MESTRADO ACADÊMICO EM IMPLANTODONTIA

Ludymila Barros Palmerston Martin

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA EM CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL *IN VITRO*

Guarulhos
2020

Ludymila Barros Palmerston Martin

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA EM CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Implantodontia da Universidade Guarulhos, como requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Implantodontia.

Orientador: Lúcio Frigo

Guarulhos
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

M379e

Martin, Ludymila Barros Palmerston
Efeito antiproliferativo da fosfoetanolamina sintética em carcinoma espinocelular oral in vitro. / Ludymila Barros Palmerston Martin. -- 2020.
21 f.; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Lucio Frigo

Dissertação (Mestrado em implantodontia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2020.

1. Carcinoma de células escamosas 2. Fosfoetanolamina sintética 3. Fosfolipídeos 4. Toxicidade I. Título II. Frigo, Lucio (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

UNIVERITAS

UNIVERSIDADE UNIVERSITAS VERITAS

UNG

UNIVERSIDADE

Grupo Ser Educacional — Gente criando o futuro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "EFEITO ANTIPRORIFERATIVO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA EM CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL *IN VITRO*" em sessão pública realizada em 18 de dezembro de 2020, considerou a candidata LUDMYLA BARROS PALMESRTON MARTIN aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Lucio Frigo (UNG)_____

2. Profa. Dra. Joseli Maria Cordeiro (UNICSUL)_____

3. Profa. Dra. Thásia Luiz Dias Ferreira (UNG)_____

Guarulhos, 18 de dezembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Rodolfo e filhas Laura e Helena, por todo apoio e incentivo; aos meus pais Sérgio e Sandra, fonte de inspiração, coragem e luta, e a todos aqueles a quem esta pesquisa possa de alguma forma ajudar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Lúcio Frigo, a quem tenho imensa admiração, orientador deste trabalho, por compartilhar seu amplo conhecimento de forma tão desprendida e natural.

À equipe de professores do programa de Pós-graduação da Universidade Guarulhos, por contribuirem para o meu crescimento profissional.

À Maria Eduarda Peres, pela sua dedicação a este projeto.

Ao Instituto Butantan, que disponibilizou sua infraestrutura e equipe para que a pesquisa fosse realizada.

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”

Max Weber

PALMERSTON, L. Efeito antiproliferativo da fosfoetanolamina sintética em carcinoma espinocelular oral *in vitro* [Dissertação de Mestrado].Guarulhos: Universidade Guarulhos UNG; 2020.

RESUMO

O carcinoma espinocelular é uma doença que apresenta incidência crescente, principalmente entre os mais jovens, com alta taxa de morbidade e de mortalidade. Infelizmente o diagnóstico tardio, que ocorre em 2/3 dos casos, leva a sequelas estruturais, funcionas e estéticas, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Diante disso se faz necessário a investigação de drogas potencialmente mais eficazes. A fosfoetanolamina sintética (FOS) tem demonstrado efeito antiproliferativo em várias linhagens de células tumorais em estudos anteriores. No presente estudo, avaliamos a citotoxicidade da FOS nas linhagens de células tumorais SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua humana por meio de teste colorimétrico MTT e alterações morfológicas das células. A FOS foi testada nas concentrações de 10 a 100 mM nos períodos de 24 e 48 horas e nas concentrações de 2 a 100 mM por 72 horas. As alterações morfológicas apresentadas pelas células tumorais tratadas por 24 e 48 horas foram visualizadas por meio de fotomicrografia. Todos os valores foram expressos como Média ± DP. Cada valor é a média de pelo menos três experimentos independentes em cada grupo. Para análises de significância o teste t de Student e a análise de variância One Way (ANOVA) foram calculados usando GraphPad Prism 4.0. Foi realizado teste de Dunnett. p valores <0.05, 0.01 e 0.001 foram considerados significantes.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Fosfoetanolamina sintética; Fosfolipídeos; Toxicidade.

PALMERSTON, L. Antiproliferative effect of synthetic phosphoetanolamine in oral squamous cell carcinoma *in vitro* [Dissertação de Mestrado].Guarulhos: Universidade Guarulhos UNG; 2020.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is a disease that has an increasing incidence, especially among younger people, with a high rate of morbidity and mortality. Unfortunately, the late diagnosis, which occurs in 2/3 of the cases, leads to structural, functional and aesthetic sequelae, compromising the patient's quality of life. Therefore, it is necessary to investigate potencially more effective drugs. Synthetic phosphoethanolamine (PHOS-S) has demonstrated antiproliferative effect on several tumor cell lines in previous studies. At the present study, we evaluated the cytotoxicity of PHO-S on tumor cell lines SCC-9 and SCC-25 of oral squamous cell carcinoma (OSCC) of human tongue through MTT colorimetric assay and cell morphological changes. PHOS-S was tested at concentrations 10-100 mM over 24 and 48 hours and at concentrations 2-100 mM over 72 hours. Morphological changes presented by the tumor cells treated for 24 and 48 hours were visualized through photomicrography. All values were expressed as Mean ± SD. Each value is the mean of at least three independent experiments in each group. For significance analyses Student's t-tests and One way analysis of variance (ANOVA) were calculated using GraphPad Prism 4.0. Dunnett´s test was performed. p values <0.05, 0.01 and 0.001 were considered significant.

Keywords: Squamous cell carcinoma; synthetic phosphoethanolamine; phospholipids; toxicity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi m$: potencial de membrana mitocondrial

CEC: Carcinoma espinocelular

DODAC: dioctadecyldimethylammonium chloride / cloreto de dioctacecildimetilamônio

DP: Desvio padrão

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FOS: Fosfoetanolamina sintética

HPV: Papilomavírus Humano

IC50%: Concentração Inibitória 50%

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

mM: Milimolar

MTT: teste colorimétrico (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)

nm: Nanômetro

OSCC: Oral squamous cell carcinoma

PHOS-S: Synthetic phosphoethanolamine

SCC: Squamous cell carcinoma

SD: Standard deviation

µL: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

Figura 2 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

Figura 3 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 72 horas de tratamento com FOS (2 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 72 horas de tratamento com FOS (2 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

Figura 4 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. Nas células tratadas ocorre diminuição da densidade celular, presença de debri celular e perda da morfologia fusiforme.

Abreviaturas: SCC, linhagem de células tumorais de CEC de língua humana; FOS, fosfoetanolamina sintética; mM, milimolar.

Figura 5 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. Com o aumento do período para 48 horas foi verificado aumento das células planctônicas, presença de debri celular e diminuição da densidade celular nas células tratadas.
Abreviaturas: SCC, linhagem de células tumorais de CEC de língua humana; FOS, fosfoetanolamina sintética; mM, milimolar.

Figura 6 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. As alterações foram mais significativas somente na concentração 60mM. Alterações discretas nas células tratadas a partir de 20 mM e alterações da morfologia mais evidente na maior concentração da FOS.
Abreviaturas: SCC, linhagem de células tumorais de CEC de língua humana; FOS, fosfoetanolamina sintética; mM, milimolar.

