. Síntese da *N*-(2-hidroxi-etil) Benzamida

A reação de formação da *N*-(2-hidroxi-etil) Benzamida (*N*-2-HEB) é conhecida como reação de Schotten-Baumann, a qual possibilita estabelecer uma ligação amida. A reação ocorre entre uma amina (2-aminoetanol) e um cloreto de acila (cloreto de benzoíla) e que utiliza uma base para a neutralização do meio ácido formado e desloca o equilíbrio para a formação da amida^{39,43,44}.

A Figura 8 mostra o mecanismo da reação, no qual o par de elétrons do nitrogênio ataca o carbono da carbonila, o oxigênio carbonílico acomoda o par de elétrons, formando um intermediário instável. O par de elétrons acomodado pelo oxigênio volta a estabelecer a dupla ligação e o cloro abandona a molécula. A base utilizada na reação captura o hidrogênio do intermediário da amida formada e estabiliza a molécula, gerando o produto desejado da reação.

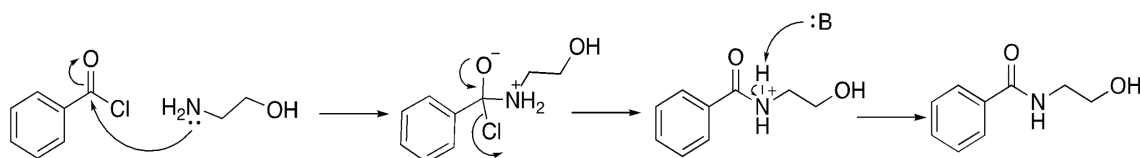


Figura 8. Reação de simplificada de Schotten-Baumann entre cloreto de benzoíla e 2-aminoetanol.

A metodologia para a obtenção da *N*-(2-hidroxi-etil) Benzamida foi adaptada da descrita por Bjørsvik e Engell, 2002⁴³. Os solventes utilizados foram tetrahidrofurano (THF) e água em proporção de 1:2 e como base foi utilizada a Et₃N, nestes foi adicionado o 2-aminoetanol e posteriormente o cloreto de benzoíla gota-a-gota, mantendo a temperatura constante da reação em 13 °C por 20 horas sob agitação. Ao término da reação o THF foi rotaevaporado. O produto bruto da reação ficou na fase aquosa, a qual foi adicionado acetato de etila (AcOet) formando duas fases, a fase orgânica (AcOet e benzamida) ficou com uma coloração levemente amarelada. A fase aquosa foi lavada outras 3 vezes com AcOet, as fases orgânicas foram unidas e seca com MgSO₄. O AcOet foi rotaevaporado e o produto resultante um sólido de cor branca amarelado, que pode estar associada ao excesso de etanolamina utilizada e a formação de ácido benzóico como subproduto.

O bruto obtido foi purificado por filtração em sílica. Em um funil de placa porosa foi acomodada sílica flash com ajuda de AcOEt, o sólido obtido foi depositado na sílica e lavado com AcOEt. As frações foram recolhidas e por cromatografia em camada delgada foi determinado em quais frações o produto isolado se encontrava. O solvente foi removido desta fração e obtido um sólido branco que foi seco em sistema de alto vácuo. Com o produto isolado e seco, o mesmo foi analisado por RMN ¹H (Figura 9) e ¹³C (Figura 10).

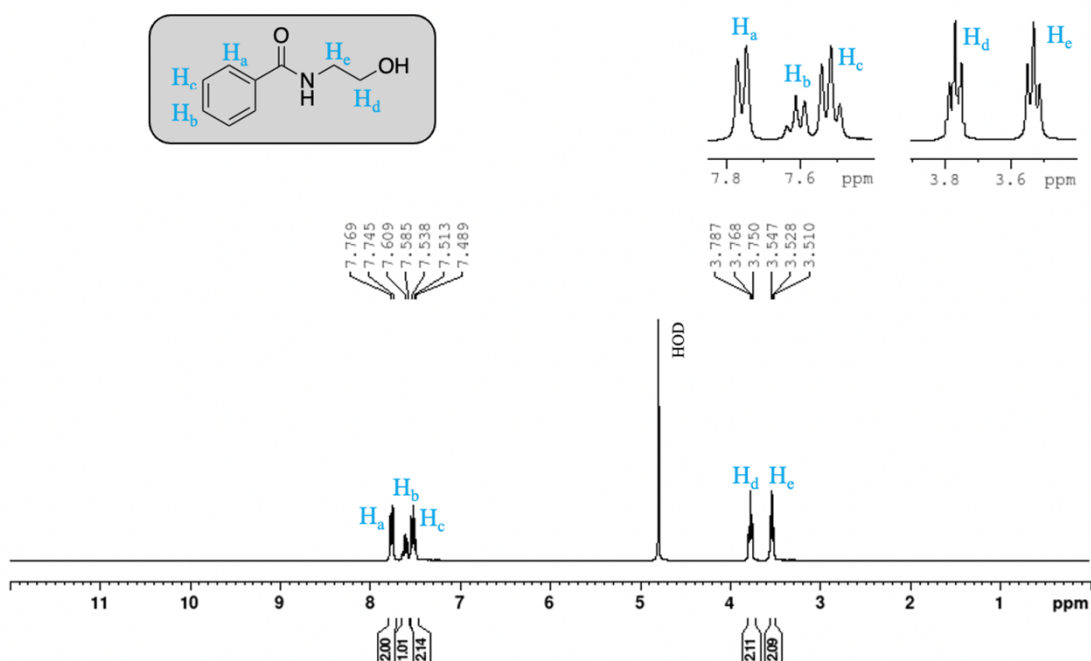


Figura 9. RMN ^1H 300 MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 4,79 ppm) do produto N-2-HEB isolado.

A análise do espectro de RMN ^1H apresentado na Figura 9, mostra em: δ 7,75 ppm (t, H_a , 1H), δ 7,59 ppm (d, H_b , 2H), δ 7,51 ppm (t, H_c , 2H), δ 3,76 ppm (t, H_d , 2H) e δ 3,52 ppm (t, H_e , 2H). Os sinais observados entre 7,51 a 7,59 ppm (H_a , H_b , H_c), representam os núcleos de hidrogênios de um anel aromático monosubstituído. Os sinais em 3,76 e 3,52 ppm (H_d e H_e) pertencem aos hidrogênios ligados a amida. Baseado nos sinais obtidos na análise, a amostra se encontra pura, pois, não há evidências de sinais de etanolamina livre utilizada em excesso na reação (1,6 eq) e a ausência de outros sinais aromáticos mostra que se houve formação de subproduto, como ácido benzóico, este foi removido na etapa de purificação. O mesmo comportamento foi observado na análise de RMN ^{13}C , representado na Figura 10.

Não são observados acoplamentos (entre carbono e hidrogênio) pois essa análise é realizada com desacoplamento de hidrogênio, o que intensifica a relação sinal ruído. A frequência dos espectros de carbono é na ordem de um quarto da frequência do núcleo de hidrogênio devido a relação giromagnética, que é a razão entre o momento de dipolo magnético do núcleo e o momento angular de spin nuclear.

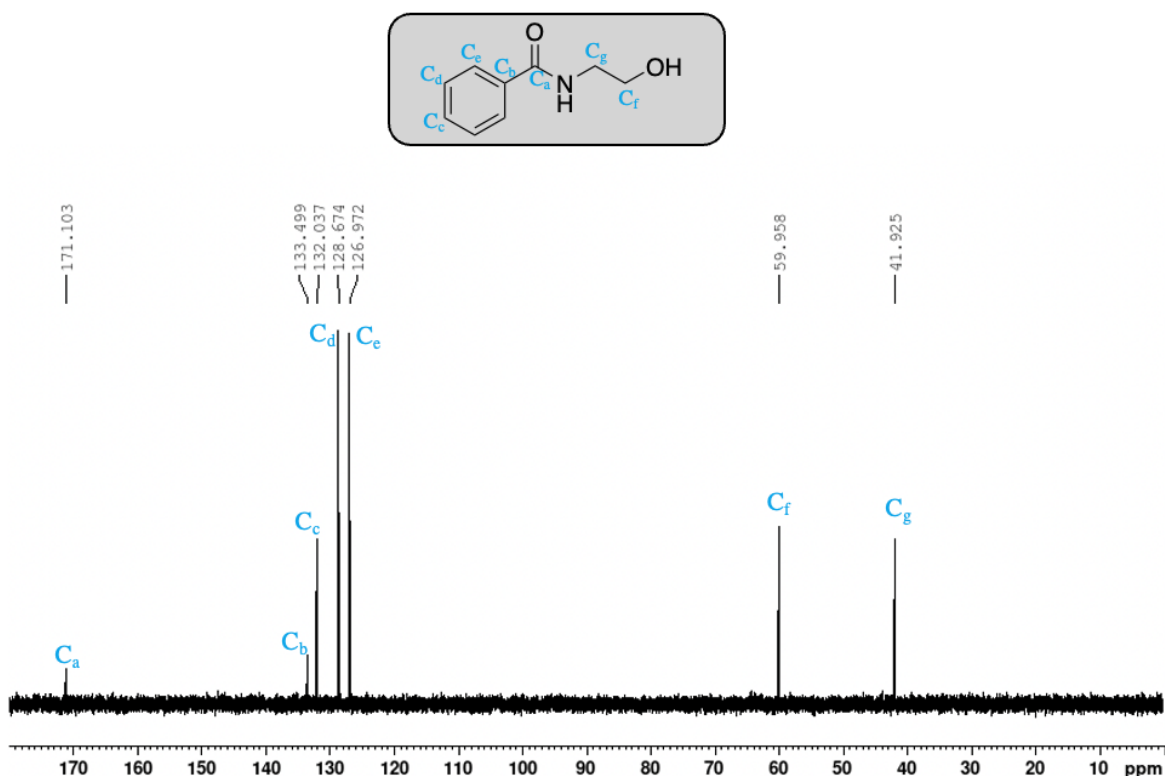


Figura 10. RMN ¹³C 125 MHz em D₂O/HOD do produto N-2-HEB isolado.

Na Figura 10, são observados 7 sinais dos núcleos de carbonos que correspondem a N-2-HEB. Deslocamentos observados em 171,10 ppm C_a (C=O) e 133,49 ppm C_b (C aromático) apresentam sinais menos intensos pois são carbonos quaternários, sem ligações com hidrogênios. Em δ 132,03 ppm C_c (CH aromático), 128,67 ppm C_d (2 CH aromático) e em 126,97 ppm C_e (2 CH aromático) são sinais correlativos aos demais carbonos do anel aromático. Por fim, em δ 59,95 ppm C_f (CH₂-OH) e em δ 41,92 ppm C_g (CH₂-NH-).

Analisando os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, se observa que o produto esperado foi sintetizado e isolado corretamente, sem traços dos materiais de partida e subprodutos. O produto obtido foi utilizado para testes *in vitro* com o código N-2-HEB.

4.3. Síntese do 2-benzamidoetil dihidrogeno fosfato (2-BEH₂F)

Para a obtenção do 2-BEH₂F foi reagindo o 2-aminoetil dihidrogeno fosfato e o cloreto de benzoíla diretamente como a metodologia utilizada para o N-2-HEB.

Entretanto, o grupo amino do 2-AEH₂F se encontra na forma protonada (NH₃⁺-R), o que tornaria a reação de Schotten-Baumann inviável. Desta forma, foi utilizada uma base orgânica (Et₃N) até atingir o pH (pH > 10) no qual ocorre a desprotonação do grupo amino do 2-AEH₂F, segundo os estudos realizados por Myller, A. T. et al., 2013¹⁴, o qual analisaram o comportamento do 2-AEH₂F em diferentes pH. A reação foi conduzida pela solubilização parcial do 2-AEH₂F na mistura água/THF (solubilidade do 2-AEH₂F em água 25,8 gL⁻¹) e adicionado a Et₃N para ajuste do pH e para atuar como base na reação (abstração de prótons). A reação foi conduzida durante 20 horas sob agitação e temperatura ambiente. Durante a reação foi notado que a parte insolúvel do 2-AEH₂F foi sendo solubilizado com o passar do tempo, indicando a formação do produto, ou seja, sob estas condições reacionais o equilíbrio químico foi deslocado favorecendo a formação do produto. Após o período de 20 horas o THF foi removido, deixando o produto formado solubilizado somente em água. Foi realizada uma extração do bruto reacional com AcOet para remoção de impurezas orgânicas que possam ter sido geradas durante a reação. A fase aquosa foi tratada com hidróxido de sódio até o pH 12, para desprotonar a trietilamina que se encontrava como trietilamônio (Et₃HN⁺) e facilitar a sua remoção, bem como utilizar o sódio como contra íon do produto. Assim, foi realizada uma segunda extração com AcOet, retirando a Et₃N da fase aquosa. A água remanescente foi removida e foi obtido um sólido branco de aspecto ceroso, o qual foi colocado em alto vácuo para remoção final da água e outras substâncias voláteis^{39,44-47}. O sólido obtido foi analisado por RMN de ¹H e ¹³C em D₂O como pode ser observado nas Figuras 11 e 12.

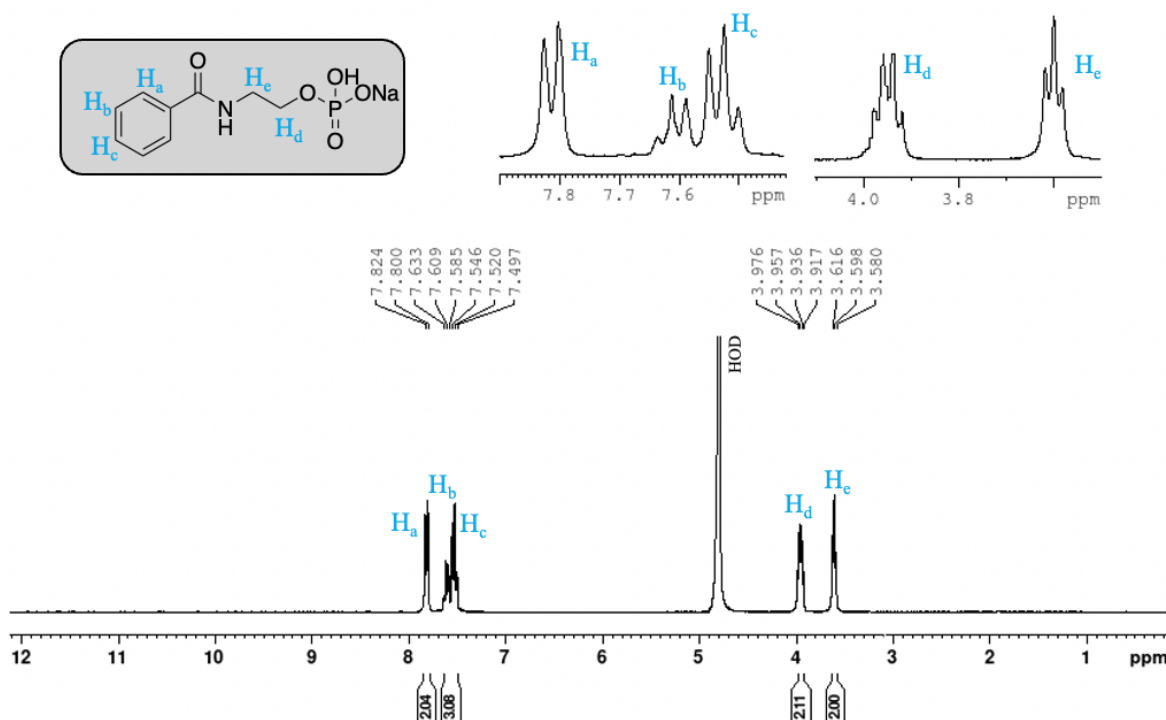


Figura 11. Espectro de RMN ^1H 300MHz em $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 4,79 ppm) do produto obtido (2-benzamidoetil fosfato de sódio).

A caracterização por RMN ^1H da amostra do produto obtido mostra os sinais esperados para o produto. Podem ser observados os sinais em δ 7,81 ppm (d, H_a , 2H), δ 7,60 ppm (t, H_b , 1H) e δ 7,52 ppm (t, H_c , 2H) compondo os sinais dos hidrogênios do anel aromático, existe também uma pequena sobreposição dos sinais dos núcleos H_b e H_c , que são normais para este tipo de espécie química. Em δ 3,94 ppm (m, H_d , 2H) se nota os núcleos vicinais ao grupo fosfato, novamente mostrando um multiplete devido ao acoplamento heteronuclear, o qual mostra que a metodologia empregada foi capaz de promover a reação e obter o produto desejado. E em δ 3,59 ppm (t, H_e , 2H) pertencente aos hidrogênios vicinais ao grupo amida. Todos os sinais, acoplamentos e deslocamentos químicos conferem com o produto pretendido.

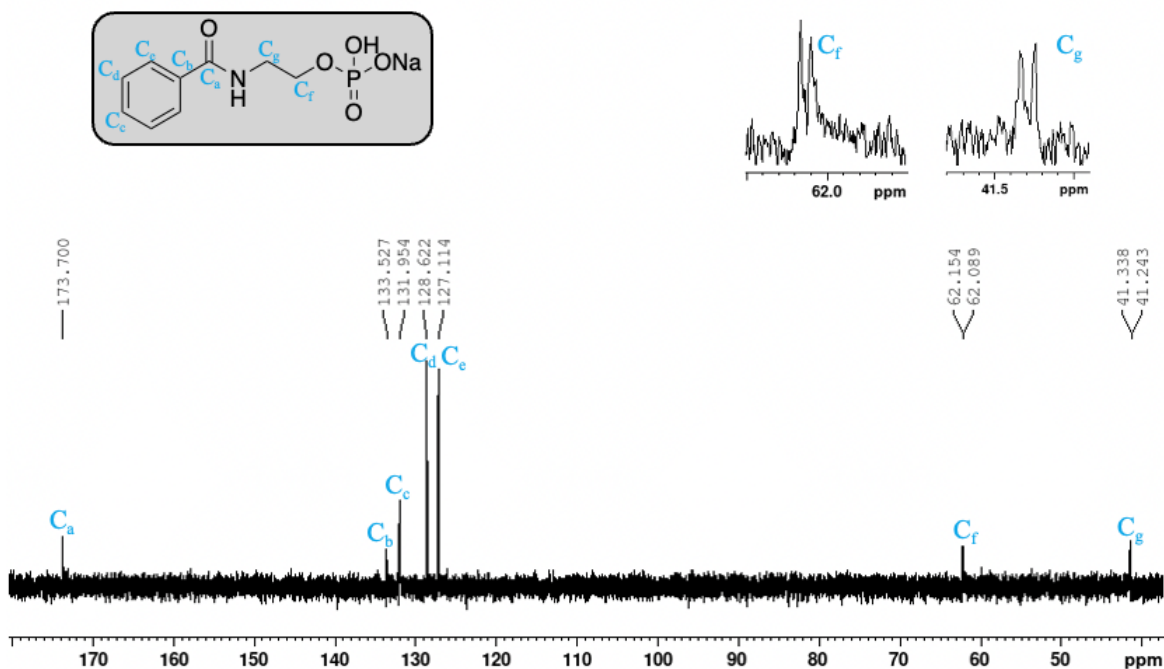


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C 125MHz em D₂O/HOD do produto obtido (2-benzamidoetil fosfato de sódio).

A Figura 12 elucida o espectro de RMN de ¹³C e confirma os sinais observados no espectro de hidrogênio. Podem ser observados em δ 173,70 ppm C_a o sinal do carbono carbinílico do grupo amida (C=O). Os carbonos aromáticos em δ 133,52 ppm C_b (C), δ 131,95 ppm C_c (CH), δ 128,62 ppm C_d (2 CH) e em δ 127,11 ppm C_e (2 CH), estes sinais mostram que a espécie analisada é monosubstituída pela presença de somente um carbono quaternário aromático, C_b. Em δ 62,12 ppm C_f (CH₂-O-P) carbono vicinal ao grupo fosfato e em δ 41,28 ppm C_g (NH-CH₂-CH₂-O-P) vicinal ao grupo amida, contudo, são observados acoplamentos heteronuclear com o átomo de fósforo para ambos. O carbono C_f a duas ligações de distância e o C_g a três ligações de distância⁴⁸. Este acoplamento heteronuclear é representado no espectro de RMN de ¹³C como doubletos, e trás informações importantes de que o grupo fosfato está ligado na molécula, confirmando as observações feitas do mesmo no espectro de RMN de ¹H.

Resumindo os resultados das análises de ambos os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) para o 2-BEH₂F, pode ser concluído que a molécula pretendida foi obtida e sem impurezas (dentro do limite de detecção das análises). O produto obtido com contra-íon de sódio é passível para testes biológicos *in vitro*, sua aplicação é realizada em solução salina ou em tampão fosfato (PBS), os quais contêm fosfatos monobásico e dibásico de sódio, que fariam trocas iônicas independentemente.

4.4. Síntese de diésteres de fósforo: 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)

A metodologia empregada para a obtenção dos diésteres de fósforo, análogos da Miltefosina, foi uma adaptação dos procedimentos descritos por Eibl, H. e Engel, J., 1992 e McGuigan, C. e Swords, B., 1992^{33,34}. Na qual foi empregada o uso de álcoois de cadeia longa como, dodecanol (C₁₂H₂₆O), hexadecanol (C₁₆H₃₄O) e octadecanol (C₁₈H₃₈O), para obtenção da porção apolar dos diésteres. A porção polar foi formada pelo cloreto de fosforila (POCl₃) e pelo 2-aminoetanol. O procedimento foi empregado para cada um dos álcoois, mantendo constante a porção polar, de tal modo foram obtidos os seguintes compostos, 2-aminoetil dodecil hidrogeno fosfato (2-AE(C12)HF), 2-aminoetil hexadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C16)HF) e 2-aminoetil octadecil hidrogeno fosfato (2-AE(C18)HF)^{16,32}.

Para a realização da síntese dos diésteres, primeiramente foi preparada uma solução do álcool (R-OH, onde R é dodecanol, hexadecanol ou octadecanol) com Et₃N em THF, uma segunda solução de 2-aminoetanol com Et₃N em THF e uma terceira com POCl₃ em THF, em condições anidras. A reação foi conduzida pela lenta adição da solução contendo o álcool na solução de POCl₃, em uma temperatura de 0 °C, até finalização da adição. A temperatura foi elevada para 20 °C e foi mantido por 15 min sob agitação, após este tempo foi realizada a adição da solução contendo o 2-aminoetanol de forma lenta e

mantendo a temperatura inferior a 40 °C, novamente depois da finalização da adição foi mantida as condições por 15 min. Neste posto da síntese a molécula já possui a cauda apolar de um fosfolipídio e um heterociclo formado pelo amino álcool com o fósforo (PNO) como pode ser observado na Figura 13.

Foram necessários cuidados, com a variação da temperatura, para que não houvesse múltiplas substituições no mesmo átomo de fósforo, com a presença de água para não haver hidrólise do POCl_3 e com a equivalência de base (Et_3N) utilizada, pois um excesso próximo de 2 equivalentes pode levar o abandono do grupo fosfato da molécula.

Formado o intermediário com a cadeia alquílica e o heterociclo (PNO), foi realizada uma filtração a vácuo para eliminar o cloreto de trietilamônio (Et_3NHCl), que é o sal resultante da base (Et_3N) com hidrogênios capturados (Et_3NH^+ , trietilamônio) e neutralizado pelo cloro (Cl) abandonado do POCl_3 durante a reação. Em seguida o solvente (THF) da reação foi removido com pressão reduzida. O bruto resultante foi um óleo de cor amarela, no qual foi adicionado ácido acético (AcOH) 70% e aquecido a 70 °C por 1 hora, para abertura do ciclo PNO. Passada 1 hora a mistura foi filtrada e deixada voltar à temperatura ambiente e adicionado acetona, quando foi possível observar a cristalização do produto. Foi realizada uma filtração e os cristais foram secos em um sistema de alto-vácuo e submetidos para análise de RMN ^1H e ^{13}C . Este procedimento foi repetido para cada um dos álcoois, com cadeias de 12, 16 e 18 carbonos.

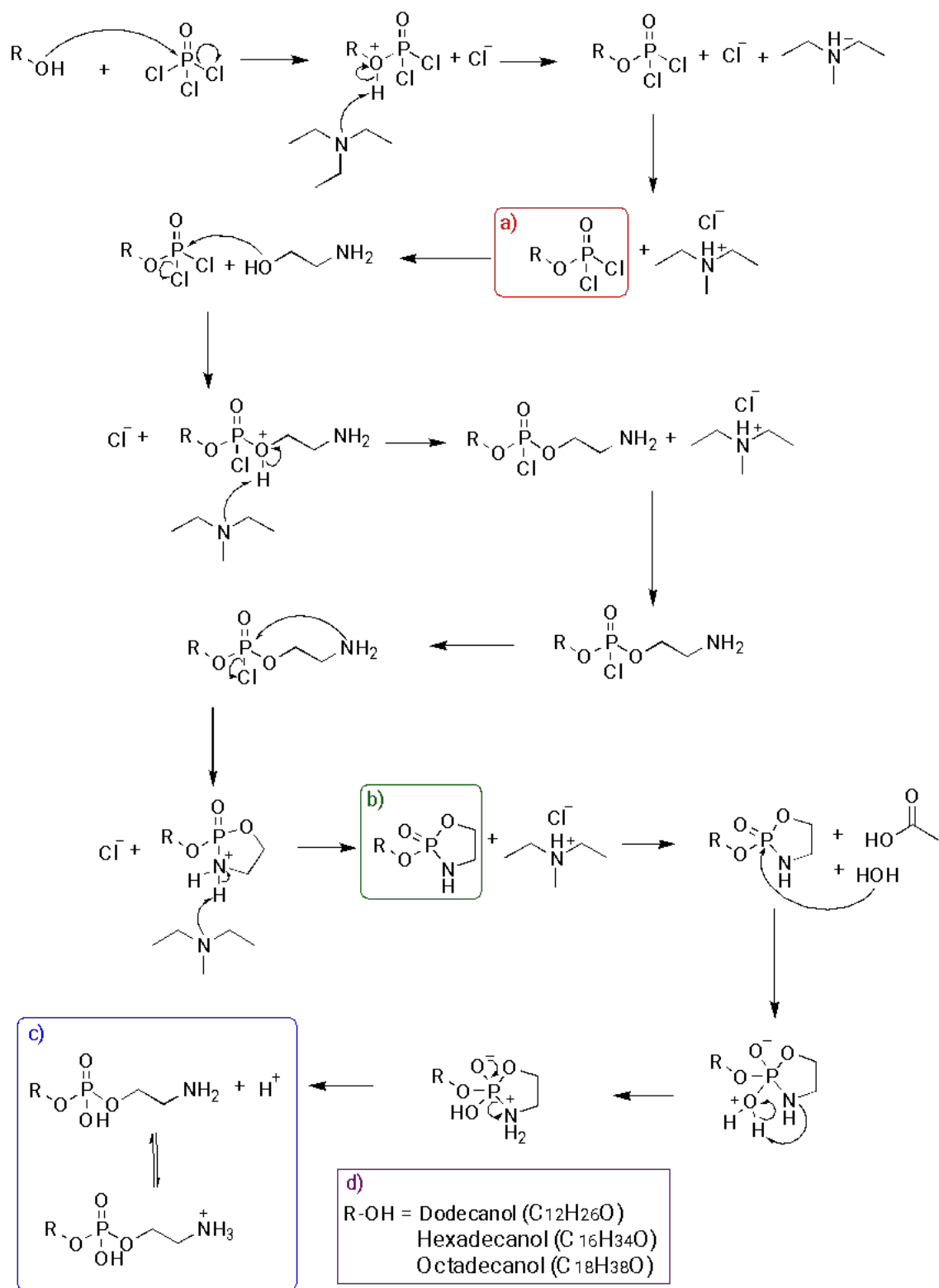


Figura 13. Mecanismo proposto para formação dos diésteres de fósforo, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. O qual a) representa a adição dos álcoois, b) mostra a adição do 2-aminoetanol e a formação do ciclo PNO, c) elucida a abertura do ciclo PNO e os produtos desejados na forma de sal e d) os substituintes utilizados (R-OH).

Os produtos obtidos e purificados (cristalização em acetona) foram submetidos a análises de RMN ^1H e ^{13}C . As Figuras 14, 15 e 16 mostram os espectros de RMN ^1H dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF e as Figuras 17, 18 e 19 os espectros de RMN ^{13}C dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF, respectivamente.

