

Giovani Marino Favero

**Efeito citotóxico causado por emulsão lipídica  
contendo 7-cetocolesterol (O<sub>x</sub>LE) em cultura de  
células tumorais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

SÃO PAULO  
2003

"Quanto é melhor adquirir a sabedoria que o ouro!  
E mais excelente, adquirir a prudência do que a prata!"

**Provérbios 16.16**

## *AGRADECIMENTOS*

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, pela orientação deste trabalho e pela amizade firmada.

Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão pela colaboração durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas pela dedicação, sabedoria e sugestões destinadas ao auxílio deste trabalho.

À Andréia Hanada Otake, e demais colegas do laboratório de adesão celular, por sua constante paciência e auxílio.

Aos professores Paulo Roberto Favero, Monique Dall'Agnol e Eversom Augusto Krum, por me ensinarem os primeiros passos na ciência.

À Luciane Maria Ricetti pelo amor e incentivo aos meus ideais.

Ao meu irmão, Luis Antonio Favero Filho, pelo estímulo e ajuda nestes dois anos, sempre me apoiando nos momentos difíceis.

À minha irmã, Maria Leonor, pela solidariedade e companheirismo.

Aos amigos do laboratório Fernando Lanichek e Vanessa Comar, pelos momentos compartilhados.

Ao amigo e instrutor Antonio Carlos Magnanelli pelos ensinamentos laboratoriais e culturais.

A todo o pessoal do laboratório, especialmente, as amigas Regina Feitosa Gil e Luciana Morgante Maselli por toda ajuda neste período.

À Dr. Estela Novak e suas alunas, por todos os momentos de discussão científica.

À Dr. Madalena e a colega Célia por toda ajuda prestada no cultivo de células.

Aos amigos David, Ricardo, Humberto, Marcelo e Gallo pelos bons momentos e companheirismo.

À Sônia, Tânia e Dona Diva, da secretaria do programa de pós-graduação, por estarem sempre aptas a ajudar com bom humor e dedicação.

À todos que participaram direta ou indiretamente neste trabalho.

SUMÁRIO	
INTRODUÇÃO	1
Lipídios	1
Oxidação lipídica. Oxisteróis	8
Oxisteróis e morte celular	13
Emulsão lipídica com características da LDL (LDE)	19
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
1.Preparo da emulsão (LDE)	24
2. Incorporação de oxisterol à LDE	25
3.Preparo de emulsão lipídica contendo 7-KC (O <sub>x</sub> LE)	26
4. Preparo de emulsão com excesso de colesterol livre (LDE/col)	28
5. Extração de HDL plasmática humana	28
6. Cultura de células	29
7. Tratamento das células	31
8. Avaliação das alterações celulares	32
9. Análise da morfologia celular	34
10. Análise da captação da emulsão marcada	35
11. Microscopia eletrônica	36
12 Análise estatística	37
RESULTADOS	38
1. Incorporação de 7-cetocolesterol a emulsão (LDE).	38
2. Preparo da emulsão contendo 7-cetocolesterol(O <sub>x</sub> LE)	43
3.Efeito da O <sub>x</sub> LE nas diferentes linhagens celulares	47
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

## RESUMO

Oxisteróis são derivados oxigenados do colesterol que podem ser formados por autooxidação ou por atividade de enzimas específicas. Eles apresentam inúmeras atividades biológicas, incluindo inibição da proliferação celular e citotoxicidade. Dentre os oxisteróis, 7-cetocolesterol (7-KC), que difere do colesterol por apresentar um grupamento cetônico no carbono 7, é conhecido por induzir morte celular por diferentes vias. Neste projeto de pesquisa pretendemos avaliar o uso de uma emulsão lipídica contendo oxisterol (O<sub>x</sub>LE) como veículo para entrega de 7-KC a células tumorais. Os efeitos tóxicos de O<sub>x</sub>LE foram avaliados nas linhagem celulares RPMI 8226 (mieloma múltiplo) e B16F10 (melanoma). As células foram tratadas com: a) uma emulsão conhecida por atuar funcionalmente como a LDL (LDE); b) O<sub>x</sub>LE (75 μM até 225μM de 7-KC); c) 7-KC (100μM). As distribuições das células nas diferentes fases do ciclo de duplicação celulares foram analisadas por citometria de fluxo com iodeto de propídio. Todos os tratamentos, nestas concentrações, levaram a acúmulo das células de mieloma na fase proliferativa do ciclo celular. Para analisar a resposta apoptótica, nos utilizamos o fluorocromo JC-1, que mede o potencial transmembranar mitocondrial. Ambas a linhagens celulares, quando tratadas com O<sub>x</sub>LE, apresentaram hiperpolarização do potencial transmembranar associado com progressivo decréscimo do mesmo. Os resultados mostram que os grupos O<sub>x</sub>LE e 7-KC induziram a uma morte massiva das células de mieloma. O<sub>x</sub>LE induziu um efeito citostático nas células de

melanoma, caracterizadas por alterações de morfologia, com um aumento na polimerização das fibras de actina, hiperpolarização seguida de perda do potencial transmitocondrial (apoptose associada à despolarização) , presença de vacúolos autofágicos como figuras de mielina (morte celular programada do tipo II – Autofagia); e impossibilitando as células de fazer a citocinese, determinado pelo aparecimento de uma população de células poliplóides. Nossos resultados indicam que esta nova emulsão contendo um oxisterol em sua formulação não é apenas um veículo para moléculas hidrofóbicas, mas pode atuar como agente cistotático/citotóxico. A morte mediada por O<sub>x</sub>LE possui características de apoptose e autofagia. Estes resultados são promissores e o possível use de O<sub>x</sub>LE *in vivo* necessita de futuras investigações.

## ABSTRACT

Oxysterols are oxygenated derivatives of cholesterol that may be formed by autoxidation or by action of specific enzymes. They exhibit a number of biologic activities including inhibition of cellular proliferation and cytotoxicity. Among oxysterols, 7-ketocholesterol (7-KC), that differs from cholesterol by a functional ketone group at C7, is known to induce cell death by different ways. Herein we evaluated the use of an oxysterol-containing lipid emulsion (O<sub>x</sub>LE) as a vehicle to deliver 7-KC to tumor cells. O<sub>x</sub>LE was evaluated regarding its toxicity on RPMI 8226 (multiple myeloma) and B16F10 (melanoma) cell lines. Cells were treated with: a) an emulsion known to act functionally as LDL (LDE); b) O<sub>x</sub>LE (75 μM to 225 μM of 7KC); c) 7KC (100 μM). The distribution of cells in the different phases of cell cycle was analyzed by flow cytometry with propidium iodide. All treatments, according to the concentrations, led the myeloma cells to an arrest in the proliferative phases of the cell cycle. To analyze the apoptotic response, we then used a fluorochrome (JC-1), which measures the mitochondrial transmembrane potential. Both cell lines when treated with O<sub>x</sub>LE had a hyperpolarization of the transmembrane potential that decrease progressively. The results showed that exposure to either O<sub>x</sub>LE or 7-KC induced a massive death of myeloma cells. O<sub>x</sub>LE had a cytostatic effect on melanoma cells characterized by morphologic alterations as increased polymerization of actin fibers; hyperpolarization followed by a dissipation of the mitochondrial transmembrane potential (apoptosis-associated depolarization); presence of



autophagic vacuoles as myelin figures (programmed cell death type II – Autophagy); and impaired cytokinesis, as determined by the emergence of a polyploid population. Our results indicated that this new oxysterol-containing emulsion is not only a carrier for hydrophobic molecules, but it can act itself as a cytostatic/cytotoxic agent. Cell death mediated by OxLE have both apoptosis and autophagy characteristics. These results are promising and the possible use of OxLE *in vivo* warrants further investigation.

## INTRODUÇÃO

### Lipídios

Lipídios são importantes moléculas utilizadas como fonte de energia, componentes de membranas celulares, precursores de hormônios esteróides e sais biliares. (RHAINDS *et al.*, 1999). Caracterizam-se, dentre outros atributos, por insolubilidade em água (hidrofobia) e solubilidade em solventes orgânicos ou detergentes. Estruturalmente são formados quase exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio.

O plasma humano contém vários lipídios associados a outras moléculas como gliceróis (triacilgliceróis), fosfolipídios e esteróides (colesterol). O colesterol é encontrado nas membranas plasmáticas, exercendo várias funções, participando inclusive do processo de proliferação celular (CHEN , 1984).

Devido à hidrofobicidade dos lipídios, eles não podem circular livremente no sangue, sendo necessário a sua associação à albumina ou às lipoproteínas, que são os maiores transportadores lipídicos no sangue (BACHORIK *et al.*, 1998).

As moléculas de colesterol, após serem esterificadas por ácidos graxos, associam-se em aglomerados aproximadamente esféricos e

recobertos externamente por uma camada de fosfolipídios. Estes se dispõem de forma a expor as extremidades hidrófilas ao meio e a apresentar componentes hidrofóbicos para o interior, isto é, para a massa de colesterol. Em associação com o recobrimento de fosfolipídios, encontra-se uma proteína. Em função da proporção entre lipídios e proteínas estes corpúsculos (lipoproteínas) serão mais ou menos densos, distinguindo-se quatro categorias, em ordem crescente de densidades: quilomicrons, VLDL (Lipoproteína de densidade muito baixa), LDL (Lipoproteína de baixa densidade) e HDL (Lipoproteína de alta densidade) (WILLIAM *et al.*, 1991). As lipoproteínas são, então, caracterizadas estruturalmente por apresentarem triglicerídeos e colesterol esterificado, envolto por uma monocamada de fosfolipídios associados a colesterol livre contendo um ou mais membros da família de proteínas anfifáticas denominadas apolipoproteínas (apo). (RHAINDS *et al.*, 1999). A figura 1 apresenta a estrutura comum a uma lipoproteína. As características das principais lipoproteínas são apresentadas na tabela 1.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal transportadora de colesterol na circulação, carregando cerca de 2/3 do colesterol total (BROWN *et al.*, 1981). As partículas de LDL possuem um diâmetro médio de 22nm e são constituídas de aproximadamente 170 moléculas de triglicerídeos e 1600 moléculas de colesterol esterificado, com 700 moléculas de fosfolipídios na monocamada que a reveste, contendo apenas uma apolipoproteína, a apoB-100, e 600 moléculas de colesterol livre, sendo

um terço no interior da vesícula e o restante no envoltório. (HEVONOJA *et al.*, 2000).

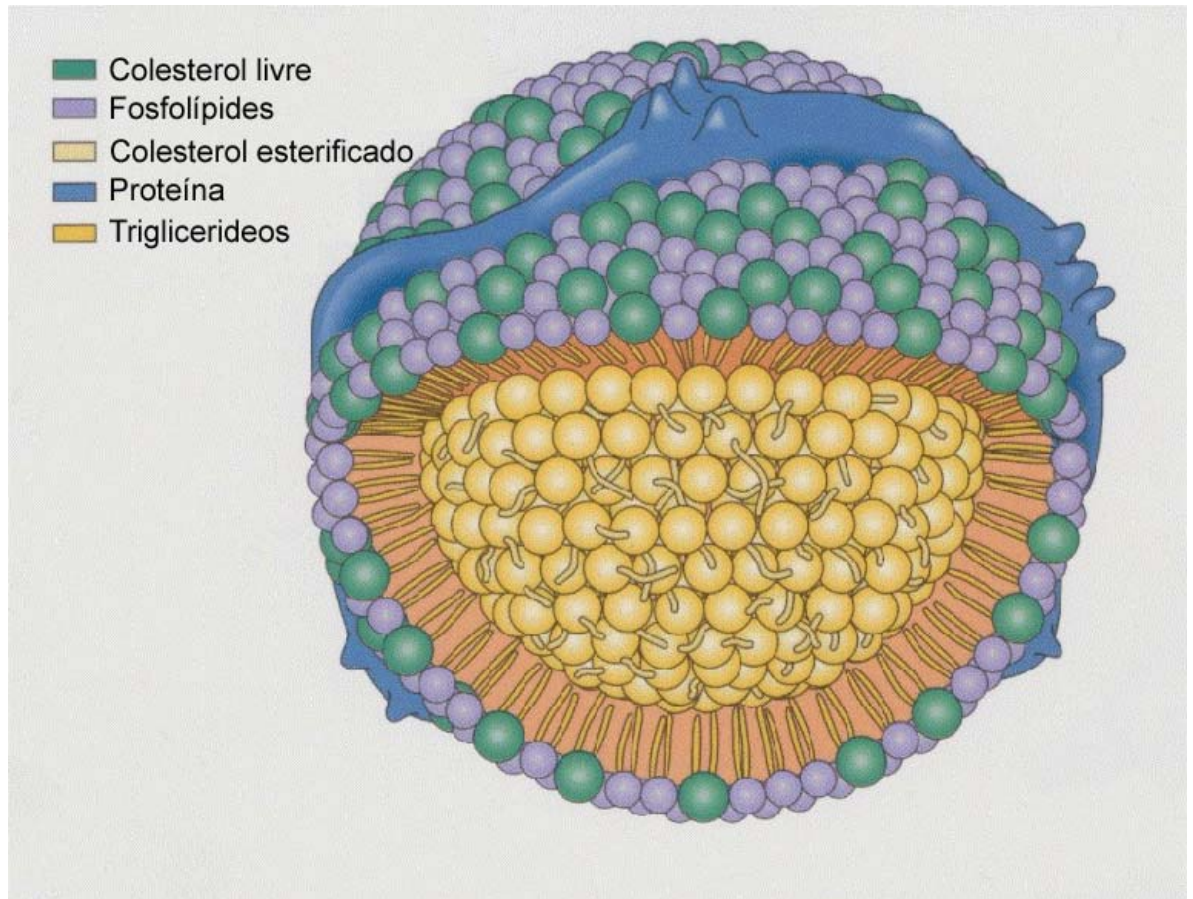


Figura 1. Estrutura de uma lipoproteína.

ApoB-100 é uma das maiores proteínas monoméricas conhecidas, contendo aproximadamente 4536 aminoácidos. As apolipoproteínas possuem distribuição dinâmica entre diferentes lipoproteínas, isto é, uma mesma molécula pode ser translocada para diferentes complexos lipoprotéicos na circulação sanguínea. A apo B-100 e apo B-48, devido provavelmente ao seu grau de interação com os componentes lipídicos das lipoproteínas, não apresentam esta propriedade (HEVONOJA *et al.*, 2000).

**Tabela 1:** Característica das principais lipoproteínas presentes no sangue. (Vance, 1996, adaptado)

	Densidade	Mobilidade Eletroforética	Principais Apo	Principais Lipídios (%)	% Apo	Origem	Função
Quilomícron	< 1.006	Origem	A <sub>I</sub> , A <sub>II</sub> , C <sub>I</sub> , C <sub>II</sub> , C <sub>III</sub> , B <sub>48</sub>	TG: 90%	2%	Intestino	Transporte TG exógeno.
VLDL	> 1.006	Pré β	B <sub>100</sub> , C <sub>I</sub> , C <sub>II</sub> , C <sub>III</sub> , E <sub>II</sub> , E <sub>III</sub> , E <sub>IV</sub>	TG: 55%	5 a 8%	Fígado e Intestino	Transporte de TG endógeno
LDL	1.006 - 1.009	entre pré α e β	B <sub>100</sub> , C <sub>I</sub> , C <sub>II</sub> , C <sub>III</sub> , E <sub>II</sub> , E <sub>III</sub> , E <sub>IV</sub>	TG: 30% e Col: 30%	15%	Intravascular	Intermediária entre o VLDL e o LDL
LDL	1.009 - 1.063	β	B <sub>100</sub> , traços de C e E	Col: 45%	20 - 24%	Intravascular	Transporte de colesterol aos tecidos
HDL	1.063 - 1.210	α	A <sub>I</sub> , A <sub>II</sub> , A <sub>IV</sub> , C <sub>I</sub> , C <sub>II</sub> , C <sub>III</sub> , E <sub>II</sub> , E <sub>III</sub> , E <sub>IV</sub> , traços de D	Fosfolípide 30%	50%	Fígado e Intestino	Transporte reverso do colesterol dos tecidos para o fígado

A LDL é originada da VLDL, que é produzida no fígado e convertida em LDL através de processo metabólico ocorrido na circulação. A LDL, comparada a VLDL, é pobre em triglicérides e rica em colesterol esterificado, apresenta como importante constituinte caracterizador a lipoproteína ApoB-100, e possui meia vida plasmática de aproximadamente dois dias. Sua densidade varia entre 1,019 e 1,063 g/ml, possuindo 3 subclasses bem definidas dentro desta variação de densidade (RHAINDS *et al.*, 1999).

A remoção da LDL do plasma é feita principalmente pelo fígado, ocorrendo a captação da LDL através da interação com os receptores de LDL (LDL-R). Estes receptores têm afinidade tanto por Apo B-100 como por Apo E, encontram-se em regiões específicas da membrana de todos os tipos celulares do nosso organismo (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

O LDL-R é uma proteína monomérica, com 160 kDa (SCHNEIDER *et al.*, 1982), foi descoberto e caracterizado por Goldstein e Brown, ganhadores do prêmio Nobel de 1985.

Após interação da lipoproteína com o receptor, ocorre internalização, conduzindo o LDE ao citoplasma por vesículas recobertas por clatrina, formando os endossomos. Os endossomos se fundem ao lisossomo onde a LDL é degradada em aminoácidos, colesterol livre e ácidos graxos livres. A diminuição do pH local promove a liberação do receptor de LDL que acaba por voltar a superfície (GOLDSTEIN *et al.*, 1979).

Em tecidos que necessitam de grande demanda de colesterol, como fígado e as glândulas adrenais, pode ocorrer captação seletiva de colesterol esterificado (CE) da LDL. Esta captação foi descrita por Green e Pittman em

1991, também ocorrendo por interação da porção protéica com um sítio de ligação de lipoproteínas (LBS), onde a lipoproteína libera CE e volta à circulação (RHAINDS *et al.*, 1999).

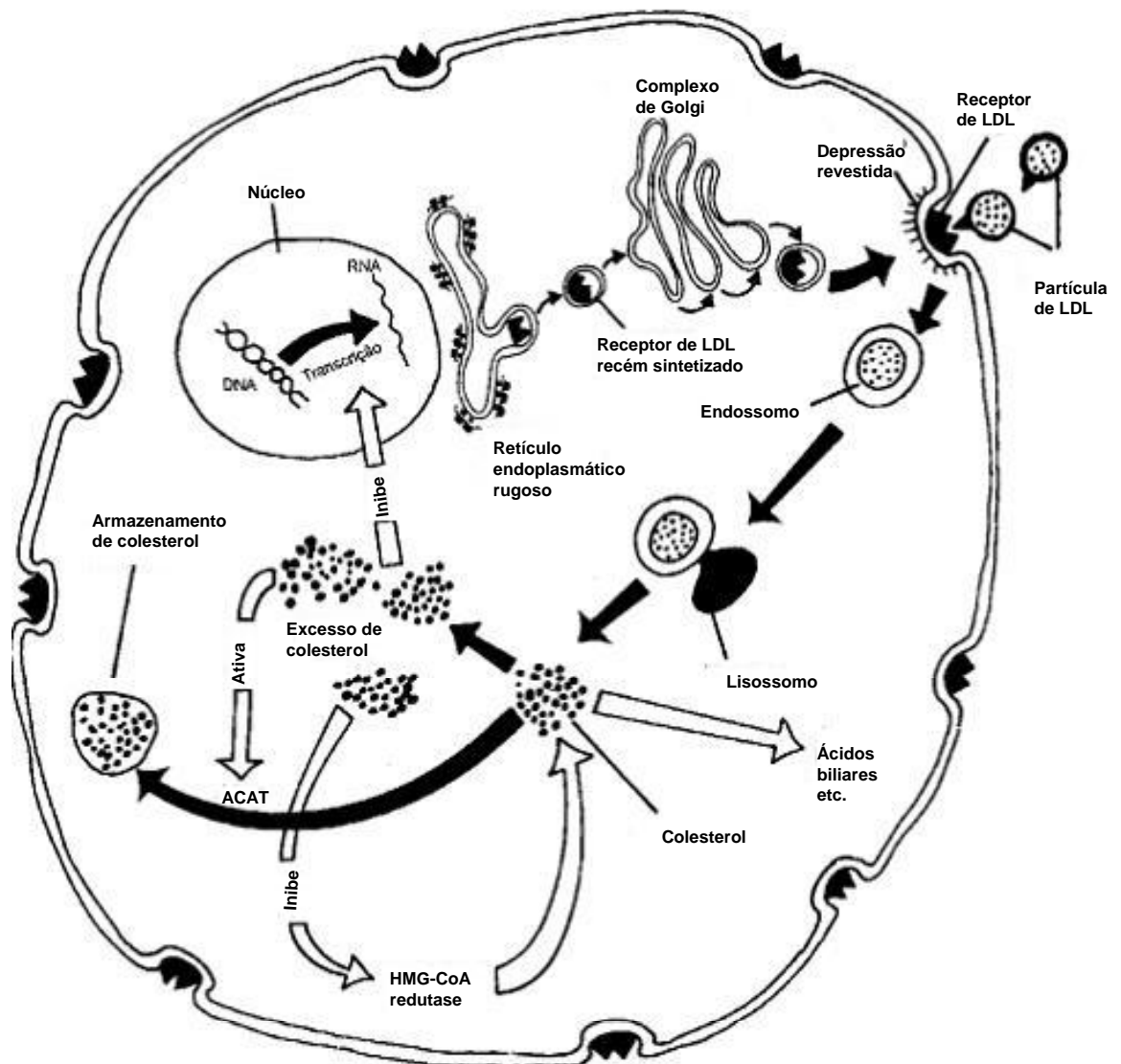


Figura 2 – Representação da interação da LDL com a célula. O receptor de LDL está localizado sobre a superfície celular, a LDL liga-se ao receptor e é conduzida ao citoplasma por vesículas recobertas por clatrina, os endossomos, que se fundem ao lisossomo. Nos lisossomos, a apoB-100 é degradada em aminoácidos, enquanto o éster de colesterol, triglicerídeos e os fosfolípidios são hidrolisados por hidrolases ácidas, gerando colesterol livre e ácidos graxos livres. O colesterol livre resultante atua de forma inibitória na produção de novos receptores de LDL, ativa a enzima ACAT, responsável pela esterificação e armazenamento do próprio colesterol, além de inibir a enzima HMGCoA redutase, principal enzima na síntese endógena de colesterol (<http://www.afh.bio.br/basicos/Digest2.htm>).

A concentração de colesterol intracelular é o regulador da afinidade dos receptores B/E por LDL, assim como da expressão dos mesmos. Paralelamente, há a diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3metilglutaril Coenzima A redutase (HMG CoA), responsável pela principal etapa de biossíntese do colesterol. A HMG CoA redutase faz parte do mecanismo que converte acetil coenzima A em colesterol, endogenamente.