Figura 7 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. As células tratadas com Pho-s demonstram diminuição da densidade celular, morfologia celular alterada e presença de debri celular.
Abreviaturas: SCC, linhagem de células tumorais de CEC de língua humana; FOS, fosfoetanolamina sintética; mM, milimolar.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO …….....……..…….. 1

2. PROPOSIÇÃO…… 6

   2.1 OBJETIVO GERAL……..... 6

   2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS……..... 6

3. MATERIAL E MÉTODOS……..... 7

   3.1 PROTOCOLO DO MTT……..... 7

   3.2 PROTOCOLO DA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA…… 7

   3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO…… 7

4. RESULTADOS……... 8

   4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR COM MTT……..... 8

   4.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA…… 10

5. DISCUSSÃO…….……..... 15

6. CONCLUSÕES…….. 18

7. REFERÊNCIAS……..... 19

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e é responsável por cerca de 2,5% do total de todos os casos de câncer e por 1,9% de todas as mortes por câncer anualmente (ALI et al., 2017). Mais de 90% dos cânceres orais (que ocorrem na boca, lábios e língua) são carcinoma espinocelular (ALI et al., 2017; KAIN et al., 2020; LAURITANO et al., 2019; REZAEI et al., 2019). Com mais de 300.000 novos casos relatados anualmente em todo o mundo, o CEC oral apresenta incidência crescente, principalmente entre os mais jovens (THOMSON, 2018). A doença tem comportamento clínico agressivo e prognóstico relativamente ruim (ALMANGUSH et al., 2017). Apresenta alta taxa de morbidade (37,8%) cinco anos após o diagnóstico (ALI et al., 2017; RIVERA et al., 2017), taxa de sobrevida relativa em 5 anos de 63% e a mortalidade afeta cerca de 19% dos pacientes (ALMANGUSH et al., 2017). A doença permanece letal e deformante devido à invasão do tumor, destruição orofacial, metástase de linfonodo cervical e disseminação final pelo sangue (THOMSON, 2018).

O câncer oral tem sido observado como uma doença multifatorial na qual fatores ambientais, genéticos e epigenéticos estão envolvidos em sua etiologia (ALI et al., 2017; LAURITANO et al., 2019). A maior incidência de CEC oral tem sido relatada em países em desenvolvimento e tem sido associada a comportamentos relacionados ao câncer oral, como uso de tabaco (com e sem fumaça), álcool e com o hábito de mascar noz de betel ou de areca. Pesquisadores relataram que tais comportamentos levam a variações genéticas em genes supressores de tumor (APC, p53), proto-oncogenes (Myc), oncogenes (Ras) e genes que controlam processos celulares normais (EIF3E, GSTM1) (ALI et al., 2017). Também são reconhecidos como fatores de risco infecções com vírus Epstein Barr e Papilomavirus Humano (HPV), em particular o HPV-16, que é responsável por 30,8% dos cânceres orofaríngeos (LAURITANO et al., 2019).

A transformação da mucosa oral escamosa estratificada normal em pré-maligna e maligna permanece pouco compreendida, embora seja reconhecido que é um processo complexo, com vários passos e multifatorial no qual alterações genéticas acumuladas interrompem o processo normal dos oncogenes e genes

supressores de tumor (CALIFANO et al., 1996; THOMSON, 2018). Clinicamente podemos identificar algumas displasias epiteliais, em diferentes graus de severidade, que são distúrbios orais potencialmente malignos. Microscopicamente estas lesões são reconhecidas pela desorganização do tecido epitelial fenotípico e alterações de desmaturação. A perda do controle do ciclo celular e a proliferação celular anormal são mecanismos fundamentais que guiam a carcinogênese. Durante a carcinogênese, foi demonstrado não somente aumento da proliferação celular, mas também a ruptura hierárquica, com o aumento da proliferação se estendendo para as camadas suprabasais, o que está associado a desfecho clínico mais complicado, com persistência, malignidade e metástase. No CEC oral, foi demonstrado em estudo in vitro um aumento significativo dos índices de proliferação para displasia cada vez mais grave e piora dos graus de diferenciação (THOMSON, 2018).

Em estudo in vitro, ao coletar mucosa oral normal em vários sítios e medir os índices de proliferação, verificou-se atividade proliferativa inerentemente alta e prolongamento da síntese de DNA da fase S do ciclo celular no assoalho de boca e região ventro-lateral da língua, áreas que são mais comumente acometidas por CEC oral (THOMSON, 2018). A língua é o local mais comumente afetado, sendo responsável por 60% dos casos de câncer oral (OMURA, 2014).

A lâmina basal é observada em todos os tipos histológicos de CEC oral, exceto em carcinoma in situ. Em CEC oral invasivo a lâmina basal é fina, descontínua e fragmentada. Isso leva à conclusão de que a fragmentação ou desintegração da lâmina basal é essencial para a invasão do tumor. Foi constatado hemidesmossomos mal desenvolvidos com tamanho e número reduzidos, exceto no carcinoma in situ. O tamanho da célula é diretamente proporcional ao grau de diferenciação do CEC oral e o tamanho do núcleo inversamente proporcional (KANNAN et al., 1994).

A característica clínica clássica do CEC oral é definida por úlceras persistentes endurecidas à palpação e infiltração periférica, podendo ou não estar associada a vegetações, manchas avermelhadas ou esbranquiçadas, dependendo da quantidade de queratina e vascularização (NEVILLE et al., 2016).

O reconhecimento de desordens potencialmente malignas é fundamental em uma estratégia intervencionista bem-sucedida na tentativa de evitar que um dano genotípico inicial e irreversível que produza desorganização e desmaturação do

tecido, progrida para CEC oral invasivo (THOMSON, 2018). A leucoplasia e a eritroplasia são consideradas doenças comuns da mucosa oral e apresentam alta taxa de transformação maligna (ALI et al., 2017). A fim de melhorar a sobrevida do paciente e reduzir a morbidade após o diagnóstico de CEC oral é imperativo que os médicos utilizem a “janela de desordens potencialmente malignas” para identificar a transformação em malignidade no estágio mais precoce possível e intervir efetivamente para interromper a progressão da doença (THOMSON, 2018).

Ao longo dos anos vários biomarcadores tumorais têm sido sugeridos para prever o comportamento do tumor, orientar o plano de tratamento e definir o prognóstico de pacientes com CEC oral, mas considerando a falta de estudos de acompanhamento, estas moléculas ainda são consideradas potenciais biomarcadores, sendo necessários mais estudos para validá-los (ALMANGUSH et al., 2017; RIVERA et al., 2017; THOMSON, 2018). Rezaei e colaboradores (2019) realizaram revisão sistemática e meta-análise, e afirmaram que as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 podem ser úteis como potenciais biomarcadores, pois se encontram significativamente aumentados em níveis séricos e salivares em pacientes com CEC oral quando comparados a pacientes saudáveis. Pesquisadores têm investigado o papel dos neutrófilos na patogênese do CEC oral (MAGALHAES et al., 2014). Está relatado também que a E-caderina poderia ser utilizada como biomarcardor para avaliar a progressão e metástase em CEC oral, mas que poderia não ser um marcador adequado para células tronco cancerígenas (ZHOU; JIANG, 2008). Na ausência de biomarcadores preditivos, o acompanhamento clínico dos pacientes com desordens potencialmente malignas a longo prazo é obrigatório para avaliar progressão e risco de transformação em maligno (THOMSON, 2018).