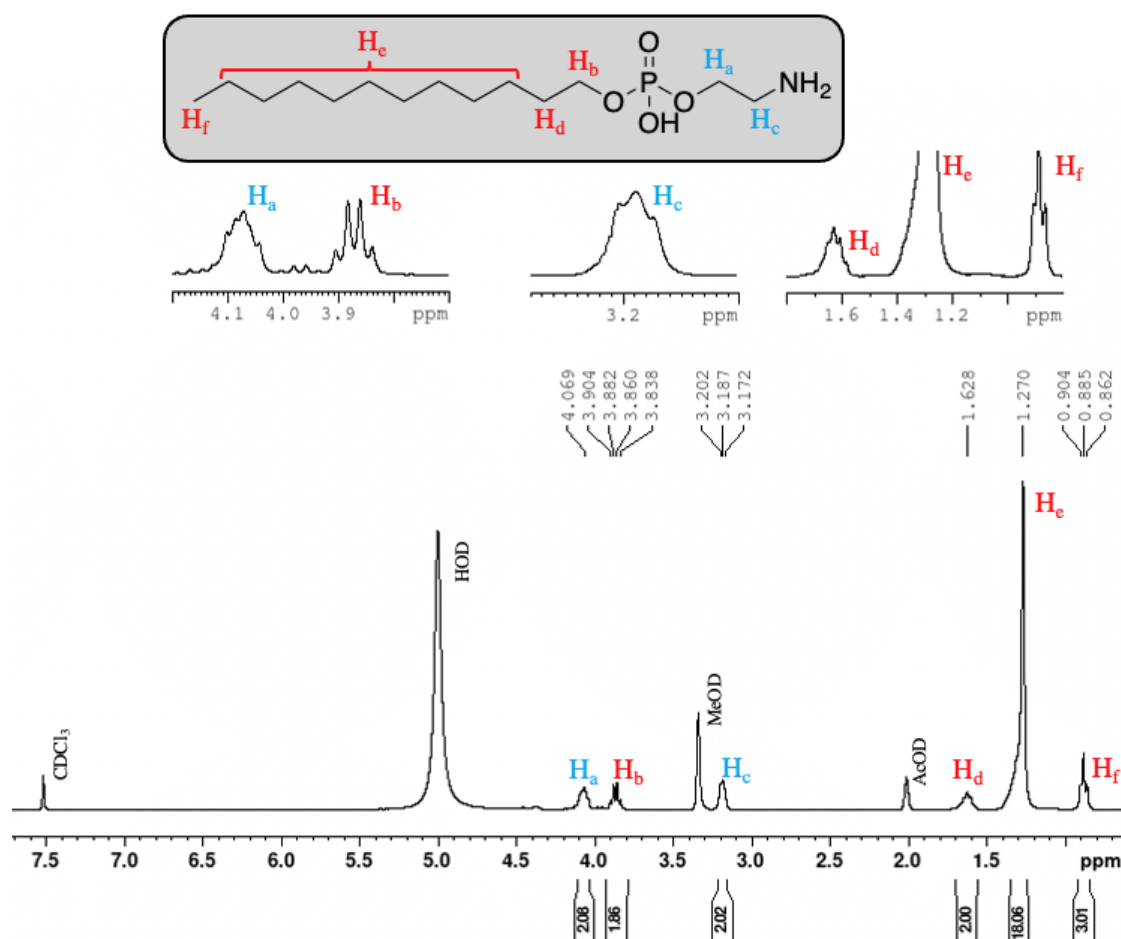


Figura 14. RMN ^1H 300 MHz do composto 2-AE(C12)HF em CDCl_3 (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

Analisando o espectro da Figura 14, podem ser observados os sinais nos seguintes deslocamentos químicos: em δ 4,06 ppm (m, H_a , 2H), δ 3,87 ppm (m, H_b , 2H), δ 3,18 ppm (t, H_c , 2H), δ 1,62 ppm (m, H_d , 2H), δ 1,27 ppm (m, H_e , 18H) e δ 0,88 ppm (t, H_f , 3H). Os deslocamentos e integrais dos sinais são os esperados para o 2-AE(C12)HF.

Para todos os espectros de RMN ^1H dos diésteres (Figura 14, 15 e 16) foi utilizado o H_d como referência para integração de sinais, pois é um sinal característico de cadeias alquílicas. Também pode se notar que o H_a e H_c , porção

polar das moléculas, apresentam uma característica de sinais menos definidos, que é consequência da mistura dos solventes empregados, pois os diésteres apresentados são moléculas anfifílicas.

E examinando os sinais H_a e H_b das estruturas sintetizadas, sendo H_a o hidrogênio vicinal do lado polar e H_b o hidrogênio vicinal do lado apolar, ambos mostram acoplamentos com os hidrogênios vicinais e com o núcleo de fósforo, mostrando que há um acoplamento heteronuclear, resultando em multipletos e não tripletos que ocorreriam se não houvesse ocorrido a formação das ligações ao grupo fosfato com os álcoois de cadeia longa e o amino álcool.

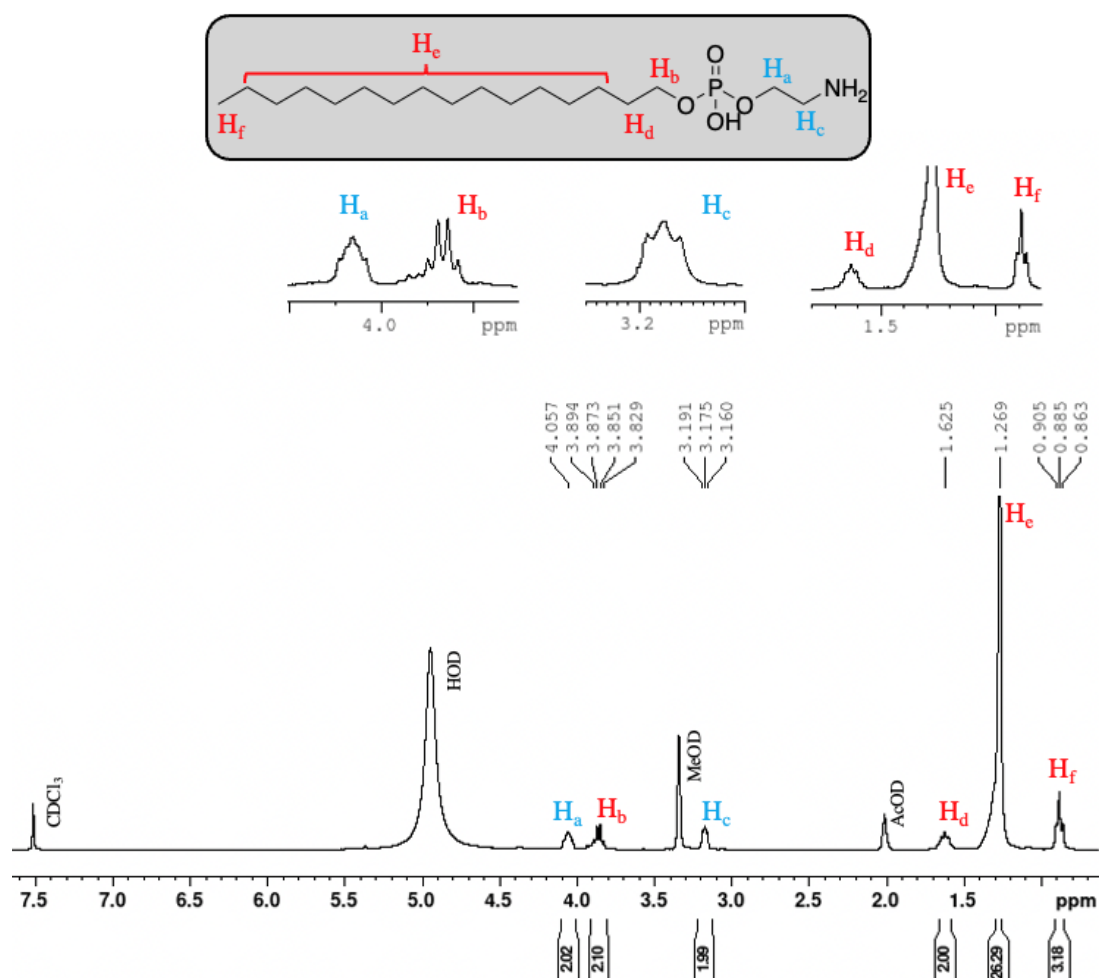


Figura 15. RMN ^1H 300 MHz do composto 2-AE(C16)HF em CDCl_3 (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

O espectro mostrado na Figura 15, aponta os sinais nos seguintes deslocamentos químicos: em δ 4,05 ppm (m, H_a, 2H), δ 3,86 ppm (m, H_b, 2H), δ 3,17 ppm (t, H_c, 2H), δ 1,62 ppm (m, H_d, 2H), δ 1,27 (m, H_e, 26H) e δ 0,88 ppm (t, H_f, 3H). Os deslocamentos e integrais dos sinais são semelhantes ao do composto 2-AE(C12)HF, com a diferença que para o sinal de H_e há uma integração de 26 hidrogênios o que caracteriza o 2-AE(C16)HF com quatro carbonos a mais em sua cadeia alifática.

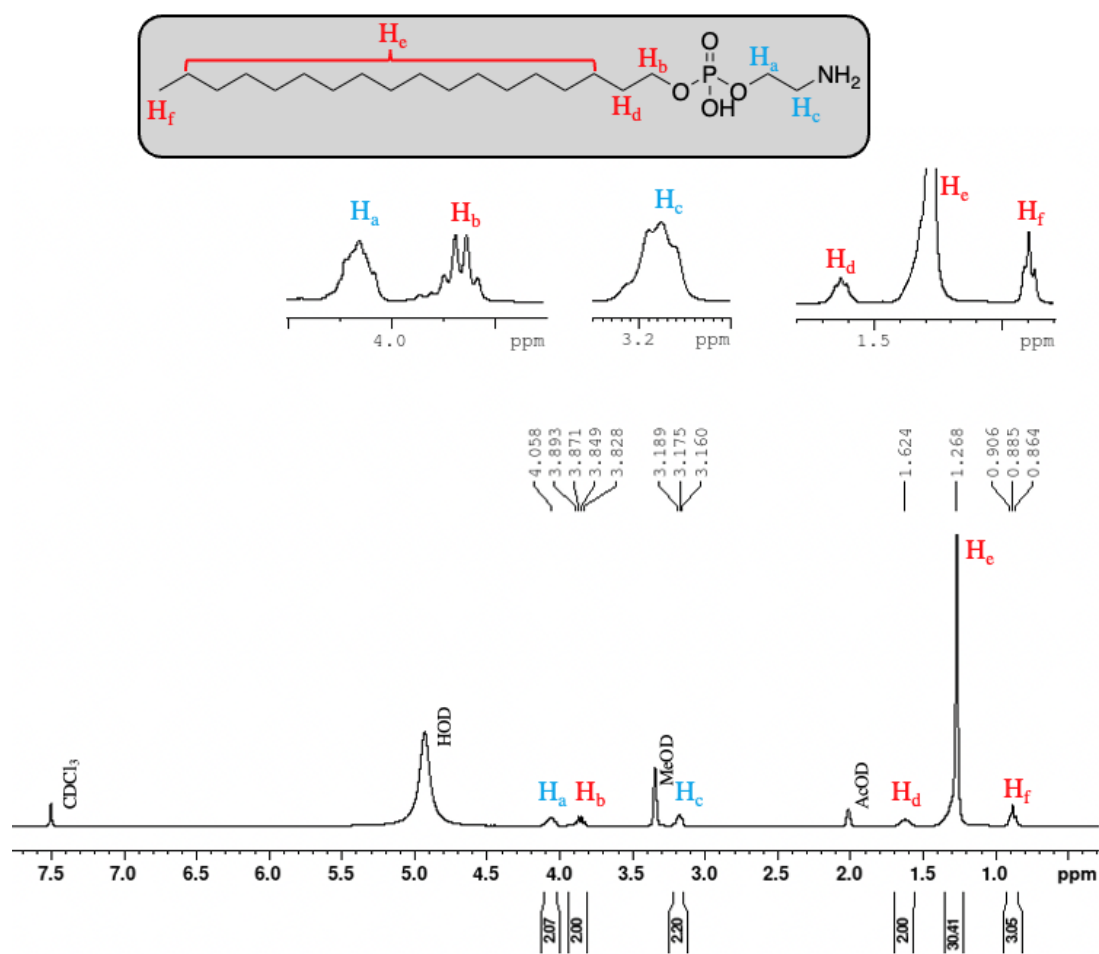


Figura 16. RMN ¹H 300 MHz do composto 2-AE(C18)HF em CDCl₃ (δ 7,51 ppm), MeOD (δ 3,34 ppm), AcOD (δ 2,01 ppm) e D₂O/HOD (δ 5,00 ppm) com proporção de 10:6:1:1.

A Figura 16, apresenta os sinais nos seguintes deslocamentos químicos: em δ 4,05 ppm (m, H_a, 2H), δ 3,85 ppm (m, H_b, 2H), δ 3,17 ppm (t, H_c, 2H), δ 1,62 ppm (m, H_d, 2H), δ 1,26 (m, H_e, 30H) e δ 0,88 ppm (t, H_f, 3H). Novamente os deslocamentos e integrais dos sinais são similares aos dos compostos 2-AE(C12)HF e 2-AE(C16)HF, com a mudança da integração de 30 hidrogênios do sinal de H_e, que distingue o composto 2-AE(C18)HF.

As Figuras 17, 18 e 19 representam os espectros de RMN ^{13}C . Os deslocamentos são maiores que os observados nos espectros de RMN ^1H devido a frequência de ressonância do núcleo de carbono. Os experimentos são executados com desacoplamento dos núcleos de hidrogênio, assim mostram sinais de forma mais simples e evitando a sobreposição de sinais. Contudo, nos três espectros apresentados podem ser observados acoplamentos entre o núcleo de fósforo e os de carbono, acoplamento de duas ligações de distância ($^2J_{\text{CP}}$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-$) e acoplamentos a três ligações de distância ($^3J_{\text{CP}}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-$). Os acoplamentos 2J relacionados aos carbonos C_a e C_b e os 3J pertinentes aos carbonos C_c e C_e .

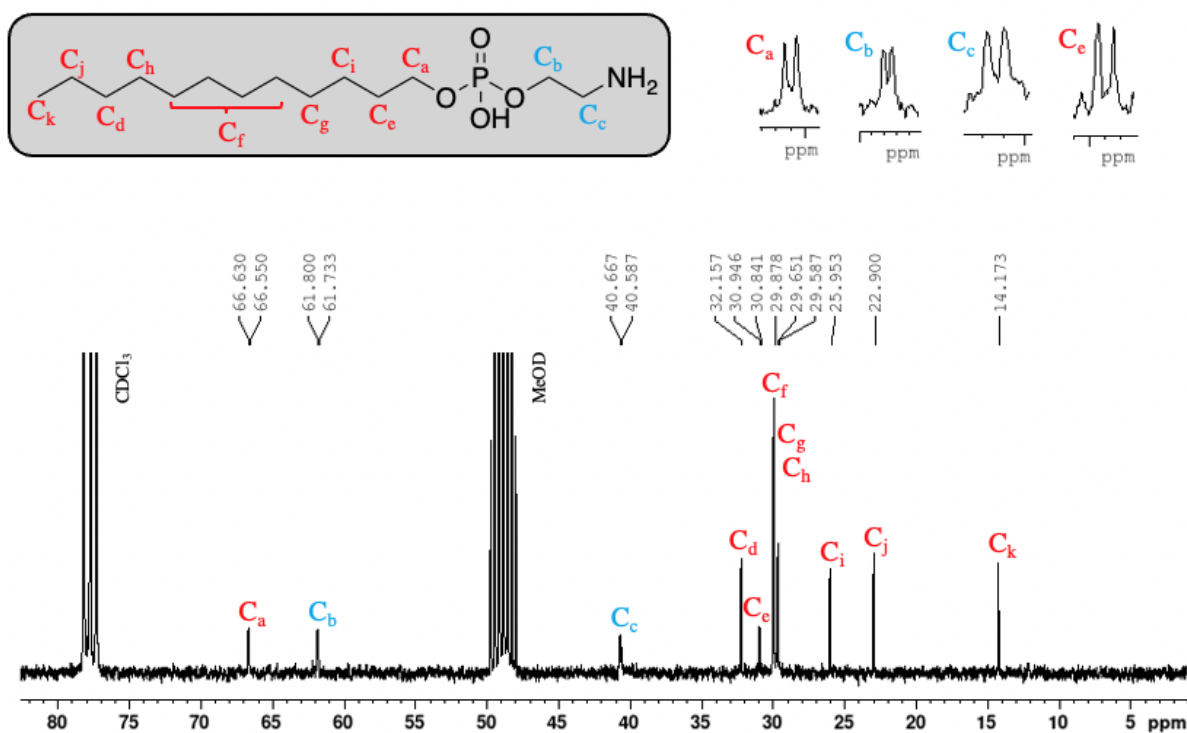


Figura 17. RMN ^{13}C 125 MHz do composto 2-AE(C12)HF em CDCl_3 (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$ com proporção de 10:6:1.

Analisando os espectros de RMN ^{13}C dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF apresentados nas Figuras 17, 18 e 19 respectivamente se nota que os deslocamentos são muito semelhantes, essa similaridade se deve pela modificação sutil na cadeia alquílica. Os sinais de maior interesse são os dos carbonos vicinais ao grupo fosfato (C_a , C_b , C_c e C_e), para observar os acoplamentos heteronucleares. Os sinais dos carbonos C_a , C_b , C_c e C_e mostraram os acoplamentos, como destacado nos espectros na forma

de dubletos, onde, C_a e C_b apresentando acoplamentos 2J e C_c e C_e acoplamentos 3J . Todos os deslocamentos mostrados abaixo são respectivos dos compostos, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF, mantendo a mesma ordem. C_a apresentou δ 66,59, 66,44 e 66,43 ppm, C_b δ 61,76, 61,66 e 61,60 ppm, C_c δ 40,62, 40,70 e 40,72 ppm e C_e δ 30,89, 30,96 e 30,96 ppm, todos representando um carbono cada. Os demais deslocamentos foram C_d δ 32,15, 32,19 e 32,21 ppm, C_f δ 29,87, 29,96 e 29,96 ppm representando 4, 8 e 10 carbonos, respectivamente. C_g δ 29,65, 29,72 e 29,73 ppm, C_h δ 29,58, 29,61 e 29,60 ppm, C_i δ 25,95, 26,02 e 26,02 ppm, C_j δ 22,90, 22,93 e 22,92 ppm, C_k δ 14,17, 14,19 e 14,21 ppm.

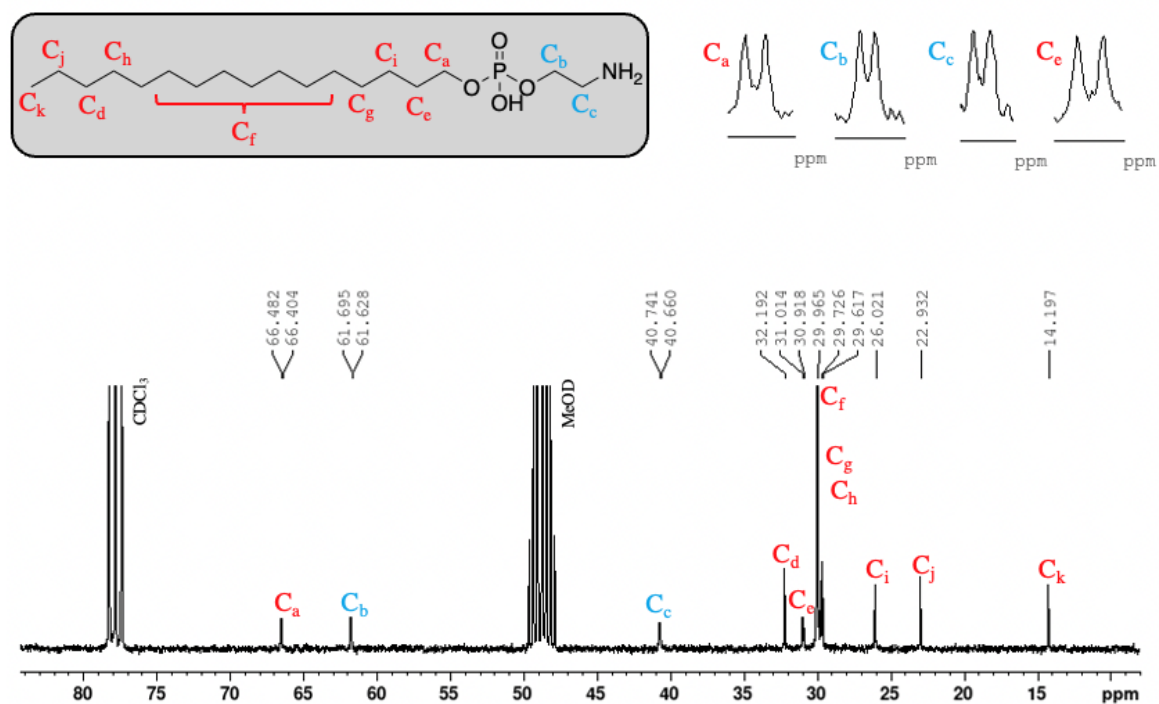


Figura 18. RMN ^{13}C 125 MHz do composto 2-AE(C16)HF em $CDCl_3$ (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e D_2O/HOD com proporção de 10:6:1.

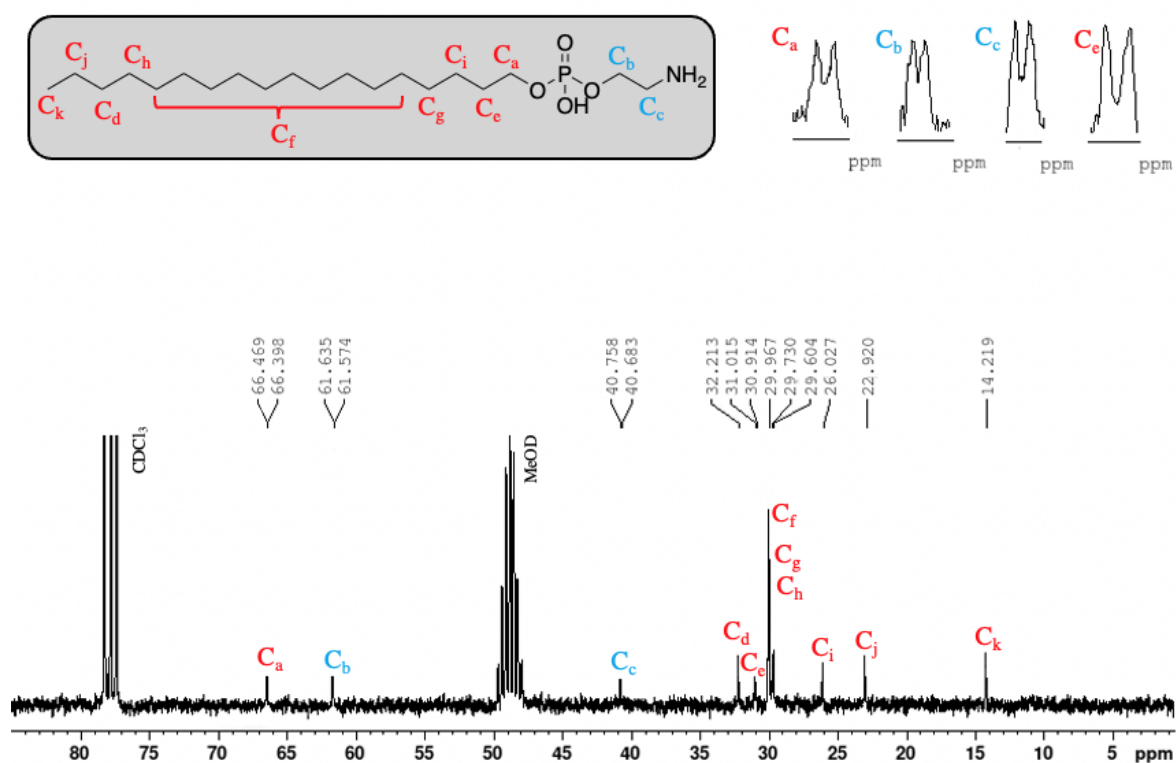


Figura 19. RMN ¹³C 125 MHz do composto 2-AE(C18)HF em CDCl₃ (δ 77,68 ppm), MeOD (δ 48,86 ppm), e D₂O/HOD com proporção de 10:6:1.

Combinando os dados obtidos pelos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C correspondem aos deslocamentos e integrações esperados para cada composto. A distribuição dos sinais nos espectros de carbono está de acordo com os sinais observados na literatura para moléculas fosfatadas e fosfolípidios de acordo com Murari, R. et al., 1982⁴⁸.

4.5. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT

A viabilidade celular foi testada em linhagens não tumorais de células de fibroblastos humanos (FN-1) e células de fibroblasto murino (L929), para se ter uma correlação entre células não tumorais e tumorais. As linhagens tumorais utilizadas foram de células de adenocarcinoma de mama triplo negativo humano (MDA MB-231) e células tumorais de adenocarcinoma de mama murino triplo negativo (4T1).

Todas as linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-BEH₂F (0,781 a 200 mmolL⁻¹) e 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF (1,56 a 100 μmolL⁻¹) diluídas em tampão fosfato (PBS) com pH 7,4 e a citotoxicidade determinada pelo método colorimétrico celular de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Este método é baseado na redução do MTT a cristais de formazan pelas células vivas, através da atividade enzima das succinatos desidrogenases mitocondriais, promovendo mudanças na coloração do MTT, que foi quantificada em um espectrofotômetro.

A determinação da sensibilidade das diferentes doses foi otimizada de acordo com as normas estabelecidas do Instituto Nacional de Câncer, USA (NCI), sendo desta maneira determinadas as atividades citotóxicas das linhagens celulares, nos períodos de 24 e 48 horas. Através deste ensaio colorimétrico foram avaliadas a toxicidade dos compostos em linhagens tumorais e normais para a determinação matemática pela equação da reta para o cálculo da concentração inibitória de 50% (IC_{50%}) através do software Graphpad Prism 9. Os valores da densidade óptica foram normalizados no inverso do Log/10 e expressos em concentração mmolL⁻¹ e μmolL⁻¹.

Desta forma, após 24 horas de crescimento celular, as células se apresentaram na fase exponencial de crescimento, as quais foram cultivadas em microplacas de 96 orifícios com uma concentração de 1x10⁵ células/mL e adicionadas diferentes concentrações dos compostos sintetizados, diluídos em meio de cultura completo, para avaliação da citotoxicidade nos períodos de 24 e 48 horas.

A capacidade de induzir a citotoxicidade e também alterações morfológicas foram analisadas utilizando um microscópio invertido, em que foram capturadas imagens das linhagens celulares estudadas nos tempos de 24 e 48 horas, nas diversas concentrações dos compostos aplicados, 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF.

Os experimentos com o 2-AEH₂F foram aplicados para as quatro linhagens celulares estudadas, os valores de IC_{50%} podem ser visualizados na Figura 20a. A linhagem de fibroblastos humano normal FN-1 tratada com 2-AEH₂F apresentou um IC_{50%} de 55,98 e 41,31 mmolL⁻¹ (24 e 48 horas). As células

de fibroblasto murino normais (L929) exibiram valores de $IC_{50\%}$ de 57,39 e 33,57 $mmolL^{-1}$ (24 e 48 horas). As células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231 tratadas com 2-AEH₂F apresentaram valores de $IC_{50\%}$ de 11,17 $mmolL^{-1}$ para 24 horas e 6,54 $mmolL^{-1}$ para 48h de tratamento. Para a linhagem de adenocarcinoma murino 4T1 os valores obtidos de $IC_{50\%}$ foram de 17,42 e 2,67 $mmolL^{-1}$ para 24 e 48 horas, respectivamente.

Comparando as $IC_{50\%}$ da linhagem FN-1 com os das células MDA MB-231, a linhagem tumoral apresentou valores de $IC_{50\%}$ 5 vezes menores para os tratamentos de 24 e 48 horas. Correlacionando os valores obtidos para a linhagem L929, os valores de $IC_{50\%}$ da linhagem tumoral foram, 3 vezes menor para o período de 24 horas e 12 vezes menor para 48 horas.

A razão das $IC_{50\%}$ das células normais com as células tumorais mostra a especificidade que o composto demonstra sobre as células tumorais, viabilizando um tratamento específico e com grande potencial farmacêutico. O estudo com as linhagens murina possibilita a continuação dos estudos do composto 2-AEH₂F em experimentos *in vivo*. Contudo, a concentração na escala de $mmolL^{-1}$ é alta para a terapêutica, estudos realizados por nosso grupo mostram que o 2-AEH₂F pode ser utilizado em associação em menores dosagens potencializando outros tratamentos^{12,49-52}.

Em células leucêmicas humanas da linhagem da leucemia mielóide crônica (K562), o composto 2-AEH₂F promove apoptose independente do perfil de expressão de genes resistência (MDR⁺). Estudos recentes, mostraram que o tratamento com o composto 2-AEH₂F em células leucêmicas K562 foi capaz de modulação na via intrínseca da apoptose promovendo a diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumento de p53, Bax, liberação do citocromo c e conseqüentemente fosforilação da caspase-3⁵³.

O tratamento com N-2-HEB foi avaliado nas quatro linhagens estudadas, que podem ser observados na Figura 20b. As células de fibroblasto humano normais FN-1 apresentaram valores de $IC_{50\%}$ de 41,11 $mmolL^{-1}$ (24 horas) e 33,60 $mmolL^{-1}$ (48 horas). A linhagem celular murino normal L929 apresentou $IC_{50\%}$ de 29,88 e 13,92 $mmolL^{-1}$ (24 e 48 horas). Para as células MDA-MB-231 o $IC_{50\%}$ obtido foi de 5,30 (24 horas) e 5,49 $mmolL^{-1}$ (48 horas). Já as células de

adenocarcinoma de mama murino 4T1 foram obtidos valores de $IC_{50\%}$ de 15,09 $mmolL^{-1}$ (24 horas) e 6,68 $mmolL^{-1}$ (48 horas).

Analisando a linhagem humana não tumoral (FN-1) com a tumoral (MDA-MB 231), foi notado uma razão de citotoxicidade de 7 vezes menor para o período de 24 horas e 6 vezes para 48 horas para as células tumorais MDA-MB 231 comparadas às células normais FN-1. Os resultados mostraram que o composto N-2-HEB para as linhagens murino (4T1 e L929) foi mais citotóxica para as células tumorais com uma razão da concentração de 2 vezes menor para as células tumorais para ambos os tempos de tratamento. O composto N-2-HEB mostra a mesma especificidade citotóxicas para as linhagens tumorais, mesmo comportamento observado para o composto 2-AEH₂F.