A importância dos receptores de Apo B-E nas células é demonstrada pelos altos níveis de LDL plasmático encontrado em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Estes níveis são causados pela perda da capacidade de ligação dos receptores celulares de Apo B-E, tornando as incapazes de internalizar lipoproteínas. (RALL *et al.*, 1983)

Os níveis de LDL plasmáticos estão grandemente implicados no desenvolvimento de vários processos patológicos, dos quais talvez o mais conhecido seja a aterosclerose. Uma concentração aumentada de colesterol plasmático é um fator de risco para a aterosclerose, o que tem sido bem caracterizado. Há mais de 80 anos, sabe-se que alimentando-se animais com dietas com excesso de colesterol, há aumento de colesterolemia e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. De fato, já em seus estágios iniciais, a aterosclerose é caracterizada pela presença, na íntima arterial, das células espumosas, macrófagos cheios de colesterol.



## **Oxidação lipídica. Oxisteróis**

A oxidação é uma das principais reações químicas às quais os lipídios podem estar sujeitos. O colesterol mostra um comportamento oxidativo particular, pela dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 e pelo grupo hidroxila presente na posição 3 da sua estrutura cíclica. De acordo com uma revisão extensa (KANDUTSCH *et al.*, 1978), o fato do colesterol ser instável na presença de luz e ar foi documentado inicialmente em 1901, enquanto que a oxidação de colesterol foi descrita primeiramente em 1907. Esta observação se tornou importante quando, em 1935, foi reconhecido que o colesterol fornecido aos animais não era puro. Assim, o agente ativo na aterosclerose induzida por dieta poderia não ser o colesterol *per se*, mas seus produtos de oxidação, denominados **oxisteróis**, o que foi postulado por Altschul em 1950. Os oxisteróis podem ser definidos como produtos de oxidação do colesterol que são formados de maneira enzimática e não-enzimática. São formados de maneira enzimática, basicamente, no fígado e tecidos geradores de hormônios; não-enzimáticos, por autooxidação induzida principalmente por radicais livres, ocorrendo com maior facilidade na posição 7; peroxidação lipídica, na qual o colesterol é oxidado por hidroperóxidos ou peróxidos cíclicos, produzindo oxidação nas posições 7, 20 e 25 (MAERKER *et al.*, 1991).

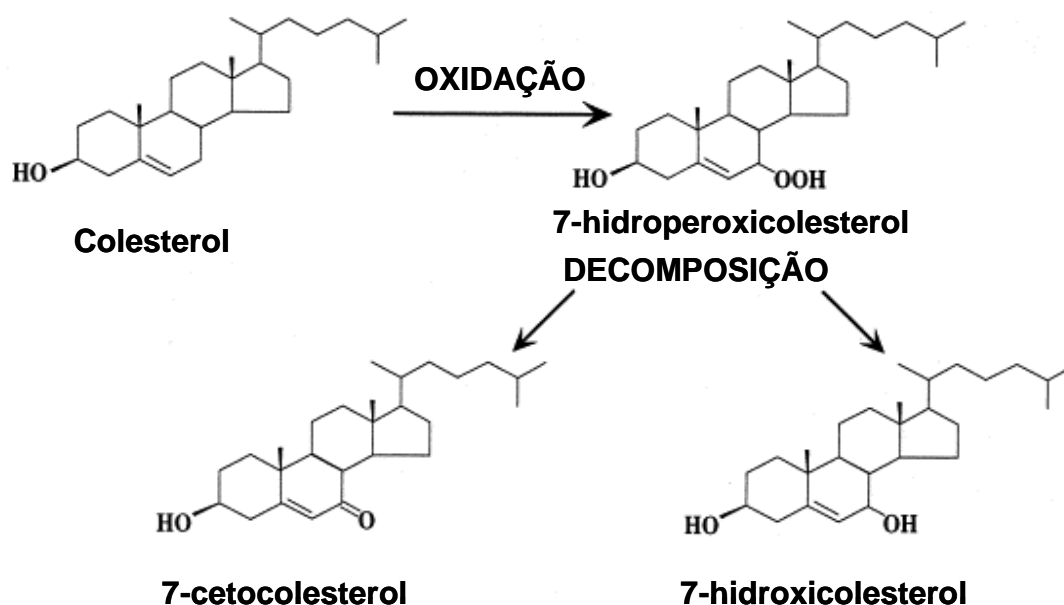


Figura 3: Maior produto do ataque de radicais livres é o 7-hidroperoxicolesterol, este é rapidamente convertido em 7-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol epiméricos. O 7-cetocolesterol é o oxisterol de origem não enzimática mais abundante na lipoproteína de baixa densidade. (Lyons *et al*, 1998, adaptado)

A biossíntese de oxisteróis foi primeiramente documentada em 1956 por Fredrickson e Ono, que incubaram colesterol radioativo com uma fração subcelular enriquecida com mitocôndrias e mostraram que eram formados 25- e 27-hidroxicolesterol. Outros oxisteróis foram descobertos posteriormente.

No plasma humano, os oxisteróis estão aparentemente distribuídos entre lipoproteínas de alta e baixa densidade. SMITH e cols. (1981) detectaram em plasma humano diferentes ésteres de oxisteróis, incluindo 7-cetocolesterol (7-KC; 3 $\beta$ -hidroxicolest-5-en-7-ona; 7-oxocolesterol), 25-hidroxicolesterol, 26-hidroxicolesterol e 7  $\beta$ -hidroxicolesterol. Eles sugeriram que a presença de alguns desses ésteres de oxisteróis leva à peroxidação do colesterol *in vivo*. Vários dos oxisteróis (dentre os mais de 60 diferentes

compostos descritos) ocorrem também nos alimentos, incluindo colesterol -  $\alpha$  e - $\beta$ -epóxidos, 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ - hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol, que é o predominante (PARISH *et al.*, 1989).

Apesar disto, os oxisteróis permaneceram como uma curiosidade bioquímica até que se demonstrou, em 1973, que certos derivados da síntese de esteróis eram potentes inibidores da síntese de esteróis em células de mamíferos em cultura e diminuía os níveis de atividade da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase nestas células (PENG *et al.*,1978; FORNAS *et al.*,1987). Colesterol altamente purificado, nas mesmas condições, praticamente não possuía efeito (TAYLOR *et al.*,1979). Isto sugeriu que os oxisteróis tinham um papel no metabolismo lipídico e estimulou a pesquisa de suas ações fisiológicas. Nos anos seguintes mostrou-se que os oxisteróis participam em vários e diferentes aspectos do metabolismo lipídico (PENG *et al.*, 1978).

De fato, os oxisteróis representam uma classe de moléculas regulatórias potentes com ações biológicas importantes, como na interferência no metabolismo de esteróis, na inibição da proliferação e diferenciação celulares, na citotoxicidade, na aterogenicidade, na mutagenicidade e na carcinogenicidade (BARANOWSKI *et al.*,1982). São reguladores da expressão gênica, substratos para a síntese de ácidos biliares e mediadores do transporte de esteróis. Como moléculas regulatórias, inibem a produção de fatores de transcrição requeridos para a expressão de vários genes das vias de suprimento de colesterol (HIGLEY *et al.*, 1984) e são ligantes que ativam receptores nucleares (BOISSONEAULT

*et al.*, 1985). Também podem ser substratos para a síntese de hormônios estereoidais (GUYTON *et al.*, 1990). Os oxisteróis são inativados pela conversão em ácidos biliares e, em algumas instâncias, a necessidade de ácidos biliares pode somente ser suprida através do metabolismo de oxisteróis (NASEEM *et al.*, 1987).

Os oxisteróis receberam atenção particular na pesquisa da aterosclerose, principalmente devido à sua presença no tecido aterosclerótico humano e porque exerce muitas propriedades pró-aterogênicas *in vitro* e, em menor escala, *in vivo*. Aparentemente, o estudo mais antigo sobre a presença de oxisteróis na aorta foi o de Hardegger *et al.*, em 1943 (KANDUTSCH *et al.*, 1978), que descreveram a colest-3,5-dien-7-ona como o principal oxisterol dentre 4 identificados. Este oxisterol é o produto de desidratação do 7-KC, formado artificialmente durante saponificação alcalina a quente. Posteriormente, estudos mostraram que o acúmulo de lipídios em macrófagos na aterosclerose se dá quando a LDL está modificada como, por exemplo, quando está oxidada. Neste caso, a interiorização se dá via receptores outros que não o da LDL ou por fagocitose. LDL oxidada é uma mistura complexa de vários componentes que incluem hidroperóxidos lipídicos, aldeídos e oxisteróis. Quando a LDL é oxidada *in vitro*, várias mudanças ocorrem nos seus componentes lipídicos e protéicos, incluindo uma perda substancial de colesterol livre e esterificado, que são convertidos a oxisteróis. Os oxisteróis, principalmente 7 $\beta$ -hidroperoxi-colesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, podem mimetizar os efeitos citotóxicos da LDL oxidada em vários tipos celulares

(HSU *et al.*, 1980; HOMES *et al.*,1984). Interessantemente, na LDL oxidada pelo  $\text{Cu}^{++}$  predominam os esteróis oxigenados na posição 7, em particular o 7 – cetocolesterol , que difere do colesterol por apresentar um grupo funcional cetona na posição 7 (RAO *et al.*,1999).

Além da origem endógena, foi sugerido que 7-KC pode ser derivado exogenamente da dieta, pois é o principal oxisterol presente em alimentos processado ricos em colesterol (CHANG *et al.*, 1998; OSADA *et al.*,2000). O fato de 7-KC incorporado à LDL acetilada ser rapidamente metabolizado e excretado pelo fígado, após injeção em ratos, sugeriu que a dieta pode não ser uma fonte importante de oxisteróis presentes na placa aterosclerótica (CHANG *et al.*, 1998); porém, este trabalho recebeu críticas potenciais, pois o veículo não era fisiológico; oxisteróis de origem dietética podem ser absorvidos e incorporados em quilomícrons.

Os efeitos do 7-KC *in vitro* incluem inibição da liberação do colesterol das células, diminuição da permeabilidade à glicose, interrupção do fluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , alteração da barreira endotelial, inibição da expressão do receptor de LDL e da liberação de óxido nítrico, citotoxicidade e indução da apoptose (LIZARD *et al.*, 1999).

## **Oxisteróis e morte celular**

Em tecidos adultos, vários estímulos que induzem a proliferação celular desencadeiam indiretamente o processo de morte celular. Assim, há um equilíbrio coordenado entre o aumento do número de células e o processo de morte celular. A descoordenação destes processos pode levar a um acúmulo de células e eventual desorganização tecidual, como ocorre nos processos neoplásicos.

A morte celular pode ser deflagrada a partir de diferentes pontos no mecanismo de vigilância intracelular, ao longo de diferentes fases do ciclo de duplicação de uma célula. É, assim, um mecanismo efetor do controle de qualidade ou estabilidade genética de uma célula normal.

Ao longo de processo de transformação maligna, estes mecanismos são progressivamente atenuados. Células de neoplasias malignas são relativamente mais resistentes à morte celular do que células normais. Compreender-se como diferentes drogas/substâncias podem induzir o processo de morte celular possibilitará o surgimento de novas estratégias terapêuticas contra tumores.

Os principais tipos de morte celular descritos na literatura são: apoptose, morte celular autofágica e necrose ou oncose.

Apoptose é um processo de morte celular programada, conhecida desde o final do século 19, porém ganhou mais clareza e importância em 1972 com as descrições feitas por Kerr, Wyllie e Currie. O termo apoptose

vem do grego significando a queda das folhas no outono, ou a queda das pétalas de uma flor.

O início do processo é um arredondamento da célula, seguido de um encolhimento. Em células aderentes em cultura isto acontece concomitantemente ao seu desprendimento. O corpo da célula e seu núcleo condensam, por extrusão de água. Ocorrem as modificações da membrana celular, surgindo as bolhas apoptóticas (*blebbs*). Finalmente, o núcleo e a célula, ao se fragmentarem, formam os corpos apoptóticos. Durante o processo, a maior parte das organelas e membrana celular permanecem intactas, sem liberação de componentes citoplasmáticos. Diferentes estímulos podem induzir apoptose em diferentes tipos celulares; porém, a maior parte das células apoptóticas possuem modificações morfológicas similares; assim, devem existir vias comuns de indução apoptótica (STRASSER *et al.*, 2000).

Os processos desencadeadores da apoptose podem ser iniciados fora (via extrínseca) ou dentro da célula (via intrínseca) (HARADA-SHIBA *et al.*, 1998). Na via extrínseca são comumente ativados os chamados receptores de morte, como por exemplo, alguns membros da superfamília do fator de necrose tumoral, que ativam as caspases que, através de proteólise, são responsáveis pela maior parte das modificações que ocorrem na apoptose. A via intrínseca é iniciada dentro da célula. Muitos eventos diferentes podem induzir a apoptose por esta via, como a ativação do p53, esteróides, irradiação, danos oxidativos, etc (MARTIN *et al.*, 2003).

A despolarização da membrana mitocondrial é uma das características comuns em quase todas os processos apoptóticos citados. Como consequência, a permeabilidade da membrana mitocondrial é alterada, e moléculas pró-apoptóticas são liberadas; elas determinam a formação de um complexo, o apoptossoma, e ativação da caspase 9, que por sua vez cliva e ativa outras caspases levando, conseqüentemente, à morte da célula (MARCHETTI *et al.*, 1996).

A apoptose foi caracterizada inicialmente como uma forma de morte celular morfológicamente distinta de morte celular por necrose. É um processo ativo que requer energia e participação da célula.

Há um grande número de diferenças entre a morte celular necrótica e a apoptose. Resumidamente a necrose pode ser considerada um evento passivo e caótico, que gera sobretudo inflamação no ambiente tecidual, é rápida e sempre patológica, sem regulação. Até a década de 70, acreditava-se ser o único tipo de morte celular. Morfológicamente, há danos severos, que proporcionam um inchamento celular, devido à perda da integridade da membrana, com ruptura das organelas (CRUCHTEN *et al.*, 2002).

A autofagia, também chamada de Morte Celular Programada do tipo II, é caracterizada pela formação de vacúolos autofágicos (“AVO”), que podem ser detectados com coloração supravital (BIEDERBICK *et al.*, 1994). O grande número de AVOs demonstra fagocitose das organelas celulares pelo lisossomo, este chamado de autolisossomo. A autofagia é independente de caspases, porém, apresenta um colapso nuclear que ocorre em consequência da destruição das organelas. Estudos demonstram



autofagia de células de câncer de mama tratada com radioterapia ou quimioterapia, e em células de mieloma múltiplo e leucemia promielocítica aguda tratadas com arsênico (KANZAWA *et al.*, 2003)

**Tabela 2-** Comparação de três tipos de morte celular.

<b>APOPTOSE</b>	<b>Necrose ou oncosse</b>	<b>AUTOFAGIA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Morte ativa</li> <li>•Condensação da cromatina.</li> <li>•Clivagem internucleossomal do DNA.</li> <li>•Fragmentação do núcleo e da célula.</li> <li>•Manutenção da integridade das organelas</li> <li>•Manutenção da integridade da membrana plasmática</li> <li>•Participação de caspases.</li> <li>•Fagocitose silenciosa.</li> <li>•Dependente de energia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Morte passiva</li> <li>•Dispersão da cromatina.</li> <li>•Clivagem aleatória do DNA .</li> <li>•Perda da integridade das organelas.</li> <li>•Perda da integridade da membrana plasmática.</li> <li>•Extravasamento do conteúdo citoplasmático.</li> <li>•Inflamação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Morte ativa</li> <li>•Sequestro de partes do citoplasma por vacúolos de membrana dupla (às vezes múltiplas) .</li> <li>•Fusão dos autofagossomas com lisosomas, endosomas ou elementos do Golgi com liberação de hidrolases ácidas .</li> <li>•Não há ativação de caspases.</li> <li>•Não há liberação de citocromo c.</li> <li>•Dependente de energia.</li> <li>•Fagocitose silenciosa.</li> <li>•Cariorrhexis.</li> </ul>

A oxidação da LDL causa, dentre outros fenômenos, a indução de apoptose. Grande número de evidências indica que a citotoxicidade (GUYTON *et al.*, 1990; NASSEM *et al.*, 1987) e a atividade pró-apoptótica da LDL oxidada são devidas principalmente aos oxisteróis. Panini e cols. demonstraram que fibroblastos que expressam CD36 (um receptor “scavenger” classe B) internalizam LDL oxidada e sofrem apoptose, enquanto que os que não expressam CD36 não internalizam LDL oxidada, não sofrendo apoptose. Consistentemente com esta hipótese, células

resistentes à morte causada pelo 25-hidroxicolesterol são também resistentes à ação citotóxica da LDL oxidada (HOLMES & YOSS, 1984). Aparentemente, a ação pró-apoptótica da LDL oxidada seria mediada pela via mitocondrial.

Oxisteróis são citotóxicos e inibem o crescimento e viabilidade de células de hepatoma e linfoma em cultura (PARISH *et al.*, 2001); também possuem efeitos tóxicos em células musculares lisas (NASSEM *et al.*, 1987). Quando colocado em forma de cristais em uma camada de colágeno inibem a adesão e o crescimento de células musculares lisas em cultura (GUYTON *et al.*, 1990). Oxisteróis, incluindo o 7-KC, são potentes indutores da apoptose em células endoteliais (PENG *et al.*, 1978; FORNAS *et al.*, 1987; TAYLOR *et al.*, 1979), assim como para uma variedade de outras células, como fibroblastos (BOISSONNEAULT *et al.*, 1985; KOLSCH *et al.*, 1999), células de mastocitoma (FORNAS *et al.*, 1987) e neuroblastoma humano (KOLSCH *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual oxisteróis causam morte celular está em estudo. Haveria três mecanismos principais não excludentes entre si. Um seria a inibição da síntese de colesterol por inibição da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase pelos oxisteróis (HSU *et al.*, 1980). De fato, há correlação entre crescimento celular e síntese de esterol e a atividade da enzima. O bloqueio total da atividade enzimática por oxisteróis inibe a síntese de DNA e a proliferação celular (CHEN, 1984). O segundo mecanismo se daria pela inserção de moléculas de oxisteróis na bicamada lipídica da membrana celular (HOLMES & YOSS, 1984), alterando

substancialmente a permeabilidade da membrana ao  $\text{Ca}^{2+}$ , o que não é causado pelo colesterol (ZHOU *et al.*, 1993). O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentaria acima de determinados níveis, ocorrendo morte celular. Podem existir outras causas. Por exemplo, os oxisteróis favorecem a secreção de interleucina 1 $\beta$  durante o processo apoptótico em células de leucemia promonocítica humana U937 (LIZARD *et al.*, 1997), aparentemente de modo dependente dos níveis celulares de glutatona (LIZARD *et al.*, 1998). O terceiro seria associado ao potencial oxidante dos oxisteróis como mencionado adiante.

Oxisteróis, como o 7-KC, também promovem indução de autofagia em células endoteliais de cordão umbilical humano, caracterizados pela formação de figuras de mielina, que são vacúolos autofágicos e com característica multilamelar, observados na microscopia eletrônica (LIZARD *et al.*, 1997). Num recente trabalho, o mesmo grupo observou a formação das figuras de mielina em células U937, associados a ensaios com monodansilcadaverina, que é um marcador para vacúolos autofágicos (MONIER *et al.*, 2003).

Recentes estudos demonstram que o 7-cetocolesterol desencadeia o processo de morte celular programada, em concentrações micromolares, em linhagens normais e cancerígenas, caracterizada pela condensação do núcleo, externalização de fosfatidilserina, perda do potencial transmembrana da mitocôndria, liberação do citocromo *c*, ativação de caspase 9 e 3 com subsequente degradação da polimerase poly ADP-ribose, e formação e acúmulo de ceramidas C16:0 e C24:1 (LIZARD *et al.*, 2002).

### **Emulsão lipídica com características da LDL (LDE)**

Emulsões são misturas altamente interdispersas de dois líquidos, aquosos ou oleosos, que não formam soluções; essa extensa fronteira entre os domínios de aquoso e oleoso pode ser estabilizada por um terceiro componente, o surfactante. Assim, teremos uma fase dispersa chamada de fase interna e uma fase contínua chamada de fase externa.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode ser considerada a fase interna de uma microemulsão; como já dito, possui um núcleo constituído por éster de colesterol (45-50% da massa) e triglicérides (3-4%), envolvida por uma monocamada de fosfolipídios (16-25%) e colesterol não esterificado (5-8%), sendo a fase externa o sangue.

O termo microemulsão foi introduzido por Schulmann, em 1943, e é definido como sendo uma dispersão transparente, fluida, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, contendo quantidades apropriadas de surfactante. São opticamente transparentes em decorrência do diminuto tamanho dos microdomínios de água e óleo (10-200 nm) que não espalham luz visível.

Do ponto de vista microestrutural, as microemulsões podem ser encaradas como agregados de surfactantes (micelas) de água dispersos em óleo (a/o) ou de óleo dispersos em água (o/a). Mais precisamente, poderiam ser interpretadas como micelas inchadas pela incorporação dos demais lipídios. Em uma micela, as moléculas de surfactante estão organizadas em

monocamadas com seus grupos polares (cabeça) orientadas na direção da água e suas caudas na direção do óleo.

Foi descrita uma microemulsão lipídica sintética (LDE) com determinadas características que a tornaram funcionalmente semelhante à LDL (MARANHÃO *et al.*, 1993), e é capaz de incorporar apoE, proteína através da qual se liga ao receptor de LDL. Essa emulsão está sendo experimentalmente utilizada para transportar quimioterápicos até determinadas células cancerígenas, uma vez que essas células apresentam uma maior captação de LDL por possuírem um número maior de receptores em relação a células normais (HO *et al.*, 1978; MOSLEY *et al.*, 1981). Estas células proliferam rapidamente, necessitando de uma maior demanda para a síntese de membranas tanto plasmática como a nuclear e mitocondrial. O aumento de receptores para LDL em células neoplásicas pode atingir de 3 a 100 vezes o número das células normais (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Esta emulsão tem como propósito minimizar efeitos colaterais de quimioterápicos comuns, como a mielossupressão, toxicidade renal, hepática, neurológica, além do possível desenvolvimento de neoplasias secundárias, devido ao direcionamento às células cancerígenas. Sendo assim, o objetivo desta possível terapia é a destruição seletiva de células malignas, sem que órgãos e tecidos normais sejam atingidos.

Estudos em ratos demonstraram que a cinética plasmática da LDE se assemelha à LDL, havendo evidências da captação pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação (MARANHÃO *et al.*, 1993). Dando continuidade a experimentação, testou-se LDE em indivíduos

normolipêmicos e em portadores de hipercolesterolemia, observando que a emulsão era removida lentamente da circulação nos pacientes com a patologia, que é caracterizada por apresentarem receptores de apo B/E defeituosos. Em outro estudo, foi analisado o caminho inverso, utilizando pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfocítica aguda (LLA); a LMA apresenta número de receptores de LDL aumentadas enquanto que na LLA o número de receptores continua normal. Conforme esperado, a LDE foi removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA (MARANHÃO *et al.*, 1992, 1994).

Vários grupos trabalham com o mesmo conceito. Ponty e cols (1993) demonstraram acúmulo de LDL humana marcada com Tc em tumores implantados (melanoma, B16F10) de camundongos (C57bl/6). Após oito dias do implante do tumor, o acúmulo de LDL marcada era maior no tumor do que no fígado ou rim.

