

RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA
MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO**

Estudo nº: 024-MAI-028-16

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

SUMÁRIO

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
RESUMO E CONCLUSÃO	6
Datas	8
1. OBJETIVOS DO ESTUDO	8
2. PESSOAL ENVOLVIDO	9
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	9
3.1. Caracterização da Substância Teste	9
3.2. Caracterização da Substância de Referência	9
3.3 Caracterização do Veículo	10
3.4 Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo	10
3.5 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo	13
3.6 Concentrações utilizadas	13
3.7 Justificativa para a seleção das concentrações	13
4. SISTEMA TESTE	13
4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	14
4.2 Obtenção do Sistema Teste	14
4.3 Manutenção do Sistema Teste	14
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	14
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	15
6.1 Desenho experimental	15
6.1.1 Avaliação da formação de colônias celulares (clonogenicidade)	15
6.1.2 Avaliação do ciclo celular	16
6.1.3 Avaliação da morte celular através de apoptose	17
6.1.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	18
6.1.5 Avaliação do possível mecanismo de ação da Monoetanolamina	19
6.2 Metodologia	20
6.2.1 Formação de colônias celulares (clonogenicidade)	20
6.2.2 Ciclo celular	20
6.2.3 Apoptose	21
6.2.4 Potencial de membrana mitocondrial	21

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

6.2.5 Avaliação dos possíveis mecanismos de ação da Monoetanolamina.....	21
6.3 Grupos experimentais	22
6.4 Análise Estatística	23
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Avaliação da formação de colônias celulares (clonogenicidade)	23
7.2 Avaliação do ciclo celular	24
7.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	25
7.4 Avaliação da morte celular através de apoptose	26
7.5 Avaliação da atividade da Monoetanolamina sobre algumas vias de sinalização	28
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO	32
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	33
10. ARQUIVAMENTO	33
11. REFERÊNCIAS	34
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	37
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO, GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR PRESIDENTE	38

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO
Número do Estudo	024-MAI-028-16
Patrocinador	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI Telefone: +55 (61) 2033-7500 Esplanada dos Ministérios, Bloco E Brasília – DF CEP 70067-900
Instalação de Teste	Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil CEP 88056-000
Diretor Presidente	Dr. João Batista Calixto Telefone: 48 32612856 E-mail: joao.calixto@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Gerente da Instalação de Teste	Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior Telefone: 48 32612856 E-mail: jarbas.siqueira@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Diretor de Estudo	Dr. Rodrigo Marcon Telefone: 48 32612856 E-mail: rodrigo.marcon@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Diretor de Estudo Substituto	Drª. Cristina Setim Freitas Telefone: 48 32612856 E-mail: cristina.setim@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
Unidade da Garantia da Qualidade	Franciele Avila Silveira Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

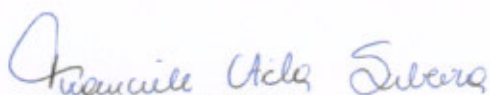
Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	11/07/2016	11/07/2016	11/07/2016
Dados Brutos	16 e 24/11/16	24/11/16	24/11/16
Relatório Final	24/11/16	24/11/16	24/11/16

*DE: Diretor de Estudo; #GIT: Gerente da Instalação de Teste

Auditoria de estudo nº 024-MAI-028-16

Florianópolis, 25 de Novembro de 2016.


Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

RESUMO E CONCLUSÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar alguns dos mecanismos envolvidos na ação citotóxica da Monoetanolamina, que segundo a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) é um constituinte encontrado na proporção de 18,2 % nas cápsulas de fosfoetanolamina sintética produzida pela USP. Foram analisados: formação de colônias celulares, ciclo celular, apoptose e potencial de membrana mitocondrial, além da expressão das proteínas mTOR, p53, caspase 3 clivada, p16 INK4A e p27 Kip1 em células da linhagem de melanoma humano.

As células tumorais da linhagem de melanoma humano (A-375) foram plaqueadas e, após 24 horas, a Monoetanolamina (1.000 μ M ou 10.000 μ M), Cisplatina (1 μ M ou 10 μ M, utilizada como controle positivo) ou o veículo (meio de cultura), foram adicionados e incubados por 48 horas. Decorrido esse período, foram realizados os ensaios para avaliação do ciclo celular, apoptose e potencial de membrana mitocondrial. Para o ensaio de formação de colônias celulares, as células da linhagem A-375 foram mantidas em garrafas de 25 cm² e tratadas com Monoetanolamina (1.000 μ M e 10.000 μ M) ou Cisplatina (1 μ M e 10 μ M) durante 48 horas e, em seguida, foram plaqueadas em meio, sem os respectivos tratamentos, e mantidas em cultura por 10 dias para a formação de colônias. Os possíveis mecanismos de ação através dos quais a Monoetanolamina exerce ação citotóxica em células de melanoma humano (A-375) também foram verificados 48 horas após sua incubação, através do ensaio de imunofluorescência para mTOR, p53, caspase 3 clivada, p16 INK4A e p27 Kip1.

Os resultados descritos neste relatório demonstraram que a Monoetanolamina, na concentração de 10.000 μ M, mantida sobre as células por 48 horas, reduziu a formação de colônias celulares em 30,1 %, alterou o ciclo celular com diminuição das células presentes nas fases G₀/G₁ e redistribuição para as fases S e G₂/M do ciclo celular, reduziu o potencial de membrana mitocondrial em 65,6 % e, por fim, induziu a morte celular por apoptose. A atividade da Monoetanolamina parece estar relacionada com a ativação da proteína p53 e das proteínas inibitórias p16 INK4A, p27 Kip1 e da caspase 3. A cisplatina utilizada como controle positivo no estudo e mantida por 48 horas sobre as células reduziu em 99,8 % a formação de

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

colônias celulares, também redistribuiu as células para as fases S e G₂/M do ciclo celular e alterou o potencial de membrana mitocondrial em 59,3 % e 53,0 % nas concentrações de 1 µM e 10 µM, respectivamente. A cisplatina (10 µM) causou aumento na marcação para a forma ativada das proteínas p53, p16 INK4A, p27Kip1 e caspase-3.

Conclui-se que a Monoetanolamina, obtida com grau de pureza superior a 98 % e incubada sobre as células de melanoma humano (A-375) por 48 horas na concentração de 10.000 µM, reduziu a formação de clones celulares, alterou o ciclo celular, modificou o potencial de membrana mitocondrial e induziu a morte das células por apoptose; tais fenômenos podem estar relacionados à ativação das proteínas p53, p16 INK4A, p27 Kip1 e caspase 3. Nas mesmas condições experimentais, a Cisplatina na concentração de 10 µM também reduziu a formação de clones celulares, alterou o ciclo celular, modificou o potencial de membrana e induziu a morte principalmente por apoptose. Importante ressaltar que a concentração efetiva da Monoetanolamina é 1000 vezes maior que a concentração do quimioterápico de referência (cisplatina). Esses resultados podem explicar, em parte, as ações citotóxicas observadas em relatórios anteriores pelo emprego de altas concentrações da Monoetanolamina quando avaliada em células de melanoma humano (A-375).

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

Datas

Data do início do estudo: 11/07/2016

Data do início do experimento: 26/07/2016

Data do término do experimento: 21/11/2016

Data do término do estudo: 25/11/2016

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a atividade citotóxica da Monoetanolamina em células de melanoma humano (A-375) e possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a atividade da Monoetanolamina sobre a formação de colônias na linhagem de células de melanoma humano (A-375);
- 2) Avaliar a atividade da Monoetanolamina sobre alteração no ciclo celular;
- 3) Avaliar a atividade da Monoetanolamina sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- 4) Avaliar a atividade pró-apoptótica da Monoetanolamina;
- 5) Avaliar possíveis vias envolvidas na atividade da Monoetanolamina.