Infelizmente dois terços dos casos são diagnosticados somente após terem avançado localmente (ALI et al., 2017), sendo que 40% dos pacientes tem doença em estágio IV no momento do diagnóstico (LAURITANO et al., 2019). A modalidade de tratamento é determinada pelo estadiamento da doença, baseado em achados do exame físico e estudos de imagem (OMURA, 2014). O tratamento do CEC oral é primariamente cirúrgico e envolve ressecção do tumor primário em bloco, podendo envolver ressecção dos nódulos cervicais, baseado na presença de riscos de metástase regional. No entanto, a ressecção bem sucedida continua sendo um desafio, com taxas de recidiva local entre 25% e 50% e sobrevida em 5 anos de 64,8% (KAIN et al., 2020). Em caso de ressecção de grande tumor primário, pode

ser também necessária cirurgia reconstrutiva. É recomendado radioterapia ou quimioterapia pós operatória para pacientes com metástase de múltiplos linfonodos ou disseminação extracapsular (extracapsular spread) (OMURA, 2014). A imunoterapia tem se mostrado uma via de tratamento promissora (LAU et al., 2020). A terapia fotodinâmica, uma abordagem contemporânea que utiliza a luz para ativar um agente fotossensibilizante na presença de oxigênio, tem sido difundida também como uma opção de tratamento de CEC oral (GONDIVKAR et al., 2018). A segurança da terapia com fotobiomodulação, como tratamento adjuvante associado a quimioterapia e radioterapia para prevenir e controlar a mucosite oral, permanece uma grande preocupação, já que a literatura traz resultados contraditórios quanto aos efeitos da fotobiomodulação em células do CEC oral (SILVEIRA et al., 2019). Em câncer de cabeça e pescoço estruturas críticas podem ser danificadas pelo tumor ou pelo próprio tratamento, e as sequelas estruturais, funcionais e estéticas, podem trazer grande impacto tanto na vida social do paciente quanto na sua reabilitação, dando ênfase que a decisão para o melhor tratamento deve ser baseada na probabilidade de cura, na qualidade de vida pós-tratamento e melhora da sobrevida (OMURA, 2014).

Com os fatores limitantes das terapias atualmente disponíveis para o tratamento do câncer, o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e menos prejudiciais é necessário. Fosfolipídios antineoplásicos e precursores lipídicos surgiram como uma nova e promissora classe de agentes antitumorais. A amina primária fosfoetanolamina é um precursor da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina e está naturalmente envolvida na renovação (turnover) das membranas celulares (FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013c). A fosfoetanolamina sintética (FOS) é um fosfolipídeo que atua como substrato para muitos fosfolipídeos de membrana (FERREIRA et al., 2013b). Embora não haja consenso para os mecanismos antineoplásicos, a ação antitumoral da FOS pode ser atribuída à modulação da biossíntese de lipídios, ou seja, rápida renovação de fosfolipídeos levando ao seu acúmulo nas membranas celulares, inibindo assim a transdução de sinais mitogênicos e induzindo a morte celular (FERREIRA et al., 2012a). Em suma, os fosfolipídios antitumorais atuam na membrana celular e não tem como alvo o DNA. Eles alteram a renovação da membrana plasmática, induzindo a morte celular, com alta seletividade para células cancerígenas (FERREIRA et al., 2012b, 2013a; LUNA et al., 2018a).

O primeiro ato de muitos agentes anticâncer é induzir a apoptose, que pode ser por via extrínseca ou intrínseca. Os efeitos apoptóticos da FOS provavelmente acontecem por via intrínseca (mitocondrial) e envolvem a ruptura do potencial de membrana combinada com o aumento da transição da permeabilidade da mitocôndria e liberação de membros pro-apoptóticos da mitocôndria para o citoplasma, principalmente o citocromo c, que aciona a cadeia de procaspases e caspases iniciadoras que induz ao aumento da atividade da caspase efetora 3, levando à externalização da fosfatidilserina. Estudos demonstraram alterações morfológicas, como retração nuclear seguida de condensação da cromatina e encolhimento celular, que são características de apoptose. Sugere-se que a FOS tem um bom perfil de biodistribuição, permitindo que atue como um composto antitumoral contra células tumorais infiltradas em diferentes órgãos (FERREIRA et al., 2012a, 2013c).

Há na literatura relato levantando preocupações éticas com o uso da FOS em pacientes com câncer. Este estudo questiona a pureza da medicação, se ela satisfaz os padrões de qualidade farmacêutica exigidos para um medicamento experimental e sua potencial atividade anticâncer (PAUMGARTTEN, 2017).

Estudos demonstraram como vantagens com o tratamento da FOS a taxa de sobrevida evidenciada nos animais tratados, a regressão do volume tumoral e ainda a especificidade e seletividade apresentada pela FOS, inibindo a proliferação de células tumorais e sua disseminação, observada pelo aumento da apoptose através da via mitocondrial (FERREIRA et al., 2013a, 2013c). Ferreira e colaboradores (2013a), afirmam que os resultados de estudos in vivo sustentam que a FOS pode ser usada em concentrações terapêuticas sem ou com efeitos colaterais mais baixos.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antitumoral e antiproliferativo *"in vitro"* da fosfoetanolamina sintética (FOS) em linhagens de células de carcinoma espinocelular (CEC) oral (SCC-9 e SCC-25).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Foram determinadas as concentrações inibitórias (IC50%) e a citotoxicidade da fosfoetanolamina sintética (FOS) nas linhagens das células tumorais citadas acima, por ensaio colorimétrico MTT que analisa a viabilidade celular, após as células serem tratadas com FOS nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

B. As alterações morfológicas celulares decorrentes da citotoxicidade foram avaliadas em fotomicrografias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo utilizamos as linhagens de células de CEC de língua humana SCC-9 (ATCC®CRL-1629™) e SCC-25 (ATCC®CRL-1628™).

3.1 Protocolo do MTT (ensaio de viabilidade celular)

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio).

As células foram plaqueadas em quadruplicata na densidade de 10^4 células, em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C. Após o período de incubação as células foram tratadas durante 24 e 48 horas com FOS nas concentrações de 10 a 100 mM e tratadas por 72 horas com FOS nas concentrações de 2 a 100 mM. Nas placas tratadas foi adicionada solução de MTT (5mg/ml) e em seguida foram incubadas por 3 horas à 37ºC. Após este período, o meio foi removido e acrescentado 150 µL de metanol para dissolver os cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm, para a determinação da concentração inibitória (IC50%). Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle e calculada a equação da reta considerando-se o valor da concentração molar na função logarítmica (log[x] mM).