Versluis e cols (1996) comprovaram os resultados observados por Ponty, demonstrando que a captação da LDL era mediada pelos receptores apo B/E, tanto *in vitro* como *in vivo*. Em 1998, Versluis e cols, demonstraram a possibilidade da utilização de lipossomas enriquecidos com apoE como veículo para a daunorubicina atingir o tumor. Rensen e cols (1997) demonstraram melhor eficácia na utilização de lipossomas enriquecidos com apoE associados a quimioterápicos do que LDL associada a quimioterápicos, além de constatar uma igual cinética de absorção e excreção entre o lipossoma enriquecido com apoE e a LDL.

Há poucos estudos sobre incorporação de oxisteróis em partículas lipídicas; alguns deles são os de LYONS & BROWN (2001), que utilizaram 7-KC em LDL acetilada ou quilomícrons. Porém, a finalidade deste grupo era estudar o metabolismo deste oxisterol, e não a sua ação como agente pró-apoptótico, transportado por uma partícula que poderia direcioná-lo a uma célula-alvo, onde exerceria seus efeitos.

## OBJETIVOS

Desenvolver uma emulsão lipídica compreendendo um oxisterol (7-KC) em sua formulação, e avaliar o efeito citotóxico deste complexo em linhagem de células neoplásicas e mais especificamente:

- Estudar a capacidade de ligação de 7-cetocolesterol a emulsão lipídica com características funcionais de LDL (LDE).
- Desenvolver uma nova emulsão contendo 7-cetocolesterol em sua formulação.
- Avaliar a citotoxicidade da emulsão e o mecanismo pelo qual ocorre, avaliando as características envolvidas no processo de morte celular.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.Preparo da emulsão (LDE)

A emulsão LDE foi preparada a partir de uma mistura contendo 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de colesteril oleato, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre não esterificado (Sigma, St. Louis), previamente secos sob fluxo de nitrogênio. 2405 KBq de [<sup>14</sup>C] colesteriloleil éter ou colesterol livre (Amersham, England) foi adicionado, correspondendo a 9.000.000 cpm. Os lipídios foram ressuspensos em 10 mL de tampão 10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 100 mM KCl, e sonicados continuamente por 180 minutos sob vapor de nitrogênio e com temperatura mantida abaixo de 52°C. A suspensão de lipídios emulsificada foi então purificada por ultracentrifugação a 40.000 xg 4°C por 30 minutos, seguido de outra ultracentrifugação para separação da emulsão, que era ajustada à densidade de 1,21 g/mL com KBr, e centrifugada por duas horas, 4°C, 40.000 xg. Em seguida foram feitas à diálise e esterilização por filtração em membrana de 0,22 μm (MARANHÃO *et al.*, 1993).

## **2. Incorporação de oxisterol à LDE**

Foram incubadas diferentes concentrações de 7-KC (Sigma, St. Louis) com LDE previamente preparada, em banho a 37°C com agitação, por 3 horas. A eficiência da incorporação foi avaliada pelas contagens dos lipídios marcados radioativamente, sendo necessária uma separação por ultracentrifugação e análise da presença de 7-KC por cromatografia em camada delgada.

### **2.1. Separação por ultracentrifugação – gradiente de densidade**

Incubaram-se 600  $\mu$ L de emulsão (contendo éter de colesterol marcado) com 50 $\mu$ L de uma solução contendo 0,8mg de 7-KC em 50 $\mu$ L de etanol absoluto (solução final de 2mM) a 37°C por 3 horas, em agitação.

A análise da incorporação do 7-KC à LDE foi realizada por ultracentrifugação. Em 650 $\mu$ L do complexo LDE-7-KC foram adicionados 150 $\mu$ L de tampão LDE (Tris-HCl 0,01M pH 8,05) e 0,27g de KBr e assim obter uma solução de densidade 1,21 g/mL. Sobre esta foram adicionadas 3 mL de 3 soluções salinas (NaCl) de densidades 1,065; 1,020; 1,006 g/mL, respectivamente. Ultracentrifugou-se a 40.000xg por 24 horas a 4°C (REDGRAVE *et al.*, 1975).

Ao final da ultracentrifugação obtiveram-se 5 frações. A radioatividade (correspondente à presença de LDE) de cada alíquota foi contada em contador de cintilação líquida (LKB). Cada fração foi separada e em seguida adicionado clorofórmio / metanol, 2:1 (v/v), para a extração de lipídios.

## **2.2. Cromatografia em camada delgada (TLC)**

Após evaporação do solvente (clorofórmio/metanol) sob fluxo de nitrogênio e reconstituição das amostras com 800 $\mu$ L de clorofórmio/metanol, as amostras foram aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada, de 20x20cm, espessura de 20mm. O sistema foi desenvolvido em benzeno / acetato de etila, 2:3 (v/v), e revelado por sublimação do iodo em câmara de saturação (FREEMAN & WEST, 1966). As amostras foram corridas contra padrões autênticos de oleato de colesterol, fosfatidilcolina, colesterol livre e 7-cetocolesterol.

## **3.Preparo de emulsão lipídica contendo 7-KC (O<sub>x</sub>LE)**

O 7-KC foi adicionado aos mesmos lipídios usados no preparo da LDE, em diferentes concentrações 1,6mg; 2,0mg; 5,0mg e 10mg, seguindo o

mesmo protocolo da emulsão anterior (LDE). A quantidade de 7-KC incorporada a LDE foi determinada pela incorporação de 7-KC [ $^3\text{H}$ ].

### **3.1. Gel filtração para avaliação de 7-KC incorporada à emulsão**

A LDE preparada com 7-cetocolesterol foi submetida à cromatografia de gel filtração em Sephadex G-200 eluído com tampão Tris 100 mM pH 8.0 para análise da quantidade de 7-KC incorporada na emulsão. Foram colhidas frações de 1 mL e a presença de radioatividade  $^3\text{H}$  7-KC e  $^{14}\text{C}$  Colesterol livre foram verificadas em cada fração.

### **3.2. Análise do tamanho das diferentes emulsões**

O tamanho das diferentes emulsões foi estimado por laser light scattering (Zeta Pals, EUA). O laser de estado sólido de 15mW, com coeficiente de difusão de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{seg}$ , e ângulo fixo de  $90^\circ$  é capaz de medir a variação de tamanho de 2 nm até  $3\mu\text{m}$ . Diluiu-se as emulsões com solução salina 0.9%, seguido de filtração em filtro de poro  $0,22\mu\text{m}$ , com posterior análise por light scattering (OWENS *et al.*, 2001). Os resultados são apresentados como média com os respectivos desvios padrões.

#### **4. Preparo de emulsão com excesso de colesterol livre (LDE/col)**

Adicionaram-se 4,5 mg de colesterol livre aos demais lipídios da emulsão, totalizando um total de 5,0 mg de colesterol livre.

#### **5. Extração de HDL plasmática humana**

A HDL nativa foi obtida de plasma humano, obtido de sangue de doadores voluntários, na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. A amostra foi centrifugada a 3.000 rpm a 4°C para fracionamento do plasma. Benzamidina, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e ácido etilenodiaminotetra-acético foram adicionados numa concentração final de 2mM, 1 mM e 1 mg/mL, respectivamente. A densidade do plasma, de 1,006 g/mL, foi ajustada a 1,063 g/mL com KBr. Após homogeneização, as amostras foram ultracentrifugadas a 40.000 xg por 24 horas a 4°C em rotor 80Ti. O material de cor esverdeada na porção inferior do tubo foi aspirado, correspondendo a HDL. O próximo passo foi dialisar extensivamente contra tampão de composto de 150 mM NaCl, 1 mM EDTA sal sódico, 3 mM azida sódica, 10 mM Tris-HCl. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry e esterilizada por filtração em filtro com poro de 0,22 µm de diâmetro. O filtrado foi submetido a fluxo de vapor de nitrogênio por cerca

de 5 minutos, antes do frasco ser bem fechado e mantido a 4°C até sua utilização.

## **6. Cultura de células**

### **6.1. RPMI 8226**

A linhagem RPMI 8226 é uma linhagem de mieloma múltiplo, oriunda de sangue periférico e foi estabelecida em 1966 por Moore e Kitamura no Roswell Park Memorial Institute. Uma das principais características dessa linhagem é a de apresentar células aderentes e células em suspensão. As em suspensão apresentam uma mistura de células em diferentes fases de maturidade e células em processo de morte. O tempo de duplicação dessa linhagem, que é cultivada em meio 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), varia de 40 a 80 horas. Esta linhagem é amplamente empregada em estudos do nosso laboratório.

## **6.2. B16F10**

A linhagem de melanoma B16 de origem murina é utilizada há vários anos, porém, a sub linhagem F10 foi estabelecida por Poste *et al*, em 1980. Esta é uma linhagem de crescimento acelerado com tempo de duplicação inferior a 24 horas, e cresce aderida à placa (POSTE *et al.*,1980). Esta linhagem é tumorigênica, isto é, quando implantado em animais singênicos gera tumores em intervalos de aproximadamente 2 semanas (NOVAK *et al.*, 2003).

## **6.3. Manutenção das células em cultura**

As células RPMI 8226 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100µg/mL estreptomicina, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>. Estas células foram mantidas em incubadora úmida de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. As mesmas condições de cultura foram utilizadas para B16F10 porém sem adição de antibióticos.

## **7. Tratamento das células**

As células RPMI 8226 foram plaqueadas em 10 mL de meio RPMI 1640 com 10% SFB em placas de cultura de 100 mm de diâmetro e cultivadas até que houvesse confluência para a realização dos experimentos.

Para avaliar o efeito das diferentes emulsões nas linhagens celulares foram realizados vários ensaios com diferentes grupos com diferentes quantidades de emulsão. A princípio trabalhou-se com e sem adição de soro fetal bovino, com e sem adição de HDL na concentração de 0,0478mg/mL ao meio. As células tratadas com 7-KC e colesterol livre, ambos na concentração de 100 $\mu$ M, diluídos em etanol. As concentrações das emulsões (LDE, O<sub>x</sub>LE e LDE/col) variaram conforme a quantidade de oxisterol presente em O<sub>x</sub>LE e foram utilizadas as concentrações de 1,25%; 2%; 2,7%; 4%; 5,5%; 6%; 6,6% e 12,5% de emulsão em meio, sendo que 2% de O<sub>x</sub>LE representa 75  $\mu$ M de 7-KC; 2,7% 100 $\mu$ M; 5,5% 200 $\mu$ M.



## **8. Avaliação das alterações celulares**

A susceptibilidade das células ao 7-cetocolesterol e da emulsão O<sub>x</sub>LE como agente citotóxico foi analisada de várias formas complementares após 24 , 48 e 72 horas de tratamento.

### **8.1. Proliferação e viabilidade celular pelo método MTT**

RPMI 8226: Foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  células por poço mantidas sob condições de cultura em placas de 96 poços, em triplicata, nos diferentes grupos já citados. As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas consecutivas. Diariamente foi feita a quantificação de células viáveis. Incubou-se 0,5 mg/mL de reativo MTT, que é um sal de tetrazolium amarelo que após incubação de 4 horas (37°C) é metabolizado formando cristais de formazam com coloração azul escura, solubilizados com 100µL tampão 10% de SDS, 0,01N HCl. Esta reação ocorre apenas em células metabolicamente ativas, através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Foi feita a leitura em 595 nm com filtro de referência em 655 nm, em espectrofotômetro. Para a quantificação das células viáveis foi feita uma curva de calibração, convertendo-se a absorbância da solução em número de células.

## 8.2. Ciclo Celular

Análise do ciclo celular foi feita por citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídio (IP), que é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente a cada Quatro pares de bases do DNA.  $2 \times 10^6$  células (RPMI 8226) e  $1 \times 10^6$  células (B16F10) foram mantidas em cultura, a cada dia sendo tripsinizadas com uma solução de 0.05% tripsina-0.02% EDTA, lavadas 2 vezes em PBS, permeabilizadas em 70% etanol, e coradas com iodeto de propídio por 30 min protegido da luz. As células foram então analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, Beckton Dickson). A fluorescência vermelha de IP foi observada por filtro 585/42 nm e a intensidade de fluorescência emitida foi mensurado em escala linear de 256 canais. Foi também avaliado o aparecimento de células hipodiplóides (identificadas como populações de células que contém quantidade de DNA inferior à quantidade observada nas fases G0/G1). As análises foram realizadas utilizando o software ModFitLT v. 2.0 (PMac) e WinMDI 2.8 (PC), <http://facs.scripps.edu/software.html>.

### **8.3. Avaliação do $\Delta\Psi_m$ (potencial transmembranar mitocondrial) por JC1**

A resposta apoptótica foi avaliada usando-se o fluorocromo JC-1, que apresenta metacromasia ao se acumular em mitocôndrias funcionais; a perda de sua metacromasia indica alterações do potencial transmitocondrial, o que esta associada ao processo de apoptose.

As células foram plaqueadas seguindo o protocolo descrito no item 8.2 (ciclo celular) e após os tratamentos foram recolhidos o sobrenadante e as células aderidas por ação proteolítica.

O precipitado celular ( $10^6$  células/mL) foi suspenso em meio contendo 10% de soro fetal bovino. Adicionou-se então a solução de JC-1 (200nM de JC1). Agitou-se intensamente as células por 20 segundos. Lavou-se com PBS, centrifugando a mistura a 300g. Repetiu-se a lavagem. Incubou-se então por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro.

A fluorescência foi medida por citometria de fluxo com laser de argônio excitado a 488nm.

### **9. Análise da morfologia celular**

As alterações morfológicas foram avaliadas pela incubação das células com faloidina, que é uma molécula fluorescente que se liga a filamentos de F-actina, não se ligando a G-actina monomérica (ZAHM *et al.*,

2003). A visualização do núcleo foi feita com o corante DAPI, que se liga ao DNA.

Plaqueou-se  $6 \times 10^4$  células (B16F10) em placa de 24 poços, contendo lamínulas, com 500  $\mu$ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Após 48 horas, retirou-se o meio e iniciaram-se os tratamentos nos tempos pré-determinados. Fixou-se as células com paraformaldeído 1% em tampão PBS pH 7,4, por 15 min. Lavou-se três vezes com PBS/BSA 2%. Adicionou-se Faloidina (1:400, v/v), por 30 min, temperatura ambiente, em câmara úmida. Lavou-se com PBS/BSA 0,2% por 3 vezes. Adicionou-se DAPI (1:1000, v/v) por 5 min, no escuro, para marcação do núcleo. Lavou-se com PBS/BSA 0,2%, por 3 vezes. Montou-se a lâmina com glicerol e esmalte comum.

### **10. Análise da captação da emulsão marcada**

Foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços. Após adesão das células, incubaram-se com LDE e O<sub>x</sub>LE por 24, 48 e 72 horas consecutivas. Após cada período, retiravam-se as células com solução de tripsina (0,05%) e EDTA (0,02%). Lavou-se o precipitado celular com tampão PBS por 3 vezes. Ressuspenderam-se os precipitado em 100 $\mu$ L de PBS, retirando-se 10 $\mu$ L para contagem dos radioisótopos em contador de

cintilação líquida (LKB). Paralelamente foi realizada contagem celular com exclusão das células mortas reagentes ao azul de Tripán.

## **11. Microscopia eletrônica**

As células B16F10 foram semeadas na densidade de  $1,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, esperando até adesão celular. As células incubadas em meio RPMI 1640 pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino, diferentes tratamentos: 100µM de 7-KC; 100µM de Colesterol; grupo controle com etanol na proporção do grupo tratado com 7-KC; O<sub>x</sub>LE contendo 75µM de 7-KC (2% de emulsão em meio RPMI 1640 pH 7,4); LDE/col 2% de emulsão em meio RPMI 1640 pH 7,4. Após 12 horas de incubação para os tratamentos sem emulsão, e 24 horas de tratamento para as células incubadas com as diferentes emulsões, as células foram lavadas e fixadas em solução de glutaraldeído (2%) por 30 minutos, com posterior retirada mecânica do material. Após fixação com glutaraldeído o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio, seguido de desidratação com acetona e incluído em resinas especiais. A etapa final foi a microtomia para obtenção de cortes ultrafinos e montagem da tela. A visualização se torna possível pela contrastação com metais pesados. Todas as etapas posteriores à fixação foram desenvolvidas no laboratório de Microscopia Eletrônica da

Biologia Celular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

## **12 Análise estatística**

A análise estatística para avaliar a diferença de tamanho entre O<sub>x</sub>LE e LDE foi de acordo com o teste T de *Student* para amostras pareadas. Para os ensaios celulares com os diferentes tratamentos foi utilizado o teste ANOVA. Ambas as análises estatísticas foram desenvolvidas no software GraphPad (Prism 3.0), e foram considerados significativamente diferentes os valores de  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

### **1. Incorporação de 7-cetocolesterol a emulsão (LDE).**

Para incorporação do oxisterol à emulsão LDE utilizou-se incubação com agitação à 37°C. Incubou-se 800µg de 7-KC a 600µL da emulsão com agitação a 37°C por 3 horas. Levando em consideração a possibilidade de não incorporação do oxisterol à emulsão e de possíveis alterações de tamanho e constituição, desenvolveu-se um gradiente de densidade com ultracentrifugação.

#### **1.1. Ultracentrifugação**

Após incubação de 7-KC à emulsão, desenvolveu-se um gradiente de ultracentrifugação com soluções salinas (1,065; 1,020; 1,006 g/mL). 24 horas após a centrifugação obteve-se 5 frações visíveis, das quais avaliaram-se a quantidade de emulsão em cada fração, retirando-se 10µL para contagem radioativa em contador de cintilação líquida. O resultado dos CPM pode ser observado na tabela 3.

**Tabela 3:** Contagem referente ao colesterol éter  $^3\text{H}$  das frações oriundas do gradiente de ultracentrifugação. Incubação de 0,8mg de 7-KC a 600 $\mu\text{L}$  de emulsão. Foram realizados dois ensaios.

Frações do gradiente de ultracentrifugação	CPM	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Primeira fração	2559,70 (6,4%)	3149,4 (8,9%)
Segunda fração	588,49 (1,5%)	109,6 (0,3%)
Terceira fração	16913,70 (42,8%)	21245,3 (60,3%)
Quarta fração	18647,50 (47,2%)	10025,7 (28,4%)
Quinta fração	819,97 (2,1%)	701,2 (2,0%)

A capacidade de saturação da LDE foi avaliada incubando 600 $\mu\text{L}$  de emulsão com diferentes quantidades de 7-KC, observando a formação das frações e as correspondentes contagens dos isótopos. Para avaliar possíveis alterações dos constituintes internos da partícula, utilizou-se a marcação do colesterol éter  $^3\text{H}$  (Tabela 4), e para análise da monocamada fosfolipídica, utilizou-se a fosfatidilcolina  $^{14}\text{C}$  (Tabela 5).



**Tabela 4.** LDE incubada com diferentes quantidades de 7-KC, análise interna da partícula através da contagem do colesterol éter <sup>3</sup>H de cada fração obtida no gradiente.

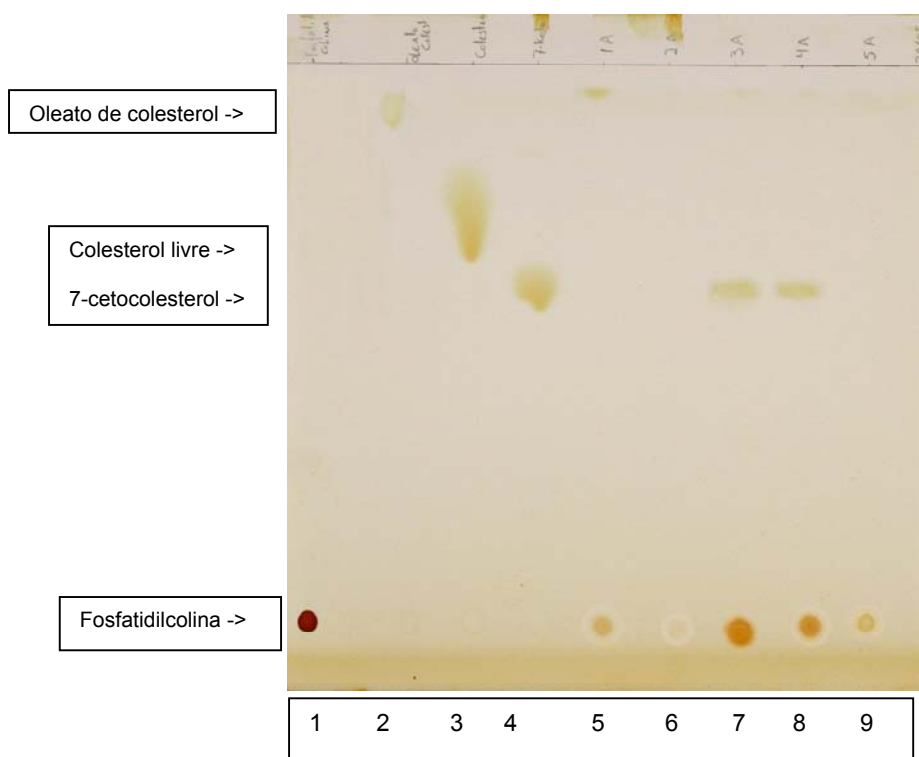
<b>Massa de 7-KC</b>	<b>Fração 1</b>	<b>Fração 2</b>	<b>Fração 3</b>	<b>Fração 4</b>	<b>Fração 5</b>
	<b>CPM</b>	<b>CPM</b>	<b>CPM</b>	<b>CPM</b>	<b>CPM</b>
2,0 mg	41780,8 (69,3%)	2032,2 (3,3%)	6394,9 (10,6%)	9682,69 (16%)	386,4 (0,6%)
2,5 mg	6345,2 (37,3%)	337,6 (2,0%)	2416,43 (14,2%)	7466,42 (43,9%)	446,6 (2,6%)
5,0 mg	35110,3 (78,7%)	233,6 (0,5%)	1412,0 (3,2%)	7553,38 (17%)	301,0 (0,6%)
10,0 mg	39561,4 (53,3%)	1808,2 (2,4%)	4072,36 (5,5%)	27966,7 (37,7%)	771,6 (1,0%)

**Tabela 5.** Análise da monocamada da microemulsão pela contagem de <sup>14</sup>C-fosfatidilcolina. Frações obtidas do gradiente de ultracentrifugação, após incubação de LDE com diferentes quantidades de 7-KC.

<b>Massa de 7-KC</b>	<b>Fração 1</b>	<b>Fração 2</b>	<b>Fração 3</b>	<b>Fração 4</b>	<b>Fração 5</b>
2,0 mg	8412,5 (25,2%)	1847,8 (5,5%)	9163,06 (27,4%)	13393,3 (40,1%)	578,4 (1,7%)
2,5 mg	10950,0 (38,7%)	198,0 (0,7%)	3835,75 (13,5%)	12591,8 (44,6%)	681,6 (2,4%)
5,0 mg	3336,33 (17,5%)	131,2 (0,7%)	2531,8 (13,3%)	12565,4 (66,1%)	446,2 (2,3%)
10,0 mg	6363,29 (9,8%)	550,6 (0,85%)	4555,28 (7,1%)	51811,1 (80,4%)	1129,4 (1,7%)

## 1.2.Cromatografia em camada delgada

Levando em consideração a produção de 3 frações contendo emulsão, desenvolveu-se a cromatografia em camada delgada para observar a presença do 7-KC e em quais frações ele estaria contido. O resultado pode ser observado na figura 4, junto com os respectivos Rf.