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

2. PESSOAL ENVOLVIDO

Rodrigo Marcon, PhD	Diretor de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
Camila Guimarães Moreira, PhD	Bolsista de pós-doutorado
Evelyn dos Santos, PhD	Bolsista de pós-doutorado
Gabriela Segat, Bacharel	Bolsista de mestrado

3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

3.1. Caracterização da Substância Teste

Nome	: Monoetanolamina
Nome químico (IUPAC)	: 2-Aminoetanol
Número do CAS	: 141-43-5
Lote	: Não informado
Data de fabricação	: 01/12/2015
Data de validade	: Não informado
Pureza	: * > 98%
Fabricante	: Instituto de Química - Unicamp
Aspectos físicos	: Líquido incolor
Identificação CIEnP	: 024.3

**Dado fornecido pela Unicamp*

3.2. Caracterização da Substância de Referência

Nome	: Cisplatina
Nome químico (IUPAC)	: <i>cis</i> - Diamnineplatinum(ii) dichloride
Número do CAS	: 15663-27-1
Lote	: *LRAA 5492
Data de validade	: *31/12/2019
Pureza	: *99,5 %
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Aspectos físicos	: *Pó amarelo

**Dados fornecidos pelo fabricante*

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

3.3 Caracterização do Veículo

Nome : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Lote : 1776559
Data de validade : 30/03/2017
Fabricante : Gibco

Nome : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Lote : 1748988
Data de validade : 30/11/2016
Fabricante : Gibco

3.4 Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo

Nome : Anexina-V
Lote : 4148572
Data de validade : 16/11/2019
Fabricante : BD Biosciences

Nome : Antibiótico-antimicótico
Lote : 105M4823V
Data de validade : 11/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Cristal violeta
Lote : 175745
Data de validade : 29/01/2019
Fabricante : Synth

Nome : Dimetilsulfóxido
Lote : 184517
Data de validade : 14/11/2017
Fabricante : Synth

Nome : Etanol
Lote : 185728
Data de validade : 09/01/2018
Fabricante : Synth

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

Nome : JC-1
Lote : MKBW30-13V
Data de validade : 28/10/2021
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Metanol
Lote : 186410
Data de validade : 03/02/2018
Fabricante : Synth

Nome : Formaldeído
Lote : 81045
Data de validade : 30/04/2020
Fabricante : Dinâmica

Nome : Soro Fetal Bovino
Lote : SPBB 1028
Data de validade : 30/08/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Soro Fetal Bovino
Lote : 210190K
Data de validade : 30/09/2016
Fabricante : Gibco

Nome : Tampão Fosfato de Sódio (PBS)
Lote : 40114018
Data de validade : 04/03/2018
Fabricante : Laborclin

Nome : Tripsina/EDTA
Lote : SLBP3635V
Data de validade : 03/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Valinomicina
Lote : 094M4115V

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

Data de validade : 21/03/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Tampão de Ligação da Anexina V
Lote : 4029834
Data de validade : 01/04/2017
Fabricante : BD Biosciences

Nome : Anticorpo primário anti-fosfo-caspase 3
Lote : #9664L
Fabricante : Cell Signaling Technology

Nome : Anticorpo primário anti-fosfo-mTOR
Lote : #2971S
Fabricante : Cell Signaling Technology

Nome : Anticorpo primário anti-fosfo-p16 INK4A
Lote : #4824
Fabricante : Cell Signaling Technology

Nome : Anticorpo primário anti-fosfo-p27 Kip1
Lote : #2552
Fabricante : Cell Signaling Technology

Nome : Anticorpo primário anti-fosfo-p53
Lote : #9284S
Fabricante : Cell Signaling Technology

Nome : Anticorpo secundário anti-rabbit 594
Lote : A1102
Fabricante : Life Technologies

Nome : Albumina de soro bovino (BSA)
Lote : STBF7163V
Data de validade : 09/07/2021
Fabricante : Sigma-Aldrich

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

Nome : Triton X-100
Lote : SLBN8333V
Data de validade : 10/08/2017
Fabricante : Sigma-Aldrich

3.5 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo

A Substância Teste (Monoetanolamina) foi diluída e a Substância de Referência (Cisplatina) foi dissolvida em condições estéreis em cabine de fluxo laminar. O veículo utilizado para a Monoetanolamina e para a Cisplatina foi o meio de cultura DMEM. As soluções de Monoetanolamina na concentração de 10.000 µM e Cisplatina na de 10 µM foram filtradas em filtro de 0,22 µm e utilizadas para a diluição da concentração de 1.000 µM da Monoetanolamina e 1 µM da Cisplatina.

3.6 Concentrações utilizadas

As concentrações utilizadas da Monoetanolamina foram 1.000 µM e 10.000 µM e da Cisplatina foram 1 µM e 10 µM.

3.7 Justificativa para a seleção das concentrações

As concentrações da Monoetanolamina (1.000 e 10.000 µM) e da Cisplatina (1 µM e 10 µM) foram selecionadas pelo CIEnP, por estarem dentro da faixa de concentrações citotóxicas observadas no estudo 024-VIP-008-16, em células de melanoma humano (A-375) e que apresentaram citotoxicidade.

4. SISTEMA TESTE

Linhagem : A375 (ATCC® CRL-1619™)
Tipo celular : Melanoma maligno
Espécie de origem : *Homo sapiens*, humano
Sexo : Feminino
Idade : 54 anos
Tecido de origem : Pele
Morfologia : Epitelial
Propriedades de crescimento em cultura : Aderente
Lote : 61573377
Fornecedor : ATCC

4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

A linhagem de melanoma humano (A-375) foi selecionada como sistema teste do presente estudo, pois no estudo 024-VIP-008-16 foi observada atividade citotóxica da Monoetanolamina sobre esta linhagem.

4.2 Obtenção do Sistema Teste

A linhagem celular de Melanoma humano (A-375) foi adquirida da “American Type Culture Collection” (ATCC) e imediatamente alocada em nitrogênio líquido, conforme o POP-E.35/versão atual. As células foram expandidas conforme POP-E.37/versão atual, para geração do estoque do Banco de Células do CIEnP e novamente congeladas conforme POP-E.19/versão atual. Para o uso no presente estudo, as células do estoque de trabalho foram descongeladas e cultivadas de acordo com as especificações do fornecedor: A-375 [A375] (ATCC® CRL-1619™). Em seguida, foram utilizadas nos experimentos, como descrito no item 6.2 (Metodologia).

4.3 Manutenção do Sistema Teste

As células provenientes do estoque foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37 ± 0,1 °C e 5 ± 0,1 % de CO₂ em garrafas contendo o meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (10 %) e solução de antibiótico-antimicótico (1 %).

5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Visando reduzir ao máximo possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados os critérios propostos pelo guia de boas práticas em cultura celular (Coecke et al., 2005). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados para efeito de cálculo das médias e análise estatística; 2) Todos os reagentes foram obtidos de fornecedores

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

credenciados pelo CIEnP e utilizados dentro do prazo de validade indicado pelo Fabricante, com exceção dos anticorpos que não possuem a informação de validade; 3) Os experimentos foram conduzidos de forma conjunta com seu respectivo controle (Substâncias de Referência); 4) Todos os parâmetros e testes estatísticos foram determinados *a priori* na elaboração do plano de estudo; 5) Todos os dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados pelo pessoal responsável pela condução do estudo e foram auditados pela UGQ;

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

6.1 Desenho experimental

6.1.1 Avaliação da formação de colônias celulares (clonogenicidade)

Conforme observado na figura 1, as células de melanoma humano (A-375) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em uma densidade de $2,9 \times 10^6$ por garrafa (A). Após 24 horas, foram realizados os tratamentos com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM), ou somente com meio de cultura (DMEM) (B). As células foram mantidas com os respectivos tratamentos por 48 horas. Em seguida, foram plaqueadas 1.000 células por poço em placa de cultura de 6 poços e incubadas por 10 dias para a formação de colônias em meio de cultura, sem tratamento. (C). Posteriormente, o número de colônias celulares foi analisado conforme item 6.2.1 (D). O ensaio foi realizado em três repetições (número experimental = 3) em duplicata. Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por um experimentador diferente.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

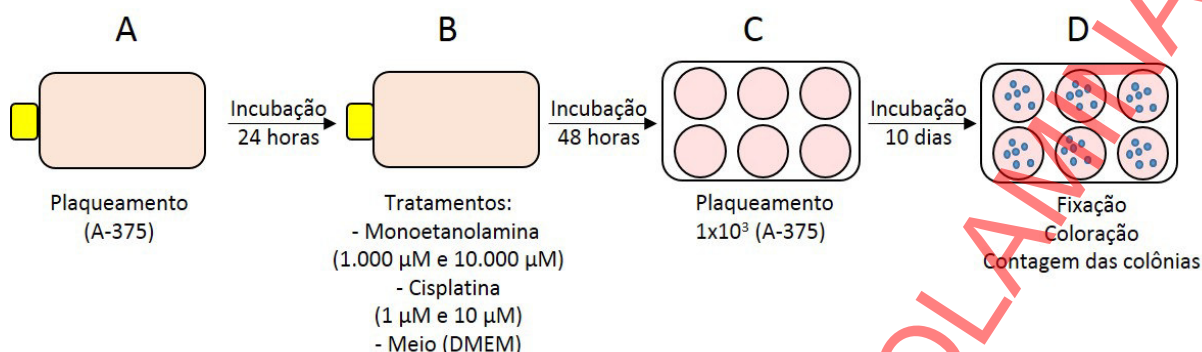


Figura 1: Ensaio de clonogenicidade. (A) Cultivo das células em garrafas de 25 cm²; (B) Tratamento das células com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) e incubação por 48 horas; (C) Plaqueamento de 1.000 células que haviam recebido o tratamento e incubação por 10 dias para a formação de colônia; (D) Fixação e coloração das células e posterior contagem das colônias por microscopia ótica.