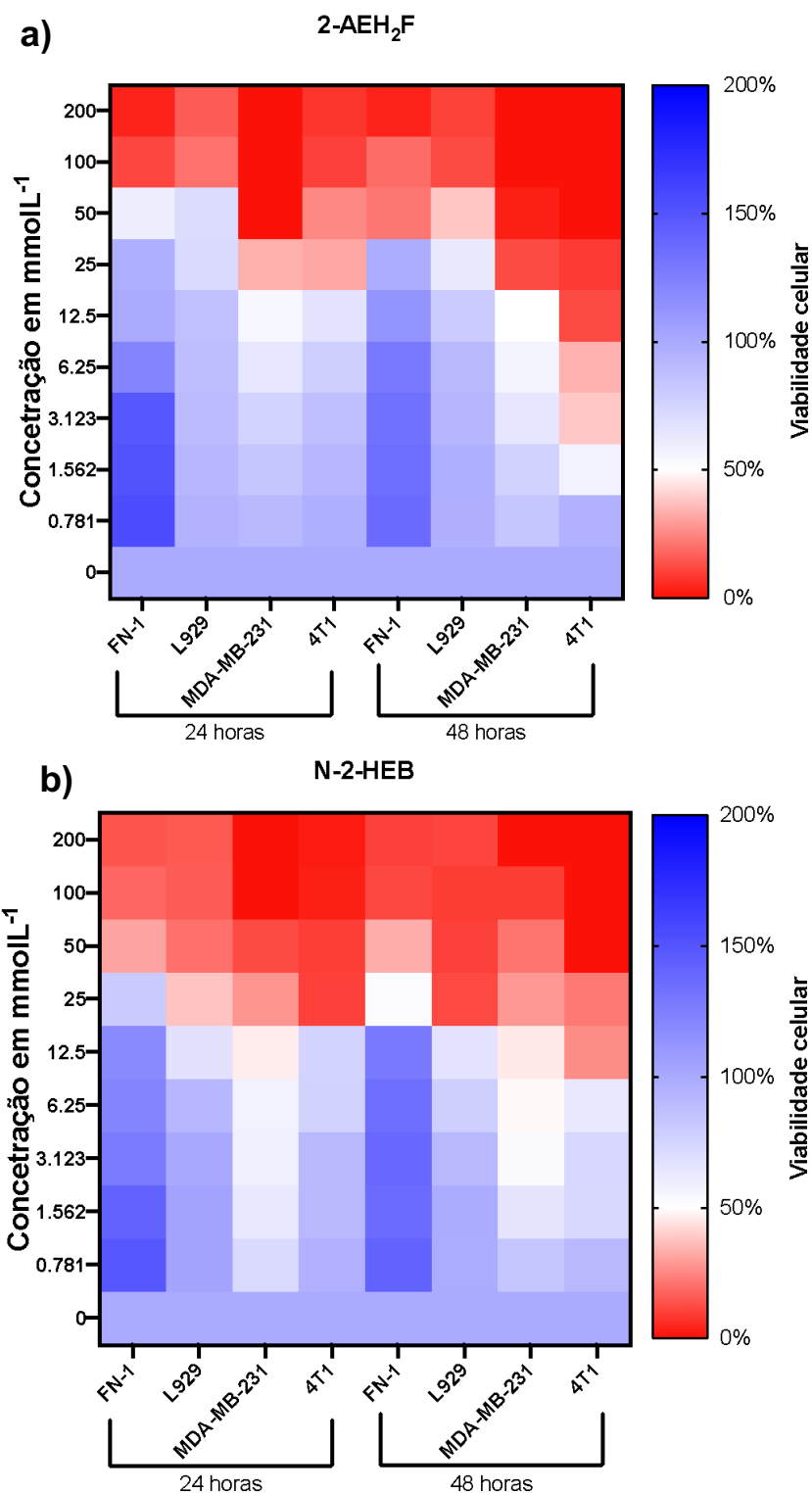


Figura 20. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de 2-AEH₂F e N-2-HEB, pelo período de 24 e 48 horas. (a) Média da viabilidade de células FN-1, L929, MDA-MB-231 e 4T1 após tratamento com o composto 2-AEH₂F. (b) Média da viabilidade de células FN-1, L929, MDA-MB-231 e 4T1 após tratamento com o composto N-2-HEB.

Destacamos que em concentrações abaixo de 25 mmolL^{-1} ambos os compostos, 2-AEH₂F e N-2-HEB para as linhagens celulares não tumorais FN-1 e L929 não demonstrou efeito citotóxico

Em concentrações abaixo de 25 mmolL^{-1} ambos os compostos, 2-AEH₂F e N-2-HEB para as linhagens celulares não tumorais FN-1 e L929 o tratamento promoveu um aumento no número de células, indicativo de resposta proliferativa para ambos os compostos, conforme apresentado nas figuras 21 (FN-1 tratada com 2-AEH₂F), 22 (FN-1 tratada com N-2-HEB), 23 (L929 tratada com 2-AEH₂F) e 24 (L929 tratada com N-2-HEB).

O aspecto das análises cito morfológicas das células de fibroblastos humanos normais utilizadas no teste de toxicidade com o 2-AEH₂F e o N-2-HEB, observa-se a viabilidade celular predominante no grupo controle das células em cultura antes do tratamento com o 2-AEH₂F e com N-2-HEB, após 24 horas do tratamento, não ocorreu alterações morfológicas dignas de nota, como desprendimento celular, debris, agregados celulares ou retração e formação de vacúolos no interior do citoplasma.

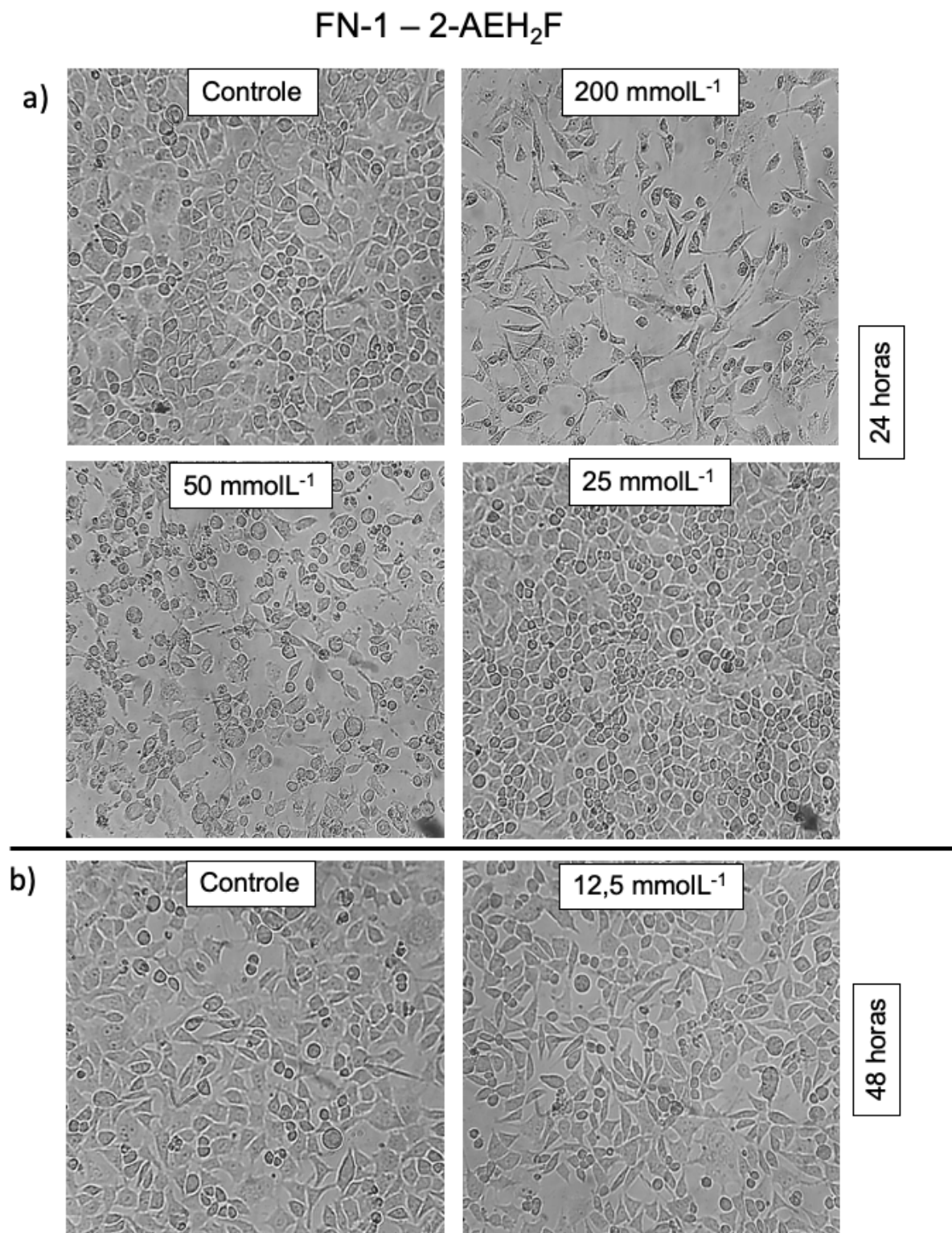


Figura 21. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais de fibroblastos humanos FN-1 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

FN-1 – N-2-HEB

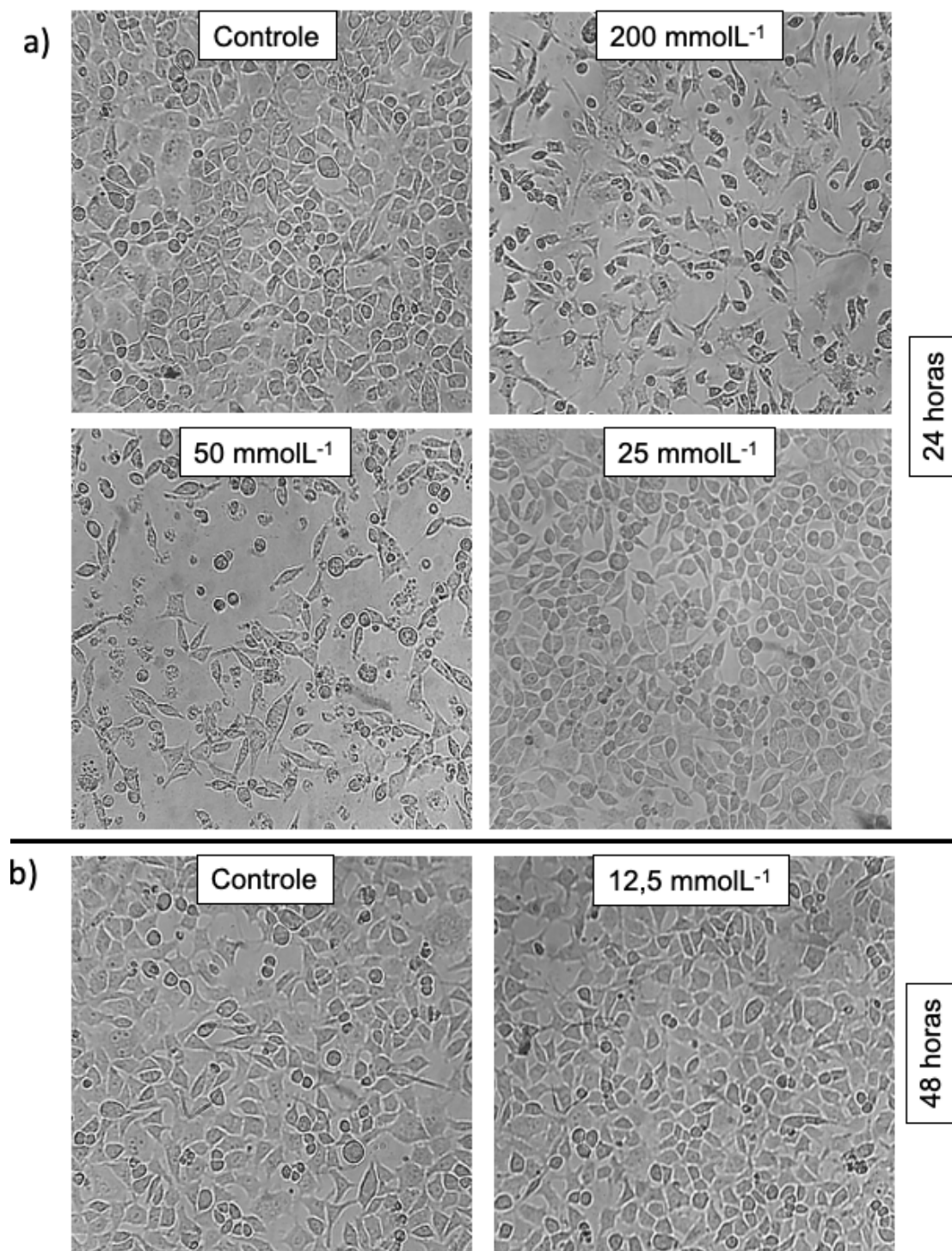


Figura 22. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos humanos FN-1 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

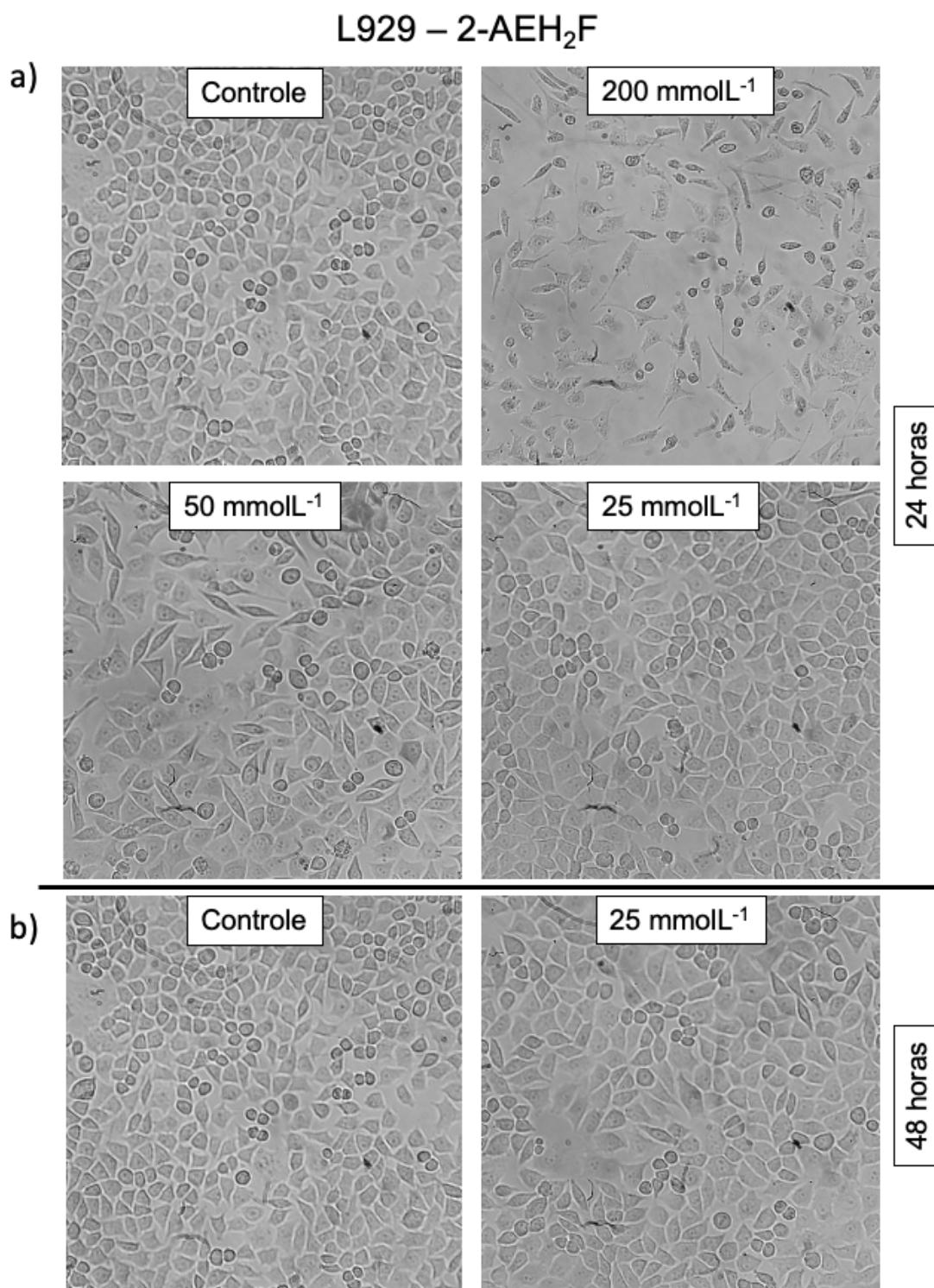


Figura 23. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos murinos L929 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

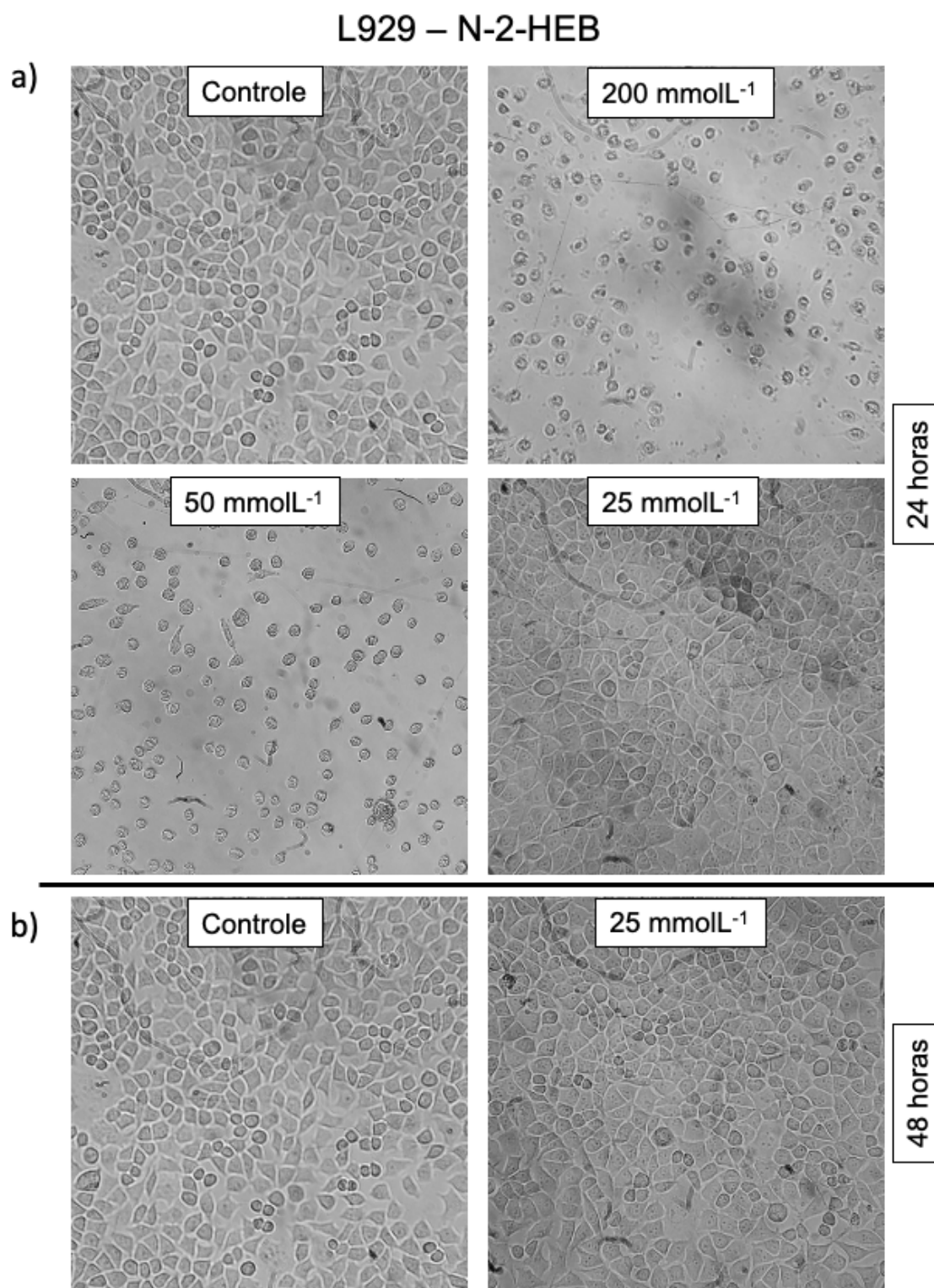


Figura 24. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células normais fibroblastos murinos L929 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

Entre os efeitos de toxicidade causados pelos compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB que influenciam na viabilidade celular, bem como as alterações na morfologia da célula tumoral murina 4T1 após a exposição nas concentrações de 0,781 a 200 mM, foram capturadas em microscópio de luz invertido com aumento de 40X. Observa-se a retração dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de agregados multicelulares, que aumentaram de tamanho quando expostos às maiores concentrações que se acentuaram após 48 horas de tratamento. Os aspectos citomorfológicos das alterações provocadas pelo tratamento com a 2-AEH₂F e o N-2-HEB estão apresentados nas figuras 25 (MDA-MB 231 tratada com o composto 2-AEH₂F), 26 (MDA-MB 231 tratada com o composto N-2-HEB), 27 (4T1 tratada com o composto 2-AEH₂F) e 28 (4T1 tratada com o composto N-2-HEB).

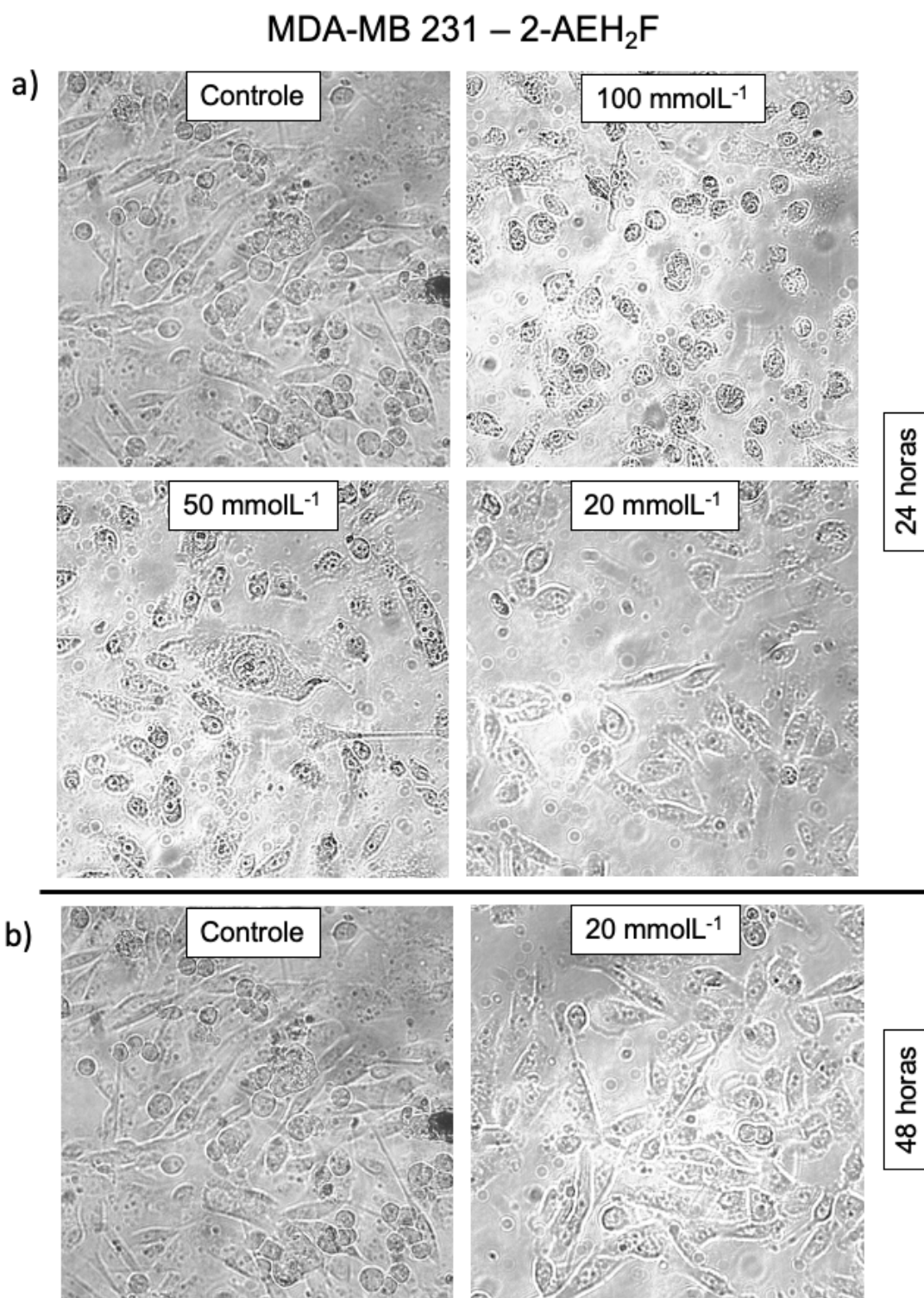


Figura 25. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 231 tratadas com o composto 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

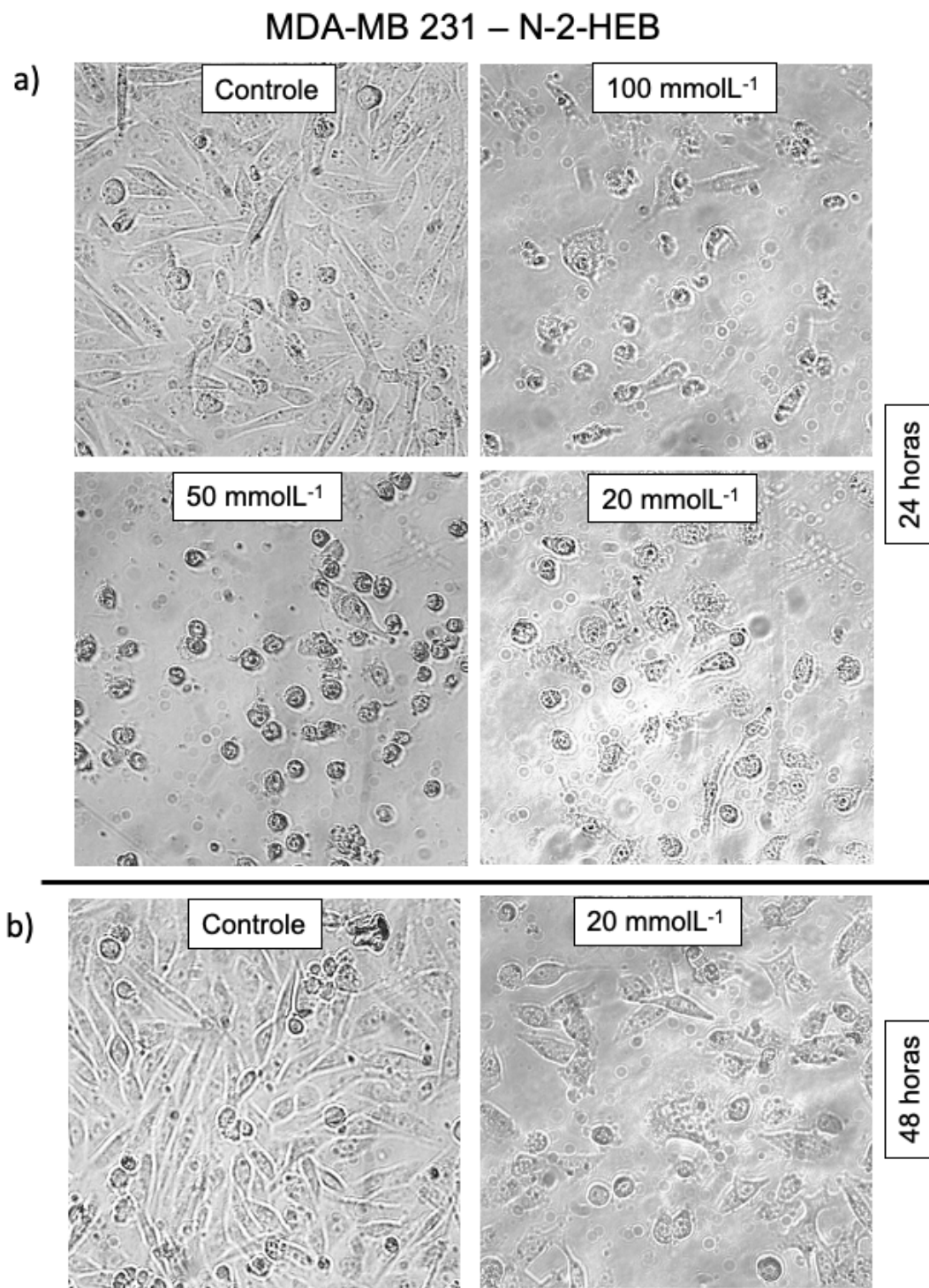


Figura 26. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 231 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