**Figura 4:** Cromatografia em camada delgada das frações obtidas por ultracentrifugação após incubação da LDE com 7-cetocolesterol. 1:padrão de fosfatidilcolina.Rf=0; 2: padrão de oleato de colesterol, Rf=0,827; 3: padrão de colesterol livre, Rf=0,65; 4: padrão de 7-cetocolesterol, Rf=0,56; 5 à 9 frações do gradiente de ultracentrifugação.

Pode-se constatar que as frações 3 e 4 apresentavam 7-cetocolesterol. Dando continuidade na análise das frações, dando ênfase agora as frações 3 e 4 por estas apresentarem o oxisterol, analisou-se o diâmetro das partículas de cada emulsão.

### 1.3 Estimativa do tamanho das frações obtidas no gradiente

O tamanho das partículas de cada fração obtida no gradiente foi estimada por *laser light scattering*, e os resultados podem ser observados na tabela 4. As frações 3 e 4, que apresentaram o 7-KC a si incorporada apresentaram um diâmetro semelhante a LDE quando incubado até 2,5mg a 600 $\mu$ L de emulsão; quando incubou-se com uma massa maior, a emulsão apresentou alterações de tamanho (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise do diâmetro efetivo de cada fração que continha emulsão, obtida no gradiente de ultracentrifugação. Os valores representam as médias e os desvios padrões.

<b>Massa de 7-KC</b>	<b>Fração 1</b>	<b>Fração 3</b>	<b>Fração 4</b>
2,0 mg	83,5 $\pm$ 30,3 nm	53,4 $\pm$ 25,4 nm	40,4 $\pm$ 10,8 nm
2,5 mg	99,7 $\pm$ 36,8 nm	50,4 $\pm$ 6,1 nm	39,8 $\pm$ 17,4 nm
5,0 mg	177,0 $\pm$ 48,8 nm	85,7 $\pm$ 34,9 nm	69,1 $\pm$ 30,0 nm
10,0 mg	201,8 $\pm$ 59,5 nm	106,9 $\pm$ 45,8 nm	113,0 $\pm$ 51,5 nm
LDE	54,7 $\pm$ 26,8nm		

Com os resultados obtidos pela incubação abordou-se uma nova estratégia de produção de uma emulsão com 7-KC por adição direta deste oxisterol aos demais lipídios, sofrendo o processo de emulsificação.

## **2. Preparo da emulsão contendo 7-cetocolesterol(O<sub>x</sub>LE)**

As emulsões foram preparadas adicionando-se 7-KC junto aos demais lipídios da emulsão (LDE), passando por todo o processo de emulsificação previamente descrito. Foram preparadas diferentes emulsões contendo 2,0; 2,5; 5,0 e 10 mg de 7-cetocolesterol. Para avaliar alterações na constituição lipídica frente à adição, avaliaram-se os lipídios marcados radiativamente (fosfatidilcolina e colesterol éter).

### **2.1. Análise da quantidade de fosfolipídios e colesterol éter nas diferentes emulsões**

Para avaliar o grau de saturação da emulsão frente a diferentes massas de 7-KC, foram analisados diferentes constituintes da emulsão como <sup>3</sup>H-colesterol éter e <sup>14</sup>C-fosfatidilcolina (Tabela 7). Esta não demonstrou alterações aparentes em relação aos seus constituintes.

**Tabela 7.** Análise de  $^3\text{H}$ -colesterol éter, e  $^{14}\text{C}$ -fosfatidilcolina. Os resultados apresentados são de emulsões preparadas em dois ensaios (n=2).

Massa de 7-KC	$^3\text{H}$ -colesterol éter Ensaio 1	$^3\text{H}$ -colesterol éter Ensaio 2	$^{14}\text{C}$ -fosfolípide Ensaio 1	$^{14}\text{C}$ -fosfolípide Ensaio 2
2,0 mg	16665,8	15886,0	12278,6	10855,9
2,5 mg	15613,2	15151,6	11991,0	10606,3
5,0 mg	16565,4	15902,3	13356,2	11436,4
10,0 mg	16023,4	15438,5	12504,6	10488,5

Tendo em mente a produção de uma emulsão que mantivesse as características de LDE com uma quantidade alta de oxisterol, levando em consideração os ensaios que demonstraram não haver alterações com relação aos constituintes, analisou-se o tamanho de cada emulsão.

## 2.2. Estimativa do tamanho de cada emulsão

Os diâmetros médios das partículas de cada emulsão foram analisados por *laser light scattering* e está demonstrado na tabela 8. Pode-se observar pouca variação de tamanho; porém, a reprodutibilidade do tamanho da emulsão com 10mg de 7-KC, e a sua instabilidade (alterações de tamanho em menos de 30 dias), fez com que optássemos pela utilização de uma emulsão com 5,0mg do oxisterol. Sua variação de diâmetros pode ser observada na Tabela 9.

**Tabela 8.** Tamanho médio de cada emulsão preparada com diferentes quantidades de 7-cetocolesterol (n=2).

<b>Massa de 7-KC</b>	<b>Diâmetro efetivo</b>
2,0 mg	62,4 ± 28,7 nm
2,5 mg	61,6 ± 28,1 nm
5,0 mg	63,4 ± 29,5 nm
10,0 mg	69,8 ± 30,1 nm
LDE	58,7 ± 26,8 nm

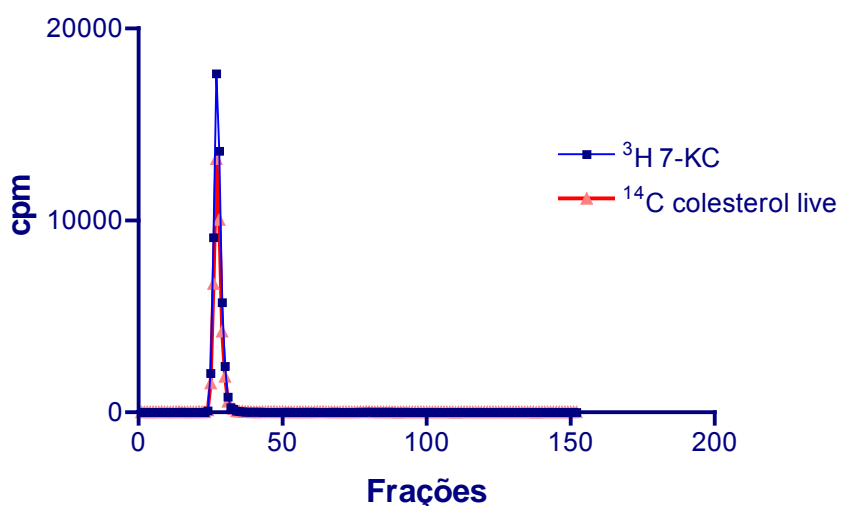
**Tabela 9.** Tamanho médio de cada emulsão. O<sub>x</sub>LE preparado com 5,0mg de 7-KC. As emulsões são significamente diferentes p=0,0259, teste T de *Student* para amostras pareadas (n=6).

<b>LDE (nm)</b>	<b>O<sub>x</sub>LE (nm)</b>
54,7 ± 26,8	63,4 ± 29,5
53,6 ± 19,5	50,4 ± 25,3
40,7 ± 17,3	58,5 ± 29,1
39,1 ± 18,8	56,5 ± 25,9
43,3 ± 19,4	57,2 ± 25,3
41,9 ± 20,8	48,5 ± 19,2
Média 45,5 ± 20,4	Média 55,7 ± 25,7

No intuito de comprovar a ligação do 7-KC à emulsão, desenvolveu-se uma cromatografia de gel filtração.

### 2.3. Gel filtração

Para avaliar a associação do 7-KC às emulsões, foram realizadas cromatografias de exclusão (gel filtração), com posterior análise dos isótopos de cada fração obtida, em contador de cintilação líquida. A figura 5 demonstra o isolamento dos componentes nas mesmas frações, sugerindo uma associação total do oxisterol a emulsão.



**Figura 5:** Contagens (cpm) referentes aos isótopos  $^3\text{H}$  7-cetocolesterol e  $^{14}\text{C}$ -colesterol livre da emulsão  $\text{O}_x\text{LE}$ . Cromatografia desenvolvida em coluna de resina Sephadex G-200 eluído em tampão Tris (100mM) pH 8,0.

### **3.Efeito da O<sub>x</sub>LE nas diferentes linhagens celulares**

A caracterização dos efeitos na indução de morte celular do 7-KC da nova emulsão foi realizada em diferentes intervalos de tempo, com diferentes concentrações de emulsão.

#### **3.1 Ensaios com células de mieloma múltiplo (RPMI 8226)**

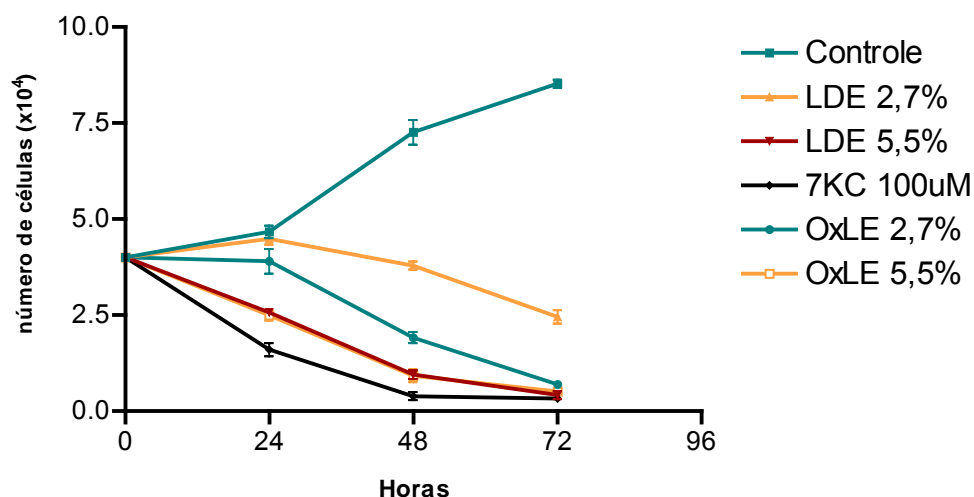
Os primeiros ensaios foram desenvolvidos com a linhagem de mieloma múltiplo, onde foram observadas toxicidade e alterações no ciclo de duplicação celular.

##### **3.1.1. Proliferação e viabilidade celular**

Estes parâmetros foram avaliados pelo reagente de MTT. Utilizou-se LDE e O<sub>x</sub>LE nas concentrações de 2,7%; 5,5%, de emulsão em meio RPMI 1640 com 10% de SFB, adicionado um excesso de HDL na concentração de 0,0478mg/mL. A primeira concentração (2,7%) possuía 100 $\mu$ M de 7-KC e a segunda (5,5%) 200 $\mu$ M, estes valores foram calculados pela contagem do <sup>3</sup>H 7-KC da emulsão (Figura 6). Para a conversão do resultado de



absorbância para número de células foi realizada uma curva de calibração de 7 diferentes quantidades de células em triplicata.



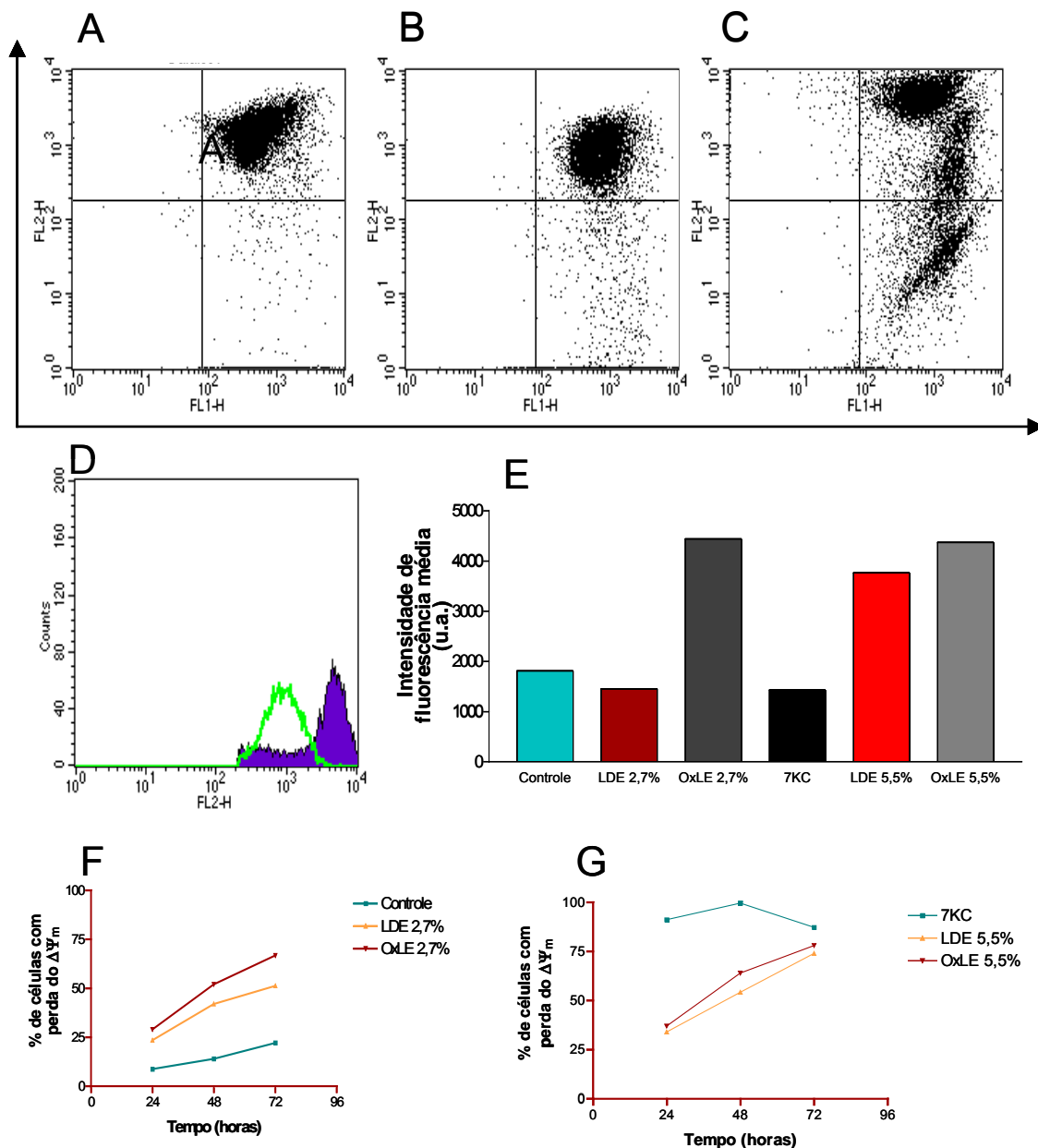
**Figura 6:** Ensaio representativo da viabilidade celular nos grupos tratados com LDE e OxLE. As células foram incubadas com diferentes concentrações de LDE e/ou OxLE e avaliadas com reagente de MTT após 24, 48 e 72 horas.

As células de mieloma múltiplo demonstraram diminuição de células metabolicamente viáveis nos tratamentos utilizados.

### 3.1.2. Análise do potencial transmitocondrial

Alterações no potencial transmitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) estão relacionado ao processo de apoptose, no qual pode ser quantificado o fluorocromo JC-1, com posterior análise em citometria de fluxo. Foram utilizados os mesmos grupos do ensaio de proliferação e viabilidade celular. 7-cetocolesterol

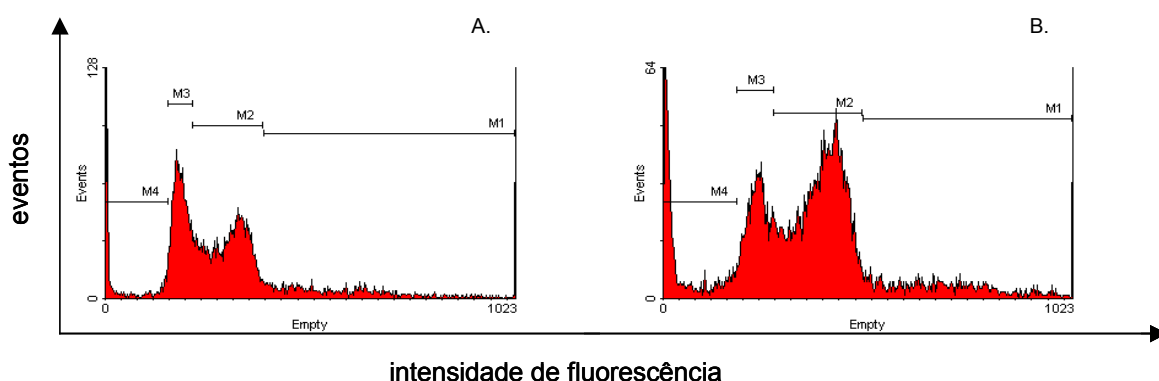
promoveu a perda do  $\Delta\Psi_M$  em 99,6% das células após 48 horas de exposição (Figura 7 G). A figura 4 A-C mostra que uma maior quantidade de células tratadas com O<sub>x</sub>LE apresentam hiperpolarização e perda do  $\Delta\Psi_M$  do que as tratadas com LDE, ambas a 2,7%. A hiperpolarização pode ser observada na figura 7 D; a hiperpolarização não ocorre quando as células são incubadas com LDE 2,7%. A figura 7 E mostra a intensidade de polarização do quadrante superior direito do *plot* nos tratamentos utilizados. A figura 7 F-G mostra a evolução de células com perda do  $\Delta\Psi_m$ , nos 3 períodos analisados.



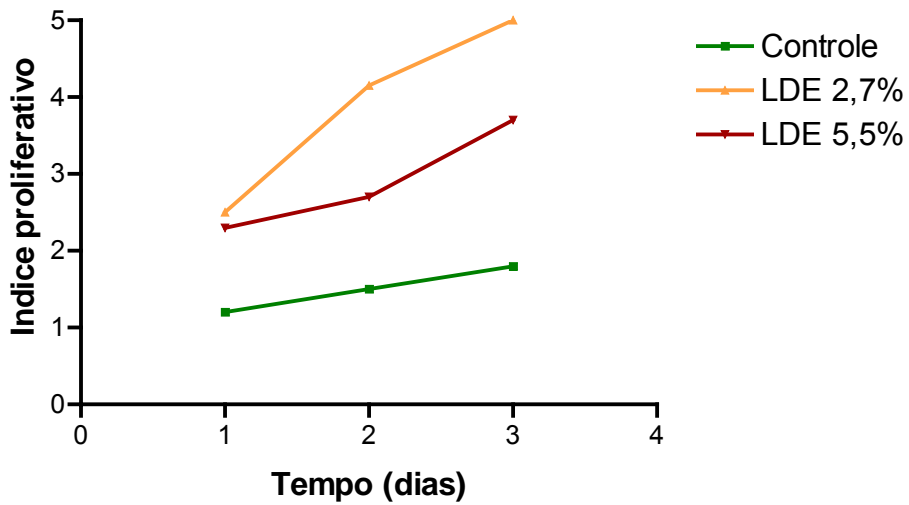
**Figura 7:** Análise do  $\Delta\Psi_m$ , feita pela diminuição da fluorescência vermelha (J-agregados), ou seja, quadrante superior direito, representando as células com  $\Delta\Psi_m$  polarizado, e os eventos do quadrante inferior difeito representando as células com perda do potencial. **A.** Grupo controle. **B** Grupo tratado com LDE 2,7%, 24 horas. **C.** Grupo tratado com OxLE 2,7%, este tratamento levou a hiperpolarização do potencial transmembranar avaliado pela intensidade de fluorescência média do quadrante superior direito associado a 37% de células com perda do  $\Delta\Psi_m$  após 24 horas de tratamento. **D** Comparação entre a hiperpolarização do grupo tratado com OxLE (roxo) e o grupo tratado com a emulsão (verde). **E** Representação da hiperpolarização nos diferentes tratamentos com as emulsões após 24 horas. **F** Aumento das células com perda do  $\Delta\Psi_m$  em diferentes tempos de tratamento com LDE e OxLE a 2,7%. **G** Análise do  $\Delta\Psi_m$  da linhagem RPMI 8226 frente a 5,5% de LDE e OxLE em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e 0,0478 mg/mL de HDL.

### 3.1.3. Ciclo celular

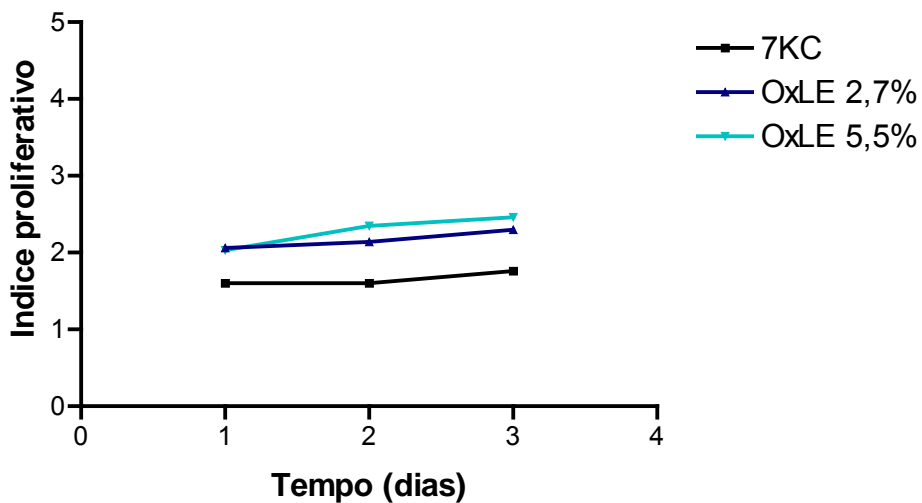
Utilizou-se a técnica do iodeto de propídio para avaliar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 8). Os grupos de tratamento foram: LDE e O<sub>x</sub>LE nas concentrações de 2,7%; 5,5%, de emulsão em meio RPMI 1640 com 10% de SFB, adicionado um excesso de HDL na concentração de 0,0478mg/mL. A primeira concentração (2,7%) possuía 100 $\mu$ M de 7-KC e a segunda (5,5%) 200 $\mu$ M, estes valores foram calculados pela contagem do <sup>3</sup>H 7-KC da emulsão. Os tratamentos com as diferentes emulsões levaram ao aumento do número de células nas fases proliferativas (S/G<sub>2</sub>/M) em relação ao controle; porém, quando tratadas apenas com LDE, a quantidade de células nestas fases era maior. Para as fases do ciclo celular calculou-se o índice proliferativo que é a razão entre a quantidade de células na fase proliferativa S/G<sub>2</sub>/M e nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Figuras 9 e 10).



**Figura 8:** Análise do ciclo celular utilizando o programa WinMDI 2.8. M1- foi excluída por tratar-se de aglomerados; M2- células nas fases de proliferação celular (S/G<sub>2</sub>/M); M3- células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; M4- sub-G<sub>0</sub> ou hipodiplóides. **A-** Análise do ciclo celular do grupo controle. **B-** Aumento de células nas fases de proliferação celular no grupo tratado com O<sub>x</sub>LE 2,7% após 24 horas.