6.1.2 Avaliação do ciclo celular

Conforme observado na figura 2, as células de melanoma humano (A-375) foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de 3×10^5 células por poço (A) em meio contendo 0,1% de soro fetal bovino para a sincronização do ciclo celular. Após 24 horas foram realizados os tratamentos com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) (B). As células foram mantidas com os respectivos tratamentos por 48 horas. Em seguida, as células foram permeabilizadas e incubadas com 7-AAD por 15 minutos (C). A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo (D), conforme descrito no item 6.2.2. O ensaio foi realizado em três repetições (número experimental = 3) em duplicata. Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por um experimentador diferente.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

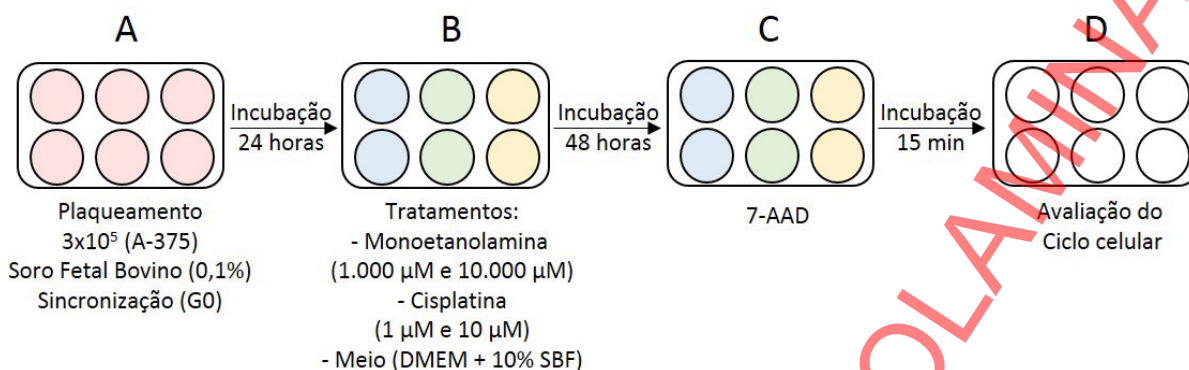


Figura 2: Ensaio para avaliação do ciclo celular. (A) Plaqueamento das células em placas de 6 poços; (B) Tratamento das células com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) e incubação por 48 horas; (C) Incubação das células com 7-AAD por 15 minutos; (D) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.

6.1.3 Avaliação da morte celular através de apoptose

Conforme observado na figura 3, as células de melanoma humano (A-375) foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de 3 x 10⁵ células por poço (A). Após 24 horas, foram feitos os tratamentos com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) (B). As células foram mantidas com os respectivos tratamentos por 48 horas. Em seguida, foram adicionados Anexina-V e 7-AAD sobre as células e incubados por 15 minutos (C). A seguir foi avaliada a porcentagem de células em apoptose através de citometria de fluxo (D). O ensaio foi realizado em três repetições (número experimental = 3) em duplicata. Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por um experimentador diferente.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

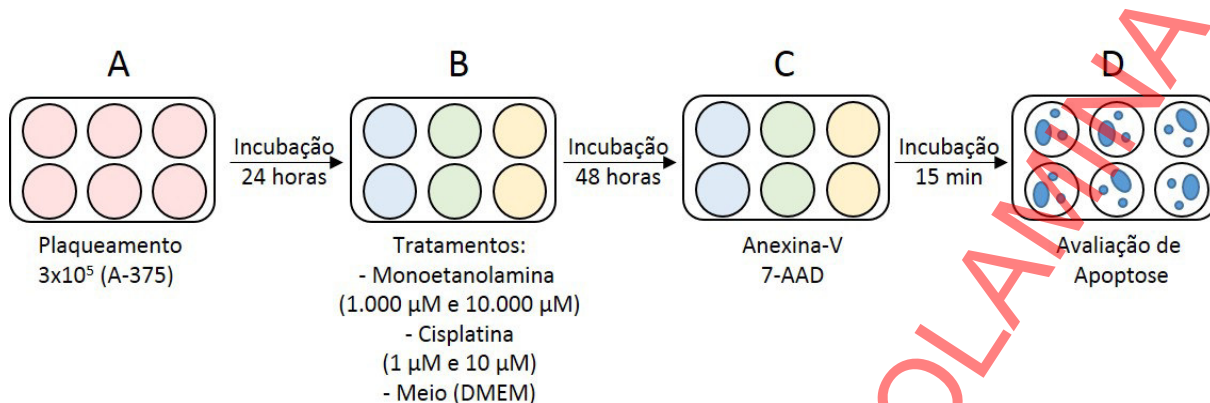


Figura 3: Ensaio para avaliação de apoptose celular. (A) Plaqueamento das células em placas de 6 poços; (B) Tratamento das células com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) e incubação por 48 horas; (C) Incubação das células com Anexina-V e 7-AAD por 15 minutos; (D) Avaliação de apoptose por citometria de fluxo.

6.1.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Conforme observado na figura 4, as células de melanoma humano (A-375) foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^4 células por poço (A). Após 24 horas, foram realizados os tratamentos com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM), Valinomicina (1 µg/mL) ou somente com meio de cultura (DMEM) (B). As células foram mantidas com os respectivos tratamentos por 48 horas. Em seguida, foi adicionado JC-1 (iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) sobre as células e incubado por 30 minutos (C). Posteriormente o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com auxílio do Spectramax como descrito no item 6.2.4. O ensaio foi realizado em três repetições (número experimental = 3) em triplicata. Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por um experimentador diferente.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

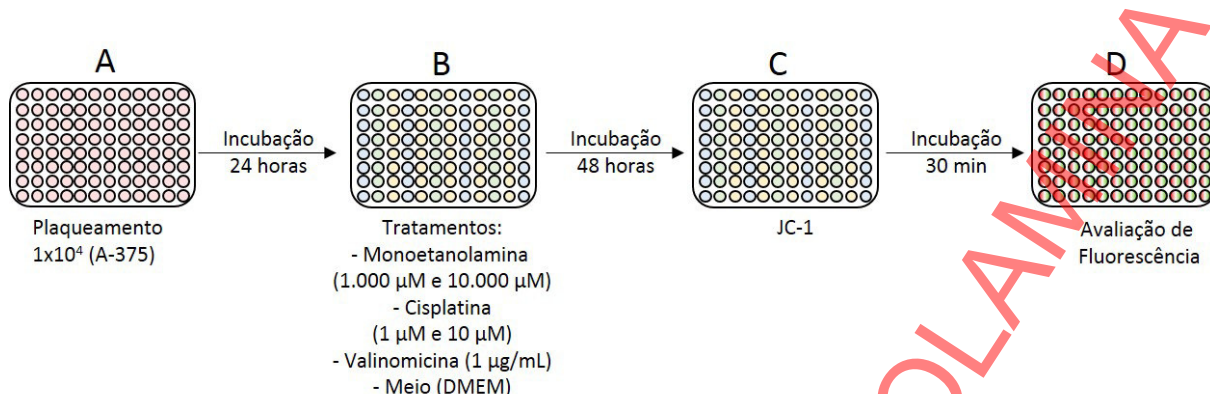


Figura 4: Ensaio para avaliação do potencial de membrana mitocondrial. (A) Plaqueamento das células em placas de 96 poços; (B) Tratamento das células com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM), Valinomicina (1 µg/mL) ou somente com meio de cultura (DMEM) e incubação por 48 horas; (C) Incubação das células com JC-1 por 30 minutos; (D) Avaliação da intensidade de fluorescência vermelha e verde utilizando um leitor de placa.