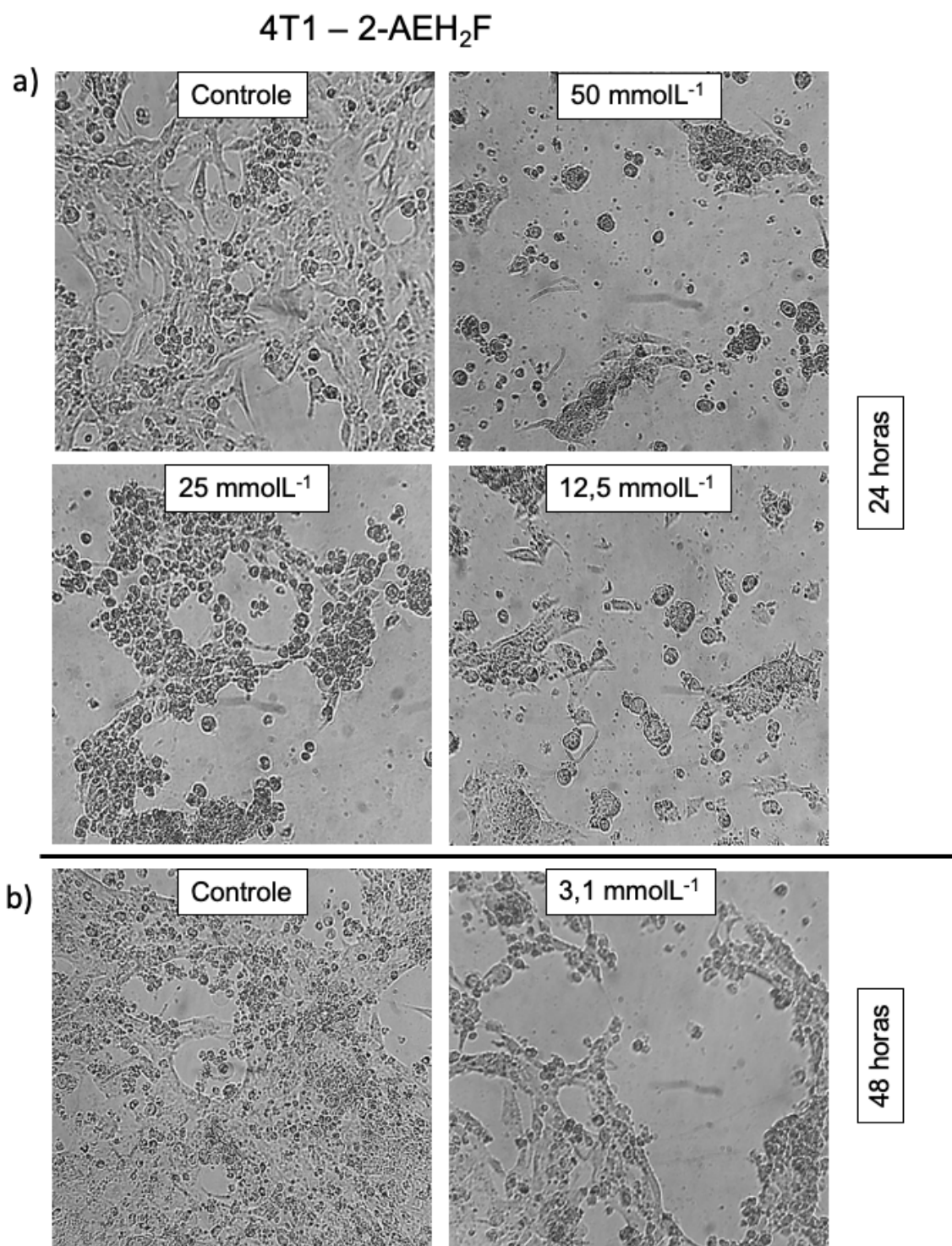


Figura 27. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1 tratadas com 2-AEH₂F em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

4T1 – N-2-HEB

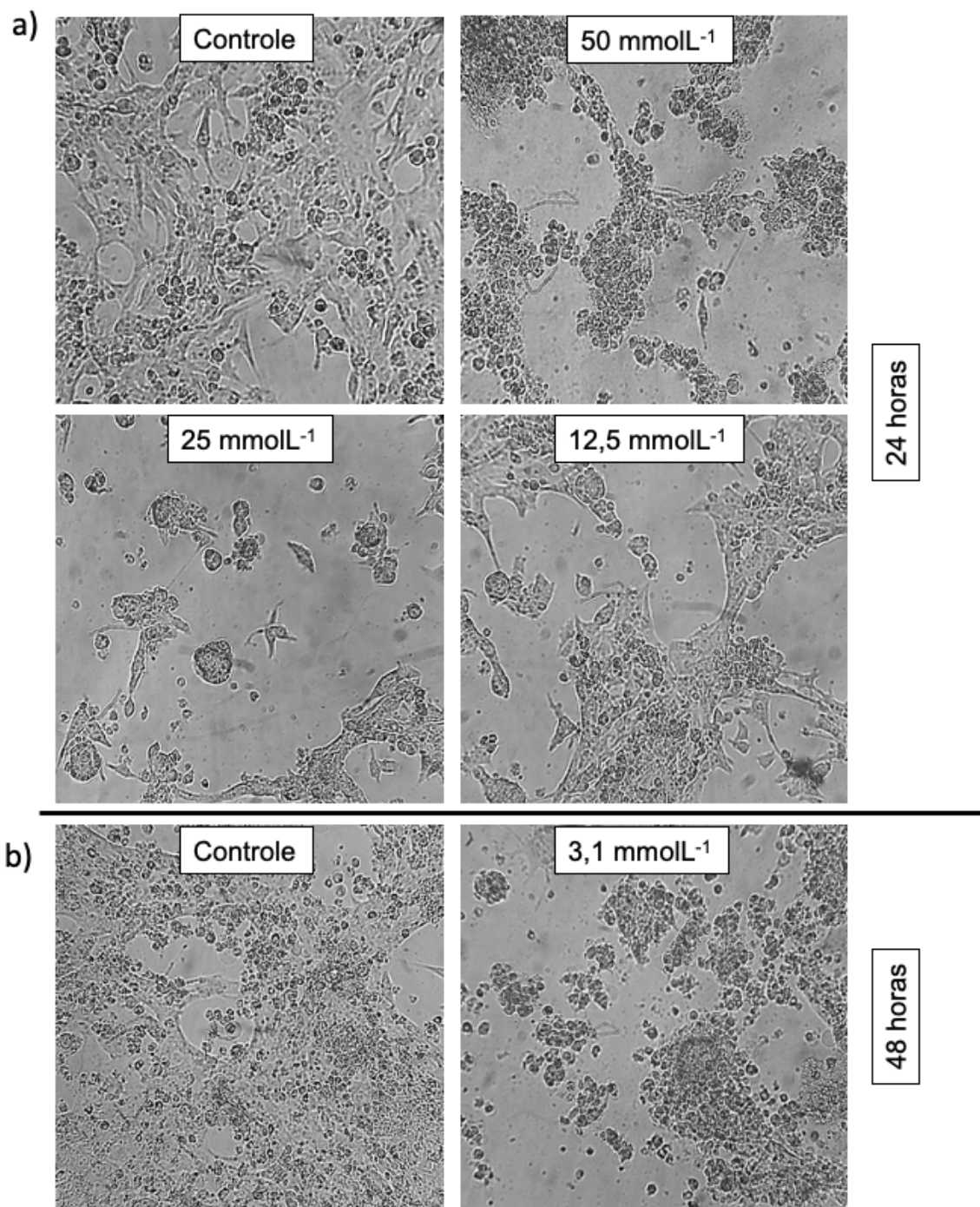


Figura 28. Fotomicrografia representativa das alterações citológicas de células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1 tratadas com o composto N-2-HEB em diferentes concentrações no período de 24 e 48h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

O composto 2-BEH₂F não mostrou efeitos de citotoxicidade (Figura 29) em concentrações que seu análogo não fosfatado (N-2-HEB), e em concentrações abaixo de 50 mmolL⁻¹ promoveu crescimento celular acentuado para células normais (FN-1, L929) e nenhuma modificação nas células tumorais (MDA-MB-231 e 4T1), Figura 30. Assim, o composto foi reservado para futuros estudos sobre seus efeitos proliferativos em células normais.

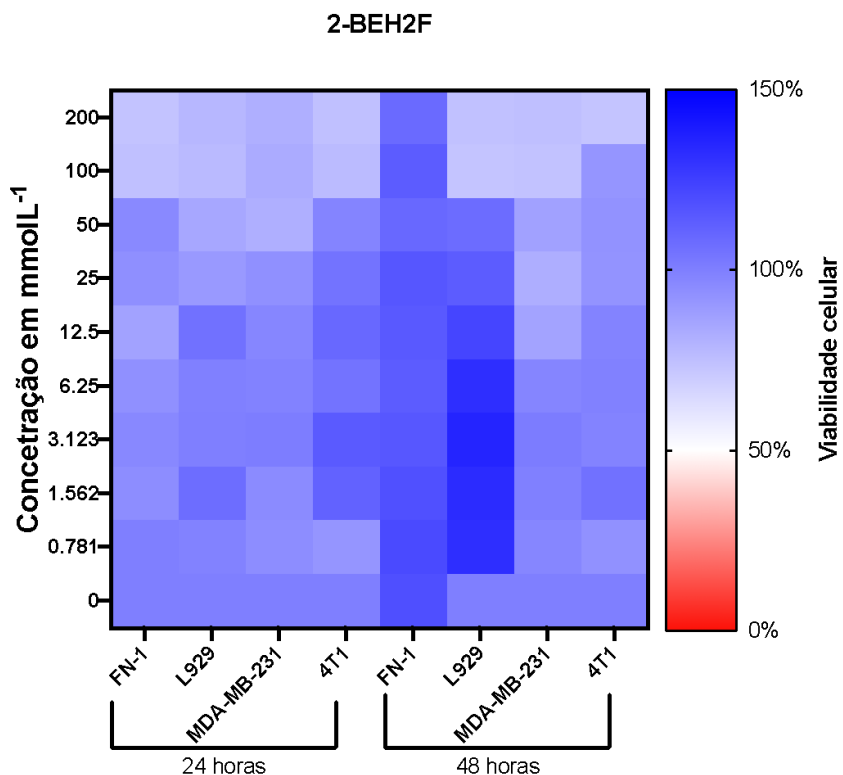


Figura 29. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto 2-BEH₂F, pelo período de 24 e 48h.

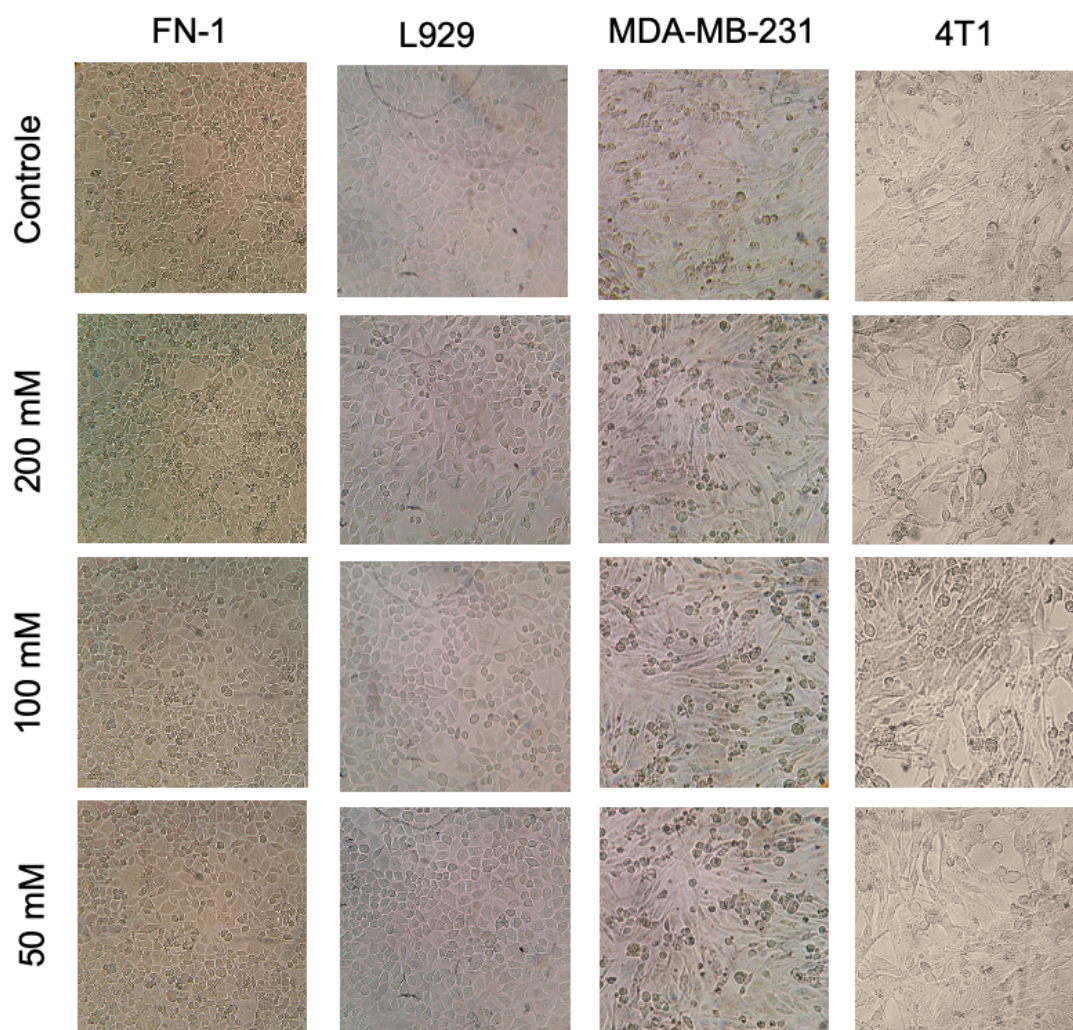


Figura 30. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-BEH₂F em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

O composto 2-AE(C12)HF apresentou valores de IC_{50%} para as linhagens tumorais de 91,57 e 99,78 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) para a linhagem 4T1 e 57,68 e 63,00 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) para a MDA-MB-231. Contudo, os valores obtidos para as linhagens não tumorais foram menores com IC_{50%} de 32,41 e 32,95 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) para FN-1 e 68,84 e 64,57 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) para L929, mostrando que o composto não foi seletivo para as linhagens tumorais (Figura 31a). O mesmo comportamento foi encontrado para o composto 2-AE(C16)HF (Figura 31b).

Os aspectos citomorfológicos das alterações provocadas pelo tratamento com os compostos 2-AE(C12)HF e 2-AE(C16)HF estão apresentados nas Figuras 32 e 33.

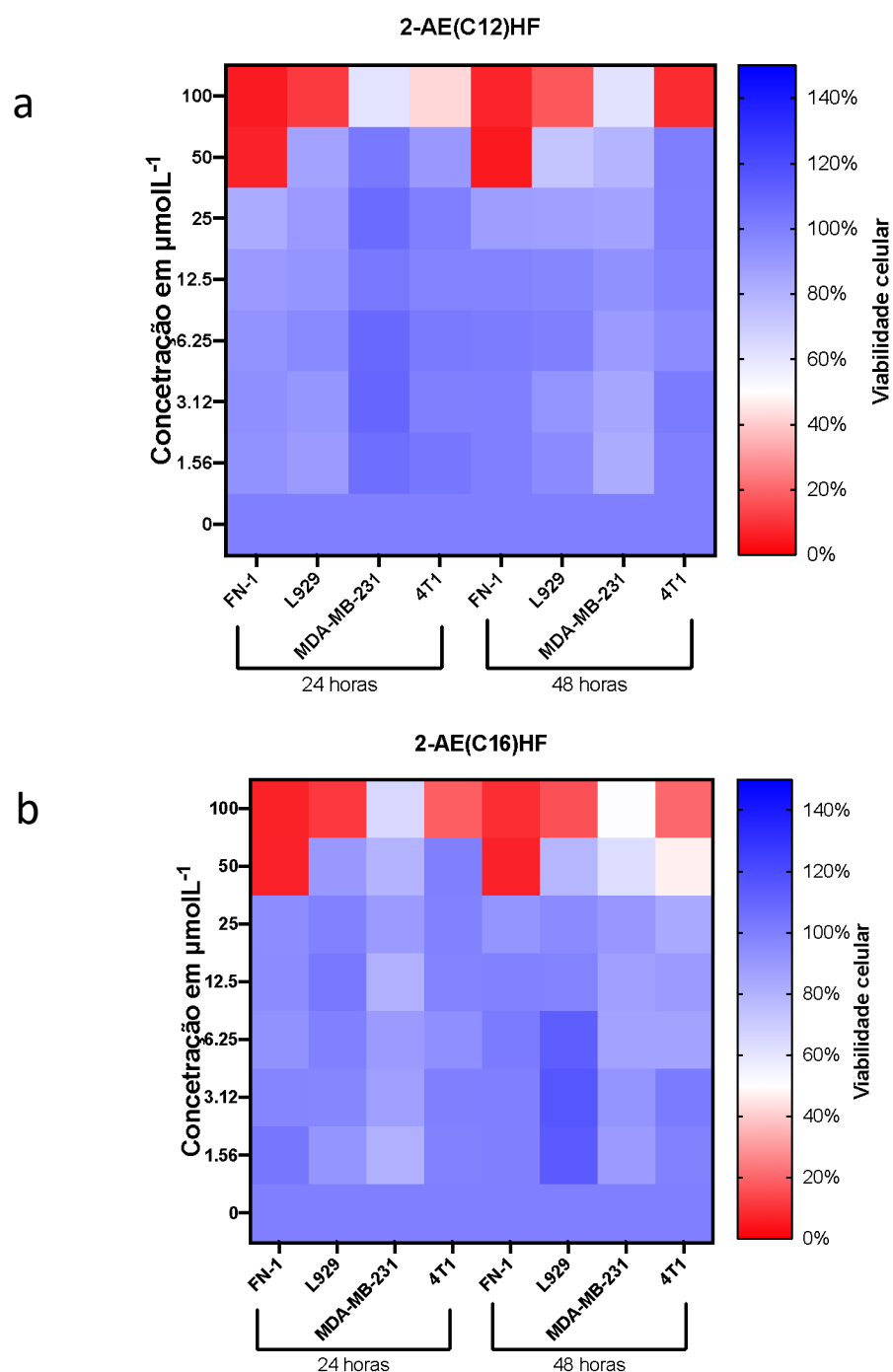


Figura 31. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos 2-AE(C12)HF e 2-AE(C16)HF, pelo período de 24 e 48h. (a) Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1 após tratamento com o composto 2-AE(C12)HF. (b) Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1 após tratamento com o composto 2-AE(C16)HF.

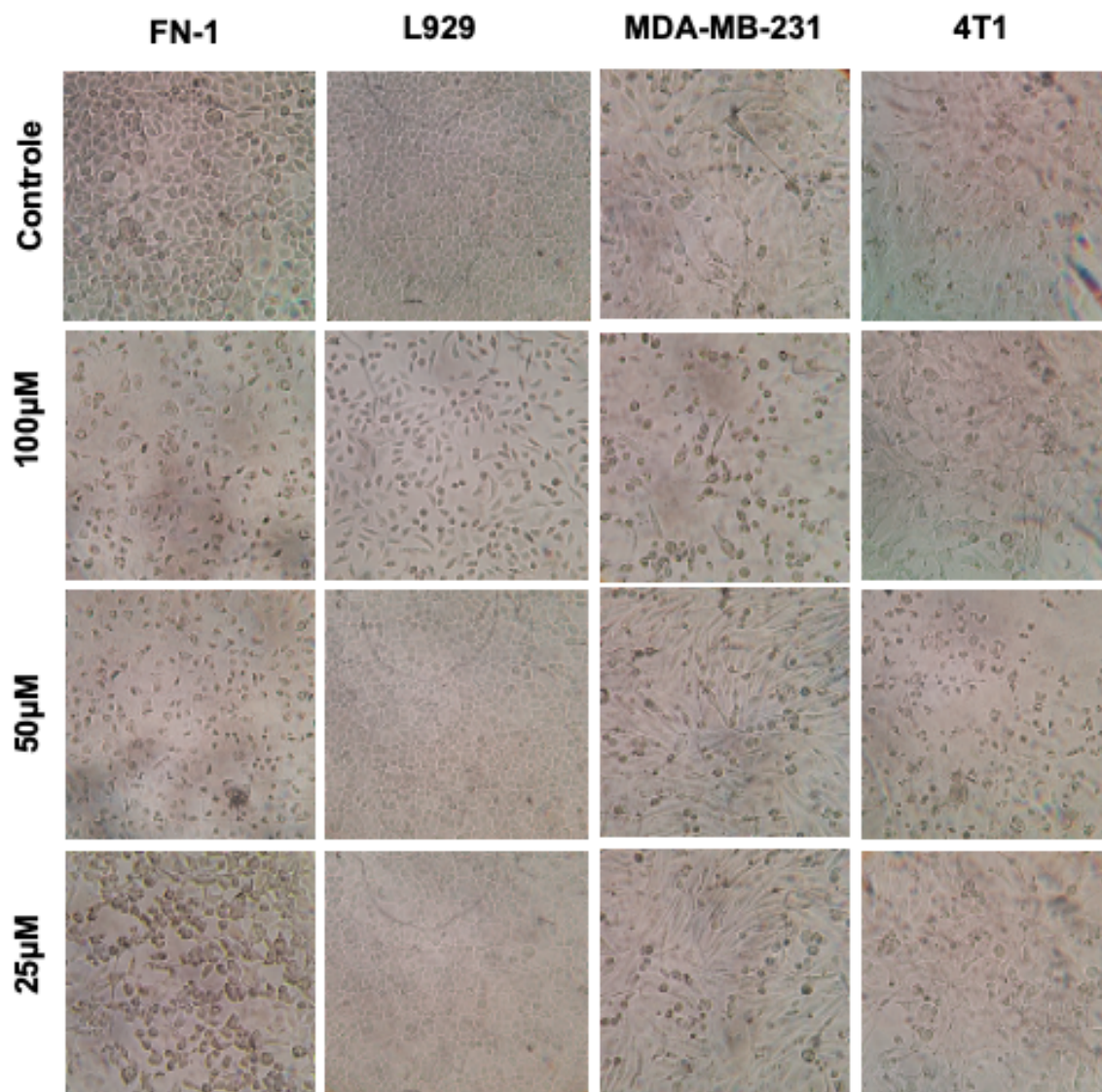


Figura 32. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C12)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

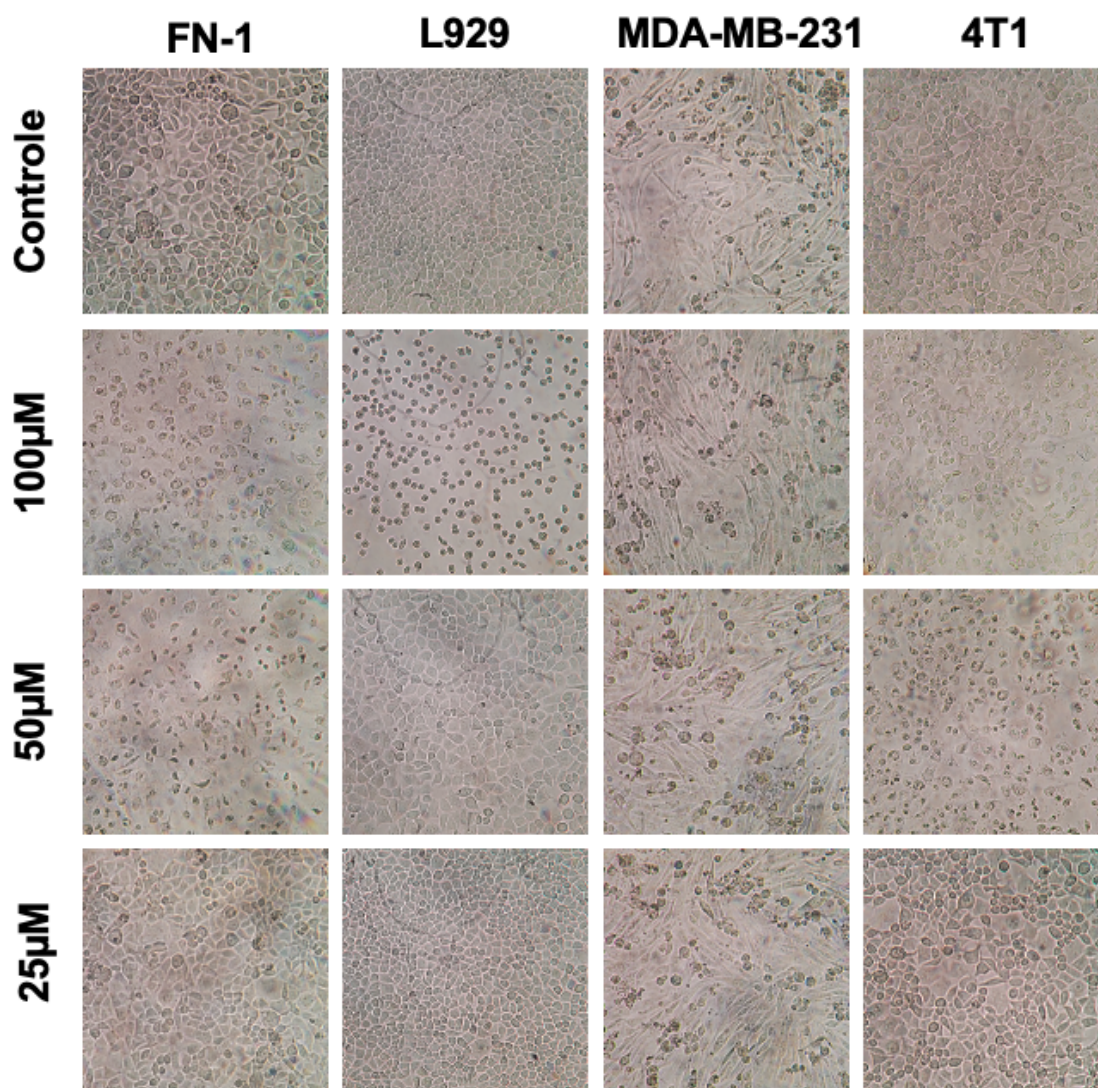


Figura 33. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C16)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

A concentração inibitória para o composto 2-AE(C18)HF teve um comportamento diferente dos seus análogos com cadeia alquílica menor. Este composto apresentou uma citotoxicidade maior para as células tumorais em relação às células não tumorais. O valor de $IC_{50\%}$ para linhagem tumoral humana MDA-MB-231 foi de 31,15 e 48,93 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) e para 4T1 40,66 e 43,40 μmolL^{-1} (24 e 48 horas). Para as células normais fibroblastos humanos FN-1 foram de 60,81 e 52,58 μmolL^{-1} (24 e 48 horas) e para os fibroblastos murinos L929 90,09 e 69,51 μmolL^{-1} (24 e 48 horas). A citotoxicidade para as células tumorais humanas e murinas foi cerca de 2 vezes maior comparada às

não tumorais (Figura 34). Os aspectos morfológicos podem ser observados na Figura 37.

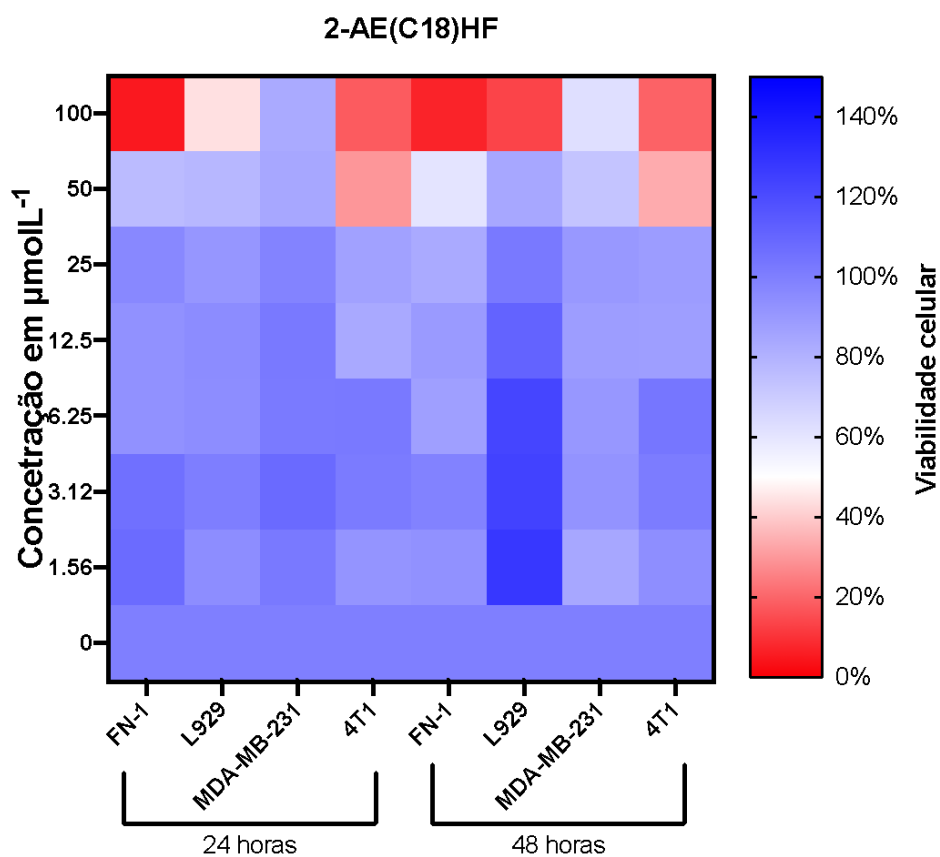


Figura 34. Mapa de calor (Heat Map) da determinação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais pelo método colorimétrico MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto 2-AE(C18)HF, pelo período de 24 e 48h. Média da viabilidade de células tumorais 4T1, MDA MB-231 e normais L929 e FN-1.