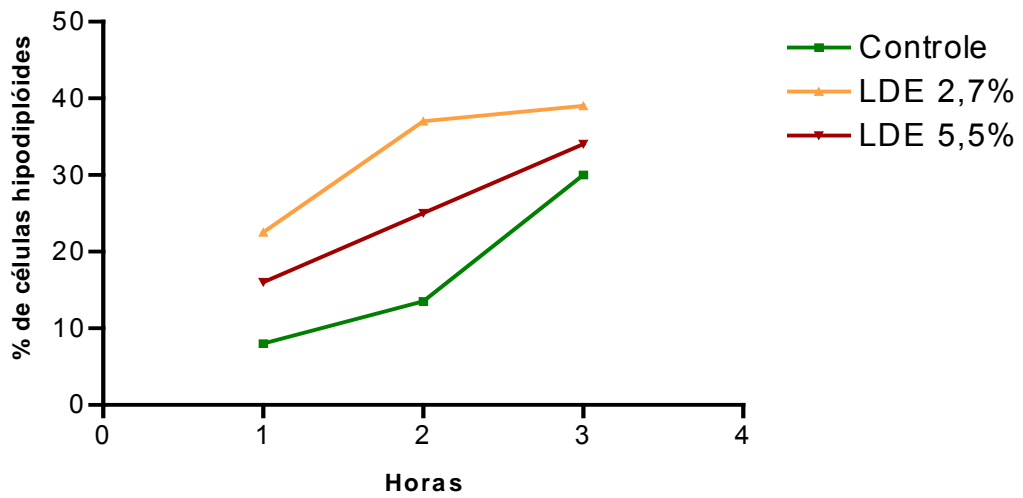


**Figura 9:** Aumento da fração proliferativa das células tratadas com LDE em relação ao grupo controle. Células RPMI 8226 cultivadas em meio RPMI1640 com adição de SFB, HDL e emulsão. Índice proliferativo é a razão entre a porção proliferativa ( $S/G_2/M$ ) e ( $G_0/G_1$ ).

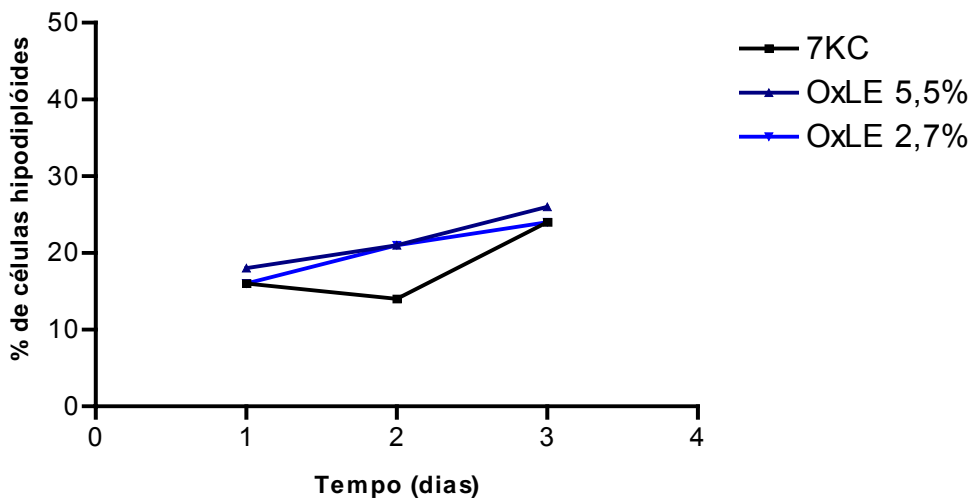


**Figura 10:** Efeito de OxLE no índice proliferativo das células RPMI 8226 em relação ao 7-KC ( $100\mu M$ ).

Avaliou-se, também, a quantidade de células hipodiplóides, indicando células em processo de morte celular (Figura 11 e 12).



**Figura 11:** Aumento de células hipodiplóides (mortas) expostas a LDE, analisado em citometria de fluxo pela incorporação de iodeto de propídio ao DNA de células RPMI 8226.



**Figura 12:** Efeito de OxLE no número de células (RPMI 8226) hipodiplóides.

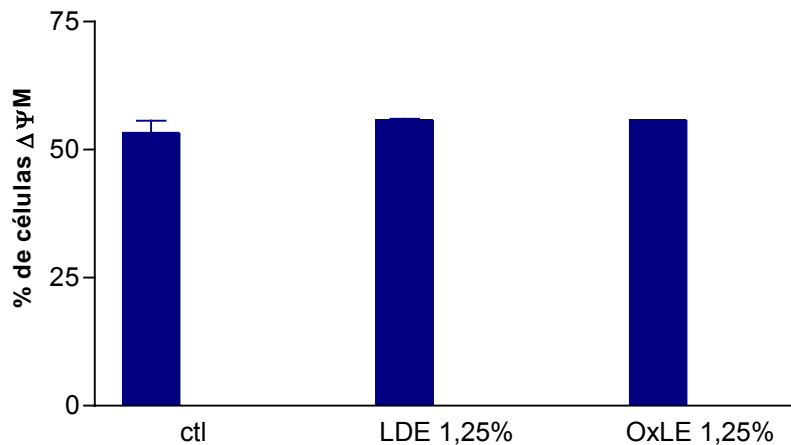
### 3.1.4. Citotoxicidade da emulsão (LDE)

Para avaliar a toxicidade da emulsão, utilizaram-se vários grupos: 1,25%; 6,8%; 12,5%, com ou sem soro fetal bovino 10%, em ambos acrescido um excesso de HDL, na concentração de 0,0478mg/mL. A toxicidade foi avaliada após 24 horas de tratamento, através da quantificação das células com perda do potencial transmitocondrial (Tabela 10). O soro fetal bovino diminuiu o efeito tóxico da emulsão.

**Tabela 10** : Avaliação da toxicidade da emulsão em diferentes concentrações através da perda do  $\Delta\Psi_m$ . Resultados após 24 horas de exposição a LDE.

Tratamentos	% de células com perda do $\Delta\Psi_m$
Controle sem SFB	51,260
Controle com 10% de SFB	45,910
LDE 1,25%	53,990
LDE 1,25% com 10% de SFB	51,860
LDE 6,8%	69,710
LDE 6,8 com 10% de SFB	57,200
LDE 12,5%	82,540
LDE 12,5% com 10% de SFB	45,150

Levando-se em consideração o resultado da toxicidade da emulsão, incubou-se as células com 1,25% de emulsão e O<sub>x</sub>LE em meio sem soro fetal bovino, com 0,0478 mg/mL de HDL (Figura 13).



**Figura 13:** Efeito de  $O_xLE$  na concentração de 1,25%, nas células de mieloma múltiplo (RPMI 8226), tratamento em meio RPMI 1640 com adição de 0,0478 mg/mL de HDL.

Avaliando-se o  $\Delta\Psi_M$ ,  $O_xLE$  não é tóxico à 1,25% na linhagem de mieloma múltiplo utilizada.

Para observar se o efeito de  $O_xLE$  não era específico da linhagem de mieloma múltiplo além de observar a sua ação em outras linhagens celulares, optou-se por trabalhar com a linhagem de melanoma murino B16F10.

### 3.2. Ensaio com células de melanoma murino (B16F10)

Os primeiros ensaios foram realizados nos títulos 1,25% de LDE e  $O_xLE$  em meio sem soro fetal bovino, com 0,0478 mg/mL de HDL, com



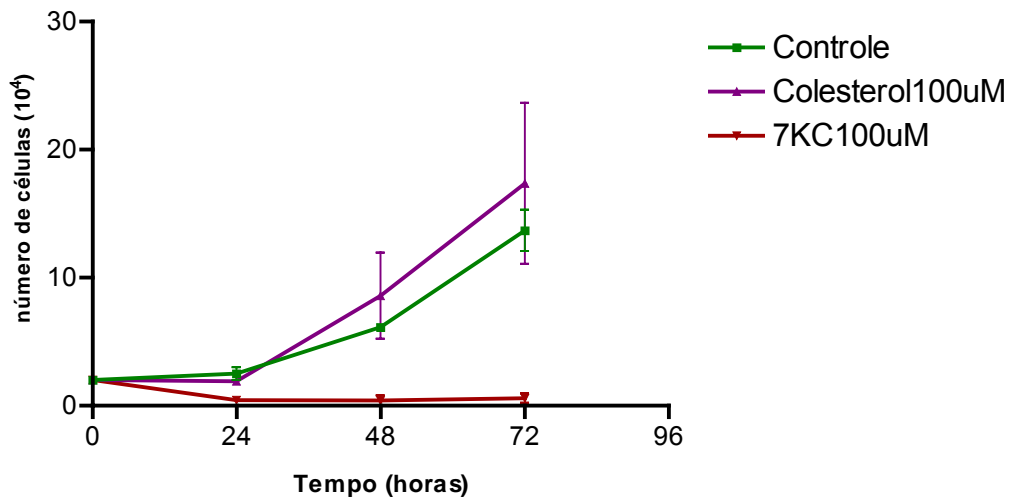
resultados semelhantes aos da RPMI 8226. Também foram realizados ensaios com e sem soro fetal bovino, com e sem adição de HDL, optando-se por trabalhar com soro fetal bovino (10%).

### **3.2.1. Ensaios com colesterol e 7-cetocolesterol**

Os ensaios foram realizados com meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino. No grupo controle foi adicionado etanol (2 $\mu$ L por mL de meio) na quantidade relativa a dos grupos com 7-KC e colesterol.

#### **3.2.1.1. Contagem de células**

Contagem de células em hemocítômetro, com exclusão das células inviáveis, reagentes com azul de tripan. Foram plaqueados 2x 10<sup>4</sup> células, em duplicata (Figura 14).

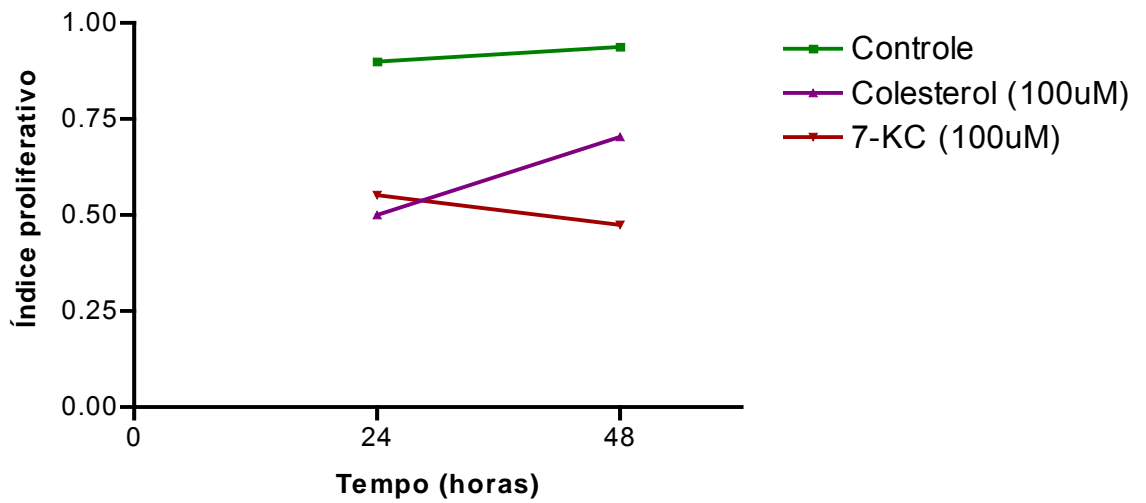


**Figura 14:** Contagem celular com exclusão das células tripan positivas (mortas). Tratamentos com 100µM de colesterol, 7-KC (100µM) e grupo controle (meio RPMI 1640 com adição de 10% de SFB).

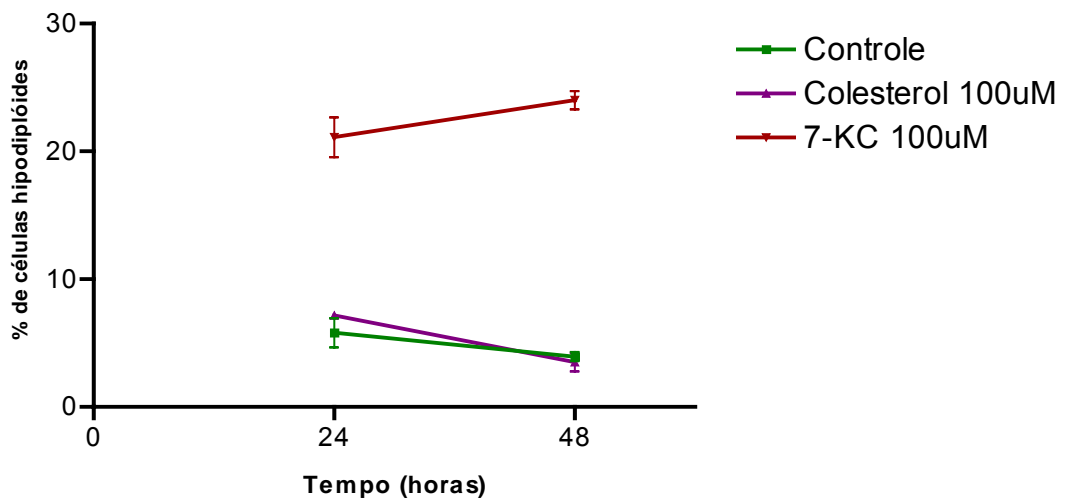
O resultado da contagem mostra o efeito tóxico do 7-KC sobre a linhagem de melanoma.

### 3.2.1.2 Análise do ciclo celular

O ciclo de duplicação celular foi analisado através da quantidade de DNA reagente com o Iodeto de Propídio. Análise foi realizada através do programa WinMID 2.8. 7-KC atuou de forma inibitória a proliferação celular (Figura 15), além de induzir a morte celular observada pelo alto percentual de células hipodiplóides (Figura 16).



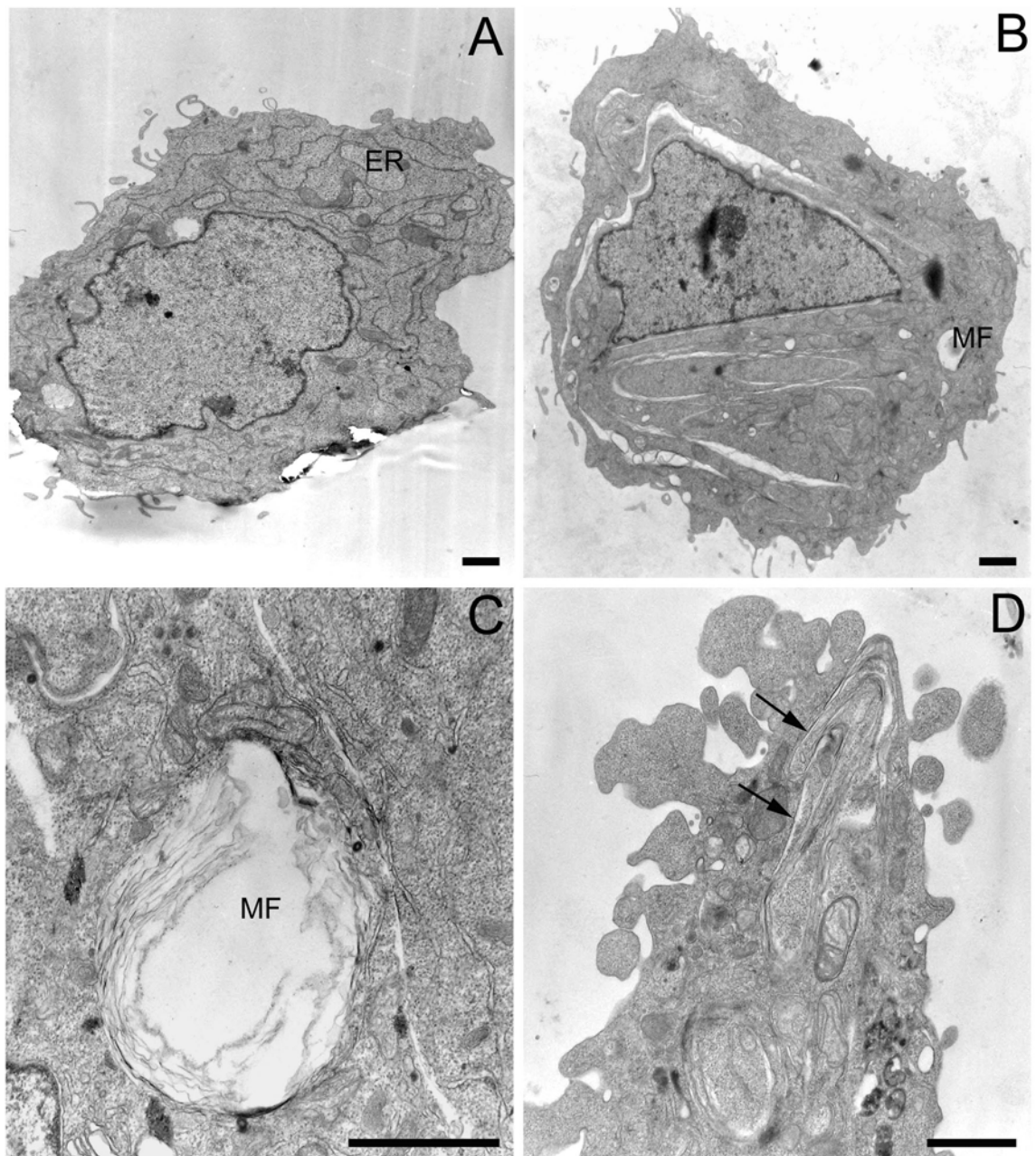
**Figura 15:** Avaliação do Índice proliferativo da linhagem B16F10 tratadas com colesterol (100µM) e 7-KC (100µM).



**Figura 16:** Evolução da quantidade de células hipodiplóides (mortas) expostas a 100 µM de 7-KC.

### 3.2.1.3. Microscopia eletrônica

Na busca de elucidar os eventos que propiciaram a morte celular induzida por 7-KC, associado à literatura específica, plaqueou-se  $1,5 \times 10^6$  células de melanoma (B16F10) para microscopia eletrônica. Os tratamentos utilizados foram: controle com etanol, colesterol ( $100\mu\text{M}$ ) e 7-KC ( $100\mu\text{M}$ ); com 12 horas de exposição. A figura 17 demonstra a análise ultraestrutural de células B16F10 tratadas com: **(A)** colesterol ( $100\mu\text{M}$ ) onde pode-se notar a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático da célula; **(B)** 7-KC ( $100\mu\text{M}$ ) onde observou-se a presença de vacúolos autofágicos, alterações de forma, principalmente do núcleo; **(C)** figuras de mielina, no tratamento com 7-KC; **(D)** alterações de membrana no tratamento com 7-KC.



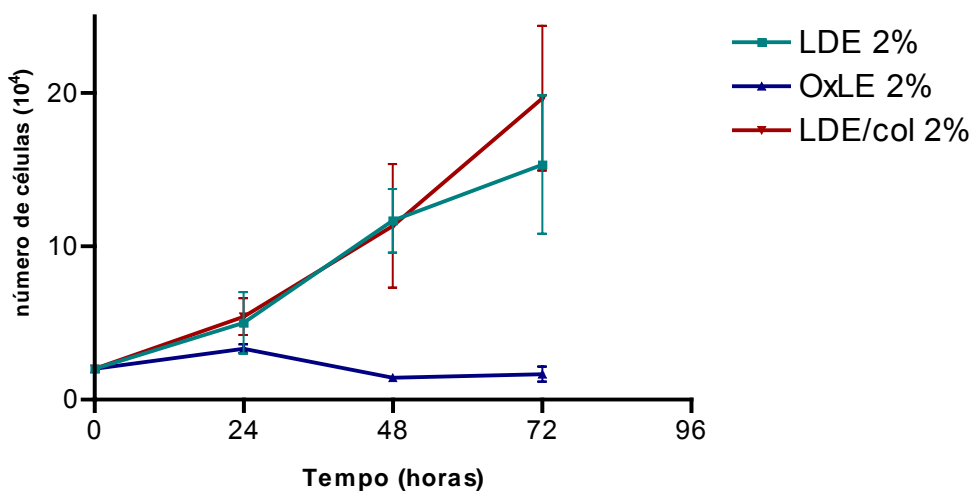
**Figura 17:** Análise ultraestrutural de células B16F10 cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de SFB com diferentes tratamentos: **A.** Tratamento com colesterol (100 $\mu$ M); note-se a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, aumento de 5000 vezes. **B.** Tratamento com 7-KC(100 $\mu$ M); note-se as alterações de citoesqueleto promovendo mudanças na morfologia nuclear, presença de vacúolos; aumento de 5000 vezes. **C.** Figura de Mielina, presente no tratamento com 100 $\mu$ M de 7-KC; note-se a membrana multilamelar característica deste vacúolo autofágico; aumento de 20.000 vezes. **D.** Alterações de membrana no tratamento com o 7-KC (100 $\mu$ M); aumento de 12.000 vezes. Barra = 1 $\mu$ m.

### 3.2.2. Ensaio com as emulsões

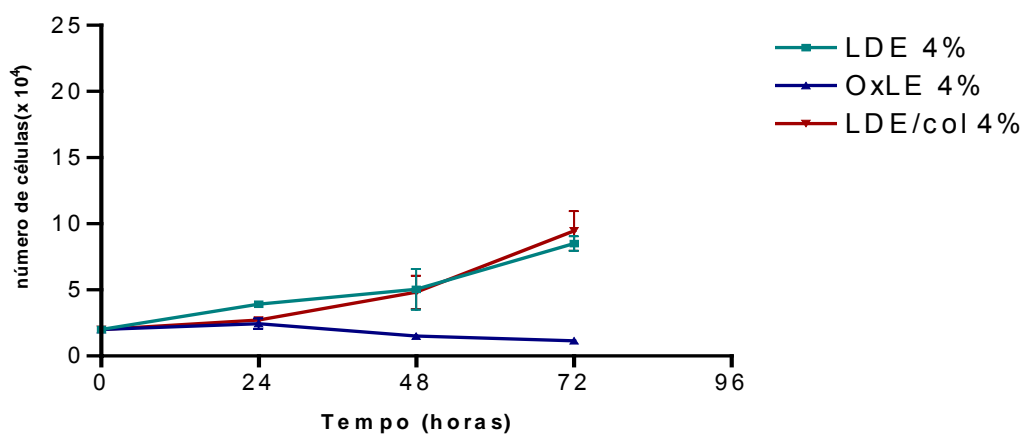
#### 3.2.2.1. Contagem de células

Contagem de células (B16F10) em hemocitômetro, com exclusão das células Tripán positivas (mortas). Para análise do efeito da emulsão na proliferação e viabilidade celular foram estudados grupos com 3 concentrações diferentes; 2%; 4%; 6%, sendo os grupos: LDE, OxLE e LDE/col (Figura 18).