3.2 Protocolo da avaliação morfológica

O efeito de citotoxicidade causado pela FOS foi fotodocumentado entre os períodos de tratamento de 24 e 48 horas. As alterações morfológicas foram observadas em fotomicrografias e capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F.

3.3 Tratamento estatístico

Todos os valores foram expressos como Média ± DP. Cada valor é a média de pelo menos três experimentos independentes em cada grupo. Para análises de significância o teste t de Student e a análise de variância One Way (ANOVA) foram calculados usando GraphPad Prism 4.0. Foi realizado teste de Dunnett. p valores <0.05, 0.01 e 0.001 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da viabilidade celular com MTT

Os resultados demonstraram que após 24 horas de tratamento, a FOS induz significativa citotoxicidade nas células tumorais SCC-9 a partir de 30 mM, ($p<0,05$) tendo a IC50% calculada de 82,7mM (R^2 0,8567). A viabilidade das células tumorais SCC-25 foi reduzida significativamente a partir de 60 mM, ($p<0,05$) e a IC50% calculada de 79,2 mM (R^2 0,9168). Os dados apontaram que a linhagem SCC-25 é mais resistente à FOS neste período testado, entretanto a IC50% definida para as duas linhagens foi semelhante. (Figura 1)

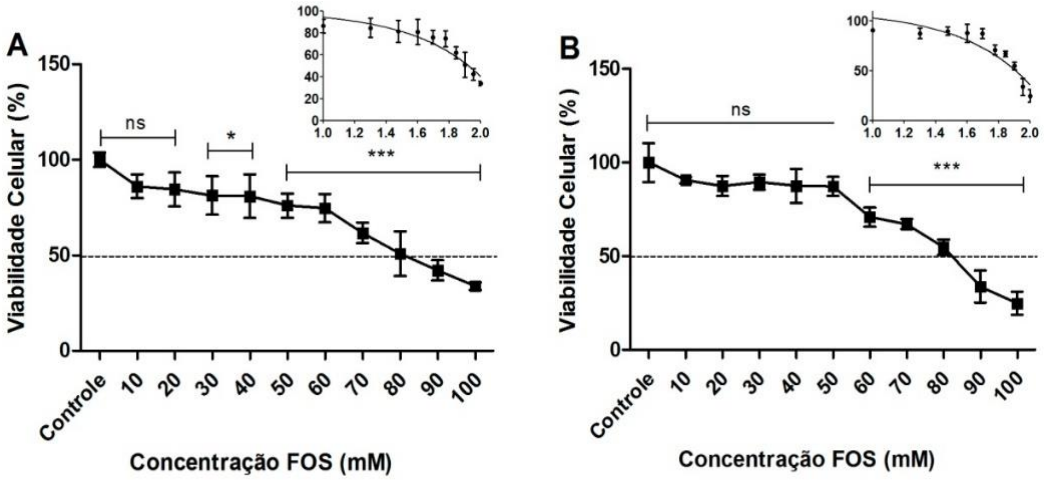

Figura 1 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

A IC50% de ambas as linhagens celulares diminuiu conforme o tempo de tratamento aumentou para 48 e 72 horas. Após 48 horas a IC50% foi semelhante nas duas linhagens celulares: 34,7 mM (R^2 0,9423) nas células tumorais SCC-9 e 35,7 mM (R^2 0,9792) nas células tumorais SCC-25. Neste período testado a linhagem celular SCC-9 se mostrou mais resistente que a SCC-25. Os dados apresentaram significativa citotoxicidade induzida pela FOS nas células tumorais

SCC-9 a partir de 30 mM, (p<0,001) e nas células tumorais SCC-25 a partir de 20 mM, (p<0,01). (Figura 2).

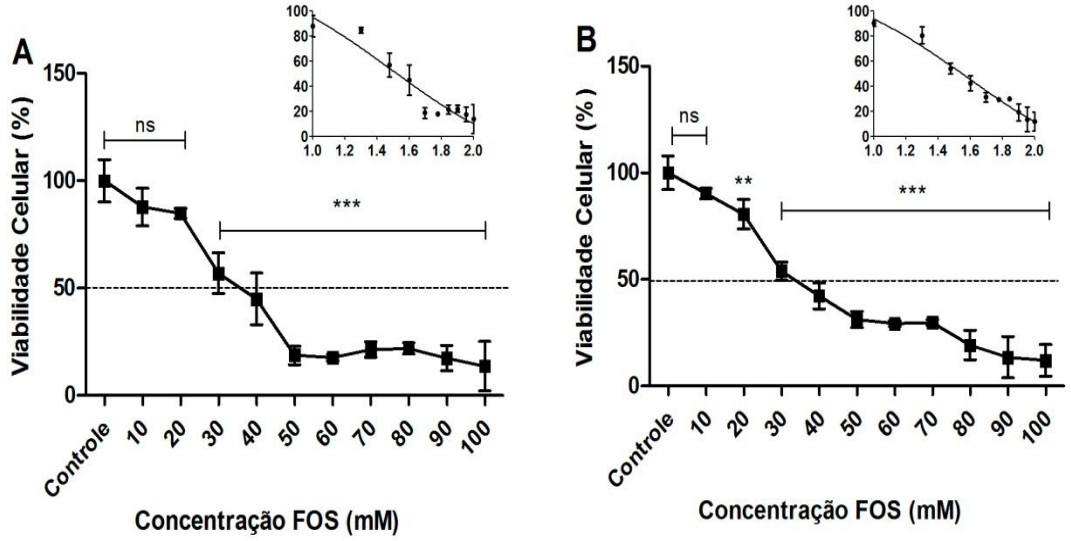

Figura 2 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 48 horas de tratamento com FOS (10 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

A IC50% nas células tumorais SCC-9 e SCC-25 para o tratamento com FOS por 72 horas foi estabelecida em valores bem abaixo dos outros dois períodos, respectivamente 3,8 mM (R^2 0,5874) e 8,3 mM (R^2 0,7964). (Figura 3)