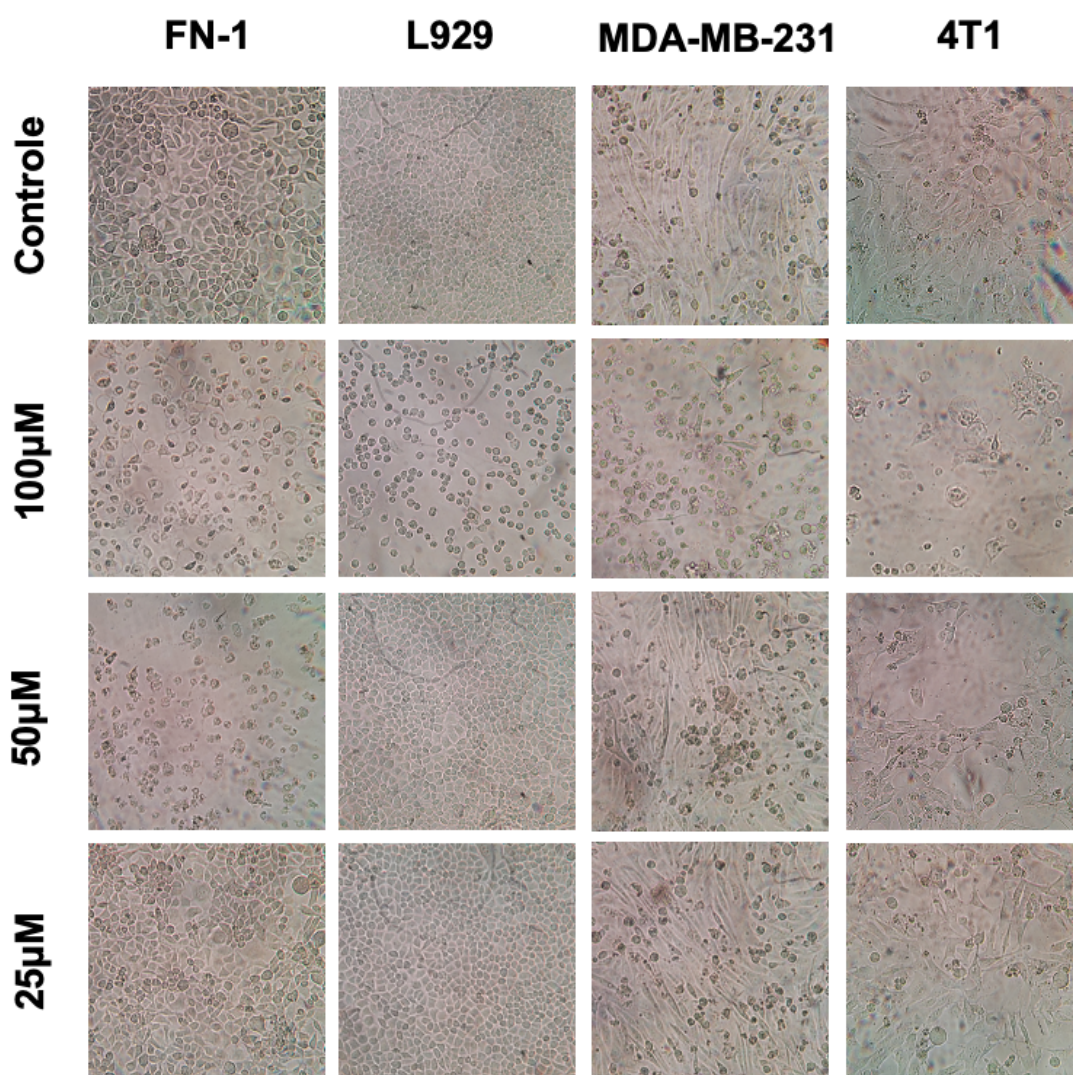


Figura 35. Fotomicrografias representativas das alterações citológicas das linhagens celulares tratadas com o composto 2-AE(C18)HF em diferentes concentrações no período de 24h. Imagens obtidas em microscópio invertido Zeiss, aumento 40X.

Os valores das $IC_{50\%}$ foram tabelados, distinguindo por linhagens não tumorais e linhagens tumorais e subdivididos pelas linhagens celulares e pelos períodos de tratamento para todos os compostos sintetizados (Tabela 2). Desta forma, foi possível fazer uma avaliação mais fácil entre as citotoxicidades e a especificidades de cada composto.

Tabela 2. Valores de IC_{50%} para células de fibroblasto humano normal FN-1, células de fibroblasto murino L929, células tumorais de mama triplo negativo humano MDA MB-231 e células tumorais de adenocarcinoma de mama murino triplo negativo 4T1, tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-BEH₂F, nos períodos de 24 e 48 horas.

Compostos	Linhagens não tumorais				Linhagens Tumorais				
	FN-1		L929		MDA-MB-231		4T1		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
2-AEH₂F	55,98	41,31	57,39	33,57	11,17	6,54	17,42	2,67	mmolL ⁻¹
N-2-HEB	41,11	33,60	29,88	13,92	5,30	5,49	15,09	6,68	mmolL ⁻¹
2-BEH₂F	x	x	x	x	x	x	x	x	mmolL ⁻¹
2-AE(C12)HF	32,41	32,95	68,84	64,57	57,68	63,00	91,57	99,78	μmolL ⁻¹
2-AE(C16)HF	35,74	34,60	71,37	67,56	52,21	48,22	86,45	48,67	μmolL ⁻¹
2-AE(C18)HF	60,81	52,58	90,09	69,51	31,15	48,93	40,66	43,42	μmolL ⁻¹

X = sem efeito de toxicidade

Resultados anteriores obtidos por nosso grupo em células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1 utilizando uma solução contendo mistura de etanolamina, fosfoetanolamina, bisfosfoetanolamina e diversos carbonatos em de pH 7,2, mostraram efeitos citotóxicos dependentes da concentração e tempo de tratamento. Nas concentrações de 10 a 100 mmolL⁻¹ nos tempos de 24 e 48 horas, foram observados efeitos deletérios sobre as células tumorais, como os aspectos morfológicos de lise e a formação de debri celular no sobrenadante, a partir da concentração de 30 mmolL⁻¹, com a obtenção da IC_{50%} no valor de 40 mmolL⁻¹. Por outro lado, o tratamento por 48 horas, neste tipo celular foi observado toxicidade maior com IC_{50%} de 19,47 mmolL⁻¹ e formação de debri a partir de 10 mmolL⁻¹ 49. Nossos resultados utilizando novas rotas de síntese e sistemas de purificação onde há uma quantidade inferior de etanolamina (aproximadamente 3%), ocorreu aumento significativo sobre seus efeitos em alvos moleculares envolvidos na citotoxicidade em concentrações inferiores às observados em trabalhos anteriores, o que demonstra a efetividade da resposta antiproliferativa seletiva para as linhagens tumorais dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AEH(C18)HF.

Contudo, o tratamento anteriormente empregado (mistura de 2-AEH₂F, etanolamina e bisfosfoetanolamina) em células de fibroblastos humanos normais

FN-1 não apresentou o mesmo efeito citotóxico observado nas células de tumorais de adenocarcinoma de mama murino 4T1 e nas células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, o que também foi detectado nas preparações com os compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB e 2-AE(C18)HF⁵⁰. Ressalvo, que em fibroblastos em baixas concentrações tratadas com estes compostos foram capazes de induzir proliferação, fato que até o momento ainda não tinha sido relatado por nosso grupo de pesquisa.

Laveli-Silva, et. al, 2017⁵⁰ e Cabral, L. et al., 2021^{51,52} demonstraram que em células tumorais de mama triplo negativo humano MDA-MB-231, não possuem a expressão dos receptores hormonais estrógeno (ER), progesterona (PR) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano HER2, que são alvos moleculares para agentes terapêuticos de forma responsivas ao tratamento com os compostos 2-AEH₂F independentemente da expressão dos receptores hormonais. Os compostos sintetizados neste projeto mostraram a mesma característica, sendo eles, o 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF.

4.6. Análise das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo

As células de fibroblasto humano normais FN-1, quando tratadas com o 2-AEH₂F apresentaram alterações consideráveis na distribuição das fases do ciclo celular, com redução do número de células na fase G₀/G₁ e aumento da fase G₂/M, com valores percentuais de 27,57±1,76% e 23,66±1,95% respectivamente (Figura 36). O DNA fragmentado das células normais FN-1 quando tratadas nas concentrações de IC_{50%} das células tumorais MDA MB-231, não apresentou aumento significativo. Para os tratamentos nas concentrações das células tumorais murinas 4T1, há um aumento significativo de 16,3±1,6% de DNA fragmentado.

O composto N-2-HEB apresentou uma diminuição de 24,83±2,89% na fase G₀/G₁ e um aumento na fase S de 17,07±4,98% para a linhagem celular FN-1. Não ocorreram alterações significativas para fase G₂/M e DNA fragmentado. O composto 2-BEH₂F não promoveu nenhuma mudança em nenhuma das fases do ciclo celular das células FN-1(Figura 36). A concentração

do tratamento com N-2-HEB foi o do $IC_{50\%}$ das células tumorais MDA MB-231, $11,17\text{mmolL}^{-1}$.

O tratamento com os diésteres de fósforo 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF, das células normais FN-1, promoveram uma diminuição na fase S de $9,81\pm 1,05\%$, $9,25\pm 2,36\%$ e $12,31\pm 0,67\%$ respectivamente. Também provocaram aumento na fase G2/M com valores percentuais de $8,41\pm 0,71\%$ (2-AE(C12)HF), $12,72\pm 1,58\%$ (2-AE(C16)HF) e $11,49\pm 1,73\%$ (2-AE(C18)HF). Não houve modificação significativas para fase G0/G1 e DNA fragmentado quando as células FN-1 foram tratadas com os diésteres (Figura 37). As concentrações dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF foram de $57,69$, $52,21$ e $31,15\ \mu\text{molL}^{-1}$, respectivamente.

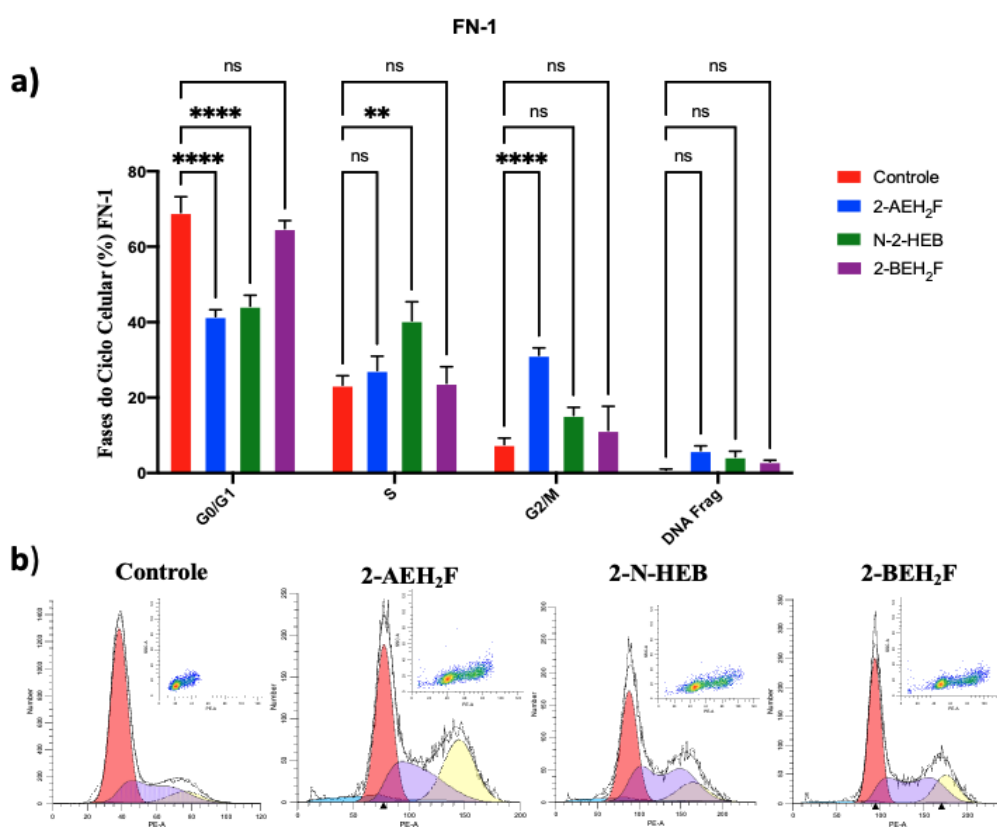


Figura 36. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos humanos FN-1. As células foram tratadas nos valores de $IC_{50\%}$ dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas obtidos em citômetro de fluxo representativos da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

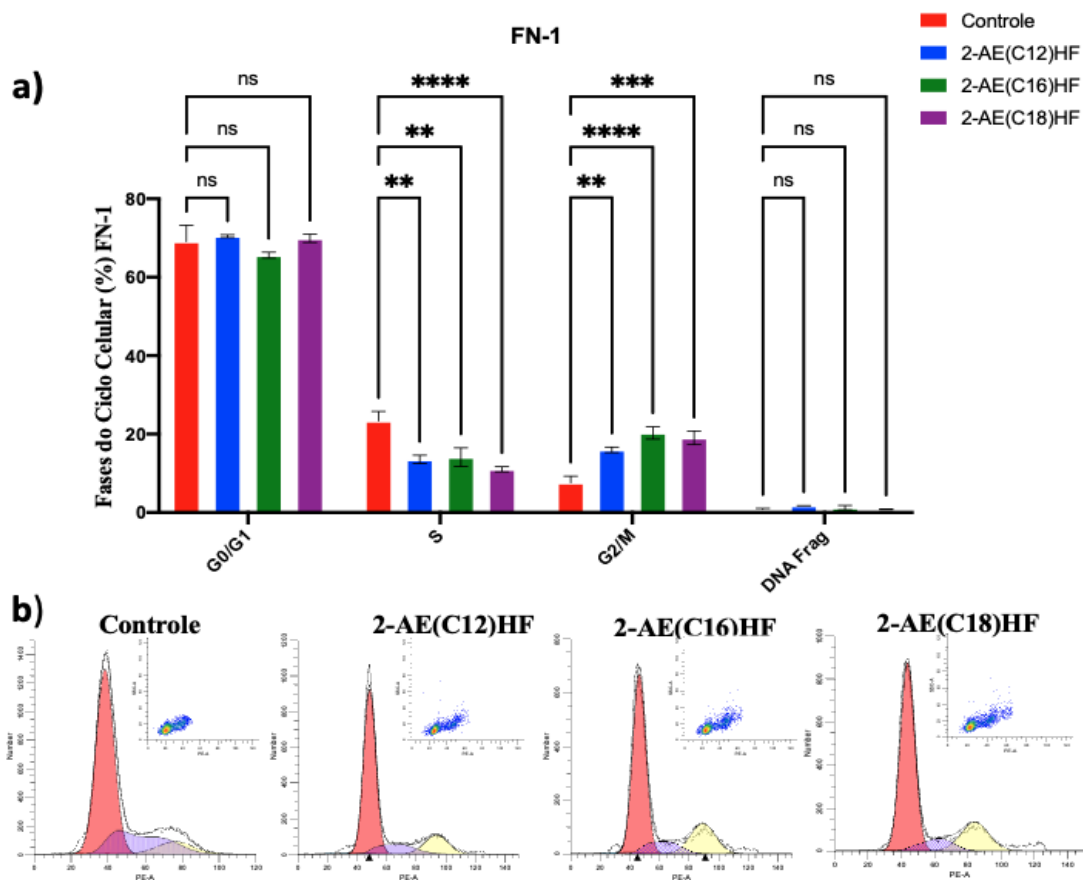


Figura 37. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos humanos FN-1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} com os compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores de p significativos * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 ****p < 0,0001. ns= não significativo.

A distribuição das células fibroblastos murino normais L929 nas diferentes fases do ciclo celular não mostrou alterações percentuais, entre os grupos de células não tratadas (controle) e tratadas com as concentrações de IC_{50%} da linhagem de adenocarcinoma murino 4T1 para os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-BEH₂F. Não foram encontradas alterações na cinética de crescimento e distribuição nas fases G0/G1, S e G2/M (Figura 38).

O ciclo celular das células normais murino L929 tratadas com os diésteres alteraram as fases do ciclo celular. O 2-AE(C12)HF promoveu uma diminuição na fase G0/G1 de 25,47 \pm 5,04%, aumento de 13,32 \pm 3,74% para a fase S e

aumento de $12,15 \pm 1,30\%$ na fase G2/M. O que sugere uma parada do ciclo na fase S. O 2-AE(C16)HF promoveu a diminuição da população da fase G0/G1 em $25,77 \pm 1,52\%$ e aumento de $19,16 \pm 4,73\%$ na fase G2/M. O 2-AE(C18)HF causou uma diminuição de $24,40 \pm 3,81\%$ na fase G0/G1 e aumento de $28,74 \pm 1,88\%$ na fase S. Nenhum dos diésteres promoveu alterações significativas no DNA fragmentado (Figura 39).

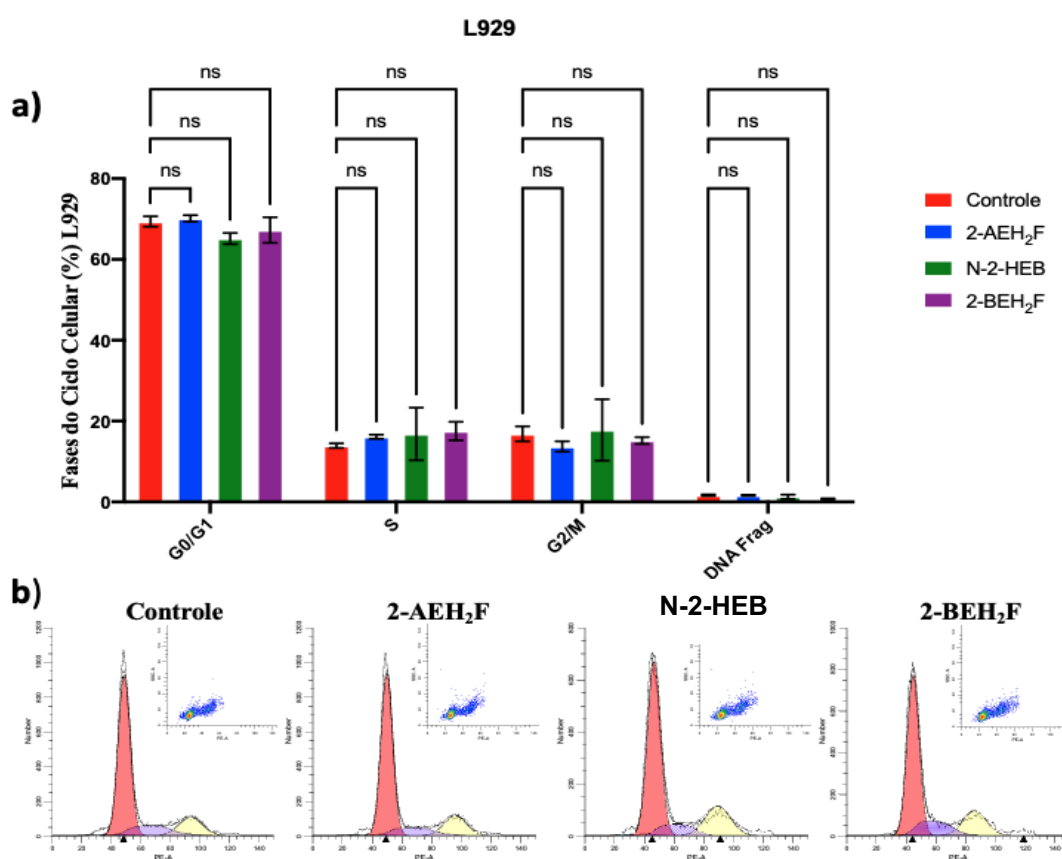


Figura 38. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos murinos L929. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos p = * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 ****p < 0,0001. ns= não significativo.

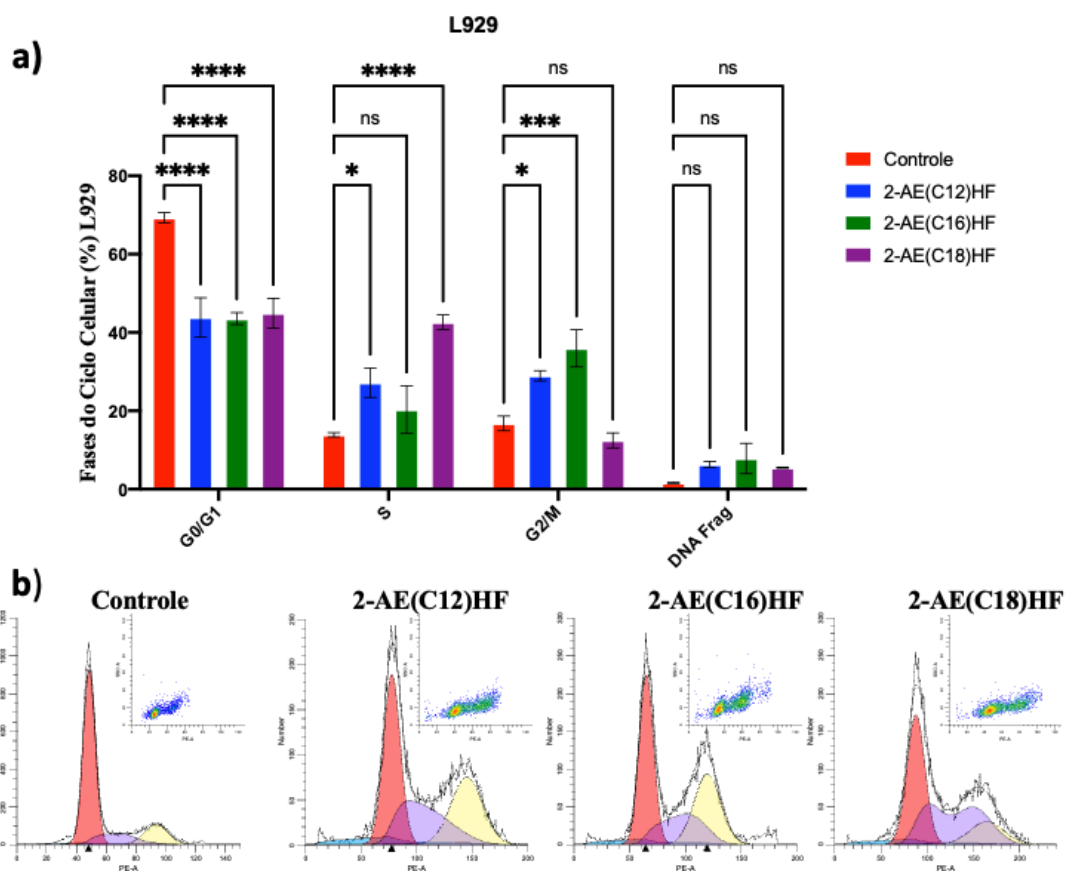


Figura 39. Análise das fases do ciclo celular nas células normais de fibroblastos murinos L929. As células foram tratadas nos valores de $IC_{50\%}$ dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos por citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$. ns= não significativo.

A análise da porcentagem de células tumorais humanas MDA MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular demonstrou que o tratamento com o composto 2-AEH₂F promoveu aumento significativo da proporção de células na fase G2/M com valor de $14,86 \pm 0,57\%$. Não houve alterações nas fases G0/G1 e fase S, assim como o DNA fragmentado. O composto N-2-HEB ocasionou a diminuição na população na fase G0/G1 de $8,56 \pm 1,40\%$ e um aumento de $13,50 \pm 1,66\%$ na fase G2/M. O 2-BEH₂F aumentou a população da fase S em $7,87 \pm 2,75\%$ (Figura

40). Os compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF não promoveram nenhuma alteração nas fases do ciclo celular da linhagem de câncer de mama triplo-negativo humano MDA-MB-231 (Figura 41).

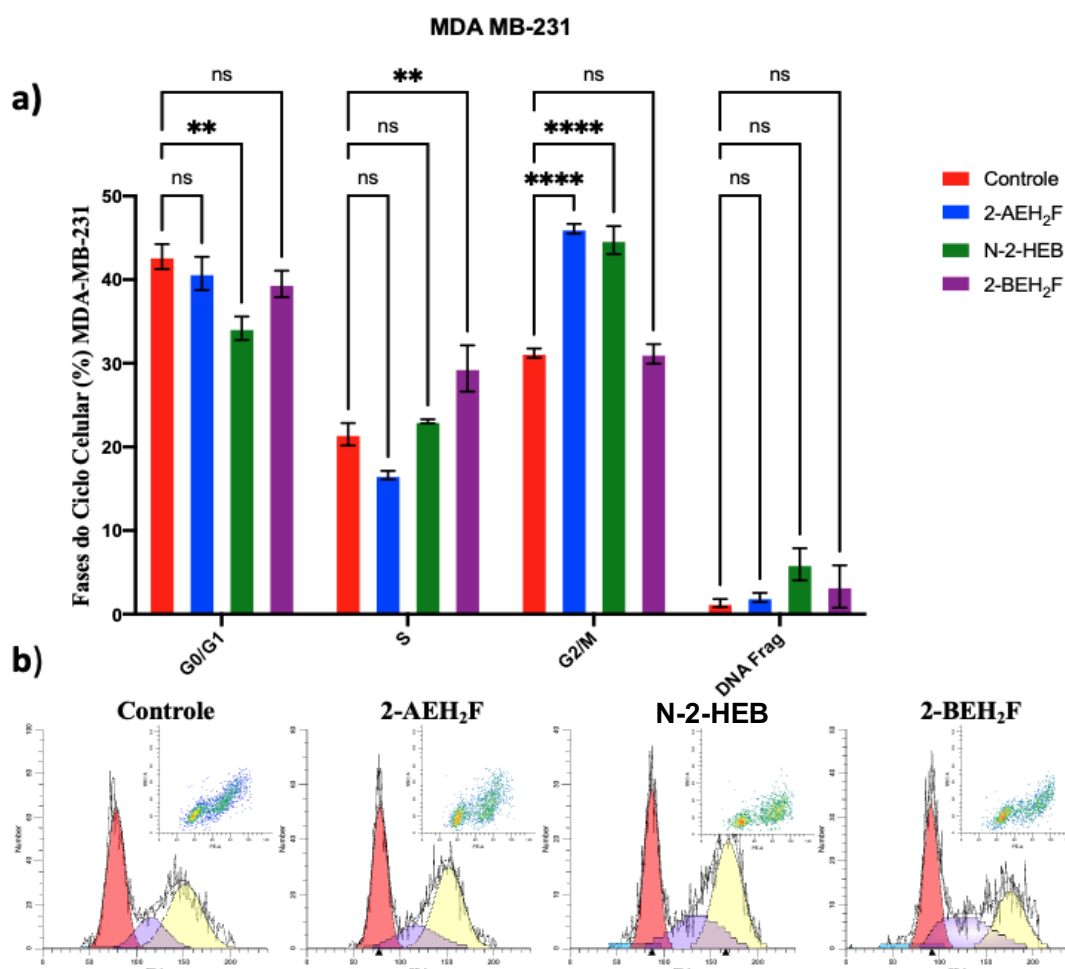


Figura 40. Análise das fases do ciclo celular nas células de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer sendo considerados valores significativos $p = *$ $p < 0,05$, $**$ $p < 0,01$, $***$ $p < 0,001$ $****$ $p < 0,0001$. ns= não significativo.

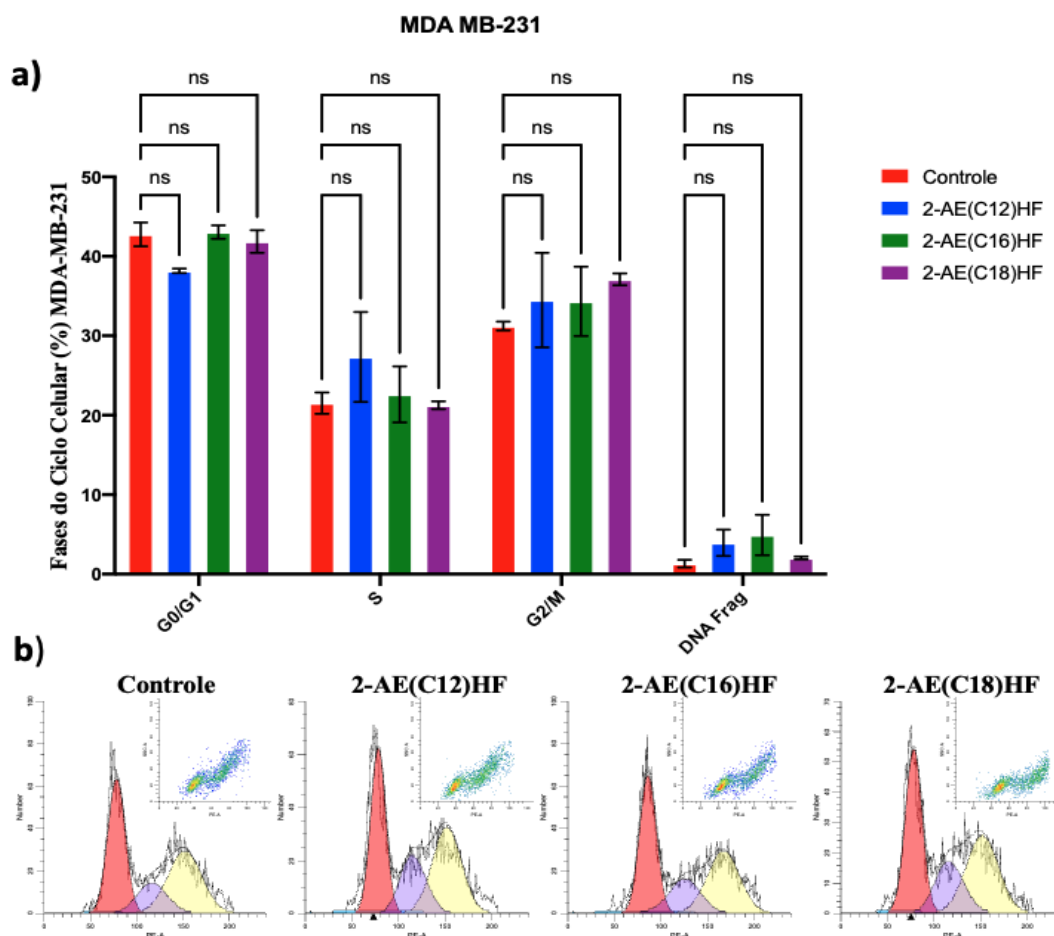


Figura 41. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231. As células foram tratadas nos valores de $IC_{50\%}$ dos compostos 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$, $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

A porcentagem de células tumorais murinas 4T1 nas diferentes fases do ciclo celular demonstrou que o número de células na fase G2/M aumentou após o tratamento com o composto 2-AE H_2 F, com percentual de $9,19 \pm 2,20\%$. Os compostos N-2-HEB, 2-BE H_2 F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF não promoveram nenhuma mudança estatisticamente significativa (Figuras 42 e 43).