6.1.5 Avaliação do possível mecanismo de ação da Monoetanolamina

Conforme observado na figura 5, as células de melanoma humano (A-375) foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo uma lamínula de vidro no fundo de cada poço em uma densidade de 6×10^4 células por poço (A). Após 48 horas, foram realizados os tratamentos com a Monoetanolamina (10.000 µM), Cisplatina (10 µM) ou somente com meio de cultura (DMEM) (B). As células foram mantidas com os respectivos tratamentos por 48 horas e, posteriormente, incubadas com anticorpos primários (anti-fosfo-mTOR, anti-fosfo-p53, anti-caspase 3 clivada, anti-p16 INK4A e anti-p27 Kip1) *overnight* a 4 °C. Após incubação com os anticorpos secundários por 2 horas, as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência, conforme descrito no item 6.2.5. O ensaio foi realizado em três repetições (número experimental = 3). Cada número experimental utilizou uma passagem, data distinta e/ou foi realizado por um experimentador diferente.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

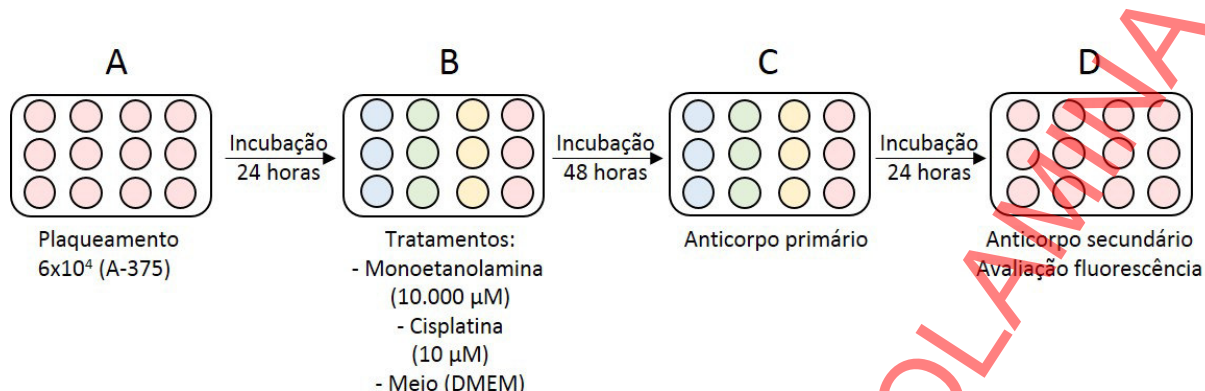


Figura 5: Avaliação do possível mecanismo de ação da Monoetanolamina. (A) Plaqueamento das células em placas de 12 poços; (B) Tratamento das células com a Monoetanolamina ($10.000 \mu\text{M}$), Cisplatina ($10 \mu\text{M}$) ou somente com meio de cultura (DMEM) e incubação por 48 horas; (C) Incubação das células com os anticorpos primários; (D) Incubação com os anticorpos secundários e avaliação da fluorescência.

6.2 Metodologia

6.2.1 Formação de colônias celulares (clonogenicidade)

O ensaio de clonogenicidade foi realizado conforme o POP D.31/versão atual. Para a avaliação das colônias formadas ao longo de 10 dias, as células foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta 0,2 % (metanol/água 1:1). Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia. As colônias foram identificadas e contadas visualmente. Imagens representativas das colônias após os tratamentos foram obtidas através de fotografia macroscópica da placa de cultivo.

6.2.2 Ciclo celular

O ensaio para a avaliação do ciclo celular foi realizado conforme POP D.25/versão atual. Após os tratamentos as células foram fixadas e permeabilizadas com a solução de paraformaldeído 4 % e Triton X-100 (0,05 %) por 30 minutos, incubadas com 7-AAD e, posteriormente, analisadas através de citometria de fluxo (BD FACS Canto II).

6.2.3 Apoptose

O ensaio para a avaliação de apoptose foi realizado conforme descrito no POP D.24/versão atual. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (120 x g, 5 minutos), lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em tampão presente no kit comercial (*"10X Annexin V Binding Buffer"*). Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS, e incubadas por 15 minutos (escuro, temperatura ambiente) com anexina-V + 7-AAD e analisadas através de citometria de fluxo (BD FACS Canto II). A marcação negativa para anexina-V e 7-AAD indica a viabilidade das células, a marcação positiva somente por anexina-V indica apoptose celular e a dupla marcação indica apoptose tardia ou necrose.

6.2.4 Potencial de membrana mitocondrial

O ensaio para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizado conforme POP D.32/versão atual. Após os tratamentos, as células foram incubadas com JC-1 (1 µL/mL) por 30 minutos em incubadora de CO₂ a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados com PBS para remoção do fluoróforo não ligado e a fluorescência foi avaliada em 490 nm (excitação) e 530 nm (emissão) (verde), e 525 nm (excitação) e 590 nm (emissão) (vermelho), através do leitor de placas Spectramax i3 (Molecular Devices). O JC-1 apresenta acúmulo dependente do potencial de membrana da mitocôndria, com consequente mudança da emissão de fluorescência de verde para vermelho. A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada através do cálculo da relação entre a fluorescência vermelha sobre a verde: alta relação indica alto potencial de membrana (células viáveis); baixa relação indica baixo potencial de membrana (células em apoptose).

6.2.5 Avaliação dos possíveis mecanismos de ação da Monoetanolamina

O ensaio de imunocitoquímica associado à imunofluorescência foi realizado conforme descrito no POP D.39/versão atual. Para avaliar possíveis mecanismos de

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

ação da monoetanolamina, foi realizada a quantificação de proteínas importantes para o processo de proliferação celular e apoptose através de imunofluorescência. Após 48 horas de incubação, os tratamentos foram removidos e uma solução de paraformaldeído 4 % foi adicionada e mantida por 10 minutos em estufa a 37 °C. Após, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos e incubadas com tampão de bloqueio (1 % BSA; 0,3 % Triton-X 100 em PBS) por 60 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-fosfo-mTOR, anti-fosfo-p53, anti-caspase 3 clivada, anti-p16 INK4A ou anti-p27 Kip1, *overnight* a 4 °C. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor 594 anti-rabbit) por 2 horas à temperatura ambiente, protegidos da luz. Decorridas 2 horas, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, montadas utilizando o reagente Prolong® Diamond AntiFade com DAPI (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA), para a marcação do núcleo celular. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio Olympus BX41 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EUA).

6.3 Grupos experimentais

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, concentrações, Sistema Teste e avaliações.

Grupos experimentais	Controle Negativo	Substância Teste	Substância de Referência
Tratamento	Veículo	Monoetanolamina	Cisplatina
Sistema Teste	Melanoma humano	Melanoma humano	Melanoma humano
Concentrações	-	1.000 µM ou 10.000 µM	1 µM ou 10 µM
Avaliações	Clonogenicidade, Apoptose, Ciclo celular, Potencial de Membrana Mitocondrial e Imunocitoquímica		
Repetições	Duplicata ou Triplicata	Duplicata ou Triplicata	Duplicata ou Triplicata
Número experimental	3	3	3

6.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para a avaliação da diferença estatística entre os grupos experimentais foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett. Para a avaliação da diferença estatística entre dois grupos foi utilizado o teste-t. Os Valores de p menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas. As quantificações relativas das marcações de imunofluorescência foram realizadas utilizando o *software* ImageJ® 1.47t e os resultados das marcações foram normalizados com DAPI.

7. RESULTADOS

7.1 Avaliação da formação de colônias celulares (clonogenicidade)

O ensaio de clonogenicidade consiste na habilidade de uma única célula proliferar e desenvolver uma colônia de clones celulares e é utilizado para verificar a capacidade de divisão celular após um tratamento que induz alterações no ciclo celular (Franken *et al.*, 2006). Conforme observado na figura 6A e B, as células da linhagem de melanoma humano (A-375) tratadas com veículo (meio de cultura) durante 48 horas, apresentaram grande capacidade de formação de clones. Nas células tratadas com a Monoetanolamina na concentração de 1.000 μ M por 48 horas, não foi observada alteração na formação de colônias, quando comparada ao grupo tratado com o veículo. Por outro lado, as células tratadas com a Monoetanolamina na concentração de 10.000 μ M por 48 horas, apresentaram redução na formação de colônias em 30,1 %, em relação ao grupo tratado com o veículo, contudo tal diferença não apresentou relevância estatística (Figura 6A e B). A cisplatina, utilizada como controle no estudo, reduziu em 99,8 % a formação de colônia, contudo tal efeito foi observado apenas na concentração de 10 μ M (Figura 6A e B).