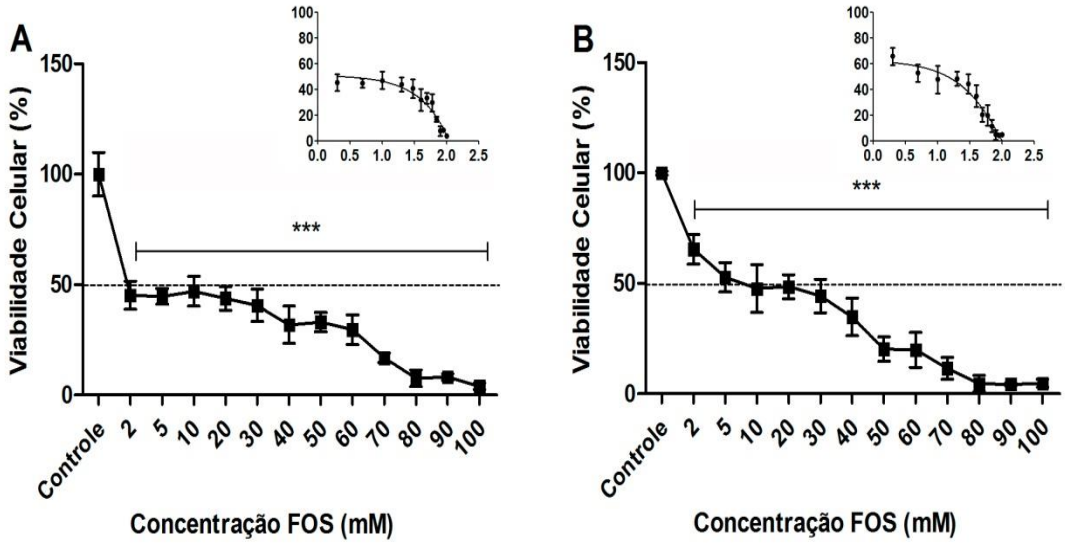

Figura 3 - Determinação da citotoxicidade em células SCC-9 e SCC-25 de carcinoma espinocelular de língua pelo método colorimétrico MTT. (A) Média ± DP da viabilidade das células SCC-9 após 72 horas de tratamento com FOS (2 – 100 mM); (B) Média ± DP da viabilidade das células SCC-25 após 72 horas de tratamento com FOS (2 – 100 mM). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns
Abreviaturas: SCC, linhagens de células tumorais de CEC de língua humana; MTT, teste colorimétrico; DP, desvio padrão; FOS, fosfoetanolamina sintética; ns, não significativo; mM, milimolar.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade indicam que a FOS promove efeitos antitumorais dose dependente após todos os períodos de tratamento testados em células tumorais SCC-9 e SCC-25 de CEC de língua humana.

4.2 Avaliação morfológica

Foi observado em todas as fotomicrografias do controle grande número de células que se apresentam confluentes, fusiformes, com prolongamentos citoplasmáticos. Notadamente se observa diminuição do número de células e inúmeras alterações morfológicas com o tratamento com a FOS em células tumorais SCC-9 e SCC-25 a partir de 20mM nos períodos de 24 e 48 horas e essas modificações ficam mais perceptíveis com o uso de concentrações maiores até o patamar testado de 60mM. Com o tratamento com a FOS, as células apresentaram retração citoplasmática levando à perda de adesão e ao aumento de células planctônicas. Fica evidente o aumento do número de células com maior grau de atipia, que apresentam relação núcleo-citoplasma alterada, cariomegalia e formação de corpos apoptóticos, que são eventos relacionados ao processo de apoptose.

Em ambas as linhagens, no período de 24 horas foram necessárias maiores concentrações da FOS para gerar as alterações citadas acima quando comparado ao período de 48 horas

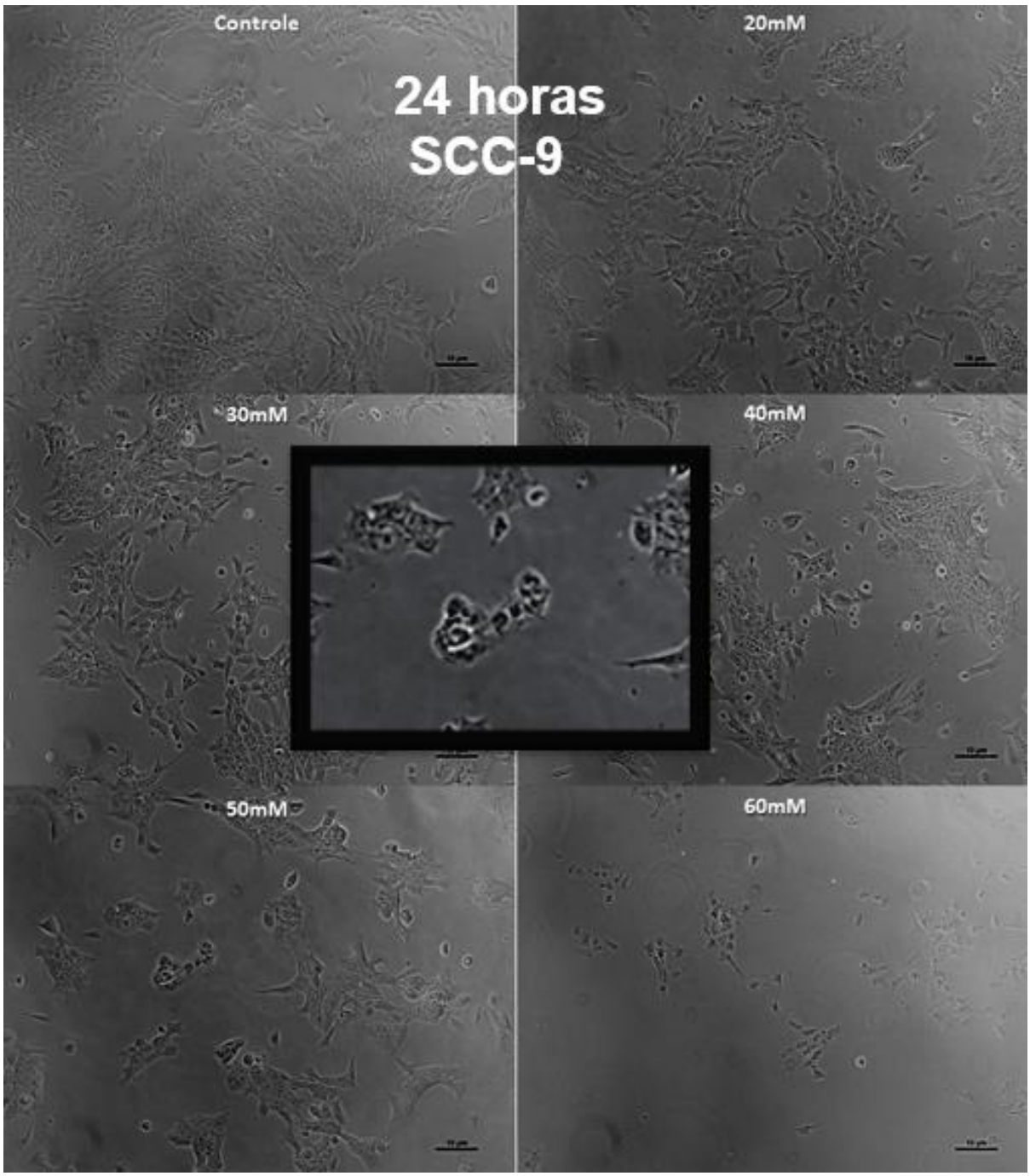

Figura 4 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. Nas células tratadas ocorre diminuição da densidade celular, presença de debri celular e perda da morfologia fusiforme.