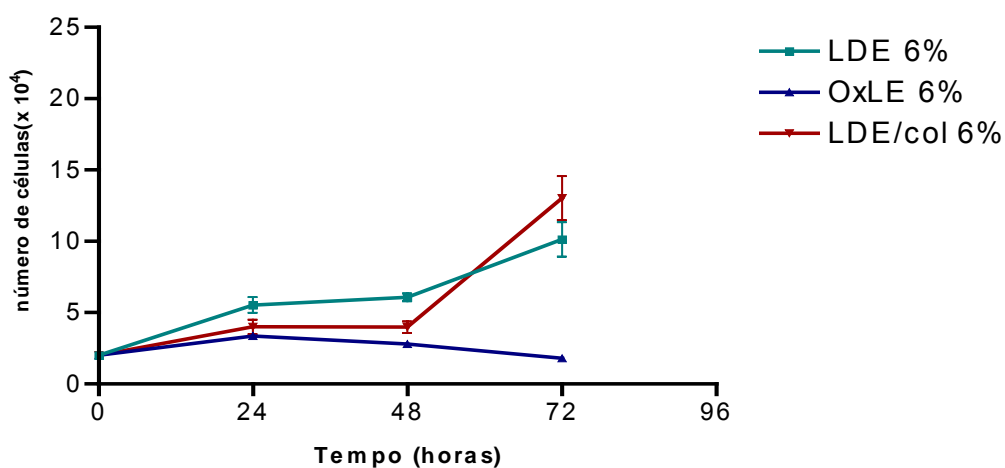
A.



B.



C.



**Figura 18:** Efeito das diferentes concentrações das emulsões no crescimento celular, contagem em hemocítômetro com exclusão das células mortas, reagentes com azul de Tripán. **A.** Emulsões na concentração de 2%; **B.** Emulsões a 4%; **C.** Emulsões a 6%.

A emulsão contendo 7-KC (OxLE) promoveu ação citostática em todas as concentrações utilizadas para a linhagem B16F10.

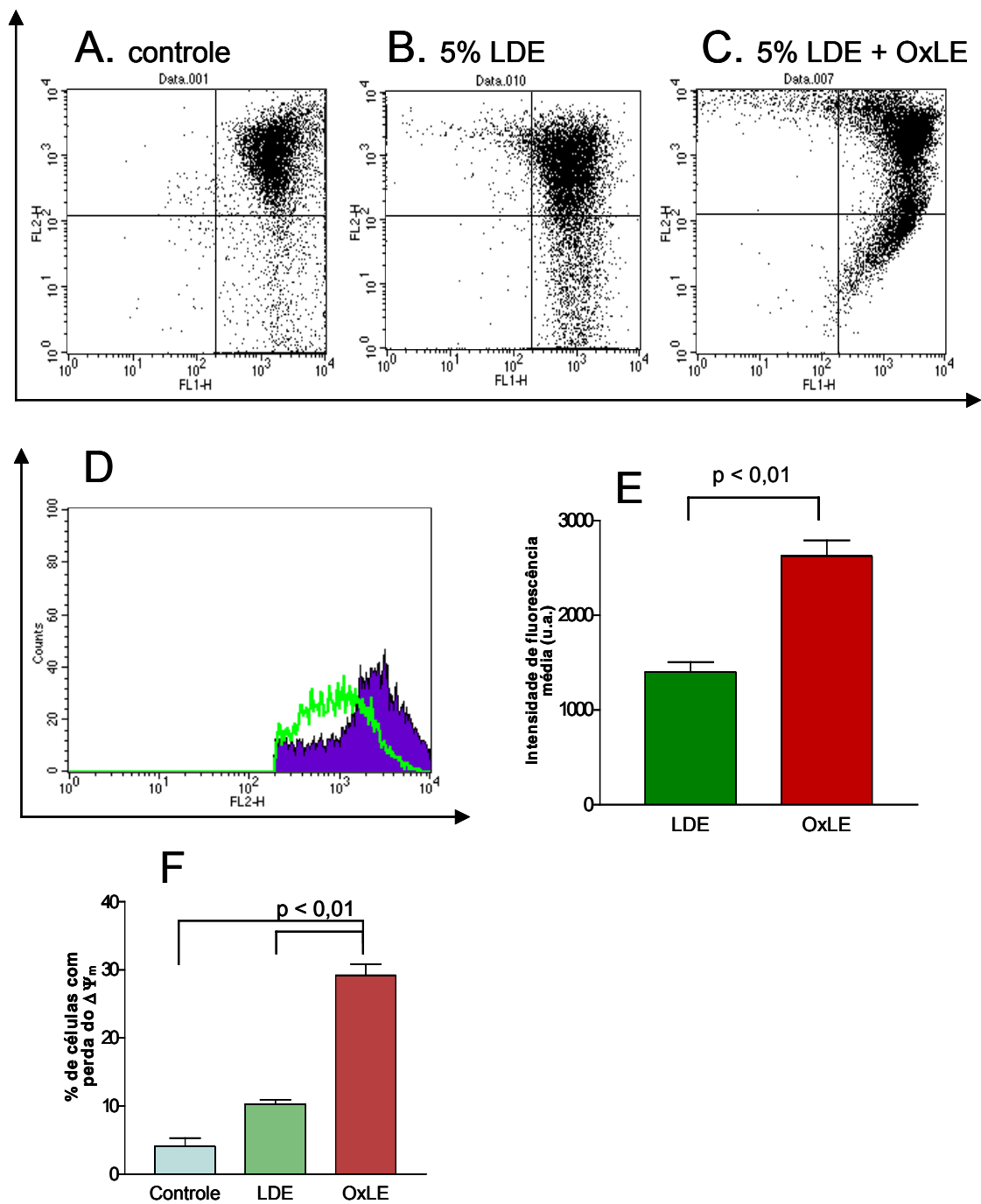
### 3.2.2.2. Análise do $\Delta\Psi_m$

Para ajudar a elucidar o processo de indução de morte celular mediada pelo oxisterol emulsificado, analisou-se o  $\Delta\Psi_M$  das células tratadas com as diferentes emulsões.

O potencial transmitocondrial foi avaliado com o fluorocromo JC1, grupos com soro fetal bovino 10% em meio RPMI 1640.

A figura 19 A-C mostra a variação do  $\Delta\Psi_M$  nos tratamentos de LDE e O<sub>x</sub>LE a 2%, nota-se maior eventos de hiperpolarização e despolarização do potencial transmitocondrial no tratamento com O<sub>x</sub>LE. Na figura 19 D-E há a comparação da hiperpolarização do  $\Delta\Psi_M$  entre O<sub>x</sub>LE (roxo) e LDE (verde) a 2%. A figura 19 F mostra a maior intensidade de células com perda do  $\Delta\Psi_M$  no tratamento com O<sub>x</sub>LE. Foram também realizados ensaios com maior concentração das emulsões (4 e 6%), apresentando resultados semelhantes aos da emulsão a 2%.



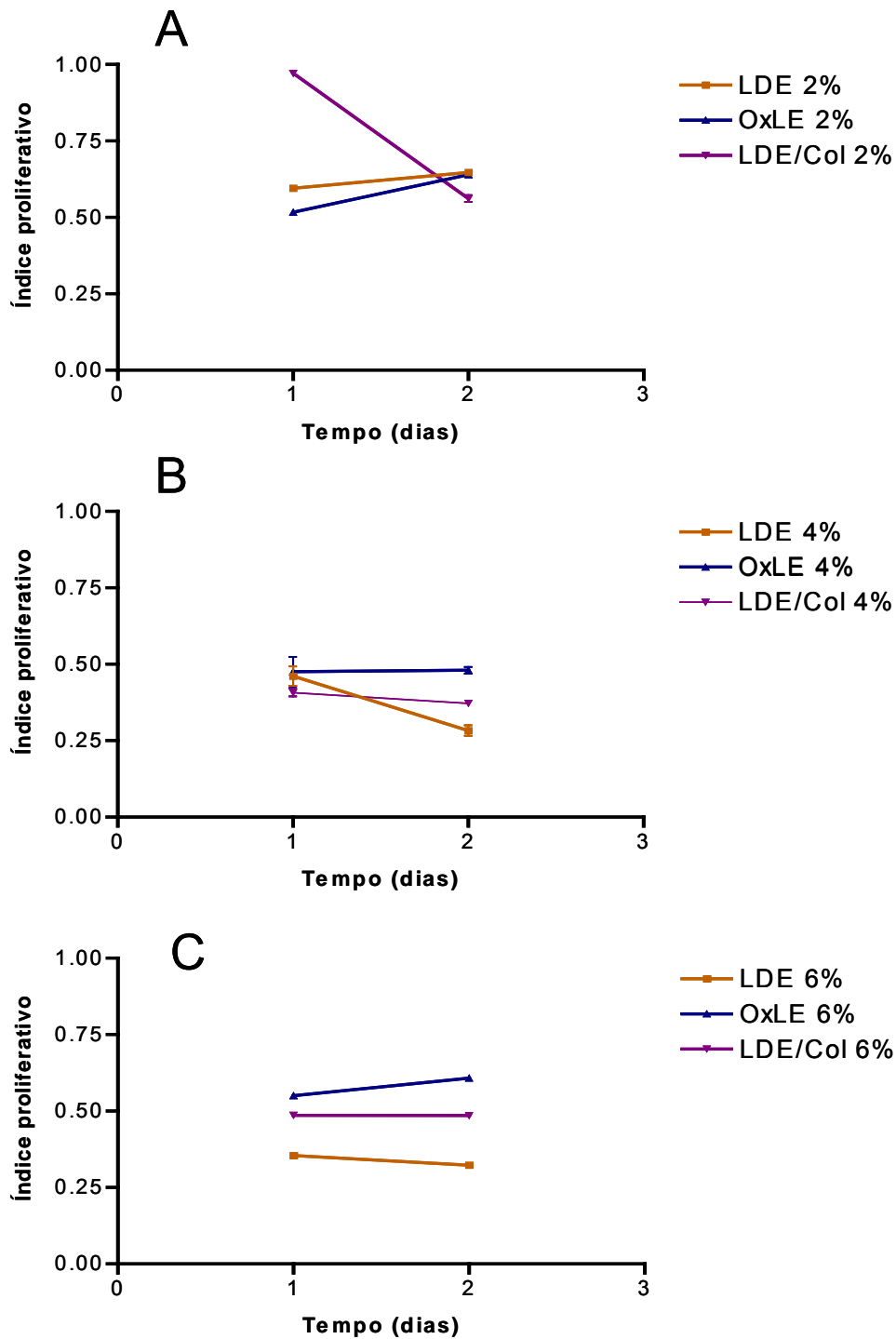


**Figura 19:** Análise do potencial transmitocondrial avaliado pela formação de agregados-J (fluorescência vermelha – FL2) que indicam  $\Delta\Psi_M$  normal; ou pela manutenção do fluorocromo na forma monomérica (J-monômeros) indicando perda do  $\Delta\Psi_M$ . **A.** Grupo controle; **B.** Células tratadas com 2% de LDE em meio RPMI 1640 com 10% de SFB; **C.** Tratamento com 2% de OxLE, este tratamento levou a hiperpolarização do potencial transmembranar, avaliado pela intensidade média de fluorescência do quadrante superior direito; o quadrante inferior direito demonstra as células com perda do  $\Delta\Psi_M$ ; **D.** Comparação da intensidade média de fluorescência das células tratadas com OxLE (roxo) e LDE. **E.** Intensidade de fluorescência média de OxLE e LDE. OxLE induz a hiperpolarização apresentando células com maior intensidade média de fluorescência do que LDE (análise estatística por ANOVA,  $p < 0,01$ ). **F.** OxLE induz a perda do  $\Delta\Psi_M$  nas células tratadas,  $p < 0,01$  (ANOVA).

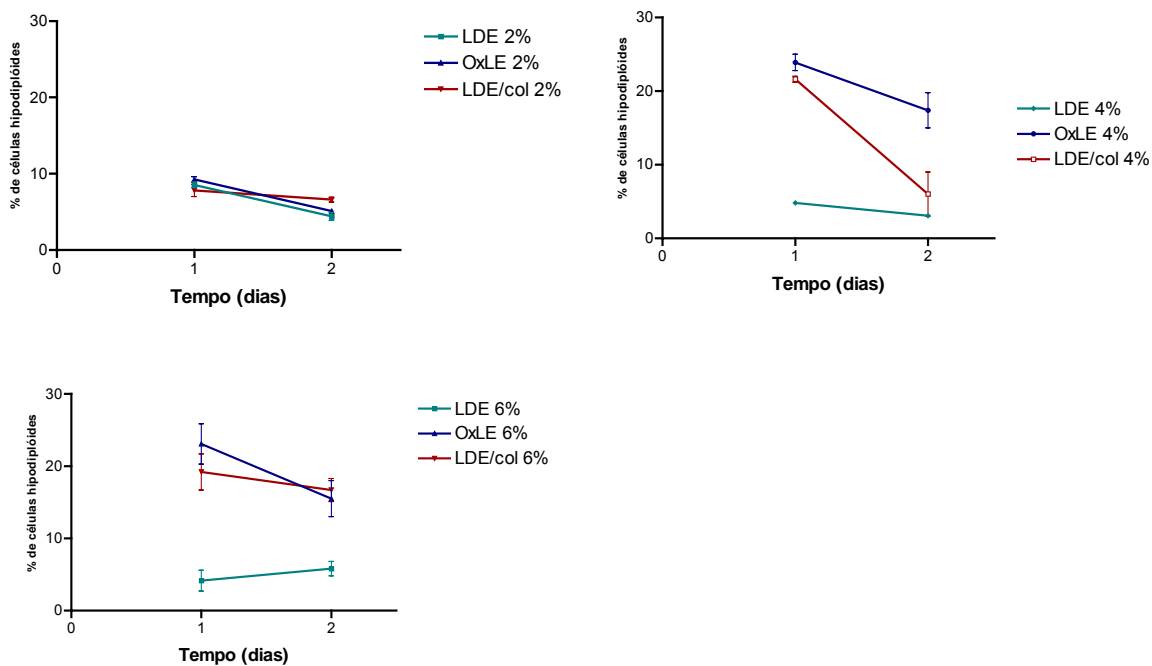
### **3.2.2.3 Análise do ciclo celular**

Para analisar a influência das emulsões sobre o ciclo de duplicação, foram estudados diversos grupos, com ou sem soro fetal bovino, com ou sem HDL, por 24 horas. Os resultados não demonstraram diferenças aparentes.

Foi realizado ensaio de 24 e 48 horas com as 3 emulsões, com soro fetal bovino 10% em meio RPMI 1640 (Figura 20). As células hipodiplóides também foram analisadas (Figura 21).



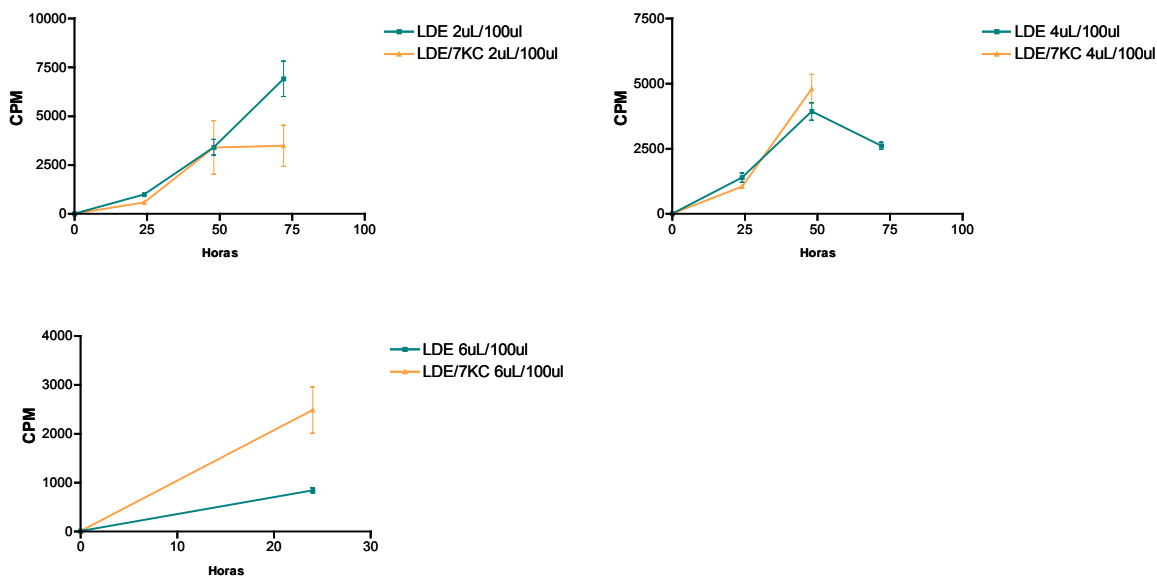
**Figura 20:** Avaliação do efeito das diferentes emulsões sobre o ciclo de duplicação celular na linhagem celular B16F10. Índice proliferativo é a razão entre a fase proliferativa (S/G2/M) e G0/G1 (n=3).



**Figura 21:** Indução de morte celular (B16F10) avaliada pela quantidade de células hipodiplóides (n=3).

### 3.2.2.4. Captação da emulsão pelas células de melanoma (B16F10)

A captação do  $^{14}\text{C}$  colesterol livre das emulsões pelas células B16F10 foi avaliada pela radioatividade relativa em contador de líquido de cintilação (Figura 22). Os grupos LDE e OxLE na concentração de 6% não apresentaram células e cpm suficientes para contagem após 48 horas.



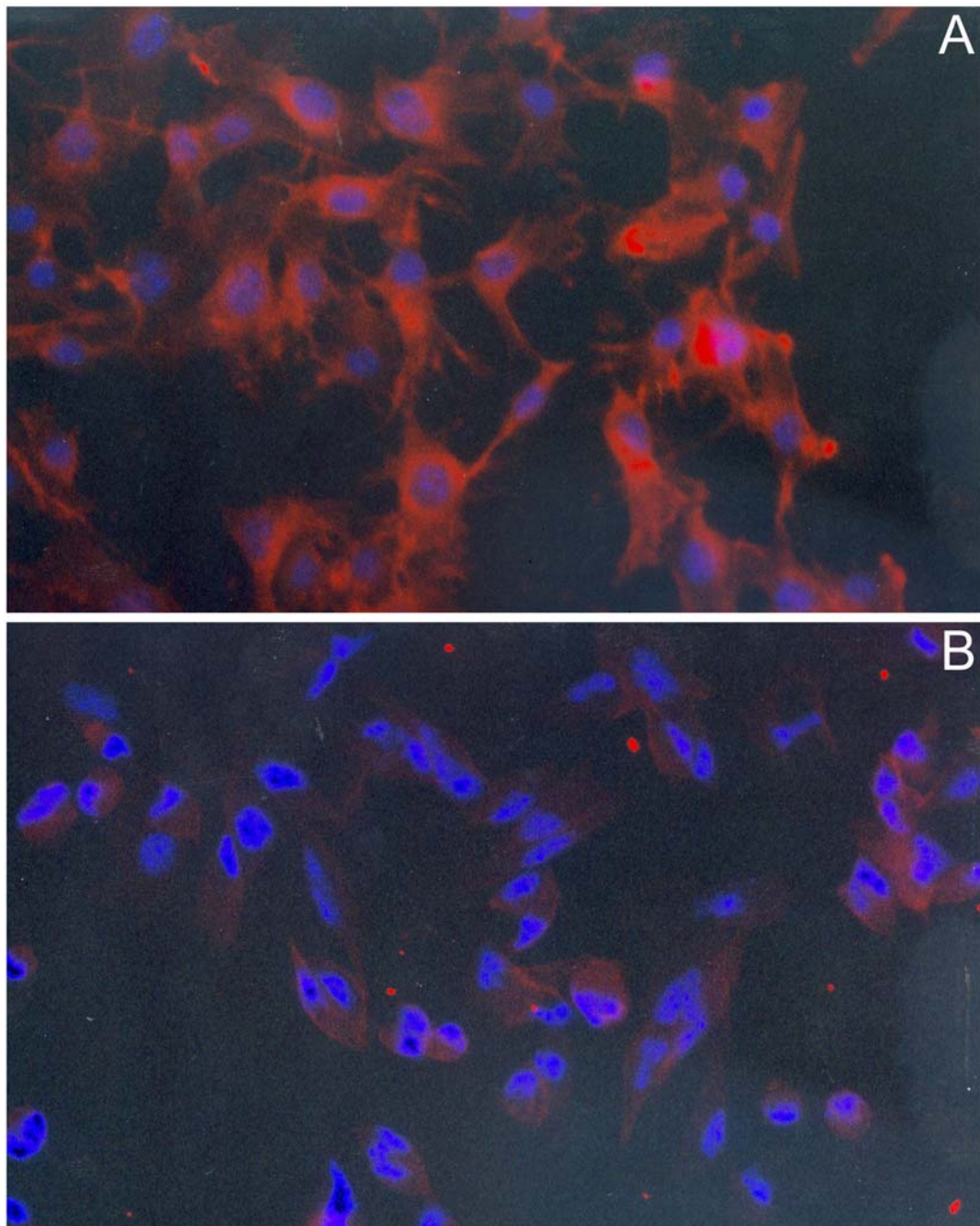
**Figura 22:** <sup>14</sup>C colesterol livre das emulsões nas células B16F10 após intervalos de tempo.

A um aumento da quantidade de colesterol livre após os intervalos de tempo, demonstrando a captação das emulsões.