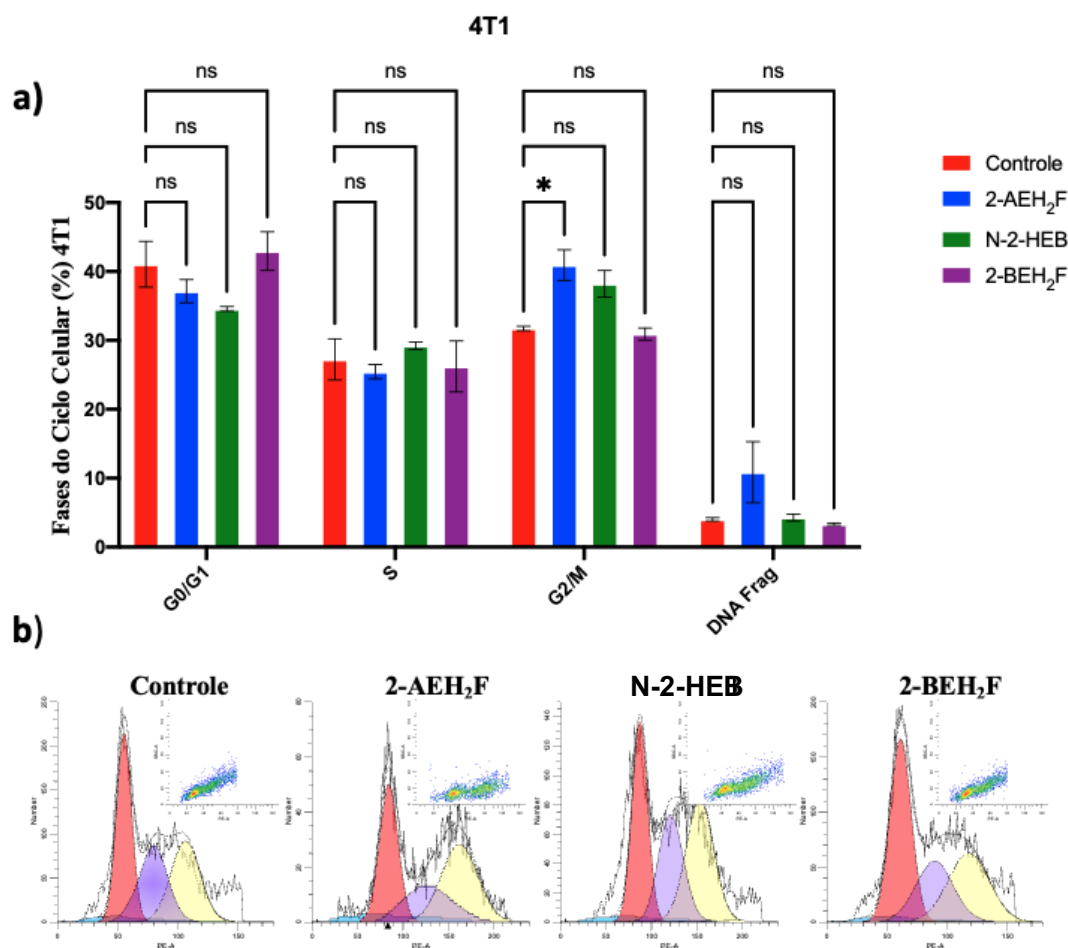


Figura 42. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de IC_{50%} dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância por ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = *$ $p < 0,05$, $**$ $p < 0,01$, $***$ $p < 0,001$ $****$ $p < 0,0001$. ns= não significativo.

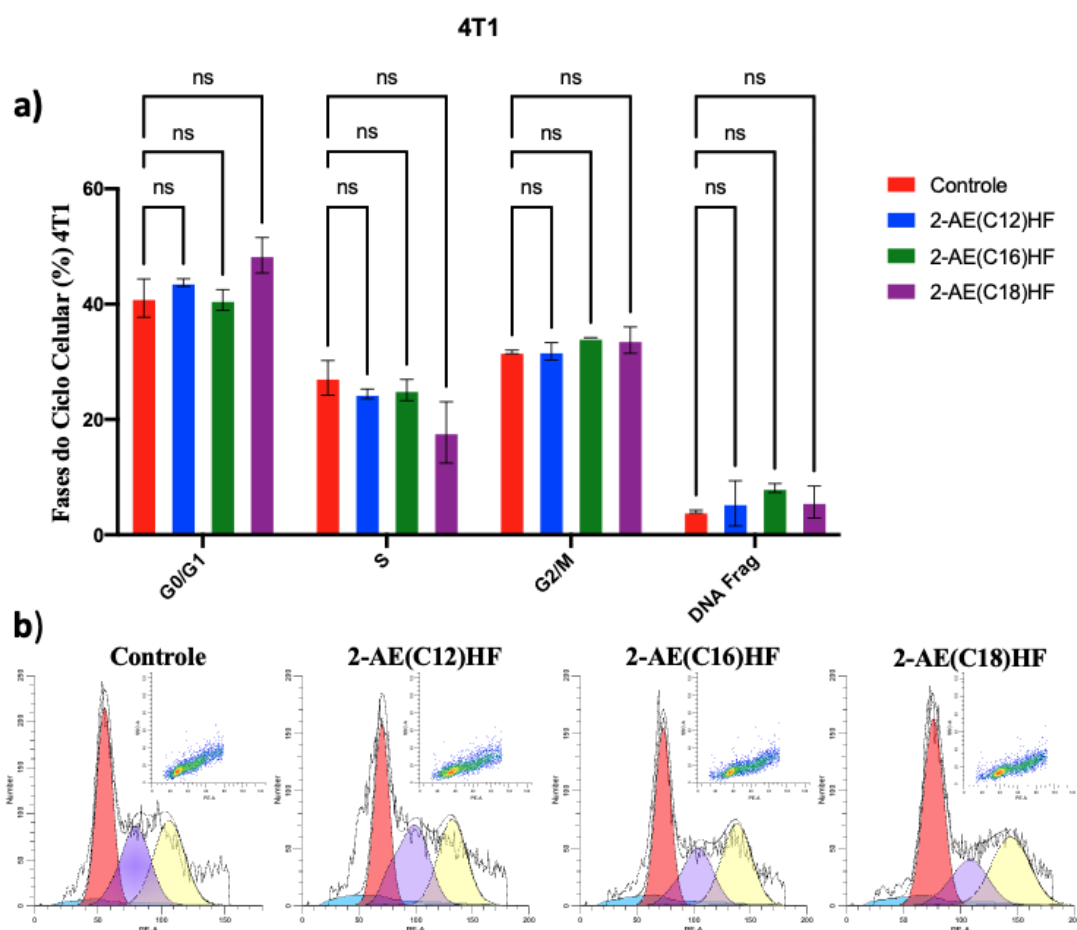


Figura 43. Análise das fases do ciclo celular nas células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1. As células foram tratadas nos valores de $IC_{50\%}$ 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF pelo período de 24h. **(a)** Gráfico de barras mostrando a correlação do efeito no ciclo celular expresso como média \pm DP de três experimentos independentes. **(b)** Histogramas representativos obtidos em citômetro de fluxo da distribuição das células nas fases do ciclo celular. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

Tabela 3. Dados da distribuição das porcentagens médias e SD das populações celulares normais e tumorais tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF.

FN-1						
	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-BEH ₂ F	2-AE(C12)HF	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
G0/G1	-27,57±1,76%	-24,83±2,89%				
S		17,07±4,98%		-9,81±1,05%	-9,25±2,36%	-12,31±0,67%
G2/M	23,66±1,95%			8,41±0,71%	12,72±1,58%	11,49±1,73%
DNA Frag						
L929						
	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-BEH ₂ F	2-AE(C12)HF	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
G0/G1				-25,47±5,04%	-25,77±1,52%	-24,40 ±3,81%
S				13,32±3,74%		28,74 ±1,88%
G2/M				12,15±1,30%	19,16±4,73%	
DNA Frag						
MDA-MB-231						
	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-BEH ₂ F	2-AE(C12)HF	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
G0/G1		-8,56±1,40%				
S			7,87±2,75%			
G2/M	14,86±0,57%	13,50±1,66%				
DNA Frag						
4T1						
	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-BEH ₂ F	2-AE(C12)HF	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
G0/G1						
S						
G2/M	9,19±2,20%					
DNA Frag						

4.7. Avaliação da expressão de marcadores celulares envolvidas na morte celular das células tumorais humanas MDA-MB-231 por citometria de Fluxo

Nas células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano MDA-MB-231 tratadas com os valores da IC₅₀ por um período de 12 horas, por citometria de fluxo. Os dados estão sumarizados na Tabela 4. A expressão da proteína p53 nos tratamentos com os diferentes compostos mostraram alterações significativas, quando tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF e comparada ao grupo controle não tratado. A expressão da p53 foi de (29,94±1,15%), (27,08±3,14%) e (31,98±1,22%) para os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF, respectivamente. O tratamento com o composto 2-AE(C16)HF não promoveu modificação significativa na expressão do marcador p53, com valores médios de (19,70±0,43%). Os dados da aquisição

no citômetro de fluxo e as médias dos grupos experimentais estão apresentadas na Figura 44 e Tabela 4.

A expressão da proteína Bcl-2 que participa do controle das atividades antiapoptóticas sofreu uma diminuição ($18,92 \pm 0,33\%$) e ($20,23 \pm 0,24\%$), após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, em comparação ao controle não tratado. Os compostos 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF promoveram aumento na expressão o marcador Bcl-2, $38,40 \pm 1,90\%$ e $26,80 \pm 1,26\%$ respectivamente, o que demonstra seu efeito indutor de proliferação.

Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF aumentaram a liberação do citocromo-c para o citoplasma e conseqüentemente o aumento da proteína pró-apoptótica Bad. Não houve diferença significativa na liberação do citocromo -c e na expressão da proteína Bad, após o tratamento com o composto 2-AE(C16)HF. Os dados estão apresentados na Tabela 4 e as médias dos valores e diferenças estatísticas na Figura 44.

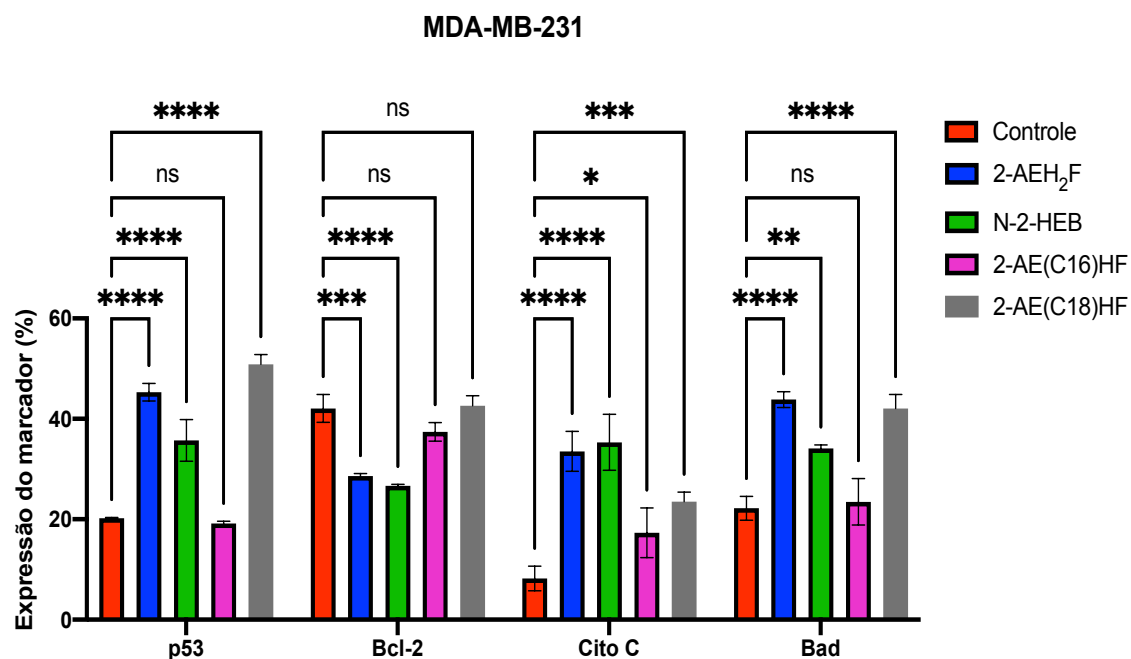


Figura 44. Modulação da expressão dos marcadores p53, Bcl-2, citocromo-c e Bad, para linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

O tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF modularam a expressão dos marcadores envolvidos na via de morte celular mitocondrial, pois aumentaram a fosforilação das caspases 3 e 8 e a expressão do marcador TRAIL-DR4. Esses dados sugerem a ativação das vias intrínsecas e extrínsecas de morte celular, uma vez que aumentam a fosforilação de proteínas de morte via mitocondrial. Os dados estão apresentados na Tabela 4 e Figura 45.

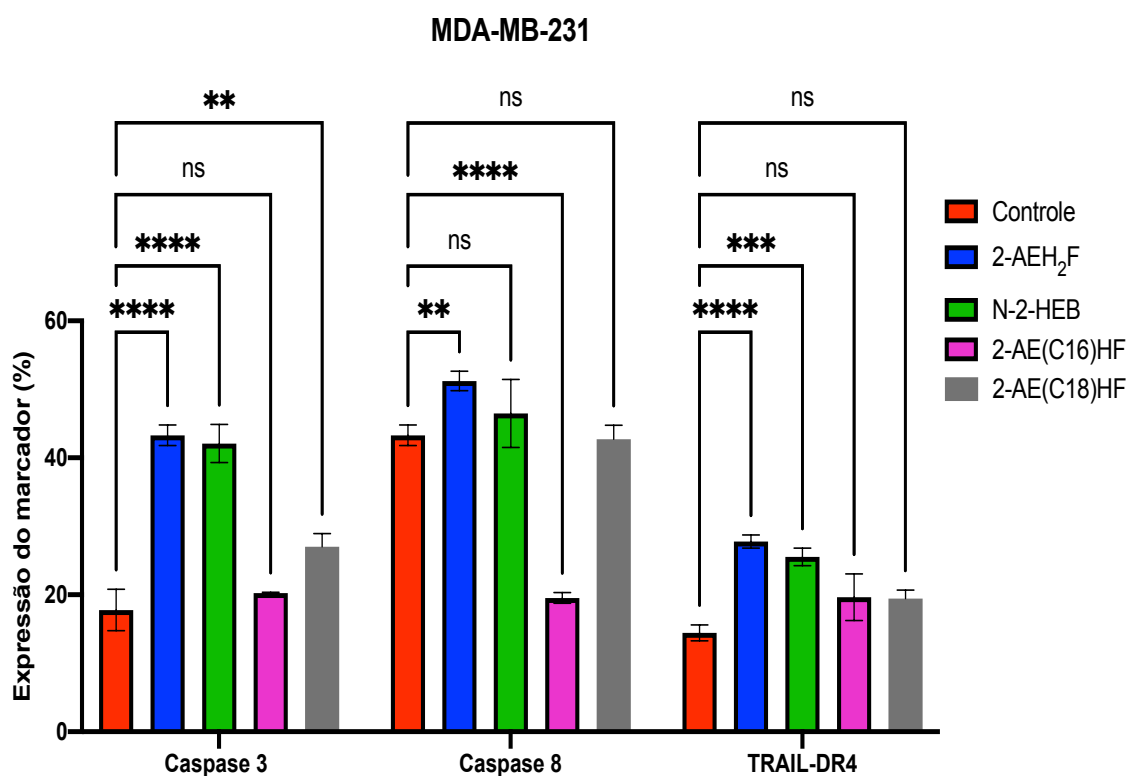


Figura 45. Modulação da expressão dos marcadores caspase 3, caspase 8 e TRAIL-DR4, para linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = *$ $p < 0,05$, $**$ $p < 0,01$, $***$ $p < 0,001$, $****$ $p < 0,0001$. ns= não significativo.

A expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2 e uPAR apresentaram modulações após o tratamento das células tumorais humanas MDA-MB-231 com os compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB o que pode sugerir o efeito na inibição da angiogênese e invasão tumoral. Com exceção do marcador VEGF-R2, envolvido principalmente na linfogênese, o composto 2-AEH₂F não alterou sua expressão (Figura 46). O receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR)

está intimamente relacionado com a invasão e metástase, desempenha papéis importantes na degradação da matriz extracelular (ECM), angiogênese tumoral, proliferação celular e apoptose, e está associado à resistência a múltiplas drogas (MDR) de células tumorais, que tem importante significado como marcador de progressão tumoral. Por outro lado, não ocorreu a modulação significativa da expressão do marcador TGF- β , após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF (Figura 46).

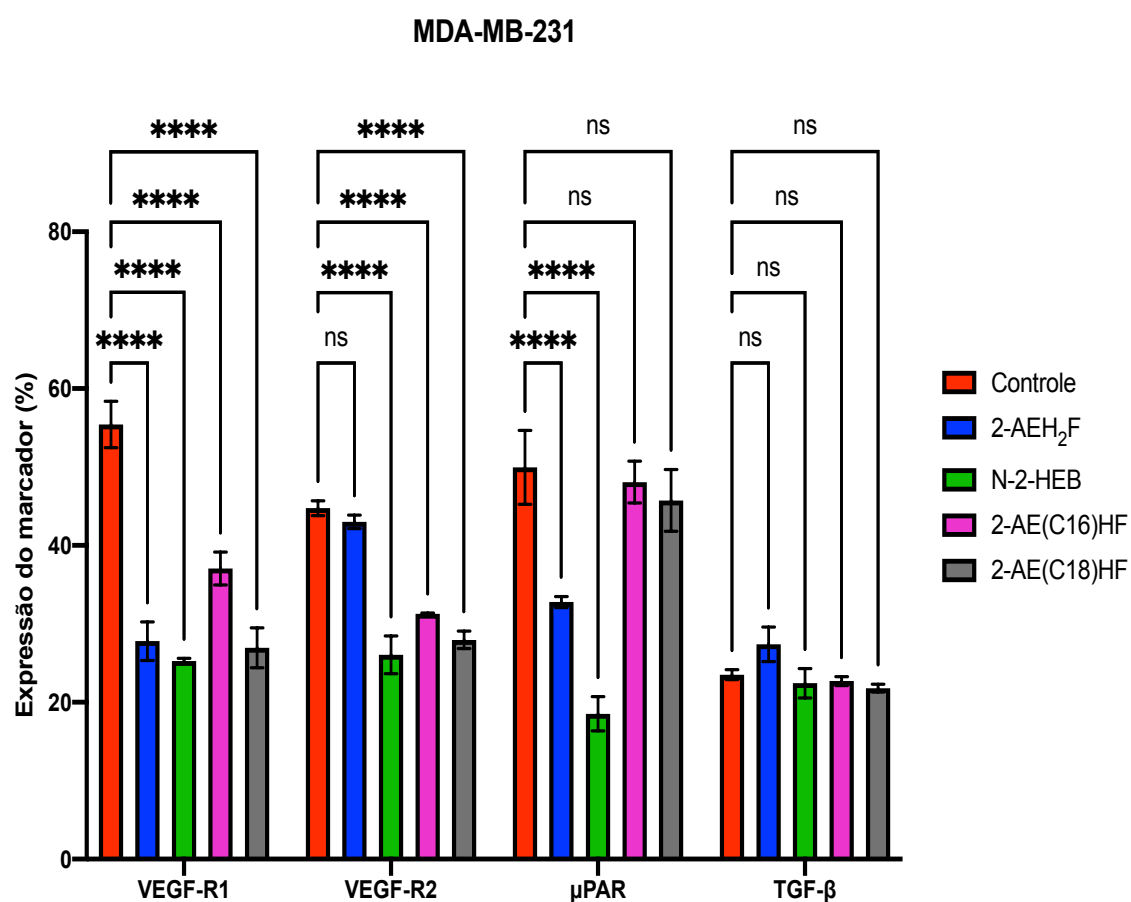


Figura 46. Modulação da expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2, uPAR e TGF- β para linhagem tumoral MDA-MB-231 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $****p < 0,0001$. ns= não significativo.

Tabela 4. Descrição resumida da expressão dos marcadores de membrana celular, nucleares e citoplasmáticos em células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo negativo humana MDA-MB-231, após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF obtidos por citometria de fluxo.

	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
Casp-3	↑	↑	X	↑
Casp-8	↑	X	↓	X
Bcl-2	↓	↓	↑	↑
p53	↑	↑	x	↑
Cito-c	↑	↑	↑	↑
Bad	↑	↑	x	↑
Trail-DR4	↑	↑	x	x
TGF-β	x	x	x	x
VEGF-R1	↓	↓	↓	↓
VEGF-R2	x	↓	↓	↓
uPAR	↓	↓	x	x

↑ aumento da expressão do marcador

↓ diminuição da expressão do marcador

X expressão não alterada após o tratamento.

4.8. Avaliação da expressão de marcadores celulares envolvidas na morte celular nas células tumorais murinas 4T1 por citometria de Fluxo

As células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo negativa murina 4T1 foram tratadas com os valores da IC_{50%} por um período de 12 horas e analisadas em por citometria de fluxo. A expressão dos receptores e marcadores envolvidos na progressão e controle da proliferação celular foram expressos em

porcentagem adquiridos no programa Cell-Quest - BD. Os dados estão sumarizados na Tabela 5.

A expressão da proteína p53 em células tumorais murinas 4T1, após os tratamentos com os diferentes compostos mostraram alterações significativas, quando tratadas com os compostos 2-AEH₂F e 2-AE(C18)HF e comparada ao grupo controle não tratado. A expressão da p53 foi de (34,83±2,44%) e (43,98±3,48%) para os compostos 2-AEH₂F e 2-AE(C18)HF, respectivamente. O tratamento com os compostos N-2-HEB e 2-AE(C16)HF não promoveu modificação significativa na expressão do marcador p53, com valores médios de (23,82±1,46%) e (16,40±0,70%), respectivamente. Os dados da aquisição no citômetro de fluxo e as médias dos grupos experimentais estão apresentados na Figura 47 e Tabela 5.

A expressão da proteína Bcl-2 que participa do controle das atividades antiapoptóticas sofreu uma diminuição após os tratamentos com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF, em comparação ao controle não tratado. Sua expressão não foi modificada significativamente pelo tratamento com o composto 2-AE(C16)HF.

Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF aumentaram a liberação do citocromo-c para o citoplasma e, conseqüentemente, o aumento da proteína pró-apoptótica Bad em todos os tratamentos. Os dados estão apresentados na Tabela 5 e as médias dos valores e diferenças estatísticas na Figura 47.

O tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF foram capazes de modular a expressão dos marcadores envolvidos na via de morte celular mitocondrial, pois aumentam a fosforilação das caspases 3 e 8, exceto 2-AEH₂F e N-2-HEB para a caspase 8, um indicativo de morte celular pela via intrínseca, uma vez que não ocorreu modulação na expressão do TRAIL-DR-4 (Figura 48).

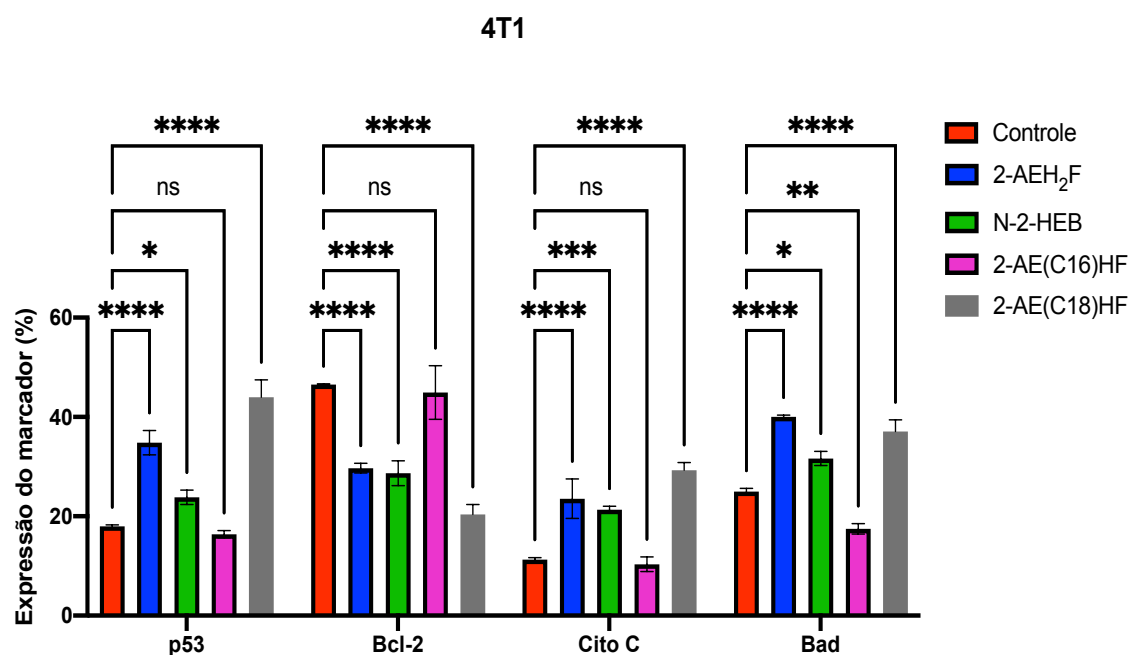


Figura 47. Modulação da expressão dos marcadores p53, Bcl-2, citocromo-c e Bad, para linhagem tumoral 4T1 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

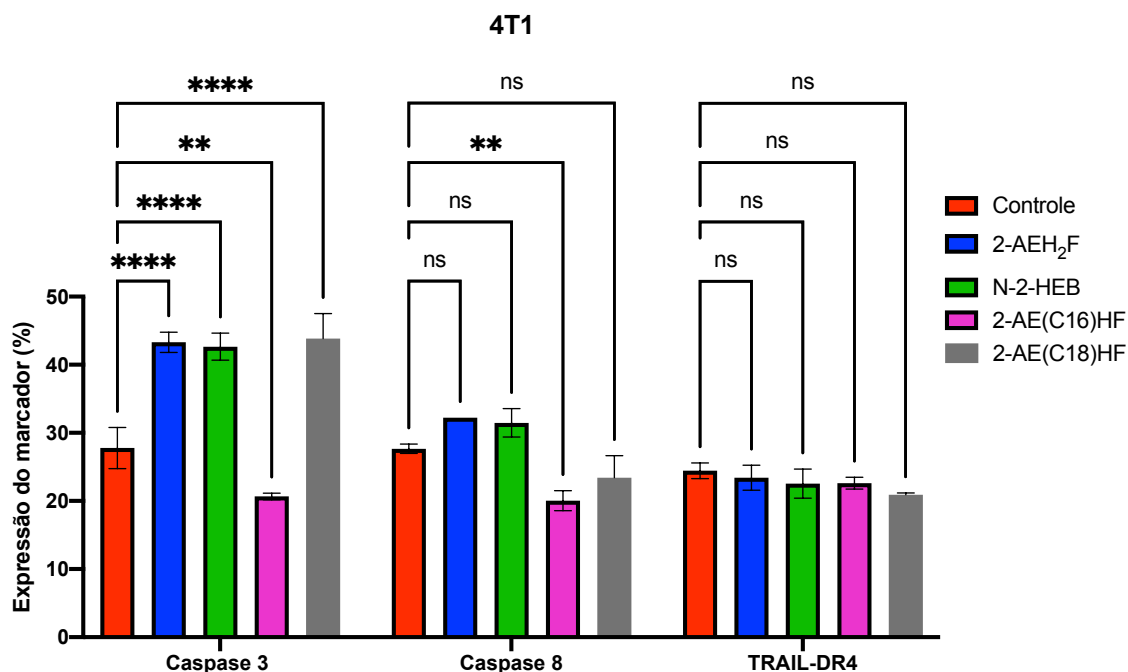


Figura 48. Modulação da expressão dos marcadores caspase 3, caspase 8 e TRAIL-DR4, para linhagem tumoral 4T1 trada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

A expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2 e uPAR apresentaram modulações após o tratamento das células tumorais murinas 4T1 com os compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB o que pode sugerir o efeito na inibição da angiogênese e invasão tumoral (Figura 49). É importante salientar que o receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR) está intimamente relacionado com a invasão e metástase, desempenha papéis importantes na degradação da matriz extracelular (ECM), angiogênese tumoral, proliferação celular e apoptose, e está associado à resistência a múltiplas drogas (MDR) de células tumorais, que tem um importante significado como marcador de progressão tumoral. Por outro lado, não ocorreu a modulação significativa da expressão do marcador TGF- β , após o tratamento com todos os compostos testados (Figura 49).