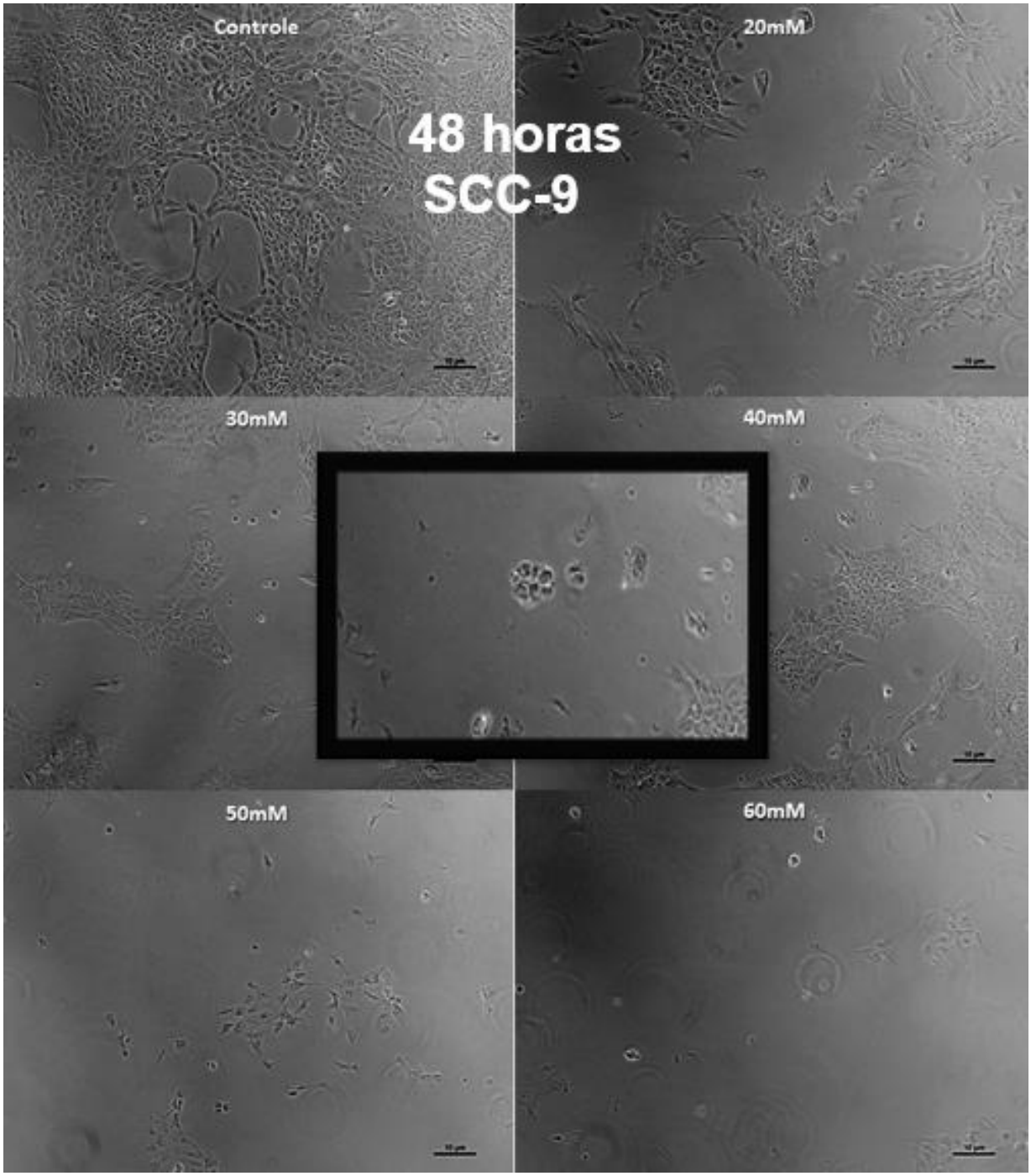

Figura 5 - Fotomicrografias das células SCC-9 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. Com o aumento do período para 48 horas foi verificado aumento das células planctônicas, presença de debri celular e diminuição da densidade celular nas células tratadas.

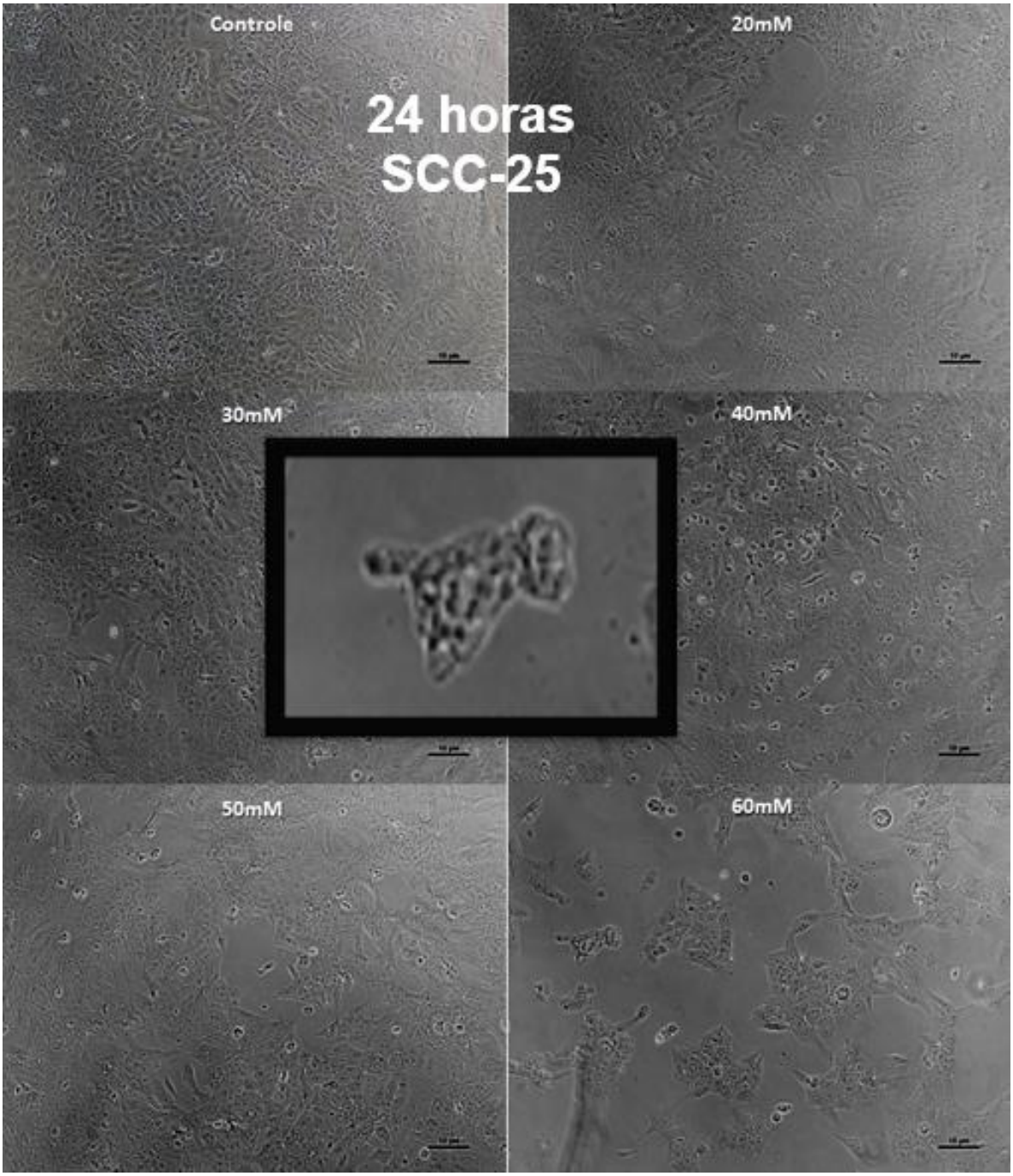

Figura 6 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 24 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. É possível observar células fusiformes, confluentes e aderidas no fundo da placa do controle. As alterações foram mais significativas somente na concentração 60mM. Alterações discretas nas células tratadas a partir de 20 mM e alterações da morfologia mais evidente na maior concentração da FOS.