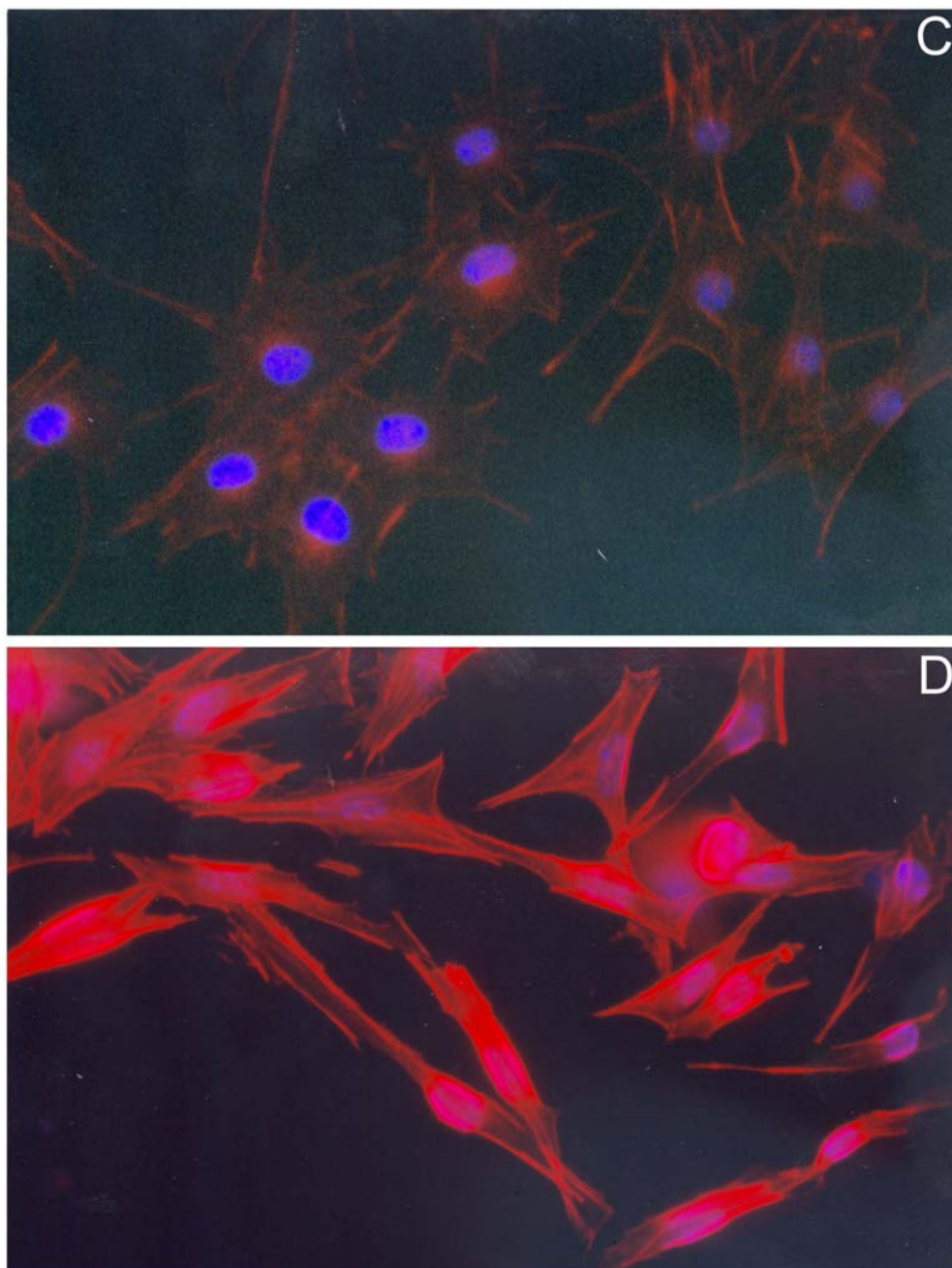
### 3.2.2.5. Análise morfológica: organização de microfilamentos de actina

Devido a alterações evidentes de citoesqueleto na linhagem de melanoma B16F10 quando tratadas com O<sub>x</sub>LE, desenvolveu-se o ensaio para avaliar a organização da actina através do reagente fluorescente faloidina. A faloidina marca especificamente a F-actina. Para análise do núcleo utilizou-se DAPI. A análise foi desenvolvida com os grupos: 100μM de 7-KC; Controle (meio RPMI 1640 + 10% de SFB + etanol) (Figura 23);

LDE e O<sub>x</sub>LE nas concentrações: 2,0% (Figura 21); 4,0%; 6,0%, por 24 horas.



**Figura 23** Células de melanoma foram cultivadas em lamínula, sem tratamento (A) ou exposta a 100 $\mu$ M de 7-KC (B). Organização fibrilar dos filamentos de actina estão discretos no grupo controle e ausentes no grupo tratado com 7-KC, apresentando-se arredondadas.

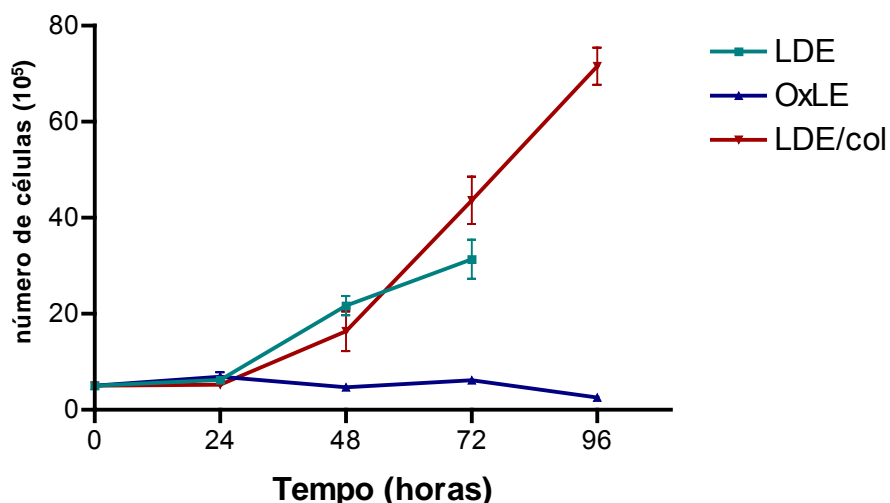


**Figura 24** Células B16F10 após 24 horas de exposição à LDE (**C**) e OxLE (75 $\mu$ M) (**D**). No tratamento com LDE, observou-se a formação da placa de adesão, acompanhado pela formação de fibras. Pode-se notar a organização fibrilar da actina associada a adesão focal. A organização das fibras foi mais intensa no grupo tratado com OxLE, com mudança da morfologia celular seguida de reorganização do citoesqueleto.

### 3.2.2.6. Ensaio de exposição contínua ao meio tratado.

Levando-se em consideração as alterações de citoesqueleto em todos os grupos contendo o oxisterol, incubaram-se  $2 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^3$ , sendo três grupos (LDE; OxLE; LDE/col, na concentração de 2%), com troca de meio a cada 24 horas. Estes meios (RPMI 1640 + 10% de soro fetal bovino) com as respectivas emulsões.

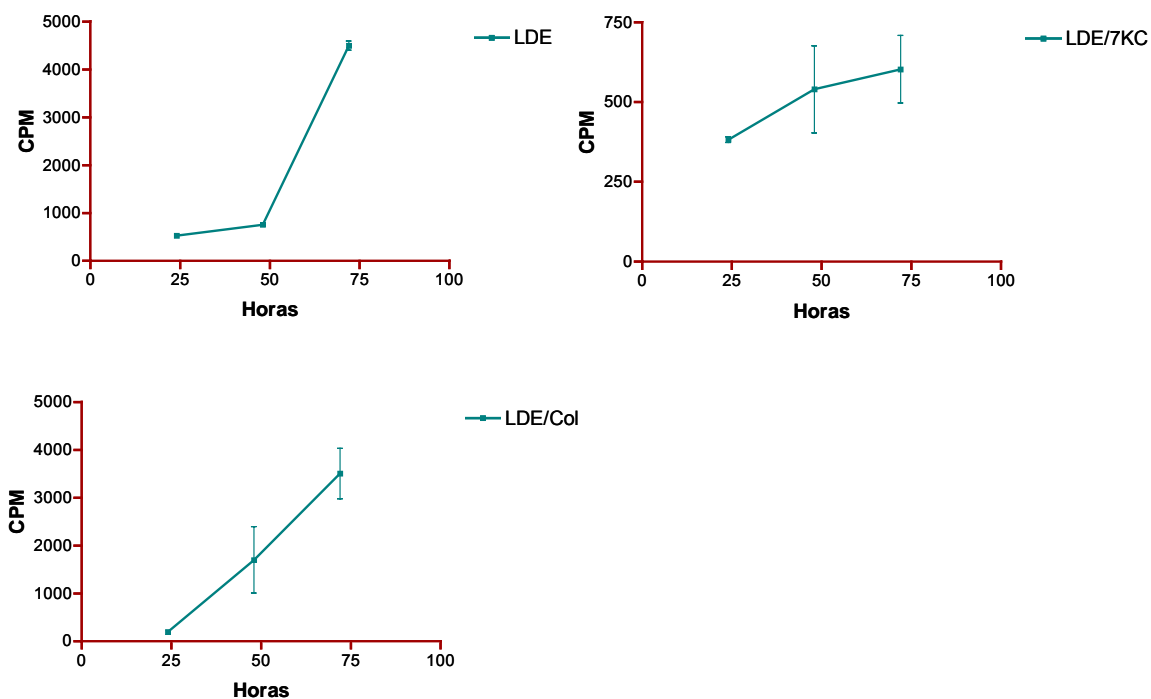
Para avaliar as alterações foi realizado a contagem com exclusão das células inviáveis por azul de tripan (Figura 25), análise da captação das emulsões através da contagem do  $^{14}\text{C}$  colesterol livre (Figura 26) e análise do ciclo celular (Figuras 27 e 28).



**Figura 25:** Células B16F10 expostas às diferentes emulsões. Ensaio desenvolvido com troca de meio a cada 24 horas. Contagem de células em hemocítômetro com exclusão das células reagentes ao Tripan (mortas).

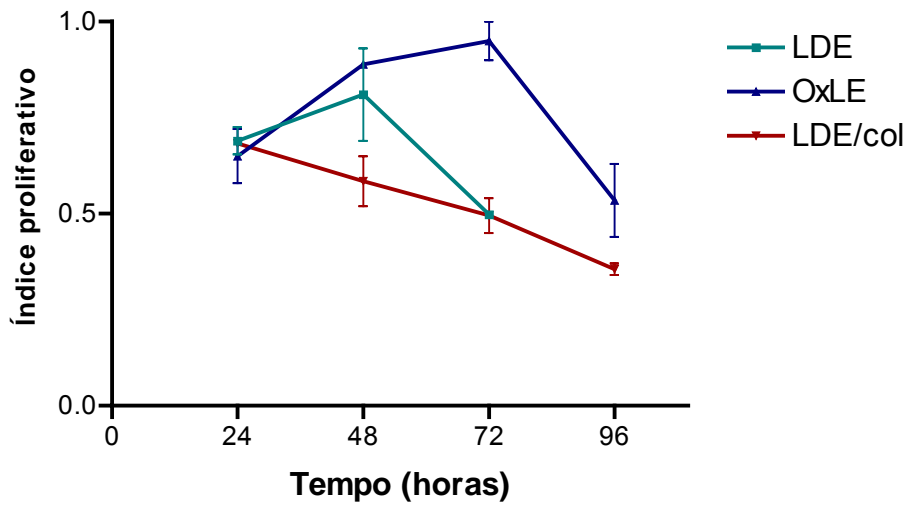


A emulsão O<sub>x</sub>LE demonstrou efeito citostático na linhagem de melanoma avaliada pela contagem de células.

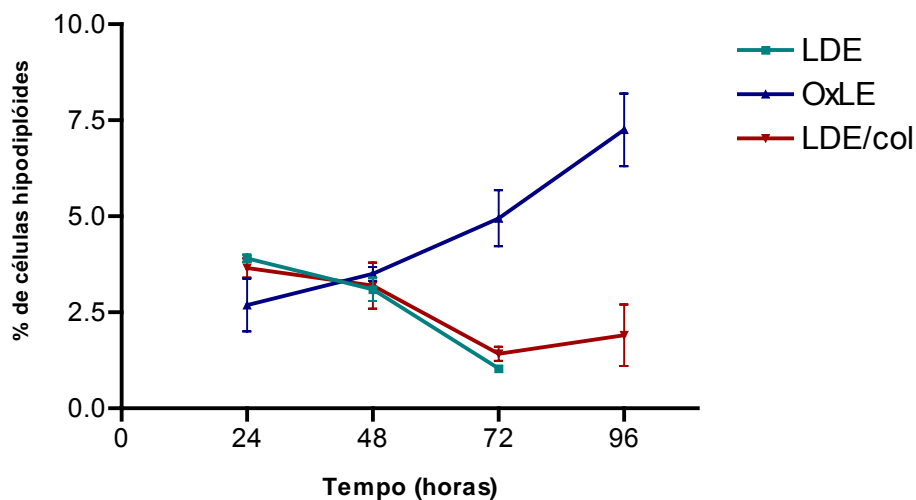


**Figura 26:** Captação do colesterol <sup>14</sup>C das diferentes emulsões . A cada 24 horas houve troca do meio contendo as diferentes emulsões na proporção de 2% (emulsão/meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino). Células de melanoma B16F10, n=3.

Houve um aumento da captação de colesterol livre referente à emulsão em todos os grupos envolvidos. Com a troca de meio a cada 24 horas houve maior exposição da população celular ao 7-cetocolesterol, o que proporcionou alteração de morfologia de toda as células associada a parada de crescimento com a presença de células com mais de um núcleo.



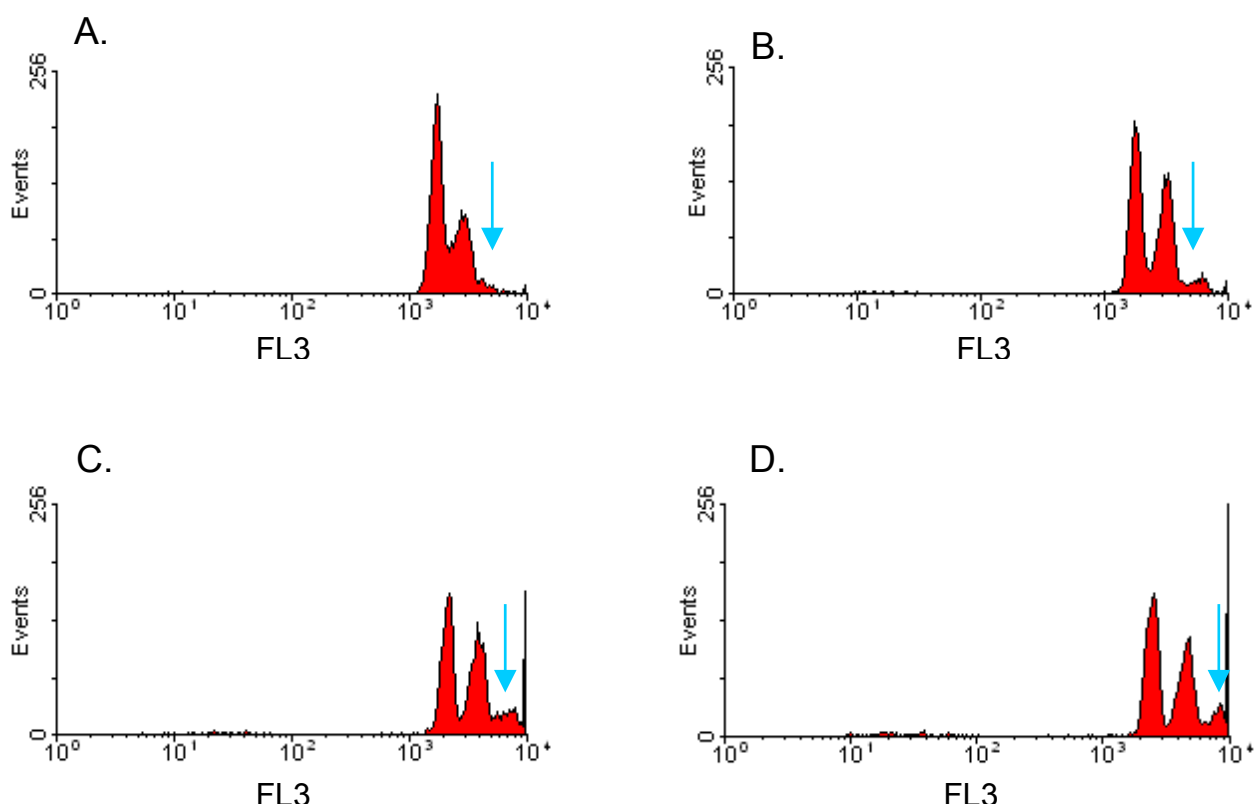
**Figura 27:** Avaliação do Índice proliferativo das células (B16F10) tratadas com contínua exposição ao meio contendo as diferentes emulsões. Índice proliferativo é a razão entre as fases de duplicação celular (S/G2/M) e G0/G1 (n=3).



**Figura 28:** Avaliação das células hipodiplóides (mortas) nos grupos tratados com as diferentes emulsões com exposição continuada. OxLE induz a aumento de células em processo de morte celular (n=3).

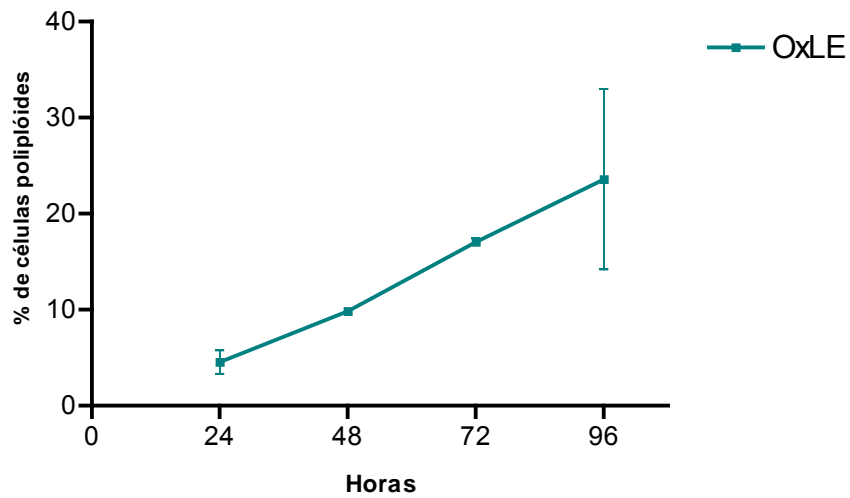
A análise do ciclo celular demonstrou que as diferentes emulsões atuam de maneira semelhante nas fases proliferativas da linhagem celular,

porém o grupo que contém 7-KC na sua formulação apresentou maior número de células em processo de morte celular (hipodiplóides) e uma população crescente de células com quantidade de DNA maior que  $4n$ , ou seja, células poliplóides (Figura 29).



**Figura 29:** Células B16F10 tratadas com  $O_xLE$  ( $75\mu M$  de 7-KC) apresentam população de células poliplóides de ordem crescente ao tempo de tratamento observado nos histograma. **A.** 24 horas de exposição; **B.** 48 horas de exposição; **C.** 72 horas de exposição; **D.** 96 horas de exposição.

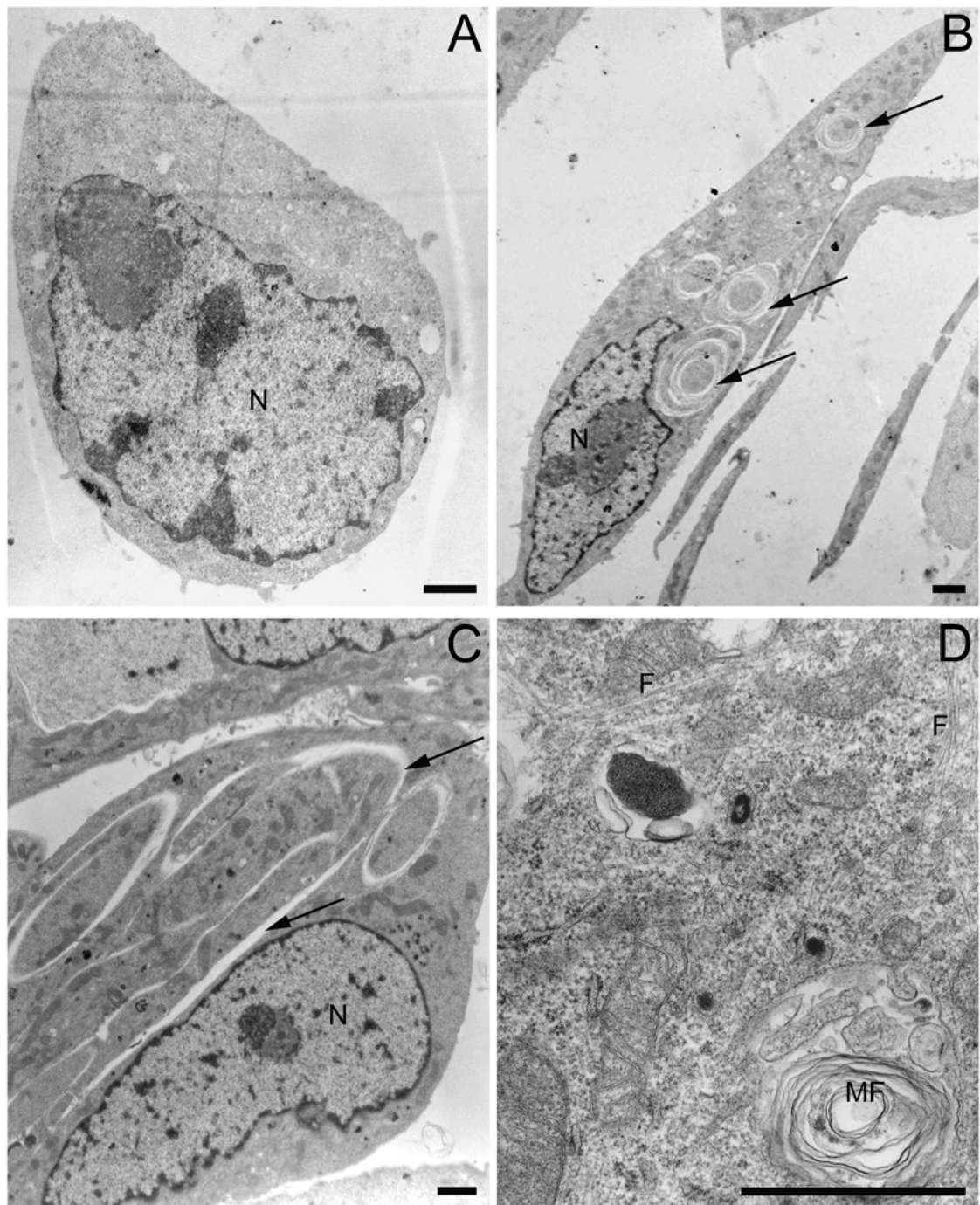
A Figura 30 expressa o aumento da população poliplóide com a seqüência de exposição a  $O_xLE$ .



**Figura 30:** Porcentagem de células poliplóides em cultura de células B16F10 tratadas com OxLE continuamente por períodos de até 96 horas.

### 3.2.2.7 Análise ultraestrutural

1,5x10<sup>6</sup> células (B16F10) foram tratadas por 24 horas, para análise por microscopia eletrônica. Foram utilizados os tratamentos OxLE e LDE/col ambos a 2% em meio RPMI 1640 com 10% de SFB. Após os tratamentos as células foram fixadas em paraformaldeído e retiradas mecanicamente. As alterações estruturais e a formação de figuras de mielina podem ser observadas na Figura 31. O tratamento com OxLE levou à formação de vacúolos autofágicos, figuras de mielina (Figura 31 D). Na Figura 31 B-C nota-se alterações de descontinuidade do citoplasma devido, provavelmente, ao efeito tóxico do oxisterol.



**Figura 31:** Análise ultraestrutural de células B16F10 cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de SFB com diferentes tratamentos: **A:** Tratamento com LDE/col. **B e C:** Tratamento com O<sub>x</sub>LE, alterações de forma nuclear seguindo a descontinuidade do citoplasma (setas). **D:** Tratamento com O<sub>x</sub>LE, visualização das fibras do citoesqueleto (F) e indução de figuras de mielina (MF). Barra = 1µm.

## DISCUSSÃO

A tentativa de uma terapia seletiva no tratamento do câncer através de veículos capazes de direcionar quimioterápicos ao alvo vem sendo objeto de estudo. Nas últimas décadas vários autores sugeriram a possibilidade da utilização da LDL como direcionador de drogas ao tumor; porém as dificuldades de isolamento da LDL plasmática e o preparo com os quimioterápicos vêm impossibilitando o seu uso em tratamentos de rotina.