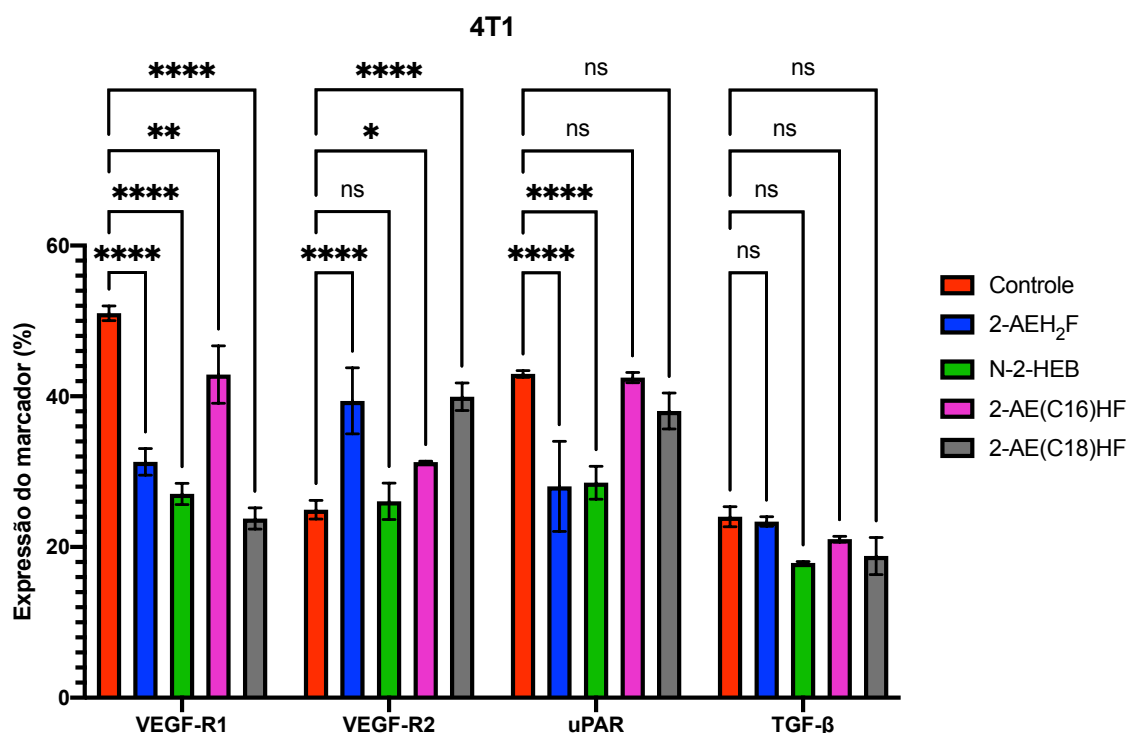


Figura 49. Modulação da expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2, uPAR e TGF- β para linhagem tumoral 4T1 tratada com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF. As diferenças estatísticas foram obtidas pelo teste de Variância ANOVA e seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ $**** p < 0,0001$. ns= não significativo.

Tabela 5. Descrição resumida da expressão dos marcadores de membrana celular, nucleares e citoplasmáticos em células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo negativo murina 4T1, após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF obtidos por citometria de fluxo.

	2-AEH ₂ F	N-2-HEB	2-AE(C16)HF	2-AE(C18)HF
Casp-3	↑	↑	↓	↑
Casp-8	x	x	↓	x
Bcl-2	↓	↓	x	↓
p53	↑	↑	x	↑
Cito-c	↑	↑	x	↑
Bad	↑	↑	↓	↑
Trail-DR4	x	x	x	x
TGF-β	x	x	x	x
VEGF-R1	↓	↓	↓	↓
VEGF-R2	↑	x	↑	↑
uPAR	↓	↓	x	x

↑ aumento da expressão do marcador
 ↓ diminuição da expressão do marcador
 X expressão não alterada após o tratamento.

A morte celular ou apoptose é um processo essencial no desenvolvimento, homeostase, remodelagem e integridade tecidual. A proliferação e eliminação celular são necessárias para manter a homeostase, assim as células indesejadas são removidas durante o processo de metamorfose, embriogênese, patogênese e renovação tecidual. Apoptose é um processo geneticamente programado de suicídio celular em resposta a sinais específicos. Normalmente, a morte celular programada é controlada por uma variedade de sinais extracelulares e intracelulares que são direcionados pelo ambiente da célula e por sinais intracelulares. A apoptose é regulada por diferentes grupos de moléculas executoras e reguladoras, das quais participam moléculas

provenientes das mitocôndrias ou se sinais da ativação de receptores e ligantes da membrana celular. O mecanismo de ação da morte celular apoptótica tipicamente caracterizado por condensação do material da cromatina, fragmentação do DNA ocorrida no núcleo, encolhimento celular, bolhas dinâmicas na membrana e perda de adesão às matrizes extracelulares. Além disso, as alterações bioquímicas incluem a externalização da fosfatidilserina e a ativação de cisteína aspartil proteases (caspases)⁵⁴.

Além dos efeitos de citotoxicidade dependentes da concentração e tempo de exposição, alterações morfológicas, rearranjos dos elementos do citoesqueleto e a expressão de marcadores da apoptose intrínseca e extrínseca foram detectadas e moduladas em células de adenocarcinoma de mama triplo negativo humanas e murinas após o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, 2-AE(C18)HF, N-2-HEB e 2-AE(C16)HF. Nossos resultados mostraram diferencialmente a expressão de marcadores dependentes da p53, Bcl-2 e liberação do citocromo -c , o que indica mecanismos de morte apoptótica intrínseca em conjunto com a a expressão do TRAIL-DR-4 a ativação da via extrínseca^{54,55}.

A sinalização apoptótica através da via extrínseca é ativada quando ligantes extracelulares como TNF (fator de necrose tumoral), Fas-L (ligante Fas) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) estão ligados ao domínio extracelular do DR (receptores transmembranares), ou seja, o receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), Fas (CD95/Apo-1) e receptores TRAIL. A ordem dos eventos envolvidos na fase extrínseca da apoptose é caracterizada pela modulação na expressão FasL/FasR e TNF- α /TNFR1. Esse desencadeamento de DRs por ligantes de morte específicos (DLs) resulta na formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC)⁵⁴.

A via intrínseca da apoptose é mediada pelas mitocôndrias, desencadeada por vários estresses extra e intracelulares, que incluem estresse oxidativo, irradiação e tratamento com drogas citotóxicas. A via intrínseca é mediada pela inserção de Bax/Bak na membrana mitocondrial e, posteriormente, o citocromo c é liberado do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol. Membros da família Bcl-2 e Bcl-xL que são proteínas antiapoptóticas impedem a liberação do

citocromo c. O citocromo c combina-se com Apaf-1 e procaspase-9 para produzir o complexo apoptossoma⁵⁶⁻⁵⁸.

Foi evidente e significativo a modulação dessas moléculas pró e antiapoptóticas pelos compostos 2-AEH₂F, 2-AE(C18)HF, N-2-HEB e 2-AE(C16)HF, uma vez que seus efeitos antiproliferativos diminuiram a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumentou Bad e a liberação do citocromo-c. O tratamento com os compostos 2-AEH 2 F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF foram capazes de modular a expressão dos marcadores envolvidos na via de morte celular mitocondrial, pois aumentam a fosforilação das caspases 3 e 8, exceto 2-AEH 2 F e N-2-HEB para a caspase 8, um indicativo de morte celular pela via intrínseca, uma vez que não ocorreu modulação na expressão do TRAIL-DR-4 (Figuras 44 e 45).

A expressão dos marcadores VEGF- R1, VEGF-R2 e uPAR apresentaram modulações após o tratamento das células tumorais murinas 4T1 com os compostos 2-AEH₂F e N-2-HEB o que pode sugerir o efeito na inibição da angiogênese e invasão tumoral. Por outro lado, não ocorreu a modulação significativa da expressão do marcador TGF-B, após o tratamento com todos os compostos testados (Figura 46).

Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF modulam a expressão dos receptores VEGF- R1, VEGF-R2 e uPAR, demonstrando o seu papel na capacidade invasiva e de progressão da malignidade. O receptor ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPAR- CD87), é codificado pelo gene PLAU que pertence à superfamília do antígeno linfático 6. A molécula uPAR ativa é um receptor de glicoproteína de membrana de cadeia única composto por 313 resíduos de aminoácidos e, está ancorado à membrana celular por uma ligação de glicosilfosfatidilinositol (GPI); contém 3 domínios homólogos, D1, D2 e D3. O uPAR medeia uma variedade de processos biológicos, como ativação do plasminogênio, proteólise, transdução de sinal celular e adesão. Classicamente, a função do uPAR é atuar como um receptor para a forma zimogênica do uPA (pro-uPA) e desencadear uma cascata de eventos proteolíticos que levam à degradação da MEC, contribuindo para a progressão do tumor. Altos níveis de expressão de uPAR foram detectados em uma variedade de células tumorais,

mas níveis muito baixos estão presentes em células normais, indicando que o nível de uPAR no tecido tumoral está intimamente relacionado à malignidade do tumor e ao prognóstico de pacientes com câncer⁵⁹.

Conceição et al., 2021 sugerem que o tratamento com o composto 2-AEH₂ em células de leucemia mielóide humana crônica K-562 e K-562 Lucena (MDR+) foi capaz de induzir efeito pró-apoptótico dependente da expressão da p53, com aumento das moléculas pró-apoptóticas Bax, Bad, caspases 3, caspases 8 e liberação de citocromo-c. Neste mesmo estudo foi evidenciado o aumento na expressão das proteínas reguladoras p21 e p27, sugerindo potencial antiproliferativo com capacidade de controlar a progressão do ciclo celular. Resultados semelhantes foram observados em células de adenocarcinoma de mama humana triplo negativo humano e adenocarcinoma de mamário hormônio responsiva MCF-7⁶⁰⁻⁶².

4.9. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo

A rodamina-123 é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas, fluorescendo em verde. Alterações em nível de integridade mitocondrial podem ser detectadas pelo aumento da fluorescência verde citosólica, indicando sua difusão da rodamina-123 da mitocôndria para o citosol.

Os experimentos para a avaliação do potencial elétrico mitocondrial foram realizados em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123 (MitoRed), após 24h de tratamento com os diferentes compostos em células tumorais e não tumorais.

O tratamento das células normais fibroblastos humanos FN-1 com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF não modificaram o potencial elétrico e ou metabólico das mitocôndrias (Figura 50a). Por outro lado, em fibroblastos normais murinos L929 houve redução significativa do $\Delta\Psi_m$ após o tratamento com os compostos 2-AE(C12)HF e 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HFH. Os dados das médias e DP estão apresentados na Figura 50b.

As células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA MB-231 o tratamento com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF diminuíram significativamente o potencial elétrico e metabólico das mitocôndrias (Figura 51a). O mesmo ocorreu com o tratamento das células tumorais de adenocarcinoma de mama murino 4T1 (Figura 51b).

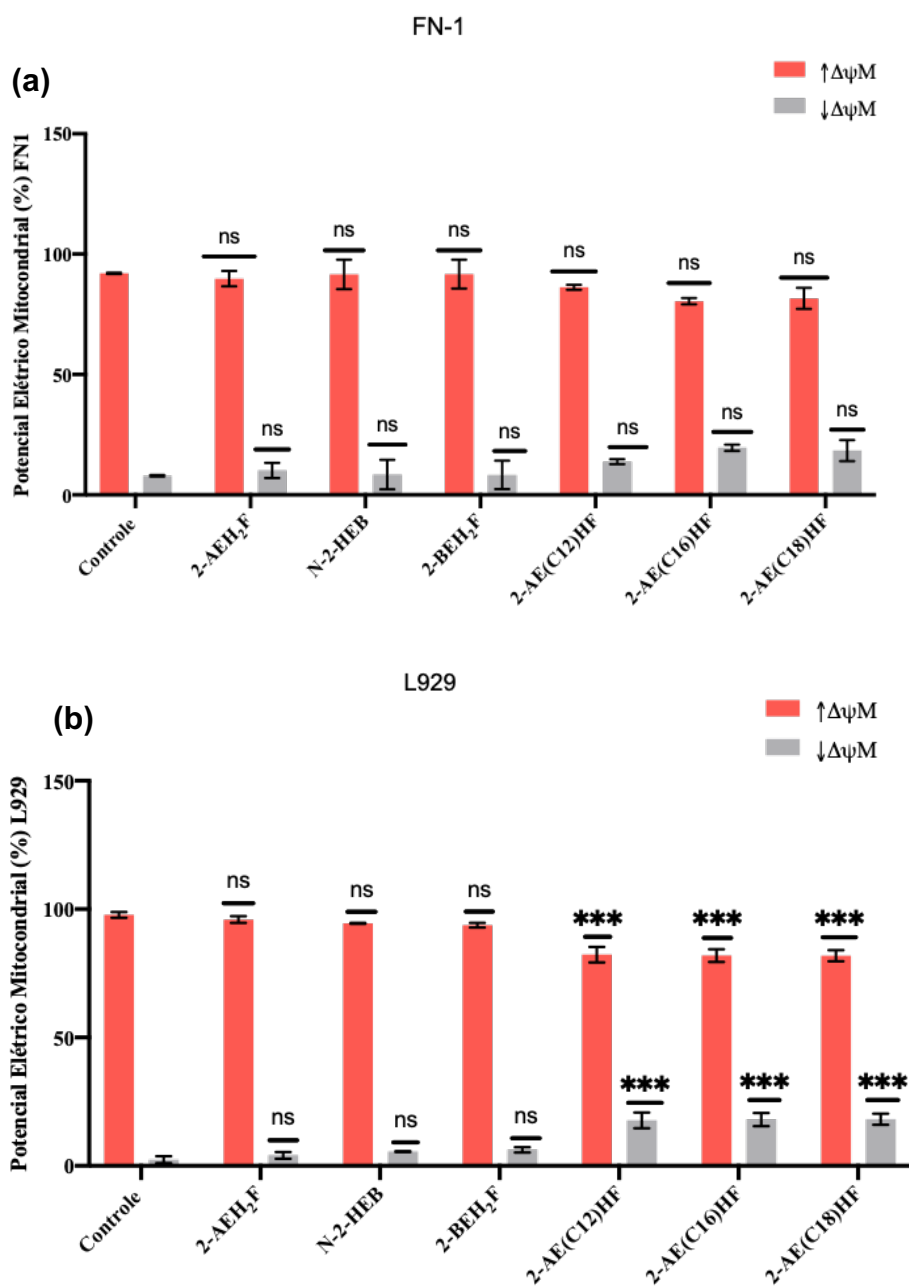


Figura 50. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células normais fibroblastos humanos FN-1 e murinos L929 obtido por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF nos valores de IC_{50%} por um período de 24h. **(a)** $\Delta\Psi_m$ das células normais fibroblastos humanos FN-1 e **(b)** $\Delta\Psi_m$ das células normais fibroblastos murinos L929. Gráfico de barras das médias e \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas de Variância ANOVA e seguido pelo teste Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = * p < 0,05$, $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$. ns= não significativo.

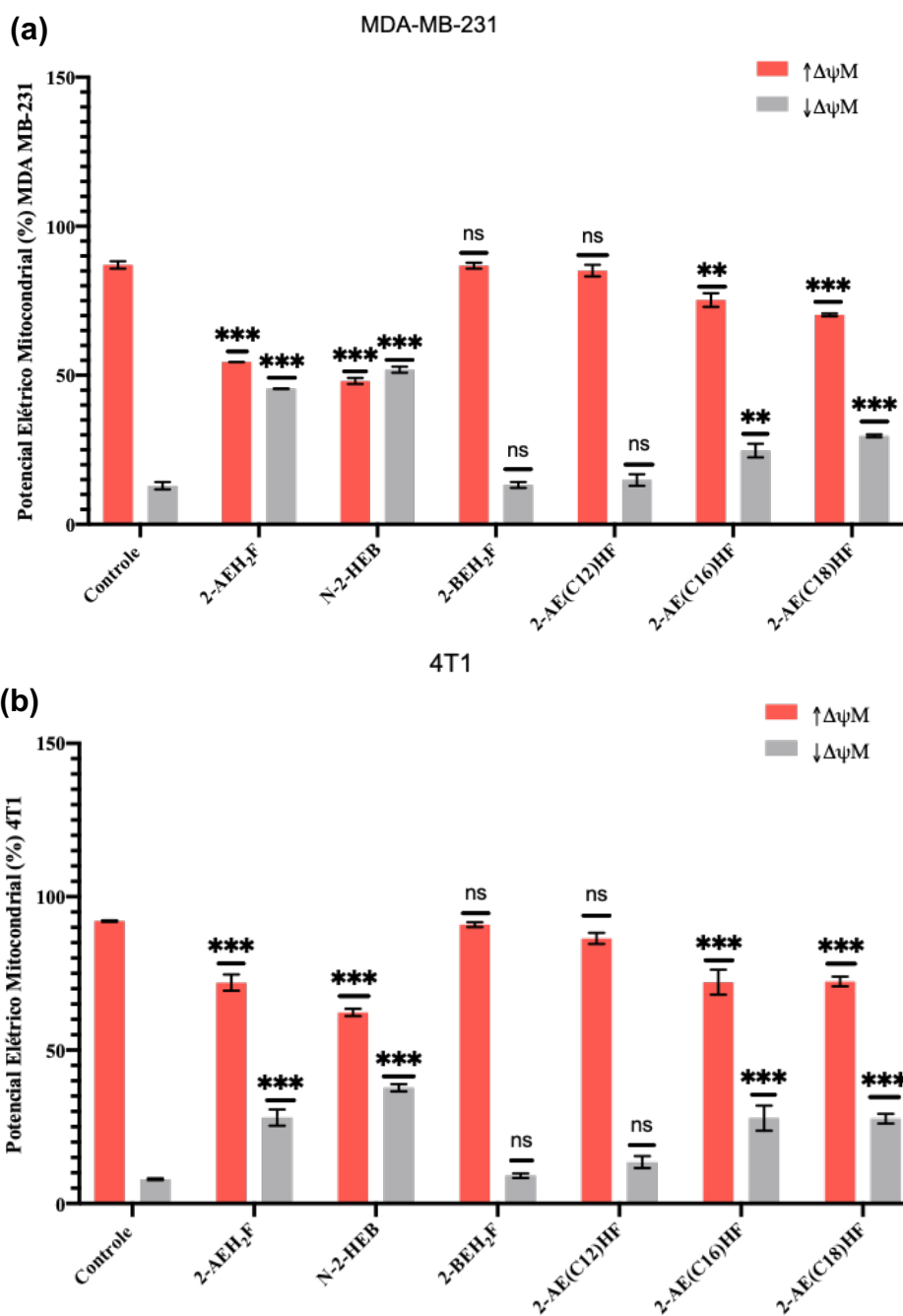


Figura 51. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e células de adenocarcinoma de mama murino 4T1 obtido por citometria de fluxo. As células foram tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF nos valores de IC₅₀% por um período de 24h. **(a)** $\Delta\Psi_M$ das células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e **(b)** $\Delta\Psi_M$ das células de adenocarcinoma de mama murino 4T1. Gráfico de barras das médias e \pm DP de três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram obtidas pelos testes de comparações múltiplas de Variância ANOVA e seguido pelo teste Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativos de $p = *$ $p < 0,05$, $**$ $p < 0,01$ e $***$ $p < 0,001$. Ns= não significativo.

As mitocôndrias desempenham papéis fundamentais na maioria das células eucarióticas, desde a produção de energia até a regulação da apoptose. Estão envolvidas diretamente no processo de respiração celular, as mitocôndrias acumulam espécies reativas de oxigênio devido aos danos nos transportadores da cadeia de transporte de elétrons. Mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), bem como no DNA nuclear, são relatadas em vários tipos de câncer. As mitocôndrias têm um duplo papel no câncer: o desenvolvimento de tumores devido a mutações no genoma mitocondrial e no processo de fosforilação oxidativa. O comprometimento da via de apoptose regulada pelas mitocôndrias acelera a tumorigênese.

Neste estudo foi utilizado a sonda rodamina- 123 e sua análise adquirida em citômetro de fluxo. Os derivados lipofílicos da rodamina têm sido amplamente investigados para aplicações de novos compostos, drogas e agentes quimioterapêuticos devido às suas estruturas hidrofóbicas e propriedades catiónicas. Vários estudos demonstraram que a membrana mitocondrial em células tumorais é relativamente mais negativa em comparação com a membrana mitocondrial em células normais, permitindo o acúmulo parcialmente seletivo de compostos catiônicos como a rodamina nas mitocôndrias das células tumorais. Outros estudos mostraram que, além das propriedades iônicas, a hidrofobicidade também desempenha um papel importante nesse acúmulo mitocondrial. A este respeito, os cátions lipofílicos, devido às suas propriedades lipofílicas e catiónicas, têm uma acumulação significativamente maior nas células tumorais em contraste com as células normais, resultando em toxicidade parcialmente seletiva⁶³.

Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF modulam a atividade elétrica mitocôndria o que suporta as propriedades de serem moléculas indutoras de apoptose ou no controle da proliferação celular uma vez que as mitocôndrias também regulam a senescência celular através do citocromo c . As sondas de rodamina também são conhecidas por acumular preferencialmente nas mitocôndrias e bloquear a produção de ATP, causando

apoptose celular. O que é um possível mecanismo de ação dos compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, e 2-AE(C16)HF⁶⁴.

A morfologia mitocondrial está associada a mutações no mtDNA e ao nível da oxidação fosforilativa nas células tumorais. Em geral, os cânceres humanos apresentam alterações estruturais heterogêneas em suas mitocôndrias, sendo que aproximadamente 50% dessas mitocôndrias apresentam alterações morfológicas e funcionais⁶⁴.

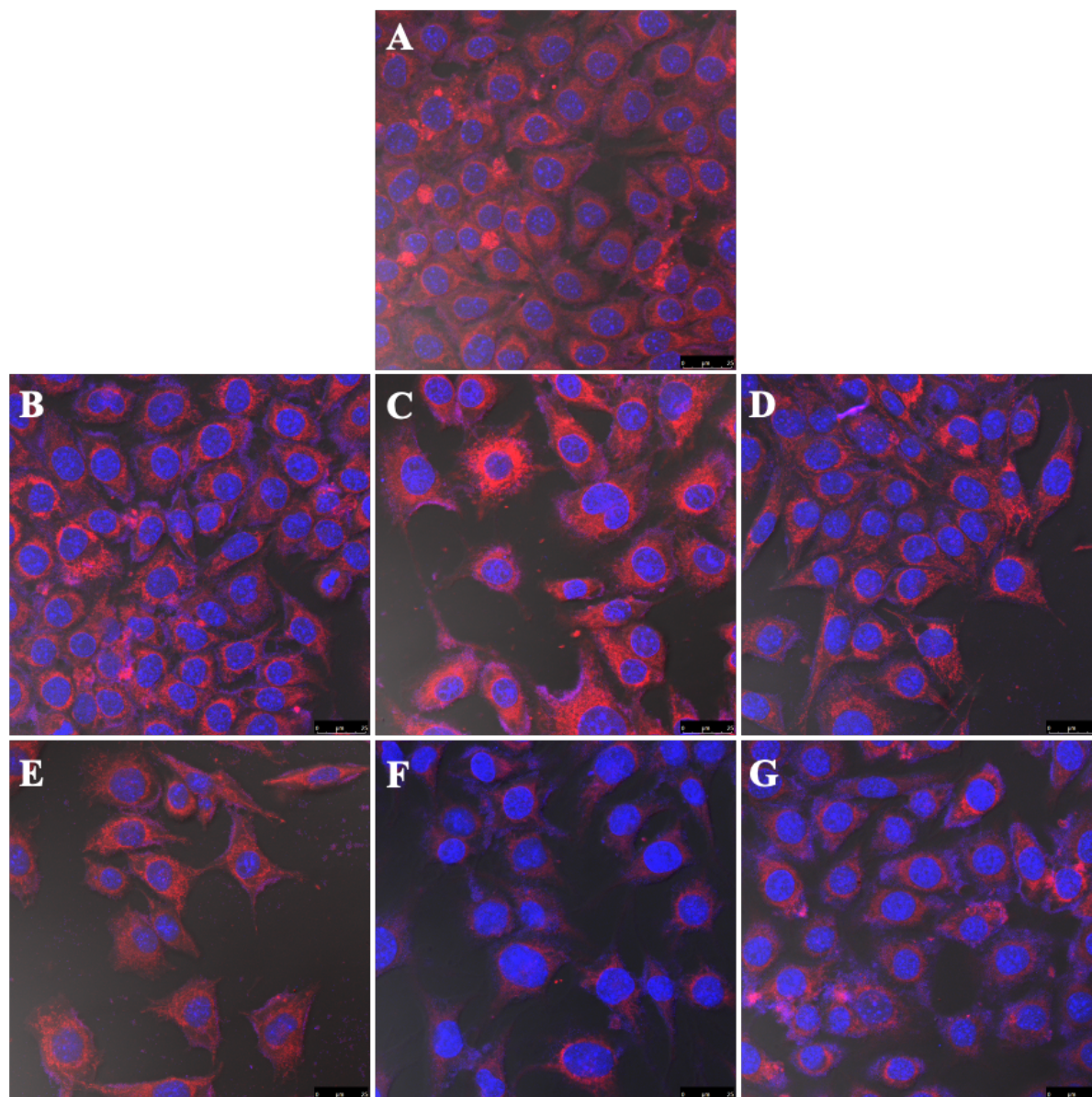
O tratamento com 2-AEH₂F, em células de leucemia mieloide crônica humana K562, Conceição, T.O.⁶⁰, recentemente descreveu alterações ultraestruturais como a formação de debris celulares provenientes de um provável processo de apoptose. As células tumorais binucleadas, vacúolos citoplasmáticos, morfologia alterada, sem definição de organelas citoplasmáticas, heterocromatina condensada e polarizada em uma região do núcleo, nucléolo apresentando alteração morfológica. Vacúolos citoplasmáticos, bem como região de afastamento anormal do envoltório nuclear criando um aumento do espaço da cisterna perinuclear entre o nucleoplasma e o citoplasma, formando estrutura semelhante a uma vesícula aptossômica. Houve alterações morfológicas nas mitocôndrias e formação de estruturas semelhantes a vacúolos no seu interior, algumas degradadas.

Um acúmulo de numerosas mitocôndrias de formato irregular com diferentes graus de densidade eletrônica na matriz foi relatado no adenoma de células de Hürthle da tireóide⁶⁵. Uma diminuição na quantidade de membranas de cristal com adaptação de aparência circular no interior mitocondrial foi relatada em linhagens celulares de osteossarcoma⁶⁶. Em contraste, um aumento consistente na densidade da matriz com condensação da matriz mitocondrial e expansão dos espaços cristalinos foi observado em células HeLa cultivadas em meio contendo galactose^{66,67}. Em células de leucemia humana, as mitocôndrias estavam anormalmente inchadas com matriz pálida e cristas desorganizadas. Esses resultados indicam deficiência grave de respiração mitocondrial e captação de glicose ativada com acúmulo de lactato^{67,68}. Além disso, tumores ricos em mitocôndrias foram relatados em cinco pacientes com carcinoma de mama. Nos gliomas, o desarranjo das cristas e a cristólise parcial ou total foram

as alterações submicroscópicas mais constantes observadas e foram associadas ao edema mitocondrial⁶⁴. Alterações mitocondriais e alterações no metabolismo energético estão associadas a fenótipos radiorresistentes no adenocarcinoma esofágico⁶⁹. A comparação da ultraestrutura mitocondrial em adenocarcinomas ductais primários do pâncreas com células pancreáticas normais revelou que as mitocondriais das células tumorais apresentaram matriz densa e configuração condensada. Mitocôndrias com matriz lucente inchada associada a desarranjo e distorção de cristas e cristólise parcial ou total foram descritas^{64,70}.

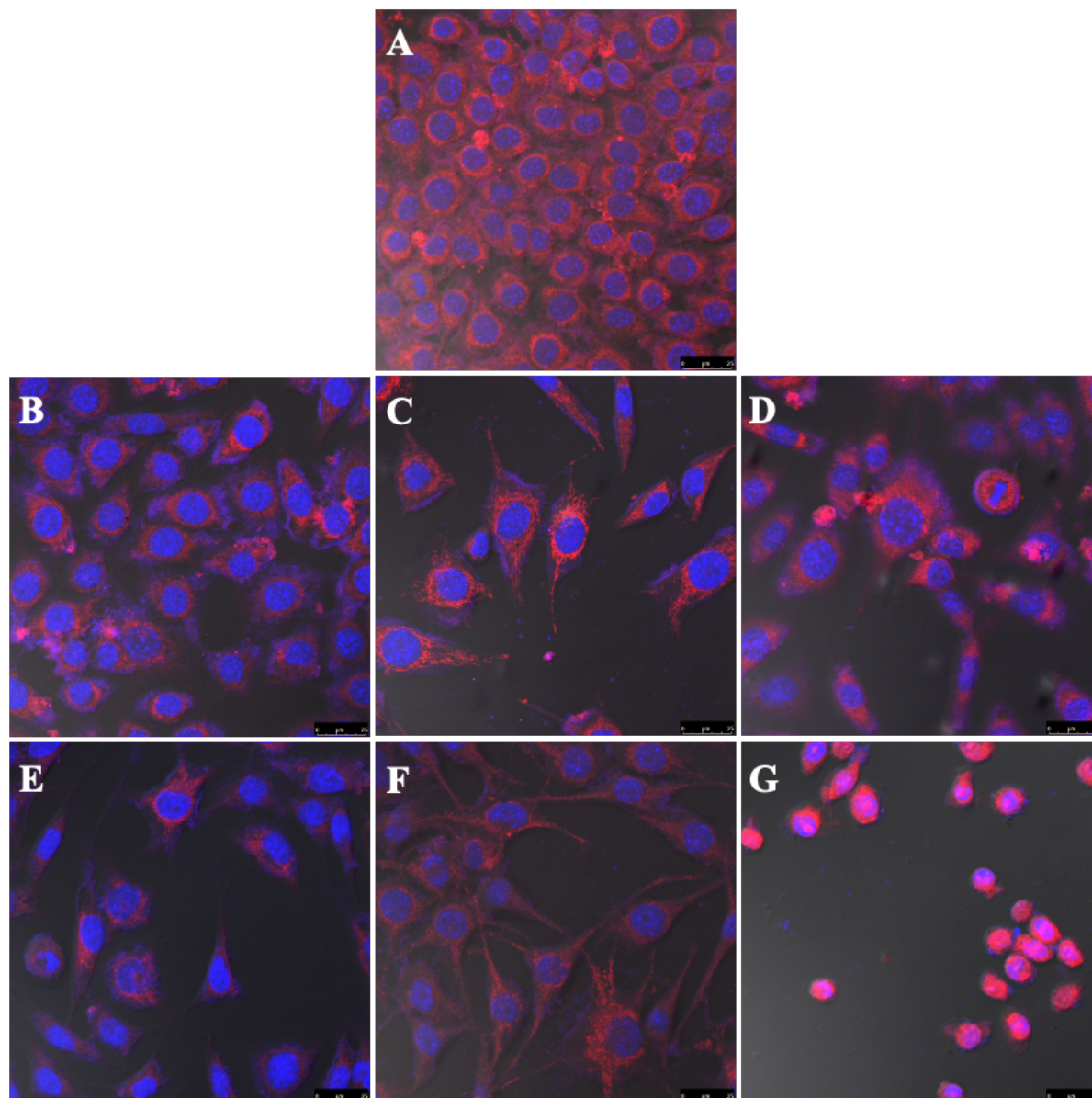
4.10. Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser em células normais fibroblastos humanos FN-1.