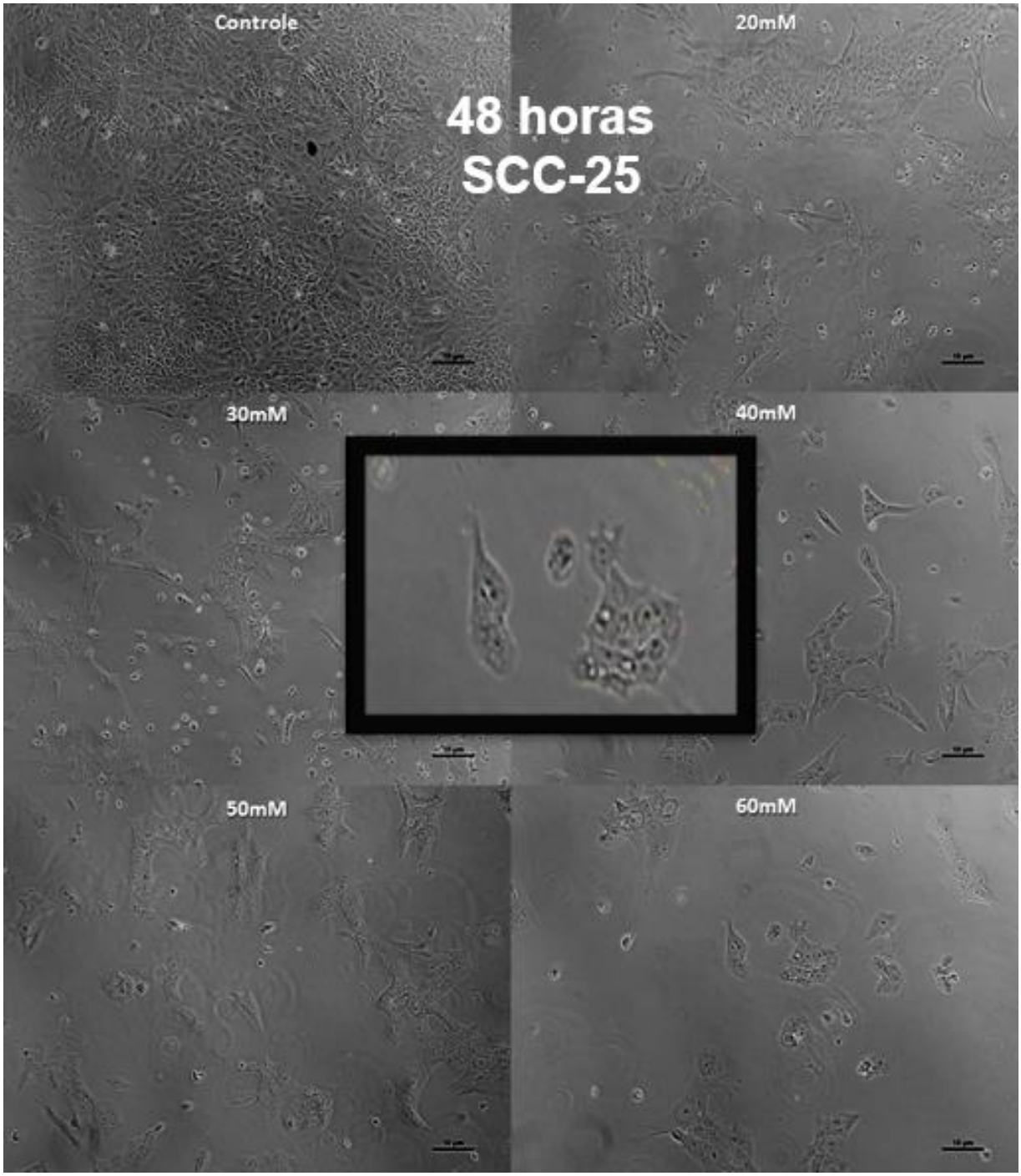

Figura 7 - Fotomicrografias das células SCC-25 após 48 horas de tratamento com a FOS nas concentrações 20 – 60 mM. As células tratadas com Pho-s demonstram diminuição da densidade celular, morfologia celular alterada e presença de debri celular.

DISCUSSÃO

Foi demonstrado que a fosfoetanolamina sintética (FOS) tem efeitos potentes em uma ampla variedade de linhagens celulares de tumor (FERREIRA et al., 2012b, 2013a, 2013b, 2013c; LUNA et al., 2016, 2018a) apontando que a FOS inibe o crescimento tumoral e aumenta a vida útil dos animais (FERREIRA et al., 2013c, 2013a) sem causar toxicidade hepática ou hematológica (FERREIRA et al., 2013c). Os estudos que avaliaram os possíveis efeitos em células endoteliais, fibroblastos e linfócitos demonstraram que a FOS não causa danos às células normais (LUNA et al., 2018b).

A mitocôndria é uma organela dinâmica que possui um papel importante no processo apoptótico (FERREIRA et al., 2013c). Foi verificado que a FOS induz a despolarização mitocondrial. A redução do potencial transmembrana da mitocôndria funciona como um gatilho para a morte celular por apoptose induzindo a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, que leva a um aumento significativo e acentuado na atividade da caspase-3, o que demonstra que a apoptose induzida por FOS é mediada por uma via dependente da mitocôndria (FERREIRA et al., 2013a, 2013b). Neste presente estudo avaliamos os efeitos citotóxicos da FOS em células de tumores cancerígenos orais (SCC-9 e SCC-25) e seus efeitos. Na literatura não há nenhum estudo utilizando a FOS nas linhagens celulares SCC-9 e SCC-25. Os resultados indicam que a FOS promove efeitos antitumorais dose dependente nos diferentes períodos de tratamento, porém, o nível de sensibilidade foi diferente em função do tempo de tratamento com a FOS. A linhagem de células tumorais SCC-25 se mostrou mais resistente ao tratamento após 24 horas em relação à linhagem SCC-9, no entanto, no período de 48 horas, as células SCC-9 passaram a ter comportamento de maior resistência. Foram observadas alterações morfológicas características da morte celular por apoptose. É importante ressaltar que a FOS demonstrou eficácia em induzir efeitos antiproliferativos nas células SCC-9 e SCC-25 em concentrações molares significativamente menores que as concentrações utilizadas para o tratamento de outras linhagens de células tumorais humanas, o que a torna um potencial fármaco para o tratamento para os tumores de cavidade oral associado às terapias convencionais.