MARANHÃO e cols. (1993) demonstrou a possibilidade da utilização de uma emulsão lipídica sintética, sem proteína, que possui metabolismo semelhante a LDL *in vivo*, sugerindo a captação de apoE no plasma.

Levando-se em consideração os resultados obtidos com esta emulsão como veículo, resolveu-se complexar a ela um oxisterol, descrito como potente indutor de morte celular, o 7-cetocolesterol.

A princípio, desenvolveu-se um complexo por incubação, mostrando a possibilidade da associação. Após incubação, separou-se o material por gradiente de ultracentrifugação. Este gradiente apresentou 5 frações visíveis, nas quais a radioatividade demonstrou a presença do  $^3\text{H}$  colesterol éter em três frações. Estas frações foram submetidas a cromatografia em camada delgada, e a análise do diâmetro por *laser light scattering*. Os resultados demonstraram a formação de uma emulsão com 7-KC por incubação, porém com muita perda de material, observada na fração 1, que não continha o 7-KC e apresentava um tamanho fora dos padrões.

No intuito de aprimorar os resultados obtidos com a incubação, produziram-se novas emulsões com diferentes quantidades de 7-KC; para tal, o oxisterol foi adicionado aos demais lipídios da emulsão, sofrendo todo o processo de emulsificação. Para avaliação da saturação da emulsão com quantidades diferentes do oxisterol, foram utilizados quatro parâmetros: a variação da fosfatidilcolina  $^{14}\text{C}$ , demonstrando o comportamento da monocamada envoltória da partícula; avaliação de um dos lipídios internos, o  $^3\text{H}$  colesterol éter; o tamanho da emulsão final e a avaliação da associação do 7-KC por cromatografia de gel filtração.

Os resultados nos levaram à utilização da emulsão que mantinha as características da LDE, com a maior quantidade de 7-KC (5 mg do oxisterol), denominada OxLE. A falta de homogeneidade de diâmetro das microemulsões é característica comum a vários grupos de pesquisa como OWENS e cols(2001).

LDE em baixas concentrações demonstrou ser atóxica para as células; porém, quando em maior quantidade, a toxicidade era clara e aparente. Estudos como o de GALLE e cols (1999) demonstram que a LDL e a Lp(a) nativas e em baixas quantidades não apresentam ação agressiva, mas quando a quantidade é aumentada, há produção de ROS e morte celular, porém em menor grau do que em células tratadas com LDL e Lp(a) oxidadas.

Como visto, os oxisteróis são capazes de induzir morte celular em várias linhagens celulares. Em nossos experimentos, 7-KC foi capaz de induzir morte celular em ambas as linhagens utilizadas (mieloma e

melanoma), acompanhada pela diminuição de células viáveis, da perda do potencial mitocondrial (JC-1), alterações de citoesqueleto e presença de figuras de mielina (vacúolos autofágicos). A análise ultraestrutural demonstrou a intensidade dos efeitos causados pelo 7-KC, haja vista o aspecto citopático e a forma nuclear acompanhando alterações de citoesqueleto.

Adicionado ao meio de cultura 7-KC, provavelmente, associou-se a seus constituintes (LIN *et al.*, 1996). LIN e cols (1996) demonstraram que tanto o colesterol quanto os oxisteróis livres estão mais associados à albumina, e, portanto, mais facilmente disponível em relação à célula. Com esta fácil captação, o 7-KC poderia desencadear o processo de morte. O colesterol por sua vez, demonstrou baixa ou nenhuma toxicidade na concentração utilizada.

As variedades de efeitos relacionados ao 7-KC impossibilitam a descrição do mecanismo preciso de morte celular. MONIER e cols (2003) sugere o termo Oxiaoptofagia (OXIdação, APOPTOse, autoFAGIA) para a morte induzida por 7-KC, já que há a presença dos três processos. O mais provável é o processo de morte esteja ligado a alterações de membrana e, como consequência, aumento do influxo de cálcio; paralelamente, há a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). SEVANI e cols (1986) demonstraram que os oxisteróis podem substituir o colesterol na membrana celular, afetando a fluidez, permeabilidade e estabilidade da membrana celular. Oxisteróis também afetam a estrutura estereoquímica das proteínas e fosfolípidios, alterando as características da membrana.



A emulsificação do 7-KC minimizou seu efeito tóxico; porém, mesmo em baixas concentrações, induziu a acúmulo de células na fase proliferativa do ciclo celular e hipodiploidia. Em estudo com células de leucemia monocítica, LIM e cols (2003) demonstraram acúmulo de células nas fases G2/M do ciclo de duplicação associados a regulação negativa nos níveis da proteína intracelular ciclina B1, responsável pela regulação da atividade de Cdc2 na transição de G2 para M na progressão celular. O mecanismo sugerido por este grupo de pesquisa estaria nos efeitos dos oxisteróis sobre a formação da membrana e homeostasia celular por duas vias: inibição da produção endógena de colesterol e inserção na bicamada lipídica da membrana.

As células de melanoma murino, quando tratadas com O<sub>x</sub>LE, apresentaram alterações morfológicas: forma fusiforme, indução de hiperpolarização do potencial transmembranar mitocondrial associada à perda do potencial. A análise ultraestrutural demonstrou produção intensa de figura de mielina em quantidade maior do que o 7-KC isoladamente. As alterações geradas pelo tratamento com O<sub>x</sub>LE, quando em maior tempo de exposição, provavelmente impossibilitavam as células de entrar em citocinese, produzindo uma população de ordem crescente de células poliplóides. Estas alterações de forma e quantidade de DNA foram irreversíveis, mesmo quando houve substituição do meio tratado por meio comum.

LIZARD e cols (1999) observaram que 7-KC induz a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser iniciada por ROS, formando

peroxirradicais lipídicos ( $\text{ROO}^*$ ) que podem produzir hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ), os quais por sua vez produzem mais peroxirradicais lipídicos, sendo uma reação em cadeia, podendo afetar os lipídios da membrana.

A geração de ROS envolve a redução do oxigênio molecular a ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) seguido pela conversão enzimática para  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou para espécies reativas, como radicais hidroperoxi ( $\text{HOO}^*$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) ou oxigênio singleto.

A ação nos grupos sulfidrílicos (SH) por espécies oxidantes pode ser de modo reversível ou por interação covalente. Os alvos mais importantes da modificação dos grupos SH por metabólitos reativos incluem a glutatona redutase, as ATPases transportadoras de cálcio na membrana plasmática e retículo endoplasmático e a proteína citoesquelética actina.

A organização da polimerização da actina é um complexo processo que envolve um grande número de proteínas que clivam, seqüestram e ancoram à membrana, processos esses regulados por vias de sinalização. Algumas proteínas como a p38 MAPKinase, que modula a reorganização e fosforila outra proteína importante no processo, a *heat shock protein 27*, estão envolvidas no processo de alteração do citoesqueleto oriundas de estresse oxidativo (HUOT *et al.*, 1997).

Desse modo, as alterações do citoesqueleto podem estar baseadas na produção de ROS pelo 7KC (LIZARD *et al.*, 1999), que ativariam MAP kinases (*mitogen-activated protein*), produzindo a fosforilação da actina polimerizada (F-actina). A estrutura formada, provavelmente, está ligada a modificações dos grupos SH dos resíduos de cisteína da actina, ou seja,

ROS elevam drasticamente a polimerização da actina (DALLE-DONE *et al.*, 2001). HUOT e cols. (1997) observou que o estresse oxidativo produz rompimento de microfilamentos do citoesqueleto, diretamente ligados a F-actina.

Em recente publicação, ZAHN e cols. (2003) demonstraram alterações semelhantes de membrana em células A7R5 tratadas com 7-KC e constataram ser um evento anterior à morte celular. Segundo o estudo, após as alterações de membrana, provavelmente devido à produção de ROS, ocorre hiperpolarização seguida de perda do potencial transmitocondrial, produção de vacúolos autofágicos e apoptose.

Segundo VANDER HAIDEN e cols (1997; 1999), a hiperpolarização da membrana mitocondrial é proveniente da perda da capacidade de conversão do gradiente de íons  $H^+$  para ATP, impedindo a troca de ATP-mitocondrial com o ADP-citosólico. A falta da troca ATP-ADP pelo canal voltagem dependente inibiria a  $F_1-F_0$ -ATPase, favorecendo o acúmulo de prótons no espaço intermembranar, levando a um aumento no potencial transmembranar. Outros investigadores sugeriram que a abertura do poro de transição mitocondrial aumentaria a permeabilidade da membrana mitocondrial, podendo propiciar a hiperpolarização (KROEMER *et al.*, 2000).

A hiperpolarização da membrana mitocondrial foi observada em células tratadas com outros indutores inespecíficos de morte celular como a camptotecina (SANCHEZ-ALCAZAR *et al.*, 2000), etoposídeo e estaurosporina (PHAM *et al.*, 2001).

Estudos como o de GIOVANNINI e cols (2002) observaram que a hiperpolarização do potencial transmitocondrial induzida por LDL oxidada em células intestinais (CaCo-2) é um evento que precede a morte celular por apoptose. Interessantemente, a LDL oxidada possui uma ação citostática sobre estas células. O evento posterior à hiperpolarização seria a despolarização da mitocôndria, com liberação do citocromo *c*, indução de caspase 9 e 3.

Em conclusão, oxisteróis, incluindo 7-cetocolesterol (7KC), são conhecidos por inibirem a proliferação celular e por serem citotóxicos. As diferentes concentrações utilizadas, nesse estudo, das emulsões (OxLE e LDE) levaram as células de mieloma ao acúmulo na fase proliferativa do ciclo celular; e nos grupos 7KC e OxLE foi observada morte celular. OxLE induziu efeito citostático sobre as células de melanoma caracterizada pelas alterações morfológicas, hiperpolarização e perda do potencial transmitocondrial, presença de vacúolos autofágicos como figuras de mielina, e poliploidia.

As possibilidades de utilização de OxLE são inúmeras, que vão desde a possível utilização desta emulsão em modelos de aterosclerose em animal ou em cultura à utilização em modelos de câncer como tratamento, por ser um veículo com propriedades de indução de morte celular.

## CONCLUSÕES

- É possível complexar 7-cetocolesterol a LDE por incubação.
- A produção de uma nova emulsão contendo 7-KC em sua constituição é viável e passível de reprodução.
- 7-cetocolesterol induz morte celular associada à autofagia e apoptose.
- LDE, em altas concentrações, é tóxico para a linhagem de mieloma múltiplo.
- A emulsificação de 7-KC (O<sub>x</sub>LE) atenua seus efeitos citotóxicos, sendo citostático para a linhagem de melanoma murino.
- O<sub>x</sub>LE, na linhagem de mieloma múltiplo utilizada, propicia o acúmulo de células na fase proliferativa do ciclo celular, porém sem aumento da proliferação, com células em processo de morte (hipodiplóides).
- O<sub>x</sub>LE induz a hiperpolarização do potencial transmembranar mitocondrial, alterações do citoesqueleto, poliploidia e aparecimento de figuras de mielina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baranowski, A., Adams, C. W., High, O. B., and Bowyer, D. B. Connective tissue responses to oxysterols. *Atherosclerosis*, **41**: 255-266, 1982.

Beckering, R. E., Jr. and Ellefson, R. D. A rapid method for lipoprotein electrophoresis using cellulose acetate as support medium. *Am.J.Clin.Pathol.*, **53**: 84-88, 1970.

Biederbick, A., Kern, H. F., and Elsasser, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur.J.Cell Biol.*, **66**: 3-14, 1995.

Boissonneault, G. A. and Heiniger, H. J. 25-Hydroxycholesterol-induced elevations in <sup>45</sup>Ca uptake: permeability changes in P815 cells. *J.Cell Physiol*, **125**: 471-475, 1985.

Chang, J. Y., Phelan, K. D., and Chavis, J. A. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Res.Bull.*, **45**: 615-622, 1998.

Chen, H. W. Role of cholesterol metabolism in cell growth. *Fed.Proc.*, **43**: 126-130, 1984.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., and Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic.Biol.Med.*, **31**: 1624-1632, 2001.

Dorlhiac-Llacer, P. E., Marquezini, M. V., Toffoletto, O., Carneiro, R. C., Maranhao, R. C., and Chamone, D. A. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **34**: 1257-1263, 2001.

Fornas, E., Fortea, A., Renau, J., and Camanas, A. Cholesterol oxygenated derivatives induce erythrocyte accumulation and endothelium alterations in the aorta of rats. Turnover of endothelial cells in the apparently intact areas remains unchanged. *Exp.Pathol.*, **31**: 105-112, 1987.

Freeman, C. P. and West, D. Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. *J.Lipid Res.*, **7**: 324-327, 1966

Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P. R., Conzelmann, E., Dimmeler, S., and Heermeier, K. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int.*, **55**: 1450-1461, 1999.

Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Sanchez, M., Masella, R., and Malorni, W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett.*, **523**: 200-206, 2002.

Goldstein, J. L., Basu, S. K., and Brown, M. S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.*, **98**: 241-260, 1983.

Guyton, J. R., Black, B. L., and Seidel, C. L. Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. A model of the atherosclerotic core region. *Am.J.Pathol.*, **137**: 425-434, 1990.

Harada-Shiba, M., Kinoshita, M., Kamido, H., and Shimokado, K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J.Biol.Chem.*, **273**: 9681-9687, 1998.



Higley, N. A. and Taylor, S. L. The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured L cells. *Food Chem.Toxicol.*, **22**: 983-992, 1984.

Ho, Y. K., Smith, R. G., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, **52**: 1099-1114, 1978.

Holmes, R. P. and Yoss, N. L. 25-Hydroxysterols increase the permeability of liposomes to Ca<sup>2+</sup> and other cations. *Biochim.Biophys.Acta*, **770**: 15-21, 1984.

Hsu, R. C., Kanofsky, J. R., and Yachnin, S. The formation of echinocytes by the insertion of oxygenated sterol compounds into red cell membranes. *Blood*, **56**: 109-117, 1980.

Hungria, V. T., Brandizzi, L. I., Chiattono, C. S., Bydlowski, S. P., and Maranhao, R. C. Metabolism of an artificial emulsion resembling chylomicrons in patients with multiple myeloma. *Leuk.Res.*, **23**: 637-641, 1999.

Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ.Res.*, **80**: 383-392, 1997.

Kandutsch, A. A., Chen, H. W., and Heiniger, H. J. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science*, **201**: 498-501, 1978.

Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., and Germano, I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.*, **63**: 2103-2108, 2003.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, **26**: 239-257, 1972.

Kolsch, H., Lutjohann, D., Tulke, A., Bjorkhem, I., and Rao, M. L. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, **818**: 171-175, 1999.

Kritharides, L., Kus, M., Brown, A. J., Jessup, W., and Dean, R. T. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-mediated efflux of 7-ketocholesterol from

macrophage foam cells. *J.Biol.Chem.*, **271**: 27450-27455, 1996.

Lin, C. Y. and Morel, D. W. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. *J.Lipid Res.*, **37**: 168-178, 1996.

Lizard, G., Lemaire, S., Monier, S., Gueldry, S., Neel, D., and Gambert, P. Induction of apoptosis and of interleukin-1beta secretion by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.*, **419**: 276-280, 1997.

Lizard, G., Moisant, M., Cordelet, C., Monier, S., Gambert, P., and Lagrost, L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J.Pathol.*, **183**: 330-338, 1997.

Lizard, G., Gueldry, S., Sordet, O., Monier, S., Athias, A., Miguet, C., Bessede, G., Lemaire, S., Solary, E., and Gambert, P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.*, **12**: 1651-1663, 1998.

Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **19**: 1190-1200, 1999.

Lizard, G., Miguet, C., Bessede, G., Monier, S., Gueldry, S., Neel, D., and Gambert, P. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Free Radic.Biol.Med.*, **28**: 743-753, 2000.

Lyons, M. A. and Brown, A. J. 7-Ketocholesterol. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **31**: 369-375, 1999.

Lyons, M. A. and Brown, A. J. 7-Ketocholesterol delivered to mice in chylomicron remnant-like particles is rapidly metabolised, excreted and does not accumulate in aorta. *Biochim.Biophys.Acta*, **1530**: 209-218, 2001.

Maranhao, R. C., Cesar, T. B., Pedroso-Mariani, S. R., Hirata, M. H., and Mesquita, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*, **28**: 691-696, 1993.

Maranhao, R. C., Garicochea, B., Silva, E. L., Dorlhiac-Llacer, P., Cadena, S. M., Coelho, I. J., Meneghetti, J. C., Pileggi, F. J., and Chamone, D. A. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, **54**: 4660-4666, 1994.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., and Kroemer, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J.Exp.Med.*, **184**: 1155-1160, 1996.

Martin, L. J., Price, A. C., McClendon, K. B., Al Abdulla, N. A., Subramaniam, J. R., Wong, P. C., and Liu, Z. Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. *J.Neurochem.*, **85**: 234-247, 2003.

Monier, S., Samadi, M., Prunet, C., Denance, M., Laubriet, A., Athias, A., Berthier, A., Steinmetz, E., Jurgens, G., Negre-Salvayre, A., Bessede, G., Lemaire-Ewing, S., Neel, D., Gambert, P., and Lizard, G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate

*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **303**: 814-824, 2003.

Moore, G. E. and Kitamura, H. Cell line derived from patient with myeloma.  
*N.Y.State J.Med.*, **68**: 2054-2060, 1968.

Mosley, S. T., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Falck, J. R., and Anderson, R. G. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **78**: 5717-5721, 1981.

Naseem, S. M. and Heald, F. P. Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. *Biochem.Int.*, **14**: 71-84, 1987.

Novak, E. M., Metzger, M., Chammas, R., Da Costa, M., Dantas, K., Manabe, C., Pires, J., De Oliveira, A. C., and Bydlowski, S. P. Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. *Gene Ther.*, **10**: 1992-1997, 2003.

Osada, K., Hoshina, S., Nakamura, S., and Sugano, M. Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *J.Agric.Food Chem.*, **48**:

3823-3829,

2000.

Owens, M. D., Baillie, G., and Halbert, G. W. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int.J.Pharm.*, **228**: 109-117, 2001.

Palladini, G., Finardi, G., and Bellomo, G. Disruption of actin microfilament organization by cholesterol oxides in 73/73 endothelial cells. *Exp.Cell Res.*, **223**: 72-82, 1996.

Panini, S. R. and Sinensky, M. S. Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr.Opin.Lipidol.*, **12**: 529-533, 2001.

Parish, E. J., Chitrakorn, S., Luu, B., Schmidt, G., and Ourisson, G. Studies of the oxysterol inhibition of tumor cell growth. *Steroids*, **53**: 579-596, 1989.

Peng, S. K., Taylor, C. B., Tham, P., Werthessen, N. T., and Mikkelsen, B. Effect of auto-oxidation products from cholesterol on aortic smooth muscle cells: an in vitro study. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **102**: 57-61, 1978.

Peng, S. K., Taylor, C. B., Hill, J. C., and Morin, R. J. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis*, **54**: 121-133,

1985.

Pham, N. A. and Hedley, D. W. Respiratory chain-generated oxidative stress following treatment of leukemic blasts with DNA-damaging agents.

*Exp.Cell Res.*, **264**: 345-352, 2001.

Ponty, E., Favre, G., Benaniba, R., Boneu, A., Lucot, H., Carton, M., and Soula, G. Biodistribution study of <sup>99m</sup>Tc-labeled LDL in B16-melanoma-bearing mice. Visualization of a preferential uptake by the tumor.

*Int.J.Cancer*, **54**: 411-417, 1993.

Post, G. J. and McCuskey, B. M. Metastatic melanoma to the bladder.

*W.V.Med.J.*, **76**: 7-8, 1980.

Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L., Bersot, T. P., Mahley, R. W., and Blum, C. B. Identification of a new structural variant of human apolipoprotein E, E2(Lys146 leads to Gln), in a type III hyperlipoproteinemic subject with the E3/2 phenotype. *J.Clin.Invest*, **72**: 1288-1297, 1983.

Rao, M. L., Lutjohann, D., Ludwig, M., and Kolsch, H. Induction of apoptosis and necrosis in human neuroblastoma cells by cholesterol oxides.

*Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **893**: 379-381, 1999.



Redgrave, T. G., Roberts, D. C., and West, C. E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal.Biochem.*, **65**: 42-49, 1975.

Rensen, P. C., Schiffelers, R. M., Versluis, A. J., Bijsterbosch, M. K., Kuijk-Meuwissen, M. E., and van Berkel, T. J. Human recombinant apolipoprotein E-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol.Pharmacol.*, **52**: 445-455, 1997.

Rhinds, D. and Brissette, L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **31**: 915-931, 1999.

Sanchez-Alcazar, J. A., Ault, J. G., Khodjakov, A., and Schneider, E. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell Death.Differ.*, **7**: 1090-1100, 2000.

Sevanian, A., Shen, L., and Ursini, F. Inhibition of LDL oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity by dihydropyridine calcium antagonists.

*Pharm.Res.*, **17**: 999-1006, 2000.

Smith, L. L., Teng, J. I., Lin, Y. Y., Seitz, P. K., and McGehee, M. F. Sterol metabolism--XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J.Steroid Biochem.*, **14**: 889-900, 1981.

Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. Apoptosis signaling. *Annu.Rev.Biochem.*, **69**: 217-245, 2000.

Taylor, C. B., Peng, S. K., Werthessen, N. T., Tham, P., and Lee, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am.J.Clin.Nutr.*, **32**: 40-57, 1979.

Teng, J. I. and Smith, L. L. High-performance liquid chromatographic analysis of human erythrocyte oxysterols as delta 4-3-ketone derivatives. *J.Chromatogr.A*, **691**: 247-254, 1995.

Van Cruchten, S. and Van Den, B. W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat.Histol.Embryol.*, **31**: 214-223, 2002.

Van Cruchten, S. and Van Den, B. W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat.Histol.Embryol.*, **31**: 214-223, 2002.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **91**: 627-637, 1997.

Verhagen, J. C., ter Braake, P., Teunissen, J., van Ginkel, G., and Sevanian, A. Physical effects of biologically formed cholesterol oxidation products on lipid membranes investigated with fluorescence depolarization spectroscopy and electron spin resonance. *J.Lipid Res.*, **37**: 1488-1502, 1996.

Versluis, A. J., Rensen, P. C., Rump, E. T., van Berkel, T. J., and Bijsterbosch, M. K. Low-density lipoprotein receptor-mediated delivery of a lipophilic daunorubicin derivative to B16 tumours in mice using apolipoprotein E-enriched liposomes. *Br.J.Cancer*, **78**: 1607-1614, 1998.

Vindelov, L. L., Christensen, I. J., and Nissen, N. I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, **3**: 323-327, 1983.

William J. Johnson, Florence H. Mahlberg, George H. Rothblat and Michael C. Phillips. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **1085**, 3, 273-298, 1991.

Zahm, J. M., Baconnais, S., Monier, S., Bonnet, N., Bessedé, G., Gambert, P., Puchelle, E., and Lizard, G. Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: Analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. *Cytometry*, **52A**: 57-69, 2003.

Zhou, Q., Smith, T. L., and Kummerow, F. A. Cytotoxicity of oxysterols on cultured smooth muscle cells from human umbilical arteries. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **202**: 75-80, 1993.