As células normais fibroblastos humanos FN-1 e murinas L929 foram tratadas com os compostos 2-AE₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF e tratados por 24 horas. As células normais de fibroblasto humano normal FN-1 (Figura 52) e murinas L929 (Figura 53) apresentaram modificações em relação ao grupo controle não tratado, principalmente após o tratamento com os compostos 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF. Foi observado no grupo controle a marcação intensa das mitocôndrias com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme e homogênea no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto arranjados ao longo da expansão celular, estes estão distribuídos e, mantendo a conformação fusiforme das células. No tratamento com os compostos 2-AE(C18)HF e 2-AE(C16)HF em ambos os tipos celulares observa-se diminuição da densidade celular, retração das expansões citoplasmáticas e diminuição da intensidade de fluorescência.



FN-1 – A) Controle; B) 2-AEH₂F; C) N-2-HEB; D) 2-BEH₂F; E) 2-AE(C12)HF; F) 2-AE(C16)HF; G) 2-AE(C18)HF

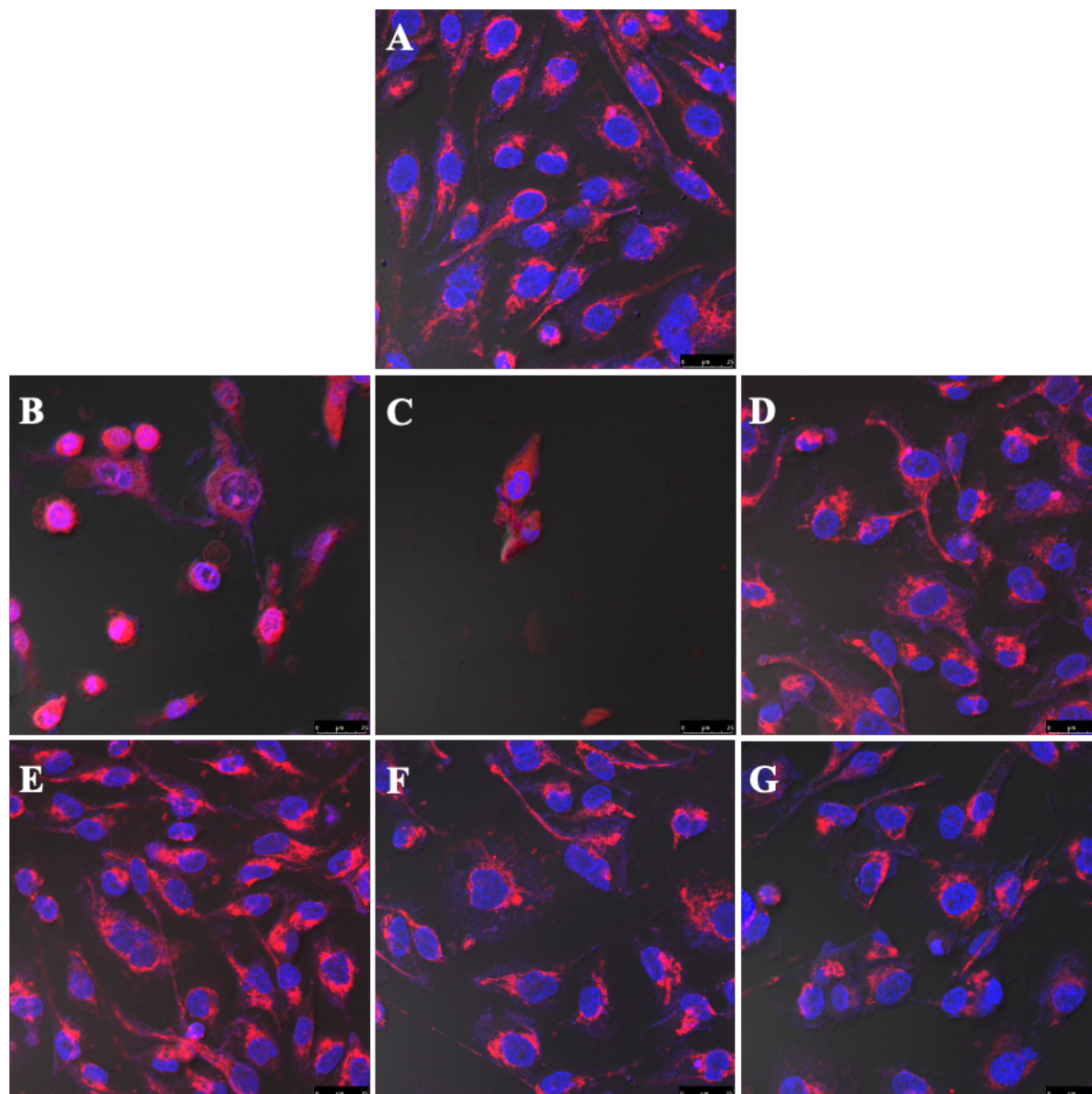
Figura 52. Fotomicrografias representativas das células normais de fibroblastos humanos FN-1 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul- DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células normais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC₅₀% por um período de 24h. Aumento barra de 20um.



L929 – A) Controle; B) 2-AEH₂F; C) N-2-HEB; D) 2-BEH₂F; E) 2-AE(C12)HF; F) 2-AE(C16)HF; G) 2-AE(C18)HF

Figura 53. Fotomicrografias representativas das células normais de fibroblastos murinos L929 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul- DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células normais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC₅₀% por um período de 24h. Aumento barra de 20um.

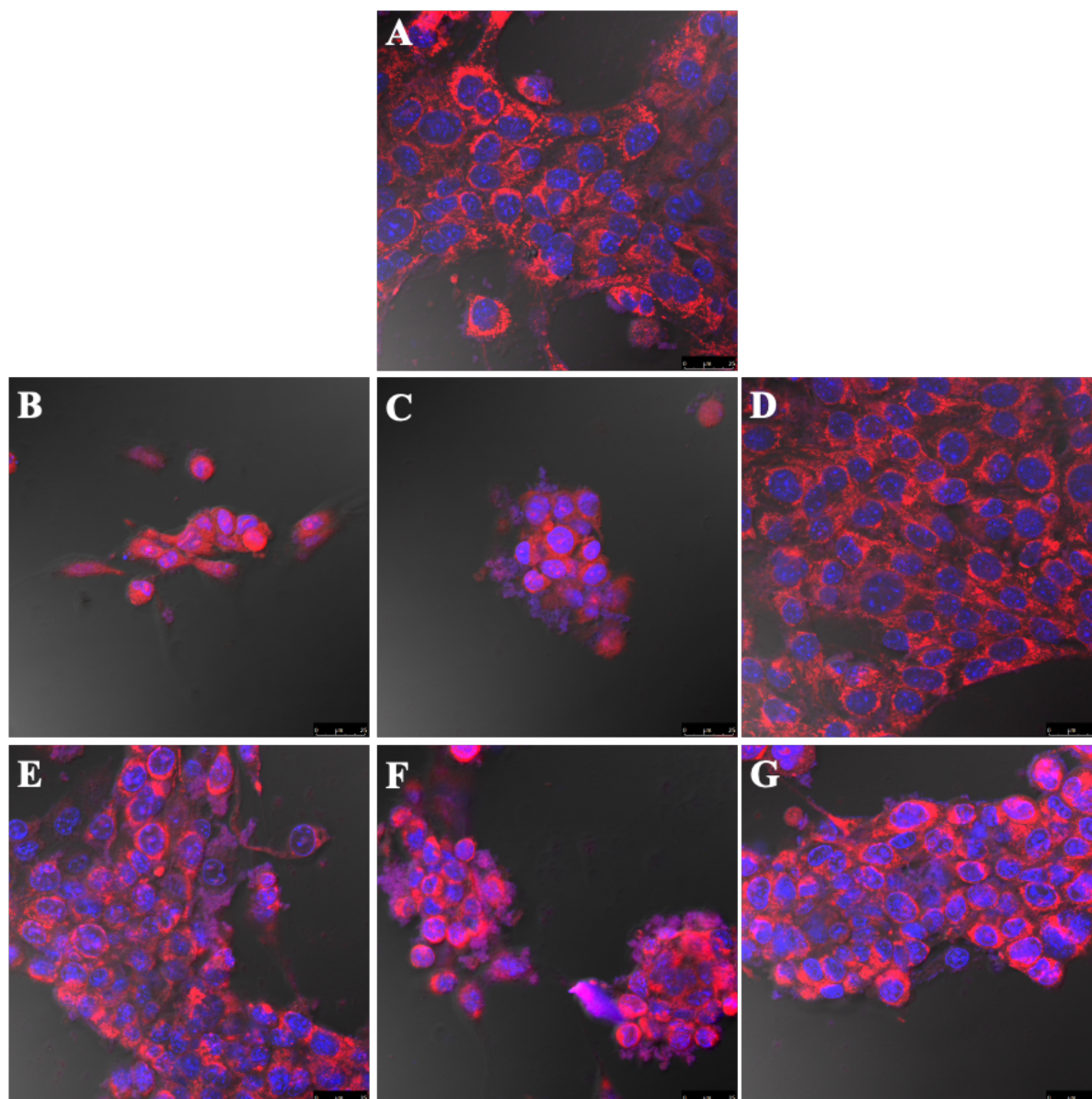
As análises em microscopia confocal a laser das células tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231, mostram que no grupo controle houve a intensa marcação das mitocôndrias com aspecto granular, distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto organizados e distribuídos ao longo das expansões do citoplasma, mantendo a conformação original das células. Nas células tumorais MDA MB-231 tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF promoveram modificações importantes no arranjo e na distribuição das mitocôndrias. Essas alterações causaram modificações morfológicas decorrente da despolarização e reorganização dos filamentos do citoesqueleto para região pericelular e redução potencial elétrico, também pode ser observado a formação das *blebs* de membrana, principalmente nos tratamentos com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB. As alterações morfológicas foram acompanhadas pela redução do potencial elétrico mitocondrial quando analisando a fluorescência e área ocupada no campo observado, como apresentado na Figura 54.



MDA-MB-231 – A) Controle; B) 2-AEH₂F; C) N-2-HEB; D) 2-BEH₂F; E) 2-AE(C12)HF; F) 2-AE(C16)HF; G) 2-AE(C18)HF

Figura 54. Fotomicrografias representativas das células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo-negativo humana MDA MB-231 obtidas por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul- DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC_{50%} por um período de 24h. Aumento barra de 20µm.

As análises em microscopia confocal a laser das células tumorais de adenocarcinoma de mama murina 4T1, mostraram que no grupo controle intensa marcação das mitocôndrias com aspecto granular, distribuídos de forma uniforme no citoplasma e os filamentos do citoesqueleto organizados e distribuídos ao longo das expansões do citoplasma, mantendo a conformação original das células. Essas células formam arranjos semelhantes a agregados tipo glandulares e figuras de mitose, como observado na Figura 55A. As células tumorais murinas 4T1 tratadas com os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF promoveram modificações importantes no arranjo do citoesqueleto e na distribuição das mitocôndrias. Essas alterações causaram modificações morfológicas decorrente da despolarização e reorganização dos filamentos do citoesqueleto para região pericelular e redução potencial elétrico, principalmente nos tratamentos com os compostos 2-AEH₂F (Figura 55B), N-2-HEB (Figura 55C), que reduziram significativamente a densidade celular. As alterações morfológicas foram acompanhadas pela redução do potencial elétrico mitocondrial quando analisando a fluorescência e área ocupada no campo observado. Estes dados corroboram com os testes da atividade metabólica e funcional das mitocôndrias obtidos em citometria de fluxo, como apresentado na Figura 53. Observa-se também que ocorreram alterações morfológicas correspondentes ao processo apoptótico, como a condensação nuclear e a perda dos nucléolos. (Figura 55B e C).



**4T1 – A) Controle; B) 2-AEH₂F; C) N-2-HEB; D) 2-BEH₂F;
E) 2-AE(C12)HF; F) 2-AE(C16)HF; G) 2-AE(C18)HF**

Figura 55. Fotomicrografias representativas das células tumorais de adenocarcinoma de mama triplo-negativo murino 4T1 por microscopia confocal a laser. Observa-se mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRED) e núcleo e material genético marcados em azul - DAPI, analisadas por microscopia confocal a laser. Células tumorais foram tratadas com os diferentes compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF no valor de IC₅₀% por um período de 24 horas. Aumento barra de 20µm.

5. CONCLUSÃO

- A síntese do composto 2-AEH₂F apresentou diversas peculiaridades e escassez de literatura. Diversas metodologias de síntese foram empregadas até chegar em uma nova metodologia onde foi possível obter o composto com rendimento, pureza e estabilidade ideais para os estudos desenvolvidos neste projeto. Foram necessários múltiplos procedimentos para a obtenção do composto puro, os quais não foram encontrados na literatura. Assim, foi desenvolvida uma nova metodologia de síntese e purificação do composto 2-AEH₂F;
- Os análogos obtidos foram sintetizados com metodologias difundidas na literatura, porém com modificações. Desta forma, foram sintetizados e isolados os compostos: N-2-HEB, 2-BEH₂F, 2-AE(C12)HF, 2-AE(C16)HF e 2-AE(C18)HF;
- A caracterização de todos os compostos foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, essa técnica possibilitou caracterizar as moléculas devido a particularidade do núcleo de fósforo, o qual apresenta acoplamentos heteronucleares com os núcleos de hidrogênio e carbono, um atributo que foi indispensável. Os acoplamentos foram a propriedade fundamental para a caracterização de todas as moléculas sintetizadas;
- Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF apresentaram citotoxicidade específica para as linhagens tumorais de mama triplo-negativo humano MDA-MB-231 e murino 4T1;
- Os compostos 2-AEH₂F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF apresentaram concentrações de IC₅₀% significativas para as células tumorais humanas MDA-MB-231. Os valores de IC₅₀% foram seletivos para as linhagens tumorais, ou seja, as concentrações necessárias dos compostos para induzir citotoxicidade nas linhagens tumorais foram significativamente menores, do que suas contrapartes não tumorais;
- 2-AEH₂F, N-2-HEB promoveram alterações na distribuição celular nas diferentes fases do ciclo celular, ambos promoveram parada na fase G₂/M para a linhagem tumoral MDA-MB-231. O diéster de fósforo 2-AE(C18)HF não apresentou nenhuma mudança significativa em nenhuma das fases do ciclo celular;

- A avaliação da expressão dos marcadores de morte celular para a linhagem tumoral humana MDA-MB-231 mostraram que o tratamento com os compostos 2-AEH2F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF aumentaram, a expressão da proteína p53, da liberação do citocromo-c, na expressão da proteína Bad e das caspases fosforiladas 3 e 8. A expressão do TRAIL-DR4 somente não foi modulada pelo composto 2-AE(C18)HF. A expressão da proteína Bcl-2 sofreu diminuição com os compostos 2-AEH2F e N-2-HEB e aumento com 2-AE(C18)HF. A modulação destes marcadores sugere a ativação da via intrínseca e extrínseca da morte celular;
- A expressão dos marcadores VEGF-R1, VEGF-R2 e uPAR apresentaram modulações após o tratamento das células tumorais humanas MDA-MB-231. O 2-AEH2F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF diminuíram a expressão do VEGF-R1, indicando o efeito na inibição da angiogênese e invasão tumoral. O N-2-HEB e 2-AE(C18)HF promoveram a diminuição do VEGF-R2, marcador que é envolvido na linfogênese. O marcador uPAR que é fortemente relacionado com a invasão e metástase, foi modulado pelos compostos 2-AEH2F e N-2-HEB causando a sua diminuição;
- Nas células tumorais MDA MB-231 tratadas com os compostos 2-AEH2F, N-2-HEB e 2-AE(C18)HF promoveram modificações importantes no arranjo e na distribuição das mitocôndrias. Modificações morfológicas decorrentes da despolarização e reorganização dos filamentos do citoesqueleto para região pericelular e redução potencial elétrico. As alterações morfológicas foram acompanhadas pela redução do potencial elétrico mitocondrial quando analisando a fluorescência e área ocupada no campo observado.

6. REFERÊNCIAS

1. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* (1979).;123(3191):309–314. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.123.3191.309>
2. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603–1616. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584910005381>
3. Wang D, Xu Z, Yu H, Chen X, Feng B, Cui Z, Lin B, Yin Q, Zhang Z, Chen C, Wang J, Zhang W, Li Y. Treatment of metastatic breast cancer by combination of chemotherapy and photothermal ablation using doxorubicin-loaded DNA wrapped gold nanorods. *Biomaterials*. 2014;35(29):8374–8384. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.094>
4. Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab*. *Cancer Metab*; 2014;2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057353/> PMID: 25057353
5. Shah T, Krishnamachary B, Wildes F, Wijnen JP, Glunde K, Bhujwalla ZM. Molecular causes of elevated phosphoethanolamine in breast and pancreatic cancer cells. *NMR Biomed*. 2018;31(8):1–9. PMID: 29928787
6. Hua DH. Design, synthesis, and evaluation of bioactive small molecules. *Chemical Record*. 2013;13(1):60–69.
7. Rouf A, Taneja SC. Synthesis of Single-enantiomer Bioactive Molecules: A Brief Overview. *Chirality*. 2014;26(2):63–78. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chir.22268> PMID: 24339171
8. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;62(6):414–428. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20503434/> PMID: 20503434

9. Rosenthal AF, Gever RP. Compounds Related to α -Glycerophosphoric Acid, Phosphorylcholine and Phosphorylethanolamine. *J Am Chem Soc.* 1958;80(19):5240–5241.
10. Baer E. Synthesis of esters of phosphoric acid related to phosphatides. *Journal of Biological Chemistry.* 1965;43(8):1343–1352.
11. Outhouse EL. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. *Biochemical Journal.* 1936;30(2):197–201.
12. Ferreira AK, Meneguelo R, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces apoptosis through caspase-3 pathway by decreasing expression of Bax/Bad protein and changes cell cycle in melanoma. *J Cancer Sci Ther.* 2011;3(3):53–59.
13. Outhouse EL. Further studies of amino-ethyl phosphoric ester—a compound apparently specific to malignant tumours. *Biochemical Journal* . 1937 ;31(9):1459–1463.
14. Myller AT, Karhe JJ, Haukka M, Pakkanen TT. The pH behavior of a 2-aminoethyl dihydrogen phosphate zwitterion studied with NMR-titrations. *J Mol Struct* ; 2013;1033:171–175.
15. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112–124.
16. Eibl H, Arnold D, Weltzien HU, Westphal O. On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs. *Justus Liebigs Ann Chem. Justus Liebigs Ann Chem*; 1967;709(1):226–230.
17. Berkovic D. Cytotoxic Etherphospholipid Analogues. *General Pharmacology: The Vascular System.* Pergamon; 1998 Oct 1;31(4):511–517.
18. Munder PG, Modolell M. Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. *Int Arch Allergy Appl Immunol. Int Arch Allergy Appl Immunol*; 1973;45(1):133–135.

19. Andreesen R, Modolell M, Weltzien HU, Eibl H, Common HH, Löhr GW, Munder PG. Selective Destruction of Human Leukemic Cells by Alkyllysophospholipids. *Cancer Res.* 1978;38(11 part 1):3894–3899.
20. Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis. BioMed Central*; 2010;9:33.
21. Busto J v., Canto-Jañez E del, Goñi FM, Mollinedo F, Alonso A. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. *J Chem Biol. Springer*; 2008;1(1–4):89.
22. Mollinedo F, de La Iglesia-Vicente J, Gajate C, de Mendoza AEH, Villalpulgárin JA, de Frias M, Roué G, Gil J, Colomer D, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res. Clin Cancer Res*;;16(7):2046–2054
23. Dummer R, Röger J, Vogt T, Becker J, Hefner H, Sindermann H, Burg G. Topical application of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas. *Prog Exp Tumor Res. Prog Exp Tumor Res*; 1992;34:160–169.
24. Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-Induced Apoptotic Cell Death on *Leishmania major* and *L. tropica* Strains. *Korean J Parasitol. Korean Society for Parasitology*; 2011;49(1):17.
25. Ngwenya BZ, Fiavey NP, Mogashoa MM. Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids. *Eur J Cancer.* 1992;28(10):1637–1642.
26. Taguchi H, Armarego WLF. Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. *Med Res Rev.* 1998;18(1):43–89.

27. Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2001;2(7):504–513
28. van der Luit AH, Vink SR, Klarenbeek JB, Perrissoud D, Solary E, Verheij M, van Blitterswijk WJ. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(8):2337–2382.
29. Papazafiri P, Avlonitis N, Angelou P, Calogeropoulou T, Koufaki M, Scoulica E, Fragiadaki I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. *Cancer Chemother Pharmacol.* *Cancer Chemother Pharmacol*; 2005;56(3):261–270.
30. Neto SC, Chierice GO, Reimer AJ, Al-Asfour SV, Meneguêlo R, de Almeida MV, Ribeiro Filho OM. Nova metodologia de síntese da fosfoetanolamina na forma sólida com cálcio, magnésio e zinco e na forma de solução com monoetanolamina. PI 0800460-9 A2, 2011.
31. Diversos autores. MCTIC Relatórios Fosfoetanolamina. 2018.
32. Eibl H, Engel J. Synthesis of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine). *Alkylphosphocholines: New Drugs in Cancer Therapy.* 1st ed. Karger Basel ; 1992. p. 1–5.
33. McGuigan C, Swords B. A High Yield Synthesis of Phosphatidyl Ethanolamines Using Phosphoramidite Intermediates. *Synthesis (Stuttg).* 1993;1993(01):133–136.
34. McGuigan Christopher, Mackenzie Andrew. The Synthesis of Some N-Linked Phospholipid Analogues via Phosphorodiamidate Heterocyclic Intermediates. *Synthesis (Stuttg).* 1996;1331.
35. Cheng K, Saha B, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G, Jacobson AE, Rice KC. Synthesis of 2-(5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenamidoethyl-d 4 dihydrogen phosphate, tetra-deuterated pAEA. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2008;51(12):389–390.

36. Dueymes C, Pirat C, Pascal R. Facile synthesis of simple mono-alkyl phosphates from phosphoric acid and alcohols. *Tetrahedron Lett.* 2008;49(36):5300–5301.
37. Obata T, Mukaiyama T. A New Synthesis of Monoalkyl Phosphates. *Journal of Organic Chemistry.* 1967;32(4):1063–1065.
38. Mukaiyama T, Hata T, Mitsunobu O. Methods of Phosphorylation by Means of Organic Dehydrating Reagents. *Journal of Organic Chemistry.* 1962;27(5):1815–1817.
39. Heindl D, Marchand D, Goulioukina N, Herdewijn P, Busson R, Wehbe J, Lescrinier E. Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Analogues with a Sugar Modified Nicotinamide Moiety. *Helv Chim Acta.* 2007;90(7):1266–1278.
40. Kingsland LC. Method of making 2-aminoethyl phosphate. United States Patent Office. 3,644,603, 1972.
41. Kryczka K, Kazimierczak J, Bombinska D, Lewandowski M. Sposób wytwarzania fosforanu 2-aminoetylu. Poland: Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej; PL(11)196501, 2006.
42. Deamer D. The Role of Lipid Membranes in Life's Origin. *Life* [Internet]. MDPI AG; 2017 Jan 17;7(1):5.
43. Bjørsvik HR, Engell T. N-Acylation Reactions Performed in Aqueous Reaction Medium: Screening and Optimising of a Synthetic Step of a Process for Iodixanol. *Org Process Res Dev.* 2002;6(2):113–119.
44. Gueguen G, Gaigé B, Grévy JM, Rogalle P, Bellan J, Wilson M, Klaébé A, Pont F, Simon MF, Chap H. Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry.* 1999;38(26):8440–8450.
45. Gonzalez SN, Mills JJ, Maugeri D, Olaya C, Laguera BL, Enders JR, Sherman J, Rodriguez A, Pierce JG, Cazzulo JJ, D'Antonio EL. Design, synthesis, and evaluation of substrate – analogue inhibitors of

- Trypanosoma cruzi ribose 5-phosphate isomerase type B. *Bioorg Med Chem Lett.* Elsevier Ltd; 2021;15(32).
46. Tanaka K, Kimura T, Maruta S. Synthesis of a novel fluorescent non-nucleotide ATP analogue and its interaction with myosin ATPase. *J Biochem.* 2011;149(4):395–403.
 47. Herdman CA, Strecker TE, Tanpure RP, Chen Z, Winters A, Gerberich J, Liu L, Hamel E, Mason RP, Chaplin DJ, Trawick ML, Pinney KG. Synthesis and biological evaluation of benzocyclooctene-based and indene-based anticancer agents that function as inhibitors of tubulin polymerization. *Medchemcomm. Royal Society of Chemistry;* 2016;7(12):2418–2427.
 48. Murari R, Abd El-Rahman MMA, Wedmid Y, Parthasarathy S, Baumann WJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of phospholipids in solution. Spectral and stereochemical assignments based on carbon-13-phosphorus-31 and carbon-13-nitrogen-14 couplings. *J Org Chem. gress;* 1982;47(11):2158–2163.
 49. Antenor Pereira Bonfim Neto, Laertty Garcia de Sousa Cabral, Thalles Anthony Duarte Oliveira, Julio Carlstron Pacheco, Monique Gonçalves Alves, Mercedes Reyes Hernández, Rosa Andreia Nogueira Laiso, Durvanei Augusto Maria. The Antiproliferative and Pro-apoptotic Role of 2-aminoethyl dihydrogen Phosphate in Triple-negative Breast Tumor Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2021;9(4).
 50. Manuela Garcia Laveli da Silva, Luciana Bastianelli Knop, Durvanei Augusto Maria. Meclizine Chloridrate and Methyl- β -Cyclodextrin Associated with Monophosphoester Synthetic Phosphoethanolamine Modulating Proliferative Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2019 Jul 8;7(7):408–420.
 51. Manuela Garcia Laveli da Silva, Laertty Garcia de Sousa Cabral, Monique Gonçalves Alves, Thais de Oliveira Conceição, Henrique Hesse, Rosa Andrea Nogueira Laiso, Daniel da Conceição Rabelo, Durvanei Augusto Maria. 2-aminoethyl Dihydrogen Phosphate as a Modulator of Proliferative

- and Apoptotic Effects in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(3):83–97.
52. de Sousa Cabral LG, Hesse H, Freire KA, de Oliveira CS, Pedron CN, Alves MG, Carlstron JP, Poyet JL, Oliveira VX, Maria DA. The BR2 peptide associated with 2-aminoethyl dihydrogen phosphate is a formulation with antiproliferative potential for a triple-negative breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153:113398.
 53. Conceição TO, Cabral LGS, Laveli-Silva MG, Pacheco JC, Alves MG, Rabelo DC, Laiso RAN, Maria DA. New potential antiproliferative monophosphoester 2-aminoethyl dihydrogen phosphate in K-562 and K-562 MDR+ leukemia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:112054.
 54. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005 Feb 2;4(2):147–171.
 55. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*. 2009 Jun 13;23(6):1625–1637.
 56. Hashemi M, Karami-Tehrani Fatemeh, Ghavami S. Cytotoxicity Effect of Cladribine on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Iran Biomed J*. 2004;8(1):7–12.
 57. Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*. 2005 Apr 15;103(8):1551–1560.
 58. Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol*. 2004;76(1):169–175.
 59. Zhai BT, Tian H, Sun J, Zou JB, Zhang XF, Cheng JX, Shi YJ, Fan Y, Guo DY. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *J Transl Med*. 2022;20(1):135.

60. Conceição TO, Cabral LGS, Laveli-Silva MG, Pacheco JC, Alves MG, Rabelo DC, Laiso RAN, Maria DA. New potential antiproliferative monophosphoester 2-aminoethyl dihydrogen phosphate in K-562 and K-562 MDR+ leukemia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:112054.
61. Manuela Garcia Laveli da Silva, Laerty Garcia de Sousa Cabral, Monique Gonçalves Alves, Thais de Oliveira Conceição, Henrique Hesse, Rosa Andrea Nogueira Laiso, Daniel da Conceição Rabelo, Durvanei Augusto Maria. 2-aminoethyl Dihydrogen Phosphate as a Modulator of Proliferative and Apoptotic Effects in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(3).
62. de Sousa Cabral LG, Hesse H, Freire KA, de Oliveira CS, Pedron CN, Alves MG, Carlstron JP, Poyet JL, Oliveira VX, Maria DA. The BR2 peptide associated with 2-aminoethyl dihydrogen phosphate is a formulation with antiproliferative potential for a triple-negative breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153.
63. He H, Li DW, Yang LY, Fu L, Zhu XJ, Wong WK, Jiang FL, Liu Y. A novel bifunctional mitochondria-targeted anticancer agent with high selectivity for cancer cells. *Sci Rep*. 2015;5(1):
64. Arismendi-Morillo G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):2062–2068.
65. Satoh M, Yagawa K. Electron microscopic study on mitochondria in hürthle cell adenoma of thyroid. *Pathol Int*. 1981;31(6):1079–1087.
66. Gilkerson RW, Margineantu DH, Capaldi RA, Selker JML. Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett*. 2000;474(1):1–4.
67. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res*. 2004;64(3):985–993.

68. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005;65(2):613–21.
69. Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, Pennisi LF, Toller M, Iommarini L, Ghelli A, Moretti M, Betts CM, Martinelli GN, Ceroni AR, Curcio F, Carelli V, Rugolo M, Tallini G, Romeo G. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(21):9001–9006.
70. Lynam-Lennon N, Maher SG, Maguire A, Phelan J, Muldoon C, Reynolds J v., O'Sullivan J. Altered Mitochondrial Function and Energy Metabolism Is Associated with a Radioresistant Phenotype in Oesophageal Adenocarcinoma. *PLoS One.* 2014;26;9(6).