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

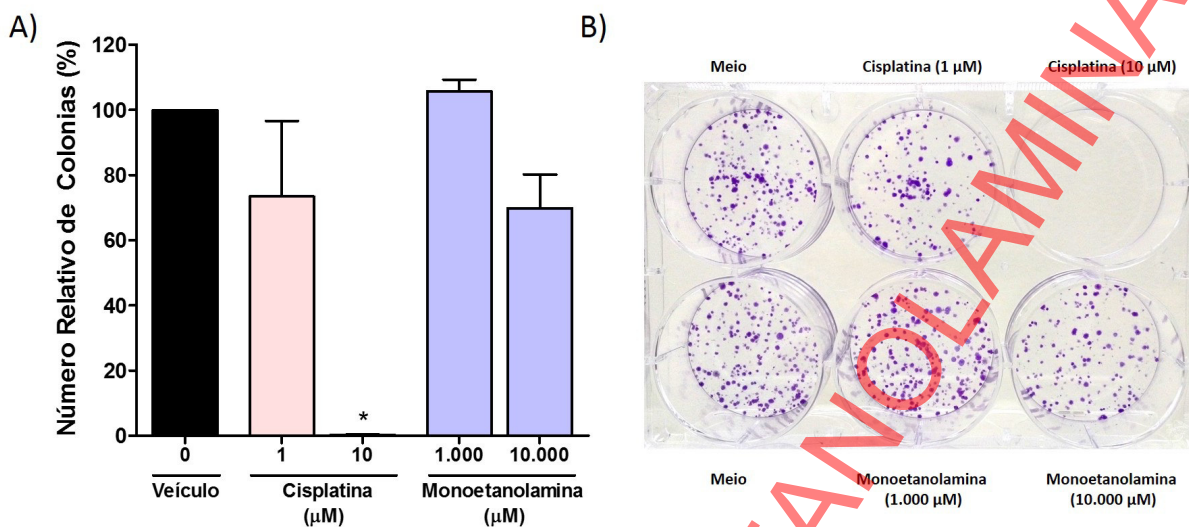


Figura 6: Avaliação da formação de colônias das células A-375 após os tratamentos. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou com o veículo (meio de cultura) por 48 horas. Posteriormente, 1000 células foram plaqueadas e mantidas em cultura por 10 dias. Em seguida, as células foram fixadas, coradas e a quantidade de colônias mensurada (A). Figura representativa de uma placa utilizada no ensaio (B). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (Meio).

7.2 Avaliação do ciclo celular

A divisão celular é um processo que ocorre naturalmente na maioria das células de mamíferos e tem a função de formar células filhas idênticas à originária (Mitchison e Salmon, 2001). O processo de divisão celular compreende diversos eventos e pode ser dividido em cinco fases distintas: G0 ("gap"), G1, S (síntese), G2, M (mitose) (Schafer, 1998). Alguns dos fármacos quimioterápicos utilizados na clínica interrompem o ciclo celular em uma das fases citadas acima, podendo culminar na indução de morte celular (Shapiro e Harper, 1999).

Conforme observado na figura 7, $58,4 \pm 2,1$ % das células da linhagem de melanoma humano (A-375), quando tratadas com veículo (meio de cultura) durante 48 horas, permaneceram na fase G₀/G₁ do ciclo celular (A), $12,7 \pm 0,2$ % de células se encontravam na fase de síntese (S) (B) e $22,7 \pm 2,0$ % na fase G₂/M do ciclo (C). As menores concentrações de Monoetanolamina (1.000 µM) e de Cisplatina (1 µM), não alteraram o ciclo celular quando comparadas ao grupo veículo; com $58,5 \pm 2,0$ e

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

61,3 ± 2,2 % das células tratadas na fase G₀/G₁ (A); 12,5 ± 0,2 e 10,4 ± 0,5 % de células na fase S (B) e 22,9 ± 1,5 % e 23,6 ± 1,2 % na fase G₂/M do ciclo (C), respectivamente. Por outro lado, o tratamento com a Monoetanolamina na concentração de 10.000 µM levou à redução da população de células presentes na fase G₀/G₁ quando comparado ao grupo veículo, apresentando 29,6 ± 8,3 % das células nesta fase (A); e aumentou a população nas fases S e G₂/M, com 24,4 ± 2,5 % (B) e 38,0 ± 6,0 % (C), respectivamente. O tratamento com a Cisplatina na concentração de 10 µM também reduziu a população de células presentes na fase G₀/G₁ e aumentou a proporção de células em G₂/M quando comparado às células tratadas com o veículo; com 9,4 ± 3,6 % na fase G₀/G₁ (A); 16,7 ± 3,3 % na fase S (B) e 40,0 ± 2,2 % na fase G₂/M (C) do ciclo celular.

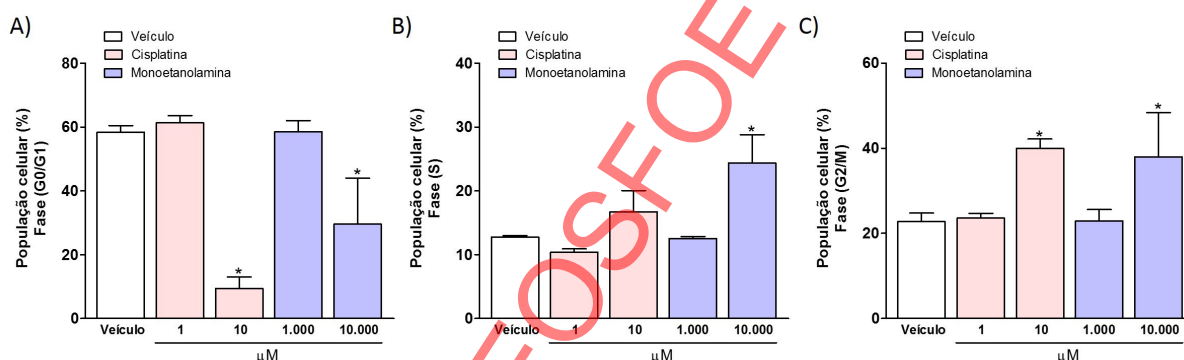


Figura 7: Porcentagem da população celular nas fases G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular após o tratamento das células A-375 por 48 horas. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (1.000 µM e 10.000 µM), Cisplatina (1 µM e 10 µM) (B) ou veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após as células foram incubadas com 7-AAD e o ciclo celular foi avaliado utilizando citômetro de fluxo. (A) porcentagem de células na fase G₀/G₁ do ciclo celular; (B) porcentagem de células na fase S do ciclo celular; (C) porcentagem de células na fase G₂/M do ciclo celular. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett. * indica p<0,05 quando comparado ao grupo veículo.

7.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela respiração celular, cuja função está diretamente ligada à sua membrana (Chen et al., 2010). A redução no potencial de membrana mitocondrial pode causar um colapso na membrana e levar à liberação de mediadores que culminam com a morte celular (Gurp *et al.*, 2003). Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, foi usado o JC-1, uma

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

sonda fluorescente utilizada como um indicador de alteração do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$). Como observado na figura 8, após 48 horas de incubação, a Monoetanolamina na concentração de 10.000 μM reduziu o potencial de membrana mitocondrial em 65,6 %, assim como observado com o controle positivo cisplatina nas concentrações de 1 μM e 10 μM , com redução no potencial de membrana em 59,3 % e 53,0 %, respectivamente. A valinomicina, um desacoplador da respiração mitocondrial, provocou uma desestruturação do potencial de membrana mitocondrial em 78,6 %, quando comparado ao grupo veículo.