A citotoxidade da FOS para linhagens celulares de leucemia foi demonstrada em ensaios de MTT in vitro, com valores de IC50% de 6, 9 e 12mM, onde foi verificado que a FOS causa um efeito significativo ($p<0.05$) na ativação da caspase-3 em todas as concentrações testadas, comprovando que exibe um potente efeito citotóxico dose dependente, induzindo apoptose via mitocondrial. O efeito antiproliferativo, bloqueando a disseminação de clones malignos foi demonstrado in vivo em modelo de células leucêmicas APL (FERREIRA et al., 2013c).

A metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer. O crescimento e a invasão do tumor são dependentes da angiogênese e de sua interação com a matriz extracelular. Um estudo in vitro, em modelo de carcinoma renal em camundongos, forneceu evidência de que a FOS demonstra atividade antiangiogênica, com inibição da proliferação, migração e formação de tubos endoteliais. Validou também efeitos antiproliferativos, mostrando inibição de metástases pulmonares, ao induzir uma parada no ciclo celular na fase G2/M, gerando outros eventos sucessivos que culminaram na indução de apoptose via mitocondrial (FERREIRA et al., 2013a).

A FOS tem demonstrado ter um mecanismo de ação duplo, induzindo apoptose e bloqueando o ciclo celular. Em estudo com células MCF-7 de câncer de mama humano deficientes em caspase-3, a FOS se mostrou citotóxica, de forma dose-dependente. Foram verificados agregados mitocondriais no citoplasma e fragmentação do DNA. A ruptura do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), o aumento da expressão do citocromo-c e de uma molécula com atividade semelhante à caspase-3 suportam a ideia de que a apoptose ocorre através da via mitocondrial, independente da presença de caspase-3. Neste estudo a FOS induziu a parada do ciclo celular na fase G1 através da inibição da ciclina D1 e da estimulação da p53 (FERREIRA et al., 2013b).

Estudos in vitro recentes incorporaram DODAC (cloreto de dioctacecildimetilamônio) à FOS, com o intuito de agir como agente de entrega e maximizar o seu efeito terapêutico, aumentando sua seletividade e citotoxicidade. Foi demonstrado que devido às interações eletrostáticas entre a lipossoma DODAC e as membranas das células tumorais, a formulação DODAC/FOS induz citotoxicidade de forma mais seletiva em células tumorais B16F10 de melanoma e em células de carcinoma hepatocelular Hepa1c1c7 de roedores, com IC50% significativamente mais baixa do que quando as células são tratadas somente com

FOS, sem efeitos significativos em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Na análise formológica das células B16F10 tratadas com DODAC/FOS foram verificadas alterações como formação de bolhas, descolamento celular, retração citoplasmática e corpos apoptóticos (LUNA et al., 2016). No entanto, o mecanismo molecular responsável pelas propriedades antitumorais da DODAC/FOS não havia sido demonstrado. A formulação lipossomal DODAC/FOS foi testada em estudo in vitro em células de carcinoma hepatocelular Hepa1c1c7 de roedores e promoveu citotoxicidade ativando as vias intrínseca, ao diminuir o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) e extrínseca, desde que a FOS demonstrou ser um composto que pode formar um complexo com receptores DR4 e DR5, que seria o mecanismo pelo qual os fosfolipídeos antitumorais são internalizados no citoplasma (LUNA et al., 2018a). Estudos demonstraram que a FOS encapsulada em lipossomas promoveu o aumento na expressão de proteínas pro-apoptóticas, como o citocromo-c e caspases 3 e 8 de forma mais eficiente, consequentemente sendo mais eficaz ao desencadear a apoptose e concluiu que a interação eletrostática entre DODAC/FOS e as células da membrana celular maximizaram o efeito antitumoral mediado pela FOS (LUNA et al., 2018a, 2018b).

6. CONCLUSÕES

Nas linhagens celulares de carcinoma espinocelular (CEC) de língua SCC-9 e SCC-25 a fosfoetanolamina sintética (FOS) apresentou:

- efeito citotóxico dose-dependente em função do tempo de tratamento nos períodos de 24, 48 e 72 horas
- alterações morfológicas semelhantes às observadas em células em processo de apoptose.

REFERÊNCIAS

ALI, J. et al. Genetic etiology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 70, p. 23–28, 2017.

ALMANGUSH, A. et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 856–866, 2017.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488–2492, 1996.

FERREIRA, A. K. et al. Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Activity of Synthetic Phosphoethanolamine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013a.

FERREIRA, A. K. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: An experimental study. **Anticancer Research**, v. 32, n. 1, p. 95–104, 2012a.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 7, p. 541–548, 2012b.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 67, n. 6, p. 481–487, 2013b.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2819–2828, 2013c.

GONDIVKAR, S. M. et al. Photodynamic treatment outcomes of potentially-malignant lesions and malignancies of the head and neck region: A systematic review. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 1, 2018.

KAIN, J. J. et al. Surgical margins in oral cavity squamous cell carcinoma: Current practices and future directions. **Laryngoscope**, v. 130, n. 1, p. 128–138, 2020.

KANNAN, S. et al. Ultrastructure of oral squamous cell carcinoma: A comparative

analysis of different histological types. **European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology**, v. 30, n. 1, p. 32–42, 1994.

LAU, A. et al. Systemic Therapy in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma- A Systematic Review and Meta-Analysis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 153, n. May, 2020.

LAURITANO, D. et al. Liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma: Prognostic significance of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. A systematic review. **Oral Oncology**, v. 97, n. March, p. 7–17, 2019.

LUNA, A. C. et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of DODAC/synthetic phosphoethanolamine on hepatocellular carcinoma cells. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2018a.

LUNA, A. C. et al. Modulation of pro-apoptotic effects and mitochondrial potential on B16F10 cells by DODAC/PHO-S liposomes. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2018b.

LUNA, A. C. et al. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1577–1591, 2016.

MAGALHAES, M. A. O. et al. Neutrophils and oral squamous cell carcinoma: lessons learned and future directions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 5, p. 695–702, 2014.

NEVILLE, B. et al.,. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 638-802.

OMURA, K. Current status of oral cancer treatment strategies: Surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 423–430, 2014.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Ethical issues on the “synthetic” phosphoethanolamine clinical trial. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 63, n. 5, p. 388–392, 2017.

REZAEI, F. et al. Evaluation of Serum and Salivary Interleukin-6 and Interleukin-8

Levels in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 12, p. 727–739, 2019.

RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 72, p. 38–47, 2017.

SILVEIRA, F. M. et al. Examining tumor modulating effects of photobiomodulation therapy on head and neck squamous cell carcinomas. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1621–1637, 2019.

THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 803–807, 2018.

ZHOU, Z.; JIANG, W. Cancer Stem Cell Model in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Stem Cell research & Therapy**, v.3, p. 17–20, 2008.