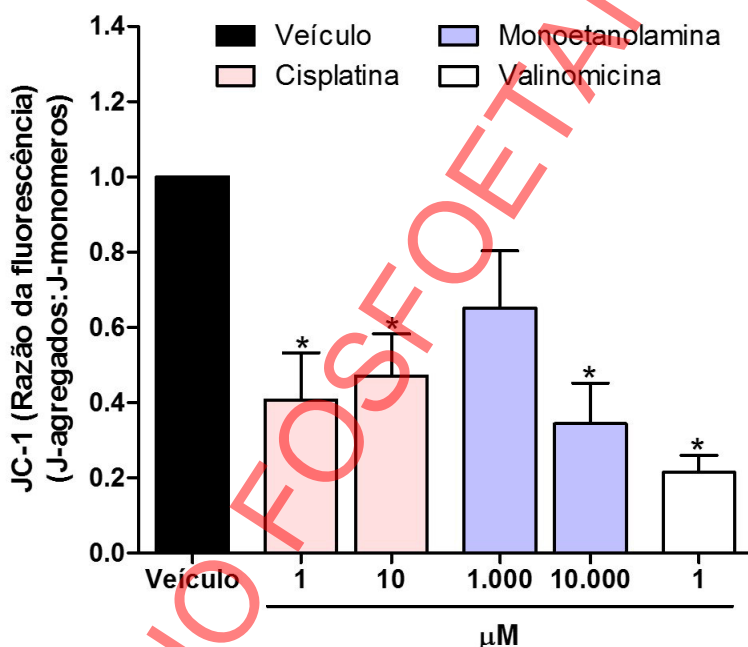


Figura 8: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após o tratamento das células A-375 por 48 horas. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (1.000 μM ou 10.000 μM), Cisplatina (1 μM ou 10 μM), Valinomicina (1 μM) ou com o veículo por 48 horas. Em seguida o JC-1 foi adicionado e o potencial de membrana avaliado através de fluorescência. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (Meio).

7.4 Avaliação da morte celular através de apoptose

Apoptose é um dos tipos de morte celular programada, que culmina na redução e fragmentação celular, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, culminando na formação de corpos apoptóticos (Elmore, 2007).

**AValiação DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS Ações CITOTÓxicAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

Uma das características da apoptose é a externalização de fosfatidilserina na membrana celular (Martin *et al.*, 1995). Através da utilização de marcadores de fosfatidilserina, como a Anexina-V, pode-se avaliar a porcentagem de células em apoptose (Van Engeland *et al.*, 1998). O 7-AAD é utilizado como um marcador de DNA e é excluído em células intactas, dessa forma a sua marcação indica permeabilização da membrana característica da apoptose.

Conforme observado na figura 9, $79,5 \pm 2,5$ % das células da linhagem de melanoma humano tratadas com veículo (meio de cultura) durante 48 horas estavam viáveis (A), enquanto que $19,7 \pm 2,1$ % se encontravam em apoptose (B) e $0,7 \pm 0,3$ % em necrose celular (C).

Nos grupos tratados com as menores concentrações de Monoetanolamina ($1.000 \mu\text{M}$) e da cisplatina ($1 \mu\text{M}$) não houve alteração em relação ao grupo veículo nas células viáveis, apoptóticas e em necróticas, sendo observado respectivamente $81,0 \pm 3,1$ e $66,5 \pm 7,4$ % das células viáveis (A); $18,0 \pm 2,9$ e $28,3 \pm 5,2$ % em apoptose (B) e, $1,0 \pm 0,5$ e $5,2 \pm 2,9$ % em necrose (C) após 48 horas de tratamento.

O tratamento com a Monoetanolamina na concentração de $10.000 \mu\text{M}$ por 48 horas reduziu a viabilidade celular quando comparado ao grupo veículo, sendo observado $34,6 \pm 7,4$ % de células vivas (A), $63,8 \pm 6,7$ % em apoptose (B) e $1,5 \pm 0,6$ % em necrose (C). A Cisplatina, utilizada como controle, na concentração de $10 \mu\text{M}$ reduziu a viabilidade celular; apresentando $25,1 \pm 8,5$ % de células vivas (A), $68,3 \pm 7,5$ % em apoptose (B) e $6,5 \pm 3,3$ % em necrose (C).

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

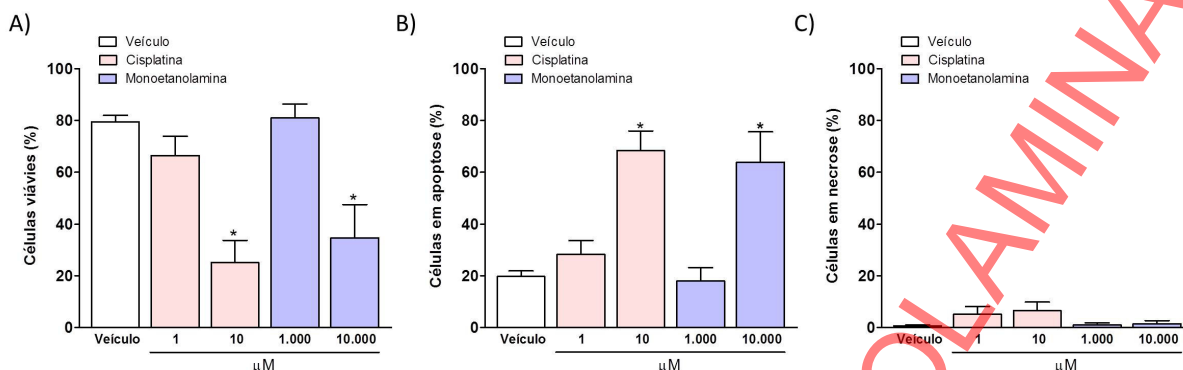


Figura 9: Porcentagem de células viáveis, em apoptose e em necrose. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (1.000 µM ou 10.000 µM), Cisplatina (1 µM ou 10 µM) ou com o veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após, as células foram marcadas com Anexina-V/7-AAD e a apoptose/necrose foi avaliada utilizando citometria de fluxo. (A) porcentagem de células viáveis; (B) porcentagem de células em apoptose; (C) porcentagem de células em necrose. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

7.5 Avaliação da atividade da Monoetanolamina sobre algumas vias de sinalização

A morte celular pode ser induzida por distintos mecanismos intracelulares que compreendem alterações no metabolismo, inibição ou ativação de proteínas responsáveis pelo ciclo celular, bem como a modulação de segundos mensageiros, receptores tirosina quinases e fatores de transcrição (Andersen *et al.*, 2005, Elmore, 2007, Malumbres e Barbacid, 2009).

A caspase 3 é ativada por proteólise pela caspase 8, formando a caspase 3 clivada, a qual tem papel importante na degradação de inúmeros substratos e na efetivação da morte celular por apoptose (Elmore, 2007). Corroborando os resultados apresentados previamente na figura 9, após 48 horas de incubação houve aumento da marcação de caspase 3 clivada nos grupos tratados com a Monoetanolamina (10.000 µM) ou com cisplatina (10 µM), indicando a ocorrência de apoptose após o tratamento com os dois compostos (Figura 10 A e B).

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

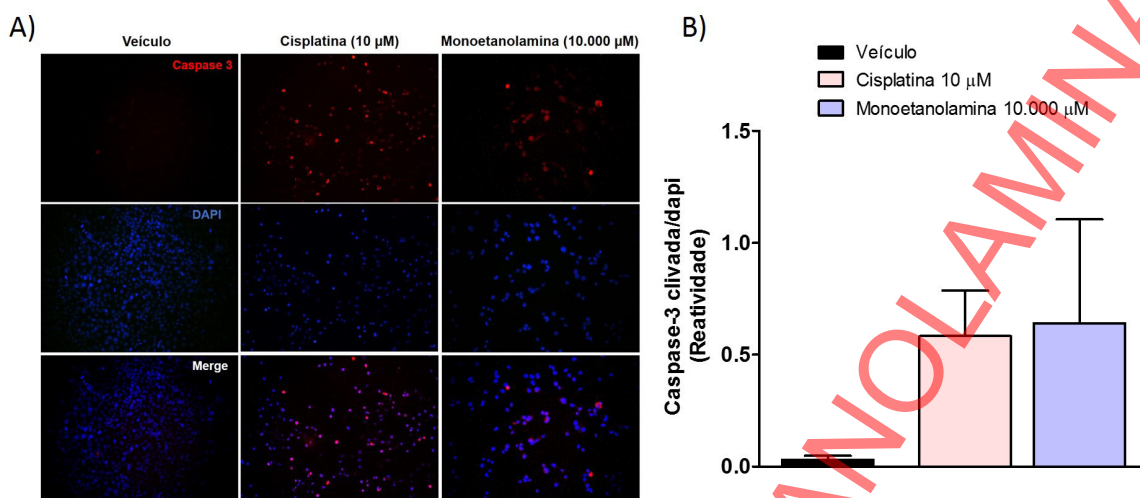


Figura 10: Avaliação da proteína caspase-3 clivada. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (10.000 µM), Cisplatina (10 µM) ou com o veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-caspase 3 clivada e avaliado a imunofluorescência. (A) Imagens representativas da marcação com caspase-3 clivada (vermelho), DAPI (núcleo das células) e a sobreposição das imagens (merge). (B) Quantificação relativa das células positivas para a proteína caspase-3 clivada em relação ao DAPI. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando teste-t. Não foi observado diferença estatística entre os grupos experimentais.

A proteína mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) é uma quinase que tem papel importante no crescimento celular, proliferação e síntese de proteínas (Hay *et al.*, 2004). A mTOR é ativada pela via da PI3 quinase, via de sinalização mediada por Akt, e resulta na expressão de proteínas importantes para a sobrevivência celular (Navé *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2000), o que tem tornado o mTOR um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais (Huang e Houghton, 2003). Conforme observado na figura 11, após 48 horas de incubação não foi observada alteração nas células tratadas com a Monoetanolamina (10.000 µM) e cisplatina (10 µM) para esta marcação em relação ao grupo veículo (Figura 11 A e B).

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

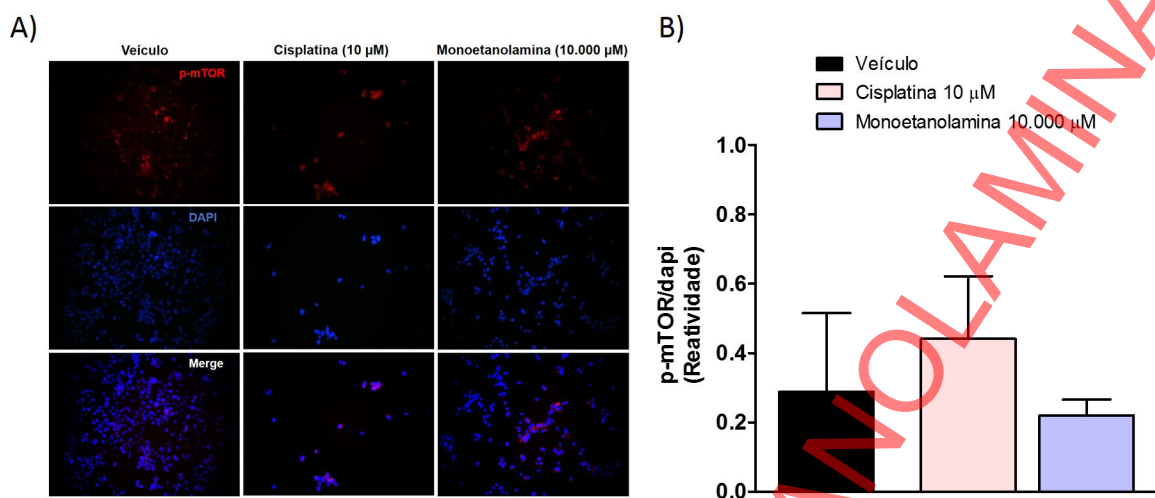


Figura 11: Avaliação da proteína quinase mTOR. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (10.000 µM), Cisplatina (10 µM) ou com o veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-fosfo-mTOR e avaliado a imunofluorescência. (A) Imagens representativas da marcação de fosfo-mTOR (vermelho), DAPI (núcleo das células) e a sobreposição das imagens (merge). (B) Quantificação relativa das células positivas para a proteína fosfo-mTOR em relação ao DAPI. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando teste-t. Não foi observado diferença estatística entre os grupos experimentais.

A proteína p53 é uma importante supressora tumoral que apresenta papel fundamental sobre a resposta a um dano no DNA celular, sendo considerada uma “guardiã” do genoma. A ativação da p53 pode levar a parada no ciclo celular (divisão celular) para que ocorra reparo no DNA e a célula não perpetua com mutações, ou então causar indução direta de morte celular por apoptose quando o reparo não é viável (Levine, 1997). Alterações no DNA induzem a fosforilação da p53, reduzindo sua afinidade pelo regulador negativo MDM2 (Shieh *et al.*, 1997), deixando-a assim em sua forma ativada. Conforme pode ser observado na figura 12 (A e B), após 48 horas de incubação houve aumento na marcação de fosfo-p53 (forma ativada) após o tratamento com a Monoetanolamina (10.000 µM) e com a Cisplatina (10 µM) em relação ao grupo veículo.

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

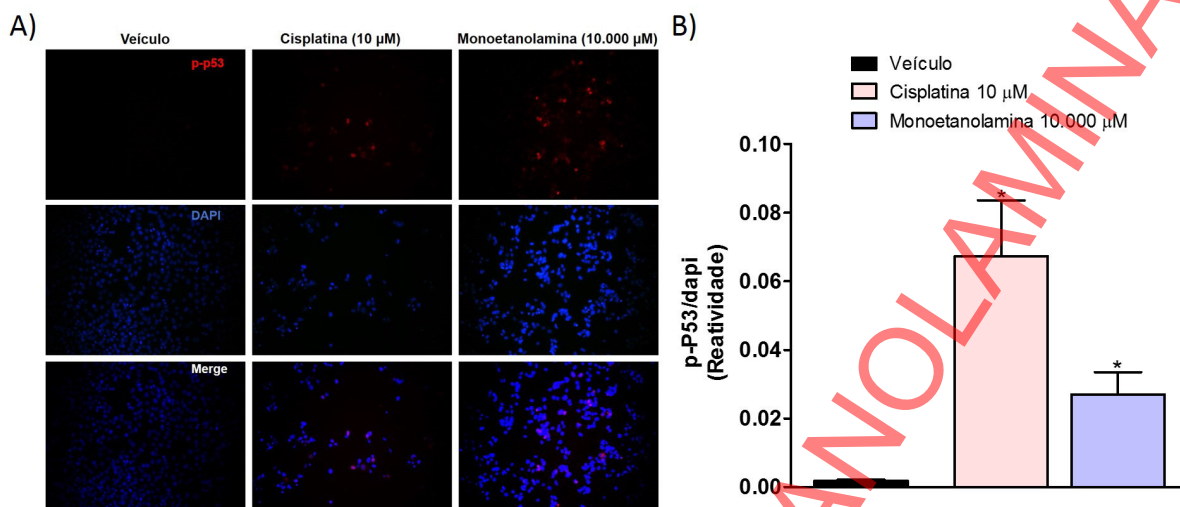


Figura 12: Avaliação da proteína fosfo-p53. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (10.000 µM), Cisplatina (10 µM) ou veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-fosfo-p53 e avaliado a imunofluorescência. (A) Imagens representativas da marcação com a fosfo-p53 (vermelho), DAPI (núcleo das células) e a sobreposição das imagens (merge). (B) Quantificação relativa das células positivas para a proteína fosfo-p53 em relação ao DAPI. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando teste-t. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de células tratadas com o veículo.

As ciclinas dependentes de quinase (CDKs) são proteínas que se tornam ativas através de um complexo com as ciclinas (CDK-ciclinas) e atuam fosforilando proteínas específicas do ciclo celular (Malumbres e Barbacid, 2009). Um dos alvos do complexo CDK-ciclina é a proteína inibitória retinoblastoma (Rb), que, quando fosforilada pela CDK-ciclina se torna inativa e permite a progressão do ciclo celular (Lukas *et al.*, 1996; Weinberg, 1995). A inativação das CDKs ocorre através de uma família de proteínas que incluem a p16 INK4A e a p27 Kip1. A proteína p16 INK4A é um inibidor específico do complexo ciclina 1/CDK4 e alterações no gene que a codifica são frequentemente observados em tumores (LaPak e Burd, 2014). A proteína p27 Kip1 é um inibidor não específico do complexo CDK-ciclina e atua principalmente na inativação da CDK2-ciclina A, bem como em outras CDKs-ciclinas forçando um ponto de restrição no ciclo celular (Sheaff *et al.*, 1997). Como observado na figura 13, houve aumento na marcação das duas proteínas inibitórias p16 INK4A (Figura 13A e B) e p27 Kip1 (Figura 13C e D) após o tratamento com a Monoetanolamina (10.000 µM) em relação ao grupo veículo, contudo um aumento

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

significativo foi observado somente através do tratamento com a Cisplatina (10 μ M) durante 48 horas em relação ao grupo tratado com o veículo.

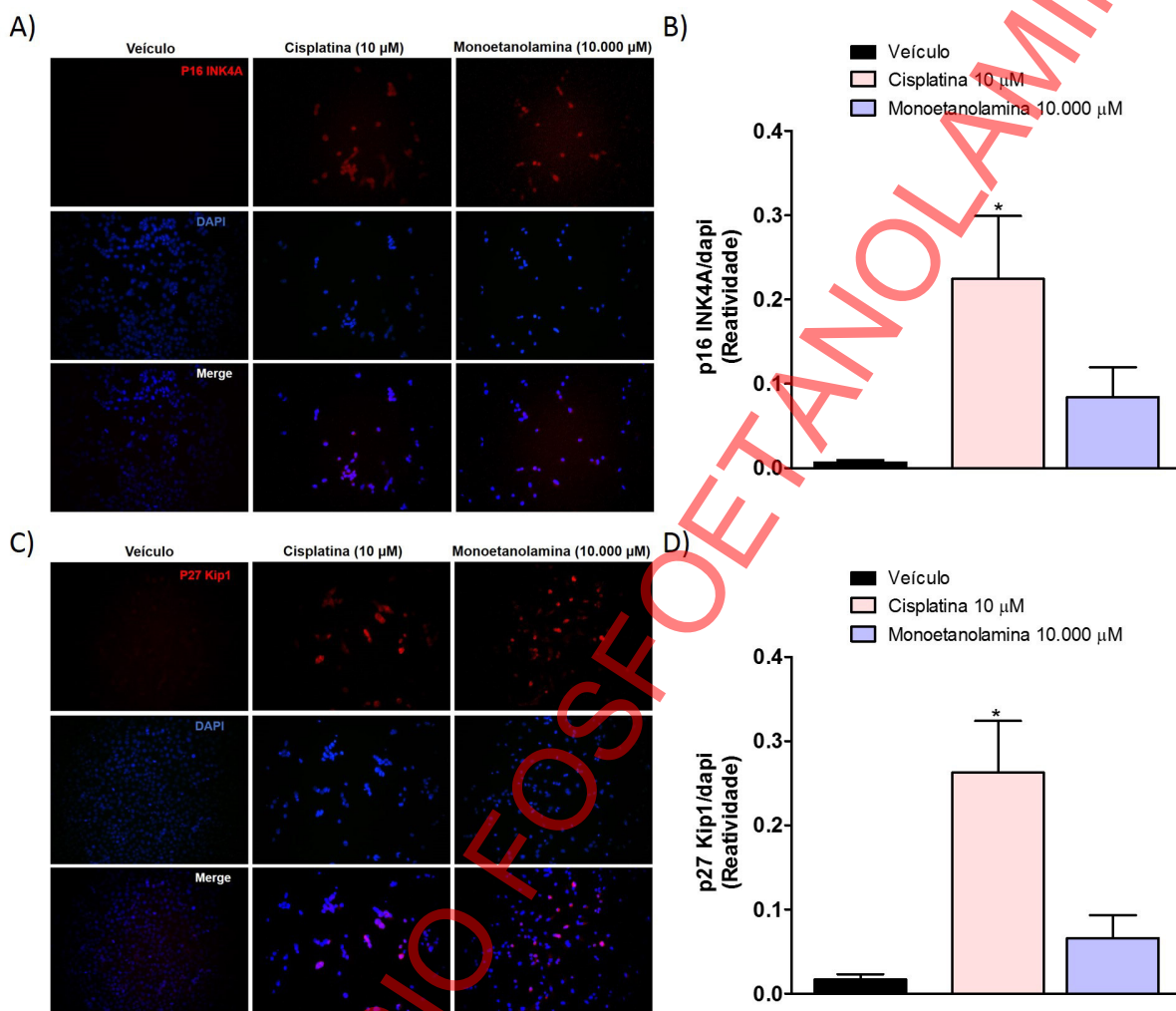


Figura 13: Avaliação da marcação das proteínas p16 INK4A e p27 Kip1. As células da linhagem de melanoma humano (A-375) foram incubadas com a Monoetanolamina (10.000 μ M), Cisplatina (10 μ M) ou com o veículo (meio de cultura) por 48 horas. Após, as células foram marcadas com os anticorpos primários anti-p16 INK4A e anti-p27 Kip1 e avaliado a imunofluorescência. (A e C) Imagens representativas da marcação com a p16 INK4A ou p27 Kip1 (vermelho), DAPI (núcleo das células) e a sobreposição das imagens (merge). (B e D) Quantificação relativa das células positivas para as proteínas p16 INK4A (B) e p27 Kip1 (D) em relação ao DAPI. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3 ensaios. A diferença estatística foi analisada utilizando teste-t. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de células tratadas com o veículo.

8. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados obtidos no presente relatório demonstram que a Monoetanolamina, obtida com grau de pureza superior a 98 % e incubada por 48

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO

horas com células de melanoma humano (A-375), na concentração de 10.000 μM , reduziu a formação de clones celulares, bloqueou o ciclo celular em S e G2/M, reduziu o potencial de membrana mitocondrial e induziu a morte das células por apoptose. Tais fenômenos podem estar relacionados com a ativação das proteínas p53, p16 INK4A, p27 Kip1 e caspase 3. Nas mesmas condições experimentais, a Cisplatina na concentração de 10 μM também reduziu a formação de clones celulares, bloqueou o ciclo celular, reduziu o potencial de membrana e induziu a morte principalmente por apoptose. Esses resultados analisados em conjunto podem explicar, pelo menos em parte, as ações citotóxicas observadas em relatórios anteriores pelo emprego de altas concentrações da Monoetanolamina quando avaliada em células de melanoma humano (A-375).

9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário adequado onde ficarão arquivadas por 5 anos.

10. ARQUIVAMENTO

Cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final foram arquivadas no CIEnP, onde serão mantidas por 5 anos. A Substância Teste, Monoetanolamina foi armazenada em local apropriado no CIEnP e será mantida até a expiração de sua validade.

11. REFERÊNCIAS

Andersen MH, Becker JC, Straten Pt. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. Nat Rev Drug Discov. 2005 May;4(5):399-409.

Chen TF, Wong YS, Zheng WJ, Liu J, Wong YS. Rutenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. Inorg Chem. 2010 49, 6366-6368.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W; Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Altern Lab Anim. 2005 Jun;33(3):261-87.

Elmore, Susan. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." Toxicologic pathology. 2007 35.4: 495–516.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9.

Gurp MV, Festjens N, Loo GV, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003 304 487 - 497.

Hay N, Sonenberg N. "Upstream and downstream of mTOR". Genes & Development. 2004 18 (16): 1926–45.

Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Curr Opin Pharmacol. 2003 Aug;3(4):371-7.

LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. Mol Cancer Res. 2014 Feb;12(2):167-83.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997 Feb 7;88(3):323-31.

Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. Mol Cell Biol. 1996 Dec;16(12):6917-25.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153-66.

Martin, S. J. Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J. Exp. Med. 1995 182, p.1545-1556.

Mitchison, T. J. & Salmon, E. D. Mitosis: a history of division. Nature Cell Biol. 2001 3, E17–E22.

Navé B T, M Ouwens, D J Withers, D R Alessi, and P R Shepherd. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. Biochem J. 1999 Dec 1; 344(Pt 2): 427–431.

Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. J Biol Chem. 2000 Mar 10;275(10):7416-23.

Schafer KA. The cell cycle: a review. Vet Pathol. 1998 Nov;35(6):461-78.

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

Shapiro, G. I., & Harper, J. W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *Journal of Clinical Investigation*, 1999 104(12), 1645–1653.

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 1997 Jun 1;11(11):1464-78.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.

Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, Schutte, F. C., B., Reutelingsperger, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998 Jan 1; 31(1): 1–9.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995 May 5;81(3):323-30.

RELATÓRIO FOSFOTETANOLAMINA

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES CITOTÓXICAS
DA MONOETANOLAMINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE MELANOMA
HUMANO**

DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se a Substância Teste utilizada.



Dr. Rodrigo Marcon
Diretor do Estudo

25/11/16
Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

**DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO SUBSTITUTO, GERENTE DA
INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR PRESIDENTE**

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.

Cristina Freitas

Dra. Cristina Setim Freitas
Diretor de Estudo Substituto

25/11/16

Data

[Assinatura]

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

25/11/16

Data

João Batista Calixto

Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIEEnP

25/11/2016

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA