Arthur Cássio de Lima Luna

Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina
sintética no modelo de hepatocarcinoma

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2017

Arthur Cássio de Lima Luna

Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina
sintética no modelo de hepatocarcinoma

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Luna, Arthur Cássio de Lima

Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética no modelo de hepatocarcinoma / Arthur Cássio de Lima Luna -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Lipossomos 2.Carcinoma hepatocelular 3.Nanocarreadores
4.Fosfoetanolamina sintética 5.Fosfolípídeos antitumorais

USP/FM/DBD-268/17

DEDICATÓRIA

Aos pacientes oncológicos, que buscam incessante a
esperança de viver. Que o outono que teima em não ir,
trazendo ventos gélidos que petrificam os vossos
ossos, engessam vossas almas e furtam os vossos
sonhos, possa se sucumbir e as vossas almas possam
ser aquecidas pelo perene desejo de persistir na
plenitude da felicidade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelas oportunidades concedidas e por sua graça perene, a qual me permitiu chegar a este momento. Entre as alternâncias de tempestades e dias ensolarados, no mar bravio que é a vida, sempre fostes o meu farol ao norte e, também, os ventos que sopram nas velas da minha embarcação, impulsionando-me.

Aos meu pais, Marcos Lima e Norma Luna, por todo incentivo e encorajamento. Agradeço pelos valores e ensinamentos que recebi, aos quais sempre buscarei ser fiel.

Aos meus irmãos, Tamires Luna e Lucas Luna, por serem um dos alicerces da minha existência. Em momento de felicidade, vocês compartilharam comigo os sorrisos mais sinceros e a euforia da alegria; nos dias tristes, acalentaram minha alma com palavras brandas e sábias; nas dificuldades, me encorajaram para eu dar o meu melhor e, simplesmente, descansar em Deus. Caminhando percorremos o caminho em direção à “utopia”; sim ela se afastou, eu sei, mas juntos chegamos até aqui e em companhia continuaremos a caminhar.

Ao meu tio e sua esposa, Assis Luna e Sueli Luna, pelo apoio concedido para que eu pudesse me estabelecer em São Paulo. Vocês tornaram viável este momento.

A Alethéia Lacerda, minha esposa, companheira e amiga. Utilizando as palavras do grande poeta Vinícius de Moraes: “A vida é arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida”. Fui agraciado por ter encontrado você, que inusitadamente veio “escondida” entre os *papers*, experimentos e pipetas. Você me fez redescobrir o significado da palavra compartilhar, trazendo “novos” sentimentos e momentos para minha existência. Obrigado por todo amor e auxílio, que tantas vezes me trouxeram alento e completude, me trazendo a certeza de que a felicidade só é plena quando partilhada. TE AMO!

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria, pelas oportunidades, ensinamentos valiosos, confiança e amizade. Agradeço por todo empenho e dedicação com os quais o senhor orientou este trabalho, estando sempre disposto e acessível para ajudar. Obrigado por me receber em seu laboratório e pelo acolhimento.

A Dra. Elia Tamasso Espin Garcia Caldini, pela amizade e palavras de incentivo. A Senhora é inspiradora e me faz enxergar a vida acadêmica de uma maneira mais ampla e nobre.

A Dra. Marcia Saldanha Kubrusly, por abrir as portas do seu laboratório, possibilitando as análises moleculares deste estudo. Além disto, e mais importante que isto, obrigado pela amizade, ensinamentos, apoio e conversas descontraídas, que sempre trouxeram ao meu rosto um doce e verdadeiro sorriso.

A Dra. Juliana Pereira, pelas grandes contribuições para este trabalho. Obrigado por viabilizar as análises de citometria, permitindo a utilização dos equipamentos disponíveis em seu laboratório.

A Dra. Greice Kelle Viegas Saraiva, pelo auxílio na preparação dos lipossomas e ensaios bioquímicos.

A todos os Professores membros da banca do exame de qualificação, obrigado por todas as sugestões e contribuições.

Aos colegas de laboratório, Sônia, Rosely, Larissa, Amanda, Manuella, Antenor, José Arthur, Leandro, Abdo, Fernanda Menezes, Angelina, Daniel, Joseleide, Roberto, Clarisse, Luciana, Thaís e Aline, sou grato a todos por terem me acolhido e pelas contribuições diretas e indiretas para a realização deste trabalho. De igual maneira,

estendo os meus agradecimentos aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Ao Dr. Jean Gabriel de Souza, pela ajuda na execução do exame de imagem PET Scan. Obrigado pela sua grande contribuição.

Aos amigos, Daniel, Carol Veríssimo, Joseleide, Aline, Leandro, Alberto, Roberto e Carlos Frederico, obrigado a todos pelos momentos de descontração, pelas horas de conversas despreziosas e “filosóficas”, debates enriquecedores e por tornarem a vida mais leve. Faço minhas as palavras de Antoine de Saint-Exupery: “Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Médicas, especialmente a Angélica e Rose, que sempre estiveram disponíveis a ajudar.

A FAPESP, pelo auxílio e financiamento deste trabalho (processos número: 15/02950-1 e 13/05251-1).

“Apesar das ruínas e da morte,
Onde sempre acabou cada ilusão,
A força dos meus sonhos é tão forte,
Que de tudo renasce a exaltação
E nunca as minhas mãos ficam vazias”.

Sophia de Mello Breyner Andresen

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

Martin Luther King

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	2
1.2. Carcinoma Hepatocelular (HCC).....	5
1.3. Desenvolvimento de fosfolipídios antineoplásicos (AFTs).....	8
1.4. Mecanismo de ação dos AFTs	10
1.5. Apoptose	12
1.6. Fosfoetanolamina sintética (FO-S)	17
1.7. Lipossomas: nanocarreadores para o tratamento do câncer.....	19
1.8. Lipossomas catiônicos	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Formulação lipossomal	28
3.1.1. Formulação da fosfoetanolamina sintética (FO-S)	28
3.1.2. Preparação dos lipossomas de DODAC/FO-S.....	28
3.2. Caracterização química e física das suspensões lipossomais	28
3.2.1. Determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas (DODAC/FO-S).....	29
3.2.2. Determinação da carga de superfície dos lipossomas (DODAC/FO-S)	29
3.2.3. Determinação do teor de fosfato	30
3.2.4. Morfologia ultraestrutural dos lipossomas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
3.3. Ensaios <i>in vitro</i>	31
3.3.1. Cultura celular.....	31
3.3.2. Avaliação da citotoxicidade	32
3.3.3. Análises das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	32

3.3.4. Determinação das proporções de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo (Anexina-V/PI)	33
3.3.5. Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo	33
3.3.6. Análise da internalização dos lipossomas fluorescentes DODAC/FO-S por microscopia confocal a laser	34
3.3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial por microscopia confocal a laser	35
3.3.8. Marcação de lisossomos por meio do fluorocromo laranja de acridina	35
3.3.9. Análise da caspase 3 ativa por microscopia confocal a laser	36
3.3.10. Análise da morfologia ultraestrutural das células tratadas com a formulação lipossomal por MEV	36
3.4. Ensaios <i>in vivo</i>	37
3.4.1. Animais	37
3.4.2. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	37
3.4.3. Resumo esquemático dos grupos	41
3.4.4. Análises hematológicas e bioquímicas	42
3.4.5. Análises histopatológicas	42
3.4.6. Distribuição dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil	43
3.4.7. Determinação das fases do ciclo celular das células da massa tumoral por citometria de fluxo	43
3.4.8. Análise do perfil de expressão de RNAm por RT-PCR	44
3.5. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Caracterização físico-química das suspensões lipossomais	47
4.1.1. Determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas DODAC/FO-S	47
4.1.2. Determinação do Potencial Zeta	51
4.1.3. Eficiência de encapsulação da FO-S	54
4.1.4. Caracterização morfológica dos lipossomas DODAC/FO-S por MEV	57
4.2. Ensaios <i>in vitro</i>	59
4.2.1. Determinação da citotoxicidade nas células tumorais	59
4.2.2. Citotoxicidade na linhagem normal endotelial humana HUVEC	67

4.2.3. Perfil de distribuição das células nas fases do ciclo celular na linhagem de melanoma murino B16F10 e HCC murino Hepa1c1c7	70
4.2.4. Proporções de células de HCC murino Hepa1c1c7 apoptóticas e necróticas.....	74
4.2.5. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular nas células de melanoma B16F10	76
4.2.6. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e controle do ciclo celular em células de HCC murino Hepa1c1c7.....	81
4.2.7. Expressão de proteínas envolvidas na apoptose em células endoteliais normais HUVEC	95
4.2.8. Avaliação da internalização dos lipossomas DODAC/FO-S em células de HCC Hepa1c1c7.....	100
4.2.9. Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células Hepa1c1c7.....	102
4.2.10. Autofagia e alterações morfológicas nas células de HCC Hepa1c1c7	104
4.2.11. Expressão da caspase 3 ativa nas células de melanoma B16F10.....	106
4.2.12. Caracterização morfológica dos lipossomas e das células tratadas por Microscopia Eletrônica de Varredura	108
4.3. Ensaios in vivo.....	110
4.3.1. Avaliação da probabilidade de sobrevivência global dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC.....	110
4.3.2. Avaliação do peso corpóreo dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC	112
4.3.3. Determinação do peso dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC	114
4.3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC.....	116
4.3.5. Avaliação do perfil hematológico nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC	123
4.3.5.1. Determinação do número de leucócitos e contagem diferencial nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC	133
4.3.6. Avaliação dos aspectos macroscópicos dos órgãos internos dos camundongos portadores de HCC murino	139
4.3.7. Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados pela via IP.....	142

4.3.8.Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nos animais portadores de HCC, tratados pela via IH	150
4.3.9.Perfil de distribuição das células da massa tumoral nas fases do ciclo celular.....	166
4.3.10.As alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos portadores de HCC	168
4.3.11.Determinação do perfil expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de HCC	178
5. DISCUSSÃO	181
6. CONCLUSÕES.....	203
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	206
8. REFERÊNCIAS	208

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABC	Cassete de ligação a ATP
AFC	Alquilfosfocolina
AFTs	fosfolipídios antineoplásicos
AIF	Fator indutor de apoptose
Akt	Proteína quinase B (ou PKB)
ALT	Alanina aminotransferase
APAF-1	Fator de ativação de apoptose 1
Apo3L	Apo3 ligante
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	Promotor de morte associado à Bcl-2
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bax	Proteína x associada à Bcl-2
Bcl-10	<i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
Bcl-2	Proteína- 2 da leucemia/linfoma da célula B
Bcl-w	<i>Bcl-2-like 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl-2 related protein, long isoform</i>
Bcl-XS	<i>Bcl-2 related protein, short isoform</i>
BD®	Becton Dickinson
BH3	Domínio agonista da morte
Bid	Agonista de morte – Domínio de interação de BH3
Bim	<i>Activator subtype of BH3-only proteins</i>
Blk	Proteína exterminadora de interação com Bcl-2
Caspase	Cisteína-aspartato proteases
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD90	<i>Cluster Differentiation 90</i>
CDKs	Ciclina dependente de quinases
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais

CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
c-Kit	Receptor do fator de células-tronco
CHC	Carcinoma Hepatocelular
cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTA	Colest-5-en-3-ol(3 beta)(trimetil amônio) acetato
CTP	Fosfocolina citidiltransferase
D	Coeficiente de difusão
nm	Nanômetros
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>
DC-Chol	3β[N-(n'N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol
DD	Domínios de morte (<i>Death domain</i>)
DED	Domínio efetor de morte
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
Diablo	Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DISC	Complexo indutor de morte
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMRIE	1,2-dimiristoiloxipropil-3- dimetil- brometo de hidroxietil amônio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAC	Cloreto de dioctadecildimetilamônio
DOGS	<i>N,N</i> -dioctadecylamidoglycylspermine
DOSPA	<i>2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium</i>
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DOTMA	1,2-dioleiloxi-3-trimetilamônio-cloropropano
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DR4	Receptor de morte 4

DR5	Receptor de morte 5
ECF	Espectroscopia de Correlação de Fótons
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EPR	Permeabilidade e retenção aumentada (<i>enhanced permeability and retention effect</i>)
FA	Fosfatase Alcalina
FADD	Domínio de morte assoado a FAS
FasL	Fas ligante
FasR	Fas receptor
FasR	Receptor FAS
FDELs	Método de <i>lipossomos vazios liofilizados</i>
fL	Fentolitros
Flt-3	Receptor de tirosina-quinase-3 similar a Fms
FO	Fosfoetanolamina
FO-S	Fosfoetanolamina sintética
g/dL	Gramas por decilitro
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCV	Vírus da hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HefC	Hexadecilfosfocolina
IAP	Fator indutor de apoptose
IC _{50%}	Concentração Inibitória de 50%
IH	Intra-hepática
IP	Intraperitoneal
KB	Carcinoma epidermoide oral humano
KB	Células de carcinoma epidermoide oral humano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LisoFC	Lisofosfatidilcolina
LPA	Modelo de leucemia promielocítica aguda
LUV	vesículas unilamelares grandes
M	Molar
MCP	Processo de morte celular programada

MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
MLV	Lipossomas multilamelares
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
mV	Milivolts
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
nM	Nanomolar
Noxa	<i>Bcl2 homology domain 3 (BH3)-only</i>
°C	Celsius
Omi/HtrA2	Proteína A2 de alta temperatura
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
p/v	Peso/Volume
p21	Proteína 21
p27	Proteína 27
p53	Proteína 53
pAkt	Proteína quinase B fosforilada.
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC	Fosfatidilcolina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PET-Scan	Tomografia por emissão de pósitron
pg	Picogramas
PgP	Glicoproteína P
PH	Domínios de homologia da Pleckstrina
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase

PIK3CA	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
QELS	Espalhamento quase elástico da luz
Raf	RAF proteína quinase serina/treonina
RDW	largura das células vermelha
RNase-A	Ribonuclease A
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
S49	Variante do linfoma de células T de Murino
SM	Esfingomielina
Smac	Segundo ativador mitocôndrial de caspase
Diablo	Proteína de ligação direta ao IAP com baixo PI)
STAT3	Fator de transcrição Transdutor de sinais e ativador de transcrição 3
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
tBid	Bid truncado
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VHB	Vírus da hepatite B
Wnt	Local de integração do vírus do tumor mamário em ratos tipo Wingless
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características do câncer. Adaptado de Negrini et al. (2010).	4
Figura 2	Características do câncer e ordem temporal em que elas aparecem no câncer hereditário (A) e no câncer esporádico (B).	4
Figura 3	Relação dose-dependente com os tipos de morte celular induzidos por alguns agentes tóxicos.	13
Figura 4	Diagrama esquemático das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.	16
Figura 5	Estrutura química da fosfoetanolamina sintética.	17
Figura 6	Representação da organização da bicamada lipídica de um lipossomo, destacando a cabeça polar e a cauda apolar dos lipídeos.	19
Figura 7	Representação dos diferentes tipos de lipossomas com base no tamanho e lamelaridade. Também é ilustrada uma porção da bicamada lipídica com modificações multifuncionais na superfície.	21
Figura 8	Visão geral da representação dos lipídios anfifílicos e catiônicos.	24
Figura 9	Estabelecimento do modelo ortotópico de CHC murino Hepa1c1c7.	38
Figura 10	Resumo dos grupos experimentais.	41
Figura 11	Distribuição de tamanho da formulação lipossomal DODAC/FO-S. O gráfico mostra a correlação da média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A concentração de DODAC 10 mM foi padronizada para todas as amostras. (A) Distribuição da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (2,0 – 37 mM) e DODAC 10 mM vazio, relação ao tempo (T=dias). (B) Distribuição da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM) e DODAC 10 mM vazio, em relação ao tempo (T= dias).	49
Figura 12	Distribuição de tamanho da formulação lipossomal DODAC/FO-S (razão molar 1:1) e DODAC vazio. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. (A) Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 (2,0 – 37 mM), em relação ao tempo (T=dias). (B) Distribuição dos lipossomas DODAC vazios (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias).	50
Figura 13	Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. (A) Potencial zeta dos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S (2,0 - 37 mM) e lipossomas de DODAC 10 mM vazios, em relação ao tempo (T=dias). (B) Potencial zeta dos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S (0,3 – 2,0 mM) e lipossomas de DODAC 10 mM vazios, em relação ao tempo.	52
Figura 14	Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S e DODAC vazios. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. (A) Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias). (B) Potencial zeta dos lipossomas DODAC vazios (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias).	53
Figura 15	Teor de fosfato na formulação lipossomal DODAC/FO-S. Teor de fosfato nos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S 2,0 mM no dia 0 (A) e 40 dias após o preparo (B).	55
Figura 16	Teor de fosfato na formulação lipossomal DODAC/FO-S. Teor de fosfato nos lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM no dia 0 (A) e 40 dias após o preparo (B).	56

- Figura 17** Eletromicrografia representativa dos lipossomas de DODAC vazios e da formulação lipossomal DODAC/FO-S por MEV. As eletromicrografias demonstram a morfologia e a distribuição dos lipossomas de DODAC/FO-S e DODAC vazio (0,3 e 2,0 mM). Lipossomas DODAC vazios com 0,3 mM (A) e 2,0 mM (B). Lipossomas DODAC/FO-S nas concentrações de 0,3 mM (C) e 2,0 mM (D). 58
- Figura 18** Fotomicrografias das análises morfológicas das células de melanoma murino B16F10. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos, que correspondem aos lipossomas associados a fragmentos celulares e corpos apoptóticos (asterisco). 61
- Figura 19** Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazio (0,3 - 2,0 mM). 62
- Figura 20** Fotomicrografias das análises morfológicas das células de HCC murino Hepa1c1c7. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos (asterisco). 63
- Figura 21** Determinação da citotoxicidade em células de HCC murino Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio, durante o período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM). 64
- Figura 22** Fotomicrografias das análises morfológicas das células de melanoma humano Skmel-28. (A) Controle, no qual as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos (asterisco). 65

Figura 23	Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano Skmel-28 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM).	66
Figura 24	Fotomicrografias das análises morfológicas das células endoteliais humanas HUVEC. (A) Controle, no qual observa-se as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM.	68
Figura 25	Determinação da citotoxicidade em células endoteliais humanas HUVEC pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio, pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM).	69
Figura 26	Análise das fases do ciclo celular nas células de melanoma murino B16F10 tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. As células foram expostas a com diferentes concentrações das formulações, por um período de 24 horas. O gráfico mostra a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (A) População de células nas fases Sub-G ₁ e G ₀ /G ₁ ; (B) População de células nas fases S e G ₂ /M.	72
Figura 27	Análise das fases do ciclo celular em células de HCC murino Hepalcl7 tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. As células foram expostas a diferentes concentrações das formulações, por um período de 12 horas. O gráfico mostra a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (A) População de células nas fases Sub-G ₁ e G ₀ /G ₁ ; (B) População de células nas fases S e G ₂ /M.	73
Figura 28	Avaliação do percentual de células nos estágios de apoptose, apoptose tardia e necrose, por citometria de fluxo. As células de HCC murino Hepalcl7 foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC, por um período de 12 horas. (A) Dot plots representativos demonstrando as diferentes populações de células em apoptose (Anexina V), necrose (PI) ou Apoptose tardia (Anexina V/PI). (B) O gráfico de barras demonstra os valores expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.	75
Figura 29	Modulação da expressão do TRAIL receptor-DR4 pela FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, avaliada por citometria de fluxo. As células melanoma murino B16F10 foram tratadas, por um período de 24 horas, com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a	77

	distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4.	
Figura 30	Modulação da atividade da caspase-3 pela FO-S, DODAC e DODAC/FO-S avaliada por citometria de fluxo. As células de melanoma murino B16F10 foram tratadas, por 24 horas, com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase-3 ativa em função das concentrações (mM) dos compostos.	78
Figura 31	Análise da expressão da caspase-8 ativa em células de melanoma murino B16F10. A expressão da caspase-8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase-8 ativa em função das concentrações (mM) dos compostos.	78
Figura 32	Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células de melanoma murino B16F10. A expressão de citocromo c foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo-c no citoplasma.	80
Figura 33	Análise da expressão da proteína p53 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína p53 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína p53 em função das concentrações dos compostos.	83
Figura 34	Análise da expressão da proteína ciclina D1 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína ciclina D1 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína ciclina D1 em função das concentrações dos compostos.	84
Figura 35	Análise da expressão da proteína p21 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína p21 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o	85

nível de expressão da proteína p21 em função das concentrações dos compostos.

- Figura 36** Análise da expressão da proteína p27 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína p27 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína p27 em função das concentrações dos compostos. 86
- Figura 37** Análise da expressão da proteína Bax em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína Bax foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína Bax em função das concentrações dos compostos. 97
- Figura 38** Análise da expressão da proteína Bcl-2 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da proteína Bcl-2 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína Bcl-2 em função das concentrações dos compostos. 88
- Figura 39** Análise da expressão do TRAIL - receptor DR4 em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão do TRAIL - receptor DR4 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4 em função das concentrações dos compostos. 89
- Figura 40** Análise da expressão da caspase 3 ativa em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da caspase -3 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 3 ativa em função das concentrações dos compostos. 90
- Figura 41** Análise da expressão da caspase 8 ativa em células de HCC murino Hepalcl7. A expressão da caspase 8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o 91

	nível de expressão da caspase 8 ativa em função das concentrações dos compostos.	
Figura 42	Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células de HCC murino Hepal1c7. A expressão de citocromo c no citoplasma foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo c no citoplasma em função das concentrações dos compostos.	92
Figura 43	Análise da expressão da proteína CD90 em células de HCC murino Hepal1c7. A expressão da proteína CD90 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do marcador CD90 em função das concentrações dos compostos.	93
Figura 44	Análise da expressão da proteína CD44 em células de HCC murino Hepal1c7. A expressão da proteína CD44 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do marcador CD44 em função das concentrações dos compostos.	94
Figura 45	Análise da expressão do TRAIL - receptor DR4 em células endoteliais normais HUVEC. A expressão do TRAIL - receptor DR4 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4 em função das concentrações dos compostos.	96
Figura 46	Análise da expressão da caspase 3 ativa em células endoteliais normais HUVEC. A expressão da caspase 3 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 3 ativa em função das concentrações dos compostos.	97
Figura 47	Análise da expressão da caspase 8 ativa em endoteliais normais HUVEC. A expressão da caspase 8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o	98

nível de expressão da caspase 8 ativa em função das concentrações dos compostos.

- Figura 48** Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células endoteliais normais HUVEC. A expressão de citocromo c no citoplasma foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células de acordo com a intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo c no citoplasma em função das concentrações dos compostos. 99
- Figura 49** Fotomicrografias dos lipossomas DODAC/FO-S/Dil em células HCC murino hep1c1c7, analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com a formulação lipossomal (0,3 e 2,0 mM) contendo o marcador fluorescente durante os tempos de 3 e 6 horas. 101
- Figura 50** Fotomicrografias das células de HCC murino Hep1c1c7 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde) e o núcleo com DAPI (azul), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período 6 horas. Controle (A, B); células tratadas com a FO-S 0,3 mM (C, D); FO-S 2,0 mM (E, F); DODAC/FO-S mM (G, H); DODAC/FO-S 2,0 mM (I, J); DODAC 0,3 mM (L, M); DODAC 2,0 mM (N, O). 103
- Figura 51** Fotomicrografias das células de HCC murino Hep1c1c7 com lisossomos marcados com laranja de acridina (vermelho) e o núcleo com DAPI (azul), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período 6 horas. Controle (A); tratamentos com FO-S 2,0 mM (B, C); DODAC/FO-S 2,0 mM (D e E) e DODAC 2,0 mM (F). 105
- Figura 52** Fotomicrografias da expressão da caspase 3 ativa em células de melanoma murino B16F10, analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período de 24 horas. (A) Células do grupo controle, as quais não apresentam marcação para a caspase 3 ativa; (B, C) Células tratadas com FO-S 0,3 e 2,0 mM, respectivamente; (D, E) Células tratadas com DODAC 0,3 e 2,0 mM, respectivamente; (F, G) Células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM, respectivamente. 107
- Figura 53** Eletromicrografia representativa das células de melanoma murino B16F10 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, analisadas por MEV. As células foram tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante 24 horas, e posteriormente analisadas por MEV. (A, B, C) Células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 0,3 mM. (D, E, F) Células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM. Observa-se, 24 horas após o tratamento, agregados lipídicos aderidos à superfície da membrana celular (seta), alguns com morfologia esférica (seta vazada). Nota-se a 109

	perda da morfologia celular (E), retração citoplasmática e presença de corpos apoptóticos (cabeça da seta).	
Figura 54	Análise da taxa de probabilidade de sobrevida global dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 89,74 mg/kg e 45 mg/kg; FO-S 8,75 mg/kg e DODAC 36,25 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas (5 dias), durante 20 dias.	111
Figura 55	Determinação do peso dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg, DODAC 36,24 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias.	113
Figura 56	Determinação do peso dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg, DODAC 36,24 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. Após o término do protocolo terapêutico, os órgãos foram coletados e pesados. Pesos do (A) coração, fígado e pulmão; (B) linfonodo, rins e baço.	115
Figura 57	Determinação das concentrações séricas de ureia nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de ureia.	118
Figura 58	Determinação das concentrações séricas de creatinina nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de creatinina.	119
Figura 59	Determinação das concentrações séricas de FA nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de FA.	120
Figura 60	Determinação das concentrações séricas de AST nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de AST.	121
Figura 61	Determinação das concentrações séricas de ALT nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de AST.	122

Figura 62	Contagem de plaquetas dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D).	126
Figura 63	Contagem de eritrócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	127
Figura 64	Contagem de hematócrito dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	128
Figura 65	Análise do volume corpuscular médio dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	129
Figura 66	Análise da hemoglobina corpuscular média dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	130
Figura 67	Contagem da concentração hemoglobina corpuscular média dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	131
Figura 68	Avaliação da distribuição da largura das células vermelhas dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC murino. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	132
Figura 69	Contagem de leucócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	135

Figura 70	Contagem de linfócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	136
Figura 71	Contagem de monócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	137
Figura 72	Contagem de granulócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D)	138
Figura 73	Fotodocumentação do aspecto macroscópico dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, pertencentes aos grupos controle tumoral e DODAC/FO-S 45 mg/kg IP e IH. Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram necropsiados para a coleta dos órgãos e posterior avaliação macroscópica. (A) Registro ilustrativo da condição corpórea do animal do controle tumoral; linfonodo inguinal apresentou aumento (seta). (B, C) Aspecto macroscópico da região abdominal do grupo DODAC/FO-S IP; foi possível observar o fígado sem alterações evidentes (asterisco) e lipossomas presentes na cavidade abdominal e no peritônio (seta); (D, E) Aspecto macroscópico da região abdominal dos animais do grupo DODAC/FO-S IH;	140
Figura 74	Fotodocumentação do aspecto morfológico do fígado camundongos C57BL/6J portadores de HCC murino, pertencentes aos grupos controle tumoral, diluente IH e tratado com DODAC/FO-S IH. Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram necropsiados e o fígado foi coletado. Registro comparativo do aspecto morfológico do fígado dos animais dos grupos diluentes IH (A); controle tumoral (B) e DODAC/FO-S pela via IH (C).	141
Figura 75	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 0 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	144
Figura 76	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 2 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	145
Figura 77	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 24 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	146

Figura 78	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC murino, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 48 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	147
Figura 79	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC murino, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 72 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	148
Figura 80	Fotodocumentação da localização macroscópica dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados pela via IP, no intervalo de 72 horas.	149
Figura 81	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 0 hora, conjugados com o traçador fluorescente Dil	152
Figura 82	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 2 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	153
Figura 83	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 3 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	154
Figura 84	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 24 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	155
Figura 85	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 48 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	156
Figura 86	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 72 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	157
Figura 87	Fotodocumentação da localização macroscópica dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados pela via IH, no intervalo de 72 horas. Os animais foram eutanasiados e necropsiados para a análise da localização dos lipossomas fluorescentes. (A) Fluorescência evidente na região ventral do animal, no interior da cavidade abdominal, correspondente a localização anatômica do fígado. (B) Lipossomas aderidos ao fígado. (C) Fígado com alteração na coloração devido a presença de lipossomas. Lipossomas (seta).	158
Figura 88	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 6 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	159

Figura 89	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 8 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	160
Figura 90	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 9 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	161
Figura 91	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 12 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	162
Figura 92	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 14 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	163
Figura 93	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 16 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	164
Figura 94	Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 20 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil.	165
Figura 95	Análise das fases do ciclo celular das populações de células dos fragmentos dos fígados dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg ou FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, durante 20 dias, no intervalo de 120 horas. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e necropsiados e fragmentos do tecido hepático/massa tumoral (~50 mg) foram coletados para avaliação das fases do ciclo celular. Populações de células nas fases Sub-G ₁ (A); G ₀ /G ₁ (B); S (C) e G ₂ /M (D).	167
Figura 96	Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J do grupo diluente IP. Nestes animais, não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluente dos compostos, no volume de 100 µL, pela via IP. (A-D) Parênquima hepática; apresentando arquitetura normal, com todos os elementos celulares que o constitui. VP= veia porta; VCL = veia centro lobular; hepatócitos (seta); sinusóides (seta vazada).	169
Figura 97	Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J do grupo diluente IH. Nestes animais, não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluente dos compostos, no volume de 100 µL, pela via IH. (A-D) Parênquima hepática; apresentando arquitetura normal, com todos os elementos celulares que o constitui. VP = veia porta; hepatócitos (seta); sinusóides (seta vazada).	170
Figura 98	Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J grupo controle tumoral. Os animais	171

deste grupo não receberam tratamento. (A-D) Parênquima hepático demonstrando um hepatocarcinoma bem estabelecido, com múltiplos focos de formação de massa tumoral (asterisco), alteração da arquitetura do parênquima, dilatação sinusoidal (seta) e presença de células com contornos irregulares e núcleo hipercromático (seta vazada).

- Figura 99** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com DODAC/FO-S IP. Os camundongos receberam DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático apresentando diversas áreas de necrose e redução das áreas de focos de massa tumoral. Tumefação dos hepatócitos (seta); áreas de necrose (seta vazada); massa tumoral (asterisco). 172
- Figura 100** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com DODAC/FO-S IH. Os camundongos receberam DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepática; apresentando diversas áreas de necrose (asterisco). 173
- Figura 101** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com FO-S IP. Os camundongos receberam FO-S 8,75 mg/kg, pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático, apresentando diminuição da formação de massa tumoral, em relação ao grupo controle tumoral. Não foi possível observar áreas evidentes de necrose. Massa tumoral (asterisco). 174
- Figura 102** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com FO-S IH. Os camundongos receberam FO-S 8,75 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático, apresentando diminuição da formação de massa tumoral, em relação ao grupo controle tumoral, e várias áreas de necrose (asterisco). 175
- Figura 103** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com DODAC IP. Os camundongos receberam DODAC 36,25 mg/kg pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático, apresentando alterações semelhantes as evidenciadas no grupo controle tumoral, como dilatação sinusoidal (seta) e a formação de massa tumoral (asterisco). 176
- Figura 104** Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de HCC, tratados com DODAC IH. Os camundongos receberam DODAC 36,25 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático, apresentando alterações semelhantes as evidenciadas no grupo controle tumoral, como dilatação sinusoidal (seta) e a formação de massa tumoral (asterisco). 177

- Figura 105** Análise do perfil de expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de HCC. Estas avaliações foram realizadas nos grupos controle tumoral, diluente IH, FO-S 8,75 mg/kg IH e DODAC/FO-S 45 mg/kg IH. Expressão gênica relativa (mRNA) da p53 (A) caspase 8 (B) caspase 3 (C). 179
- Figura 106** Análise do perfil de expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de HCC. Estas avaliações foram realizadas nos grupos controle tumoral, diluente IH, FO-S 8,75 mg/kg IH e DODAC/FO-S 45 mg/kg IH. Expressão gênica relativa (mRNA) da ciclina B1 (A), Bax (B) Bcl-2 (C). 180

RESUMO

Luna ACL. *Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética no modelo de hepatocarcinoma* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A fosfoetanolamina sintética (FO-S), um fosfomonoéster, apresenta relevante atividade antitumoral. Contudo, a utilização de um carreador para encapsular a FO-S em lipossomas poderia favorecer a sua disponibilidade no microambiente tumoral, possibilitando o aumento da sua eficácia. Desta forma, o presente estudo avaliou a eficiência de encapsulamento da FO-S em lipossomas de DODAC e o seu potencial antitumoral. Os lipossomas foram preparados por ultrasonicação e caracterizados físico-quimicamente. A citotoxicidade foi avaliada nas linhagens tumorais B16F10 (melanoma murino), Hepa1c1c7 (hepatocarcinoma murino) e Skmel-28 (melanoma humano) e nas células normais HUVEC, após o tratamento com diferentes concentrações dos lipossomas DODAC/FO-S, no tempo de 24 horas. A internalização dos lipossomas e o potencial elétrico mitocondrial foram analisados por microscopia confocal a laser. Adicionalmente, a expressão das proteínas caspases 3 e 8 ativas, receptor DR4, citocromo c, p53, p21, Bax, p27, CD44, CD90, Bcl-2 e ciclina D1 foi quantificada por citometria de fluxo. Para os estudos *in vivo*, os camundongos C57BL/6J portadores de hepatocarcinoma foram tratados com FO-S, DODAC/FO-S e DODAC, pelas vias intraperitoneal (IP) e intra-hepática (IH), durante 20 dias. Os resultados demonstraram que os lipossomas apresentaram aspecto esférico e alta eficiência de encapsulação da FO-S, como também promoveram maior citotoxicidade nas linhagens tumorais estudadas, em comparação com FO-S. Além disto, nas células B16F10 e Hepa1c1c7, ocasionou parada nas fases S e G₂/M do ciclo celular. A linhagem Hepa1c1c7 foi a mais sensível ao tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S, os quais foram internalizados em até 6 horas e promoveram a diminuição de CD90, CD44, ciclina D1 e Bcl-2, o aumento de p53, p21, p27, Bax e caspases 8 e 3 ativas e a liberação do citocromo c. O aumento significativo das caspases 8 e 3 ativas, expressão do receptor DR4 e a liberação do citocromo c também ocorreu nas linhagens B16F10 e Skmel-28. Os resultados *in vivo* mostraram que os lipossomas DODAC/FO-S e a FO-S não induziram hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e caquexia. Os lipossomas DODAC/FO-S não ocasionaram mielossupressão e hemólise, apresentando menor toxicidade em relação a FO-S, administrada pelas vias IP e IH. Além disto, os tratamentos com DODAC/FO-S (IH) e FO-S (IH e IP) foram efetivos em diminuir o número de células na fase S. Contudo, apenas os lipossomas DODAC/FO-S (IH) reduziram significativamente os focos tumorais, aumentando as áreas de necrose, promovendo também o aumento da expressão gênica da p53, ciclina B1 e caspases 8 e 3. O conjunto dos resultados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a formulação lipossomal DODAC/FO-S foi capaz de maximizar os efeitos antitumorais da FO-S, ativando as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose.

Descritores: lipossomas; carcinoma hepatocelular; nanocarreadores; fosfoetanolamina sintética; fosfolipídios antitumorais.

SUMMARY

Luna ACL. *Potential antitumor of the DODAC/PHO-S liposomal formulation in the model of hepatocellular carcinoma* [Tesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Synthetic phosphoethanolamine (PHO-S) - a phosphomonoester - has shown relevant anticancer effects. However, the utilization of a carrier to encapsulate the PHO-S in liposomes can maximize its availability in the tumor microenvironment, allowing an increase in its effectiveness. Thus, the present study has evaluated efficiency of PHO-S encapsulation in DODAC liposomes and its antitumor potential. The liposomes were prepared by ultrasonication and physico-chemically characterized. The cytotoxic effects were evaluated on B16F10 cells (murine melanoma), Hepa1c1c7 cells (murine hepatocellular carcinoma), Skmel-28 (human melanoma) and in endothelial cells HUVEC, after treatment with DODAC/PHO-S liposomes at different concentrations for 24 hours. The internalization of the liposomes and mitochondrial electrical potential were analyzed by confocal laser microscopy. Additionally, the expression of active caspases 3 and 8, receptor DR4, cytochrome c, p53, p21, Bax, p27, CD44, CD90, Bcl-2 and cyclin D1 proteins was quantified by flow cytometry. For *in vivo* studies, C57BL/6J mice with hepatocellular carcinoma were treated with PHO-S, DODAC/PHO-S and DODAC, by intraperitoneal (IP) and intratumoral (IT) routes for 20 days. The results demonstrated that liposomes presented spherical aspect and high PHO-S encapsulation efficiency, as also promoted high cytotoxic effect - compared with PHO-S. Furthermore, in B16F10 and Hepa1c1c7 cells, the liposomes induced S and G2/M cell cycle arrest. Hepa1c1c7 cells showed greater sensitivity to the DODAC/PHO-S formulation, which were internalized until 6 hours and promoted a decrease in the expression of CD90, CD44, cyclin D1 and Bcl-2, an increase of p53, p21, p27, Bax and active caspases 8 and 3 and the liberation of cytochrome c. The significant increase in the expression of active caspases 3 and 8, DR4 receptor and liberation of cytochrome c also occurred in B16F10 and Skmel-28 cells. *In vivo* results showed that DODAC/PHO-S liposomes and PHO-S did not induce nephrotoxicity, hepatotoxicity and cachexia. DODAC/PHO-S liposomes did not cause myelosuppression and hemolysis, presenting lower toxicity in relation to PHO-S - when administered by IP and IT routes. Moreover, treatment with DODAC/PHO-S (IT) and PHO-S (IT and IP) effectively decreased the number of cells in S phase. However, only DODAC/PHO-S liposomes significantly reduced the number of tumor foci, increasing area of necrosis, and also promoting an increase in gene expression of p53, cyclin B1 and caspases 8 and 3. The set of *in vitro* and *in vivo* results demonstrated that DODAC/PHO-S liposomal formulation was capable of maximizing the PHO-S antitumor effects, activating the intrinsic and extrinsic pathways of the apoptosis.

Descriptors: liposomes; hepatocellular carcinoma; nanocarriers; synthetic phosphoethanolamine; antitumor phospholipids.

1.INTRODUÇÃO

1.1.Câncer

Nas últimas décadas houve avanços significativos na compreensão dos processos patológicos, nos métodos de diagnósticos, na disponibilização de novos tratamentos e na prevenção do câncer. Apesar destes progressos na área oncológica, o câncer ainda é uma das principais causas de morte em todo o mundo. A Global Burden of Disease Cancer Collaboration estima que, em 2015, ocorreram 17,5 milhões de casos de câncer e 8,7 milhões de mortes, com previsão de aumento para 23,3 milhões de novos casos até 2030 (Bray et al., 2012; Biemar e Foti, 2013). Entre 2005 e 2015, a incidência de casos aumentou 33%, dos quais 12,6% foram em virtude do crescimento populacional, 16,4% em função do envelhecimento da população e 4,1% devido ao aumento das taxas de incidência por idade (Fitzmaurice et al., 2017). A Sociedade Americana do Câncer e a União Internacional Contra o Câncer indicam que aproximadamente 7 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente em todo o mundo, o que torna essa doença responsável por 12,5% dos óbitos mundiais (Aggarwal et al., 2009)

No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, que também é válida para 2017, apontou a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, os quais foram responsáveis por 190 mil óbitos por ano, reforçando a magnitude deste problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (180 mil novos casos) foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelo câncer de próstata (61 mil) e pulmão (8,1%) em homens e mama (28,1%) e intestino (8,6%), nas mulheres (INCA, 2016).

Câncer é um termo genérico utilizado para um conjunto de mais de 200 doenças caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado. Outros termos empregados são tumores malignos e neoplasias. O câncer não é uma doença moderna; contudo, a incidência tem aumentado, principalmente, devido a elevação da expectativa de vida (Galuschka et al., 2017).

O processo de tumorigênese é composto por múltiplas etapas, as quais refletem alterações genéticas que surgem tanto da ativação de proto-oncogenes (os quais controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular) em oncogenes (formas alteradas dos proto-oncogenes), quanto de mutações que levam a perda da função e/ou inativação dos genes supressores tumorais, relacionados com o controle do crescimento celular desregulado e a ativação de vias de reparo do DNA. Mecanismos epigenéticos também contribuem para a alteração da expressão destes genes; sendo assim,

o câncer é uma doença multigenética que surge como resultado de mutações e alterações epigenéticas, associadas a redes complexas de sinalização celular (Lee e Muller, 2010; Santarius et al., 2010; Goodson et al., 2015).

Os principais mecanismos que participam da ativação dos proto-oncogenes em oncogenes envolvem mutação, amplificação gênica ou rearranjo cromossômico. Entre os oncogenes estão os que codificam fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, proteínas transdutoras de sinais, fatores de transcrição e proteínas antiapoptóticas. Os genes supressores tumorais sofrem mutações deletérias recessivas. Dentre estes genes, destacam-se aqueles que codificam proteínas que regulam os pontos de checagem do ciclo celular, proteínas apoptóticas e enzimas envolvidas no reparo do DNA (Hudson et al., 2010; Fabbri, 2013).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram as alterações funcionais essenciais que ocorrem durante a tumorigênese, as quais foram identificadas como sendo as características do câncer: autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão aos mecanismos de morte por apoptose e senescência, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão dos tecidos e capacidade de metástase (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). No complexo processo de tumorigênese, as interações celulares que acontecem no microambiente tumoral também exercem um papel crucial na progressão tumoral (Sonnenschein e Soto, 2013).

Características adicionais têm sido incluídas por contribuírem de forma relevante para a tumorigênese. São elas: instabilidade genômica, habilidade de escapar do sistema de vigilância imunológica, capacidade de crescer em um ambiente com inflamação crônica e a reprogramação do metabolismo celular (Negrini et al., 2010; Cavallo et al., 2011; Hanahan e Weinberg, 2011). Ainda, outras cinco características têm sido propostas, as quais diferem das descritas por Hanahan e Weinberg (2011) no sentido de não representarem capacidades funcionais adquiridas, mas por definirem o estado das células tumorais em detrimento as condições de estresse celular: danos ao DNA e estresse durante a replicação do DNA, estresse metabólico, mitótico, proteotóxico e oxidativo, sendo estas duas últimas consideradas características secundárias (Luo et al., 2009; Negrini et al., 2010; Goodson et al., 2015) (Figura 1).

A instabilidade genômica foi inicialmente separada das características do câncer por não representar uma capacidade biológica funcional da célula tumoral, mas por

direcionar o surgimento destas. Entretanto, atualmente tem sido inclusa como uma característica marcante do câncer, pois está presente em todos os estágios da doença, desde as lesões pré-tumorais até nos cânceres em estágio avançado (Negrini et al., 2010; Hanahan e Weinberg, 2011; Goodson et al., 2015). Nos cânceres hereditários, a instabilidade genômica é provavelmente o evento inicial que facilita o estabelecimento das outras características do tumor. Nos cânceres esporádicos e não hereditários, a desregulação dos genes envolvidos nas vias de crescimento celular pode ser o evento inicial, gerando danos ao DNA que conduzem a instabilidade genômica e a evasão dos mecanismos de morte celular (Figura 2) (Zhivotovsky e Orrenius, 2010; Orrenius et al., 2011; Patel et al., 2013).

Figura 1: Características do câncer. Adaptado de Negrini et al. (2010).

A: Câncer hereditário

B: Câncer esporádico

Figura 2: Características do câncer e ordem temporal em que elas aparecem no câncer hereditário (A) e no câncer esporádico (B). Adaptado de Negrini et al. (2010).

A supressão dos mecanismos apoptóticos está envolvida tanto no processo de tumorigênese e manutenção do fenótipo maligno quanto no desenvolvimento de resistência a drogas (Fulda et al., 2010; Baguley, 2011; Portt et al., 2011; Ouyang et al., 2012; Housman et al., 2014). A apoptose é uma forma de morte celular programada envolvida na remoção de células indesejadas, geneticamente danificadas ou senescentes, sendo fundamental para a manutenção da homeostase dos tecidos (Sun e Peng, 2009; Plati et al., 2011; Ocker e Höpfner, 2012).

O desenvolvimento do fenótipo de resistência a múltiplas drogas é um dos principais mecanismos responsáveis por falhas no tratamento do câncer, bem como pela recidiva da doença (Lage, 2008; Fletcher et al., 2010; Gillet e Gottesman, 2010). A estratégia de se utilizar várias drogas citotóxicas que possuam diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação distintos não é a solução para este problema porque muitos tumores são capazes de se tornarem resistentes, de forma simultânea, a diversos quimioterápicos. Este fenômeno é conhecido como MDR (resistência a múltiplas drogas), sendo conferido por uma série de mecanismos celulares, tais como: defeitos nas vias de morte celular; particularmente a apoptose, aumento nos mecanismos de detoxificação, alterações nos sistemas de reparo do DNA, menor disponibilidade da droga no seu sítio de ação devido a questões farmacocinéticas e superexpressão de bombas de efluxo (Lage, 2008; Gillet e Gottesman, 2010; Zahreddine e Borden, 2013; Rueff e Rodrigues, 2016).

Um dos mecanismos de MDR mais comuns e bem estudados envolve a superexpressão dos transportadores membros da família ABC (*ATP binding cassette*), os quais consistem em uma ampla família de proteínas transmembranares (Wu et al., 2008; Choi e Yu, 2014). A glicoproteína P (PgP) é o membro melhor caracterizado na conferência do fenótipo MDR, no qual vários quimioterápicos utilizados na clínica são conhecidos por serem substratos desta bomba de efluxo (Callaghan et al., 2008). Uma das estratégias para superar o fenótipo MDR tem sido o uso de agentes moduladores, que atuam inibindo a atividade dos transportadores envolvidos no fenótipo MDR (Fletcher et al., 2010; Lee e Muller, 2010; Zahreddine e Borden, 2013; Rueff e Rodrigues, 2016).

1.2.Carcinoma Hepatocelular (CHC)

O CHC é um tumor maligno primário, derivado das principais células do fígado - os hepatócitos, consistindo em uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer

em todo o mundo, na qual os seus portadores apresentam sobrevida média de 6 a 20 meses (Byam et al., 2013). Nos Estados Unidos, o CHC é a nona principal causa de morte por câncer (CDC, 2010; Balogh et al., 2016), com expectativa do aumento da incidência à medida que a hepatite C, esteatose, esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e obesidade se tornam mais prevalentes (Balogh et al., 2016). No mundo, o CHC é a sexta neoplasia mais frequente, correspondendo a terceira causa de morte atribuída por câncer, e sendo mais frequente nos homens, com maior incidência na Ásia Oriental e do Sul, África Central e Ocidental, Melanésia e Micronésia /Polinésia (Waller et al., 2015). As altas taxas de CHC em partes da Ásia e África subsaariana são o reflexo da elevada prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB), com 5% da população nessas regiões infectada cronicamente com o vírus (Ferlay et al., 2010; Balogh et al., 2016). O número de mortes tem aumento globalmente; nos Estados Unidos, o número tem dobrado nos últimos 20 anos (Trojan et al., 2016).

A fisiopatologia do CHC é um tema em evolução e parece ser multifatorial. Igualmente aos demais cânceres, o CHC surge a partir de mutações em determinados genes (Waller et al., 2015). Em 1981, após Beasley e colaboradores correlacionarem o VHB ao desenvolvimento de CHC, achou-se que a causa deste tipo de tumor havia sido identificada (Beasley et al., 1981). Em seguida, outras pesquisas correlacionaram a etiologia da cirrose adjacente ao aparecimento do CHC. Estudos recentes têm mostrado uma ligação entre síndromes metabólicas e doenças hepáticas não alcoólicas com o aparecimento do CHC (Bruix et al., 2011; Bruix et al., 2014; Bruix et al., 2016).

O CHC surge predominantemente no fígado cirrótico, no qual a inflamação recorrente ocorre juntamente com fibrogênese, predispondo o surgimento de displasia no fígado e posterior transformação maligna (Block et al., 2003; Waller et al., 2015). Dessa maneira, as doenças hepáticas crônicas e a cirrose permanecem como os fatores de risco mais determinantes para o desenvolvimento do CHC - a hepatite viral e a ingestão excessiva de álcool são os principais fatores de risco em todo o mundo (Balogh et al., 2016).

A hepatite viral crônica pode desencadear a cirrose e, posteriormente, o surgimento do CHC. As hepatites B e C são as causas mais comuns de hepatite crônica no mundo. O VHB é composto por uma molécula de DNA circular de cadeia dupla, podendo apresentar oito genótipos (A a H). O vírus é transmitido por intermédio de transfusões de sangue contaminado, injeções intravenosas e contato sexual. A transmissão vertical da mãe para

o feto é a principal causa de infecção pelo VHB em todo o mundo. Os portadores de VHB apresentam um risco de desenvolvimento de CHC de 10-25%, ao longo da vida. Ao contrário de outras causas de hepatite crônica, a infecção por VHB é a única em que pode haver o desenvolvimento de CHC sem evidência de cirrose (Bruix et al., 2011; Bruix et al., 2014; Crissien e Frenette, 2014; Balogh et al., 2016; Bruix et al., 2016).

O vírus da hepatite C (HCV) é constituído por RNA de fita simples, com alta variabilidade genética, havendo seis genótipos diferentes de HCV isolados (Bostan e Mahmood, 2010). Um percentual de 80% dos pacientes infectados com HVC evoluem para hepatite crônica e aproximadamente 20% desenvolvem cirrose (Asham et al., 2013). Nestes casos, o desenvolvimento para o CHC é quase que, exclusivamente, uma consequência do estabelecimento de cirrose. A infecção dupla por HBV e HCV em pacientes cirróticos aumenta o risco de desenvolvimento de CHC em 165%, em comparação com 17% para hepatite C e 23% para a hepatite B (Gao et al., 2013; Crissien e Frenette, 2014).

O consumo de álcool continua a ser um fator de risco importante para o desenvolvimento de CHC. A relação entre álcool e doença hepática está correlacionada com a quantidade de álcool consumida ao longo da vida, sendo o uso intenso de álcool o principal fator de risco para o desenvolvimento de CHC (Batey et al., 1992; Balogh et al., 2016).

Em relação a diabetes e obesidade, 70% dos pacientes portadores destas doenças e com mais de 50 anos são propensos para desenvolver NASH, com fibrose avançada (Rinella, 2015). Patologias crônicas, como diabetes mellitus e obesidade, aumentam o risco de CHC. Pacientes com diabetes têm entre 1,8 e 4 vezes maior risco de desenvolver CHC (Wong et al., 2014).

A obesidade é um fator associado a muitas doenças hepatobiliares, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), esteatose e cirrose criptogênica, que podem progredir para o CHC (Calle et al., 2003; Reddy e Rao, 2006). A obesidade em si aumenta o risco de CHC em 1,5 a 4 vezes. O risco relativo de CHC é de 117% para indivíduos com sobrepeso e 189% para pacientes obesos (Larsson e Wolk, 2007; Waller et al., 2015; Balogh et al., 2016).

Entre as proteínas e vias que estão afetadas durante a hepatocarcinogênese, a p53, PIK3CA e Wnt/ β -catenina estão frequentemente mutadas em pacientes com CHC. Duas vias da diferenciação celular, Wnt- β -catenina e Hedgehog, aparecem frequentemente

alteradas. O aumento da ativação da via Wnt está associado a adenomas pré-neoplásicos com grandes chances de transformação maligna (Waller et al., 2015). Calvisi et al. (2011) demonstraram que a elevação da expressão da forma ativada de Akt, em fígados de camundongos, induz a lipogênese e ao desenvolvimento de CHC (Calvisi et al., 2011).

Os tratamentos considerados curativos e que estão correlacionados com um bom prognóstico, como ressecção hepática e transplante hepático ortotópico, estão limitados ao diagnóstico precoce (Kim et al., 2016). Os pacientes portadores de CHC com nódulo único ou com até 3 nódulos ≤ 3 cm são classificados com câncer precoce e podem se beneficiar da ressecção, transplante e ablação. Os pacientes em estágio intermediário podem se favorecer da quimioterapia (Bruix et al., 2016).

Em caso de CHC avançado, o Sorafenib é o tratamento indicado e aprovado, sendo considerado a terapia padrão. Este fármaco é um inibidor da serina/treonina quinase Raf e de receptores tirosina quinase associados com os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) 2 e 3, receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) β , Flt-3 e c-Kit e outras vias de sinalização, incluindo STAT3 (Shaaban et al., 2014; Kuczyński et al., 2015). Apesar dos efeitos antitumorais, estudos clínicos de fase III randomizados com pacientes portadores de CHC avançados demonstraram que o tratamento com o Sorafenib promoveu o aumento da sobrevida global em apenas 2,8 a 2,3 meses (Llovet et al., 2008; Cheng et al., 2009).

Em um estudo recente, no qual se utilizou o modelo de xenográfico de CHC Hep3B-hCG em camundongos atímicos, foi demonstrado que o tratamento com o Sorafenib, com escalonamento entre as doses de 30 e 60 mg/kg, melhorou o efeito antitumoral; entretanto, diminuiu a sobrevivência devido à perda excessiva de peso corporal (Kuczyński et al., 2015). Diante dos fatores limitantes do tratamento do CHC em estágio avançado, novos agentes terapêuticos são necessários, afim de maximizar a eficácia antitumoral e diminuir os efeitos adversos.

1.3.Desenvolvimento de fosfolipídios antineoplásicos (AFTs)

Os AFTs têm surgido como novos agentes antitumorais promissores, que apresentam propriedades antiproliferativas e não possuem como alvo o DNA, mas atuam modificando o *turnover* na membrana celular e induzindo morte por apoptose, com alta seletividade para as células tumorais (Ríos-Marco et al., 2011; Marco et al., 2014). A

edelfosina, ilmofofina, miltefosina, perifosina, erucilfosfocolina e erufosina consistem nos representantes desta nova classe de agentes antitumorais, os quais são estruturalmente relacionados, sendo essencialmente constituídos por uma longa cadeia de hidrocarboneto apolares. Estes compostos podem facilmente ser inseridos na bicamada lipídica da membrana celular e, por apresentarem propriedades de detergente, eles mesmos podem causar a lise celular, em altas concentrações (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij, 2013; Marco et al., 2014; Ríos-Marco et al., 2017).

Em 1960, um grupo de pesquisadores composto por Eibl, Arnold, Weltzien e Westphal desenvolveram, pela primeira vez, análogos metabolicamente estáveis da lisofosfatidilcolina (lisoFC), em Friburgo na Alemanha. Esta primeira observação da possível obtenção de lisoFC na forma sintética possibilitou sua utilização *in vitro* e *in vivo* para os estudos de seus efeitos sobre a modulação do sistema imunológico (Eibl et al., 1967; Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij, 2013).

No final da década de 60, Hansjörg Eibl substituiu quimicamente a ligação éster por éter na região que conecta o glicerol à cadeia de hidrocarbonetos, tornando as estruturas análogas resistentes às enzimas acetiltransferase e lisofosfolipase (Eibl et al., 1967). Surpreendentemente, Munder e colaboradores descobriram que alguns destes éteres lipídicos exerciam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, de forma bastante seletiva (Andreesen et al., 1978; Munder et al., 1980). Entre estes análogos sintéticos, o 1-octadecil-2-metilfosforilcolina (ET-18- OCH₃; edelfosina) demonstrou ser um composto com ampla atividade antitumoral, tornando-se rapidamente o principal protótipo da classe para a elaboração de novos éteres derivados. A principal aplicação da edelfosina, na prática clínica, é no tratamento de leucemias agudas, tanto mieloides quanto linfoides, nas quais a sua utilização promove apoptose das células leucêmicas (Vogler et al., 1996; Mollinedo et al., 2010; Van Blitterswijk e Verheij, 2013; Ríos-Marco et al., 2017).

Outros éteres análogos da lysoPC foram sintetizados, partindo-se da edelfosina como protótipo para a obtenção de agentes antitumorais promissores. Estes lipídeos antitumorais sintéticos podem ser divididos em dois grandes subtipos. O primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolípídios, coletivamente chamados de éter lipídeos antitumorais ou análogos alquilfosfolípídeos antitumorais. O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina (AFC), que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo composta por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, tendo

como principal protótipo representante a hexadecilfosfocolina (HefC; Miltefosina) (Giantonio et al., 2004; Busto et al., 2007; Ríos-Marco et al., 2011; Ríos-Marco et al., 2017).

1.4. Mecanismo de ação dos AFTs

Os AFTs são modificadores da resposta biológica. O mecanismo de ação dos AFTs difere dos quimioterápicos clássicos, tendo como alvo a membrana celular, em vez do DNA. A internalização destes compostos não ocorre por um mecanismo único, mas são propostos diferentes processos para tal finalidade (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij 2013). O alvo dos AFTs pode estar localizado na membrana plasmática, bem como no interior da célula (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij, 2013).

Estudos mostram que em linhagem de linfoma de rato S49 e nas células HeLa, os AFTs são internalizados via *lipids rafts* por endocitose, de modo que o bloqueio desta via impede a sua captação e toxicidade (Van Der Luit et al., 2003; Van Der Luit et al., 2007). No entanto, em outras linhagens celulares, como nas células de carcinoma epidermoide oral humano (KB), a absorção de AFTs envolve um mecanismo independente dos *lipids rafts*, sendo um processo provavelmente mediado pela translocase de aminofosfolipídeo (Muñoz-Martínez et al., 2008; Ríos-Marco et al., 2017). Dessa maneira, pelo menos dois mecanismos diferentes são relatados para a internalização dos AFTs; contudo, mais estudos estão sendo conduzidos para elucidar este processo (Ríos-Marco et al., 2017).

Os AFTs interferem no *turnover* dos fosfolipídios de membrana, afetando, portanto, a geração de segundos mensageiros, como ácido fosfatídico, diacilglicerol e fosfoinositídeo. Também podem modificar a propriedade física das membranas. Tais alterações seriam as responsáveis pelo estresse celular, que culminaria na indução da morte celular por apoptose (Sprong et al., 2001; Van Blitterswijk e Verheij, 2013).

Estudos mostram que a miltelfosina promove alterações específicas no metabolismo dos fosfolipídios, interferindo na transdução de sinais baseada em lipídeos e na biossíntese de fosfolipídios (Van Blitterswijk et al., 2009). Detmar et al. (1994) sugeriram que os efeitos antiproliferativos da miltelfosina estão relacionados com a inibição da biossíntese da fosfatidilcolina (PC), mediada pela inativação da enzima chave neste processo, a CTP (fosfocolina citidiltransferase), levando a translocação desta

enzima das membranas para o citosol, onde ela encontra-se inativa. Estudos mais recentes demonstraram que a mitelfosina causa uma redução na biossíntese de PC por alterar a atividade da CTP (Jiménez-López et al., 2010; Ríos-Marco et al., 2011; Marco et al., 2014; Ríos-Marco et al., 2017).

O bloqueio da CTP pelos AFTs levaria à inibição da síntese da fosfatidilcolina e do diacilglicerol, catalisada pela enzima esfingomielina sintase. Esta última está envolvida no metabolismo da esfingomielina e da ceramida, promovendo a conversão de ceramida para esfingomielina na rede trans-golgi. Com a redução da sua atividade ocorreria acúmulo de ceramida, uma molécula comumente associada à indução de apoptose (Huang et al., 2011).

A miltefosine também interfere no metabolismo dos esfingolipídios, impedindo a formação de esfingomielina (SM) e promovendo o acúmulo intracelular de ceramida. (Jiménez-López et al., 2006). Contudo, Gills et al. (2012) mostraram que o tratamento prolongado com perifosine e análogos éter lipídicos de fosfatidilinositol levaram à morte celular devido ao acúmulo de ceramida, por meio da ativação direta de esfingomielinase (Gills et al., 2012).

Os AFTs também podem interferir no transporte e metabolismo intracelular de colesterol, sendo este efeito relevante na alteração da homeostase do colesterol. O tratamento das células HepG2 com a miltefosine impediu a esterificação do colesterol, resultando na elevação do colesterol nas células (Jiménez-López et al., 2006). Foi possível observar também que este tratamento aumentou a atividade da 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase e do receptor de LDL. Estes efeitos foram observados também com outros AFTs, em diferentes linhagens de células (Carrasco et al., 2008; Carrasco et al., 2010; Ríos-Marco et al., 2015).

Um dos mecanismos mais amplamente estudados pelos quais os AFTs exercem suas ações antiproliferativas é por meio da inibição da via PI3K / Akt / mTOR. A proteína Akt é central na sobrevivência celular, sendo superexpressa em muito tipos de tumores (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij, 2013). O AFTs mais bem caracterizado como inibidor da via Akt é o perifosine, que tem sido amplamente estudado (Ríos-Marco et al., 2017). Estudos mostraram que a atividade antiproliferativa do perifosine foi maior nas linhagens celulares de pulmão humano H460, H358 e H157 do que em H226; isto ocorreu porque as três primeiras linhagens apresentaram uma diminuição significativa na fosforilação de Akt (Fu et al., 2009). Este resultado sobre o

Akt foi similar em outros modelos celulares (Dasmahapatra et al., 2004; Elrod et al., 2007).

Estudos *in vitro* têm mostrado que a ação da perifosine sobre o pAkt não ocorre por meio da inibição da PI3K, indicando que há um outro mecanismo envolvido (Kondapaka et al., 2003). Levando em consideração a estrutura fosfolipídica do perifosine, é provável que a inibição de Akt possa ocorrer devido a interação dos AFTs com os fosfoinosítídeos. A inibição da translocação de Akt pela interferência do perifosine no domínio PH (domínios de homologia da Pleckstrina) desta proteína têm sido relatada. (Hennessy et al., 2007). Os AFTs também podem causar diminuição do colesterol e, consequentemente, o efluxo de colesterol da membrana plasmática reduz diretamente pAkt (Ríos-Marco et al., 2011). Múltiplos mecanismos de inibição da Akt pela perifosine têm sido descritos (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk et al., 2009; Van Blitterswijk e Verheij, 2013; Ríos-Marco et al., 2017).

1.5. Apoptose

Em 1972, o termo apoptose (a-po-toe-sis; do grego após = separação, ptôsis = queda) foi utilizado pela primeira vez por Kerr et al. (1972); contudo, seu conceito é mais antigo (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002). O significado original do termo refere-se a queda das folhas das árvores no outono, mas foi usado por Kerr para descrever formas morfológicamente distintas de morte celular (Duque-Parra, 2005). Dessa maneira, o termo passou a ser utilizado como sinônimo para o processo de morte celular programada (MCP), que pode ser dividida em apoptose ou MCP tipo 1; autofagia ou MCP tipo 2 e necrose programada ou MCP tipo 3 (Ouyang et al., 2012; Green e Liambi, 2015). Em certas condições, o tipo de morte celular que é desencadeada por determinados agentes tóxicos depende da sua concentração; por exemplo, a exposição a baixas concentrações pode resultar em morte por autofagia ou apoptose, enquanto que concentrações elevadas do mesmo composto podem induzir necrose (Orrenius et al., 2011) (Figura 3). Contudo, a apoptose é fundamentalmente diferente dos outros tipos de morte celular em relação a incidência, morfologia e processos bioquímicos. O tempo de exposição também influencia no tipo de morte desencadeada.

Figura 3: Relação dose-dependente com os tipos de morte celular induzidos por alguns agentes tóxicos. Adaptado de Orrenius et al. (2011).

A apoptose é considerada um componente vital de vários processos biológicos, incluindo: homeostase tecidual, desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, involução normal de tecidos hormônio-dependentes, desenvolvimento embrionário e morte celular induzida por produtos químicos (Elmore, 2007; Tuzlak et al., 2016). A apoptose é essencial para promover morte em células invadidas por patógenos e também participa da cicatrização de feridas, visto que está envolvida na remoção das células do sistema imunológico e na evolução do tecido de granulação em tecido cicatricial (Elmore, 2007; Tuzlak et al., 2016).

O processo de apoptose é um mecanismo altamente complexo, que envolve uma cascata de eventos moleculares que dependem de energia. As alterações morfológicas particulares das células apoptóticas incluem condensação e fragmentação nuclear, retração celular, formação de "*blebs*" na membrana, perda de adesão celular e formação de corpos apoptóticos (Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015). As modificações bioquímicas consistem na fragmentação internucleossômica do DNA, externalização da fosfatidilserina e ativação de uma família de proteases conhecidas como caspases (Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015).

Nos mamíferos, a cascata do processo apoptótico pode ser iniciada por duas principais vias: a extrínseca, que é mediada por receptores de morte presentes na superfície celular, e a intrínseca, que envolve alterações na mitocôndria (Burz et al., 2009; Portt et al., 2011; Goldar et al., 2015). As principais proteínas reguladoras de ambas as vias da apoptose são as caspases (Li e Yuan, 2008). As caspases são divididas em três grupos, de acordo com suas funções específicas em diferentes processos, incluindo aqueles envolvidas no desenvolvimento, inflamação e apoptose (Weyhenmeyer et al.,

2012). Sendo assim, pelo menos dez caspases principais foram identificadas, sendo divididas em caspases iniciadores (caspases 2, 8, 9 e 10), caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) e caspases inflamatórias (caspases 1, 4 e 5) (Pucci et al., 2000; Goldar et al., 2015).

O processo apoptótico pela via extrínseca se inicia com a interação de ligantes extracelulares e a seus receptores transmembranares, que são membros da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Os ligantes melhor caracterizados e seus respectivos receptores incluem: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (Pucci et al., 2000; Green e Liambi, 2015; Kiraz et al., 2016). Um exemplo da ativação da via extrínseca da apoptose é a interação do ligante de morte homotrimérico FasL com o seu receptor, o que resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras chamadas FADD (domínio de morte associado a FAS), por meio da ligação entre os domínios de morte (DD – *Death domain*), que também estão presentes no receptor FAS. Subsequentemente, o FADD recruta a forma inativada da caspase 8 (pró-caspase 8), cuja agregação e homodimerização forma o complexo indutor de morte (DISC), resultando na sua autocatálise e ativação. A pró-caspase 8 interage com FADD por meio de um outro domínio, chamado domínio efetor de morte (DED) (Cuda et al., 2016). A caspase 10 também tem sido descrita como uma proteína capaz de se associar ao FADD no complexo DISC, pois também possui o domínio DED (Barnhart et al., 2003). A forma ativa da caspase 8 induz a ativação das pró-caspases 3 e 7, que são proteínas efetoras da apoptose, levando a morte celular. Em outras células, também conhecidas como células do tipo 2, após a formação do DISC, a caspase 8 trunca a proteína Bid em seu domínio BH3 (domínio agonista da morte), gerando fragmentos tBid. Estes fragmentos induzem a translocação, oligomerização e inserção de Bax e/ou Bak na membrana externa da mitocôndria, ocasionando a liberação de citocromo c e também de outras proteínas mitocondriais, incluindo o fator indutor de apoptose (AIF), endonuclease G, Smac/Diablo e a serina protease Omi/HtrA2 (Proteína A2 de alta temperatura). Após a liberação do citocromo c este associa-se com uma molécula de ATP e a uma proteína chamada de APAF-1, que sofre modificação conformacional e se liga a pró-caspase 9, formando um complexo chamado de apoptossomo. Este complexo permite a clivagem da caspase 9, que ativa a pró-caspase 3. A caspase 3 ativa é responsável pela clivagem de diversos substratos, os quais são responsáveis pelas alterações características da apoptose (Elmore, 2007; Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015; Cuda et al., 2016) (Figura 4).

A via intrínseca é regulada por diferentes estímulos, tais como irradiação, agentes quimioterápicos ou tóxicos, infecções e danos no DNA, os quais promovem estresse intracelular, ativando proteínas que irão desencadear a apoptose pela via mitocondrial. Estes estímulos podem ser mediados por sinais que agem de forma positiva ou negativa. Os sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas, resultando em falhas na supressão do programa de morte que culminam com a apoptose. Os estímulos que atuam de forma positiva incluem a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres. Estes estímulos podem modular a expressão de proteínas pró-apoptóticas e a inibição das antiapoptóticas, levando a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), perda do potencial transmembranar mitocondrial e a liberação de proteínas mitocondriais. A abertura do PTPM é normalmente mediada por uma variedade de interações proteína-membrana e proteína-proteína entre membros da família de proteínas Bcl-2 (Elmore, 2007; Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015; Cuda et al., 2016).

A família de proteínas Bcl-2 compreende 25 membros, que são divididos conforme a sua atividade em pró ou antiapoptóticos. Entre as proteínas antiapoptóticas destacam-se Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG. As pró-apoptóticas incluem Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim e Blk. Os genes de algumas proteínas da família Bcl-2 tem a sua transcrição regulada pela proteína de supressão tumoral p53, que promove a transcrição de genes pró-apoptóticos e de bloqueio do ciclo celular. Entre as proteínas reguladas pela p53 estão as pró-apoptóticas DR-5, Bax, Bak, Noxa, PUMA e as anti-apoptóticas Bcl-2 e survivina. A proteína p53 citoplasmática também pode interagir com as proteínas da família Bcl-2 apoptóticas, permitindo a inserção de Bax e/ou Bak na membrana externa da mitocôndria e a liberação das proteínas mitocondriais descritas anteriormente, ocasionando a subsequente ativação das caspases 3,6 e 7 (Elmore, 2007; Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015; Cuda et al., 2016) (Figura 4).

Os efeitos da maioria dos quimioterápicos e o sucesso dos atuais esquemas de intervenção terapêutica para o tratamento do câncer, como radioterapia e imunoterapia, dependem fortemente da capacidade de induzir a célula tumoral a desencadear sua morte por apoptose (Fulda et al., 2010; Gyrd-Hansen e Meier, 2010). Então, o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo as vias intracelulares e moléculas envolvidas na execução da morte por apoptose constitui uma das estratégias terapêuticas na área da

Oncologia (Russo et al., 2006; Ciavarella et al., 2010; Moffitt et al., 2010; Ola et al., 2011; Straub, 2011; Sankari et al., 2012; tuzlak et al., 2016; Cuda et al., 2016).

Embora o câncer exiba características heterogêneas, todos os tumores malignos crescem além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (Okada e Mak, 2004). De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral (Zörnig et al., 2001). A apoptose, na prática clínica, é alvo para um potencial uso terapêutico ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e a quimioterapia (Nicholson, 2000; Debatin, 2004; tuzlak et al., 2016; Cuda et al., 2016).

Figura 4: Diagrama esquemático das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Adaptado de Goldar et al., (2015).

1.6.Fosfoetanolamina sintética (FO-S)

A fosfoetanolamina (FO) é uma molécula envolvida no *turnover* dos fosfolipídios, atuando como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana, entre eles a fosfatidiletanolamina (Gibellini e Smith, 2010). A FO foi isolada pela primeira vez em 1936 por Edgar Laurence Outhouse, do Departamento de Pesquisas Médicas do Instituto Banting da Universidade de Toronto (Outhouse, 1936), a partir de tumores em bovinos. Após seus trabalhos, outros pesquisadores encontraram a FO em intestinos de ratos saudáveis e em tecidos cerebrais de bovinos (Awapara, 1950; Folsch e Osterberg, 1959). Por estarem presente nos tecidos saudáveis e tumorais, surgiu um crescente interesse científico nos compostos fosforilados, com objetivo de se elucidar os diferentes comportamentos químicos das fosfoproteínas e outras classes de organofosforados (Folsch e Osterberg, 1959).

Com base nos estudos realizados por Outhouse, o grupo de Química Analítica da USP - São Carlos sintetizou a fosfoetanolamina (FO-S; fosfoetanolamina sintética), que corresponde a uma estrutura química formada por um grupo fosfato polar, seguido de uma cadeia etílica e uma amina terminal. Por ser um fosfomonoéster, os átomos de hidrogênios são ionizáveis em solução aquosa (Figura 5).

Figura 5: Estrutura química da fosfoetanolamina sintética.

Diversos estudos, utilizando diferentes linhagens de tumores, têm demonstrado que a FO-S apresentam amplo potencial antitumoral, reduzindo a viabilidade de células tumorais como EAT (tumor ascítico de ehrlich), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), H292 (câncer de pulmão humano), B16F10 (melanoma murino) e Skmel-28 e MeWo (melanoma humano), sem qualquer efeito aparente sobre as células normais, tais como fibroblastos e linfócitos (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al.,

2012b; Ferreira, 2013a; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c; Ferreira et al., 2013d).

Ensaio *in vitro* com a linhagem de células de EAT mostraram que o tratamento com FO-S foi capaz de promover morte celular por apoptose, diminuir o potencial elétrico mitocondrial e aumentar a expressão da proteína caspase 3 ativa. Também foi observado que a FO-S promoveu a parada do ciclo celular na fase sub-G₁, impedindo a progressão do ciclo celular. Os ensaios *in vivo* com o modelo de EAT em camundongos comprovaram que os efeitos antitumorais da FO-S, demonstrando que o tratamento foi capaz de inibir o crescimento tumoral e aumentar a sobrevida dos animais sem causar toxicidade no fígado (Ferreira et al., 2012a).

O tratamento de células de melanoma B16F10 com FO-S resultou em uma inibição dose-dependente da viabilidade celular; parada das células na fase G₂/M do ciclo celular; aumento da caspase 3 e indução do processo de apoptose (Ferreira et al., 2012b). No modelo *in vivo* de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma, a FO-S foi capaz de reduzir o volume tumoral e os focos metastáticos e aumentar a taxa de sobrevida dos animais (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012b). Os estudos comparativos *in vivo* entre a FO-S e o agente quimioterápico Taxol, no modelo experimental de melanoma B16F10, suportam a utilização da FO-S como um novo agente no tratamento anticâncer, uma vez que os efeitos terapêuticos obtidos para a redução do volume tumoral e da disseminação metastática foram superiores ao do Taxol (Ferreira et al., 2011).

A FO-S também demonstrou efeito antitumoral em células de leucemia, induzindo apoptose pela via mitocondrial. A avaliação dos efeitos da FO-S, no modelo de leucemia promielocítica aguda (LPA) *in vivo*, demonstrou que o composto apresenta efeito antiproliferativo, diminuindo o número de células mieloides imaturas CD177+ e Gr-1+ no baço, medula óssea e fígado. Ocorreu também a redução da expansão dos clones malignos CD34(+)/CD117(+), CD34(+) e Gr-1(+) na medula óssea (Ferreira et al., 2013b).

Estudos recentes demonstraram que, após o tratamento das células Jurkat (células derivadas a partir da leucemia de células T humana) com a vitamina K₂ (menaquinona), que é citotóxica nestas células, ocorreu a formação de vários metabólitos, dentre os quais a FO foi o mais relevante, cujos níveis aumentaram mais de duas vezes após 24 horas de tratamento e 5 vezes no período de 72 horas. Dessa forma, os resultados mostram que o

efeito apoptótico da fosfoetanolamina apresenta uma importante função na indução de morte celular após o tratamento com vitamina K2 (Dhakshinamoorthy et al., 2015).

1.7. Lipossomas: nanocarreadores para o tratamento do câncer

Com o avanço da nanotecnologia, diversos tipos de sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*) têm sido desenvolvidos para contornar limitações relativas a solubilidade nos fluidos biológicos, estabilidade físico-química, biodisponibilidade no tecido alvo e toxicidade nas células normais. Dentre estes sistemas, os lipossomas consistem em um dos tipos de nanocarreadores mais investigados para a melhoria do tratamento antitumoral. Vários estudos demonstram que esse tipo de formulação pode maximizar a farmacocinética e a eficácia antitumoral de vários compostos (Kumar et al., 2012; Mattheolabakis et al., 2012; Urbinati et al., 2012; Drbohlavova et al., 2013; Pandey et al., 2016).

Os lipossomas consistem em pequenas vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas lipídicas, as quais isolam um ou mais compartimentos aquosos internos do meio aquoso externo (Figura 6). Devido a sua natureza anfótera, é possível encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, de acordo com seu grau de lipofilicidade e carga. Moléculas hidrofílicas são incorporadas na cavidade aquosa interna, enquanto que as lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão (Bitounis et al., 2012; Mattheolabakis et al., 2012; Slingerland et al., 2012; Huang et al., 2016; Xing et al., 2016).

Figura 6: Representação da organização da bicamada lipídica de um lipossoma, destacando a cabeça polar e a cauda apolar dos lipídeos. Adaptado de Bitounis et al. (2012).

Dependendo do processo de preparação, os lipossomas podem apresentar apenas um compartimento aquoso circundado por uma bicamada lipídica ou serem constituídos por várias bicamadas lipídicas e aquosas concêntricas. Aqueles que contêm apenas uma bicamada são denominados unilamelares, os quais podem ser de pequeno tamanho (SUV), quando apresentam diâmetro menor que 100 nm, ou de grande tamanho (LUV), quando o diâmetro varia entre 100 a 1000 nm. Os lipossomas multilamelares (MLV) são compostos por mais de uma bicamada lipídica e geralmente apresentam tamanho superior a 100 nm (Arias et al., 2011; Akbarzadeh et al., 2013; Pattni et al., 2015; Witkowska e Jahn, 2017).

Os lipossomas são formados por lipídeos anfifílicos, como os fosfolipídios, esfingolipídios (principalmente gangliosídeos) e glicolipídeos. Apesar de fosfolipídios naturais poderem ser utilizados na formulação desses sistemas vesiculares, as moléculas sintéticas são preferidas devido à sua maior estabilidade, sobretudo os derivados da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, os quais possuem longas cadeias. O colesterol exerce um importante papel na fluidez, permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica, sendo normalmente adicionado nas formulações (Arias et al., 2011; Bitounis et al., 2012; Pattni et al., 2015) (Figura 7).

Figura 7: Representação dos diferentes tipos de lipossomas com base no tamanho e lamelaridade. Também é ilustrada uma porção da bicamada lipídica com modificações multifuncionais na superfície. Adaptado de Pattni et al. (2015).

Diversos processos podem ser utilizados para a preparação dos lipossomas, sendo o método de hidratação do filme lipídico o primeiro método descrito e um dos mais empregados. Inicialmente, os componentes lipídicos são dissolvidos em um solvente adequado isento de toxicidade residual. Após remoção do solvente, a baixa temperatura e pressão reduzida, obtém-se um filme lipídico bem fino. Este é então hidratado com uma solução tampão (glicina com água), em temperatura acima da temperatura de transição de fase, de modo que ocorra a fusão do lipídeo. Na sequência, a solução é submetida a vários ciclos de agitação/aquecimento, obtendo-se ao final dessa etapa uma suspensão de MLV e então os outros tipos de lipossomas: SUV geralmente é preparado por intermédio do processo de sonicação e o LUV pelo método de extrusão (Riaz, 1996; Akbarzadeh et al., 2013; Pattni et al., 2015).

A farmacocinética e a biodistribuição dos lipossomas são influenciadas pela via de administração e pelas características do sistema vesicular, que incluem o tamanho da vesícula, a composição lipídica, a carga superficial, a estrutura lamelar e o grau de

hidrofilia (Ulrich, 2002; Bitounis et al., 2012; Witkowska e Jahn, 2017). Os lipossomas variam de acordo com suas características estruturais, podendo assim ser divididos em classe diferentes, tais como: lipossomas convencionais; catiônico; aniônico; de longa circulação; sítio-específicos; virossomas e DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos (Batista et al., 2007).

Três aspectos da biologia tumoral são diretamente relacionados ao desenvolvimento de nanocarreadores para incorporação de fármacos antitumorais: o aumento das fenestras do revestimento endotelial da neovascularização tumoral, que propicia a permeabilidade e retenção aumentada (EPR); o pH extracelular mais ácido da célula tumoral em relação ao pH fisiológico e a expressão de antígenos específicos na superfície destas células (Mattheolabakis et al., 2012; Taurin et al., 2012; Ferreira et al., 2013e).

Várias formulações lipossomais contendo agentes antitumorais encapsulados estão clinicamente disponíveis ou em estágios avançados de desenvolvimento clínico (Bozzuto e Molinari, 2015). Como exemplos têm-se o Doxil®/Caelyx® (doxorubicina peguilada) (Tacar et al., 2013), o Lipoplatin® (cisplatina) (Stathopoulos e Boulikas, 2012), o DepoCyte® (citarabina) (Rueda Domínguez et al., 2005), o DaunoXome® (daunorubicina) (Rosenthal et al., 2002), o MBP-426 (oxiplatina), BIND (docetaxel) e o MM302 (doxorubicina) (Van Der Meel et al., 2013; Bozzuto e Molinari, 2015).

Nas últimas décadas, as pesquisas envolvendo sistemas de liberação de fármacos têm propiciado o desenvolvimento de nanocarreadores cada vez mais versáteis e eficazes, gerando um impacto extremamente favorável na quimioterapia. O aumento exponencial de publicações e patentes nesta área atesta essa ideia. Deste modo, o desenvolvimento de nanocarreadores multifuncionais continua a ser explorado na busca de terapias mais eficazes (Bozzuto e Molinari, 2015).

1.8. Lipossomas catiônicos

Os lipossomas catiônicos são formados a partir de lipídeos catiônicos, que são moléculas anfifílicas compostas de uma ou duas cadeias de ácidos graxos acopladas a um grupo éster e um grupamento amínico hidrofílico (El-Aneed, 2004). Os lipossomas catiônicos são amplamente utilizados para a terapia gênica. Sua capacidade para mediar a transfecção pode ser atribuída a vários fatores físicos, incluindo a sua condensação espontânea com o DNA, devido a interação eletrostática. A presença de carga positiva na

superfície destes lipossomas pode promover a associação com as superfícies das células carregadas negativamente, bem como suas propriedades fusogênicas podem desestabilizar a membrana plasmática (Shim et al. 2013; Ulrich, 2002; Majzoub et al., 2016).

Lipídeos carregados positivamente, são moléculas estrategicamente desenhadas, com base nos princípios estruturais que são projetados para se condensarem ao DNA e interagir com membranas biológicas de cargas opostas. Exemplos de compostos anfifílicos catiônicos incluem DOTAP, DOTMA, DODAC, DC-Chol, DMRIE, DOSPA, DOGS, entre muitos outros (Figura 8) (Ulrich, 2002; Majzoub et al., 2016).

Estudos vêm demonstrando que os lipossomas catiônicos podem ser utilizados como sistemas de entrega de drogas antivasculares devido a sua capacidade de interação seletiva com as células endoteliais associadas ao tumor. A utilização destes princípios tem contribuído para o desenvolvimento de formulações de lipossomas catiônicos contendo fármacos, tais como paclitaxel, etoposídeo e cisplatina (Shim et al. 2013; Sengupta et al., 2000; Kunstfeld et al., 2003; Lee, 2009; Ho et al., 2010; Majzoub et al., 2016).

Figura 8: Visão geral da representação dos lipídios anfifílicos e catiônicos. Adaptado de Ulrich (2002).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Encapsular a fosfoetanolamina sintética em lipossomas catiônicos de DODAC (cloreto de dioctadecildimetilamônio), determinar a estabilidade físico-química desta formulação e avaliar o seu potencial antitumoral e pró-apoptótico em linhagens de células de CHC e no modelo de camundongos C57BL/J6 portadores de CHC.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Formulação lipossomal

3.1.1. Formulação da fosfoetanolamina sintética (FO-S)

A FO-S utilizada neste projeto foi preparada conforme publicado previamente (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013a; Ferreira et al., 2013b). A solução estoque de 1M foi preparada em água ultrapurificada e armazenada à temperatura ambiente para a realização dos experimentos *in vitro*. A mesma já foi formulada em nosso laboratório para estudos anteriores e se mostrou estável.

3.1.2. Preparação dos lipossomas de DODAC/FO-S

A preparação dos lipossomas foi padronizada para todos os experimentos. Primeiramente, o DODAC em pó foi pesado e dissolvido em 10 mL de água ultrapurificada, de forma a obter-se concentrações de 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0 mM. Posteriormente, a FO-S foi acrescentada à solução na mesma razão molar do DODAC (1:1). Também foram realizados outros ensaios com a solução composta de DODAC (10 mM) e FO-S, em concentrações que variam de 0,3 – 37 mM. As dispersões de DODAC/FO-S foram colocadas em banho-maria a 45 °C, por um período de 20 minutos. Após este processo, as amostras foram agitadas no vórtex até a completa homogeneização do sistema e, em seguida, foram sonicadas utilizando o ultrasonicador BraunSonic 1510. A potência selecionada foi de $\cong$ 70 watts, por 3 a 4 minutos. Durante a sonicação, as amostras foram mantidas a aproximadamente 60 °C. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm em 24 °C, por um período de 5 minutos, para a retirada dos resíduos de titânio provenientes da ponta do sonicador.

3.2. Caracterização química e física das suspensões lipossomais

As suspensões lipossomais obtidas de DODAC/FO-S foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e teor (%) de fosfato das partículas.

3.2.1. Determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas (DODAC/FO-S)

O tamanho médio dos lipossomas pode ser determinado por espalhamento quase elástico da luz (Quasi-Elastic Light Scattering - QELS), que utiliza o princípio da Espectroscopia de Correlação de Fótons (ECF). A ECF consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo, devido aos movimentos Brownianos das partículas em suspensão. Os diâmetros das partículas são determinados por meio da aferição das dispersões de uma radiação laser incidentes na amostra, provocada por vesículas em suspensão. Uma vez que as vesículas não são estáticas, a variação temporal do espalhamento depende do coeficiente de difusão (D) das mesmas. Assim, as variações da intensidade da difração da luz são tanto mais rápidas quanto menores forem às vesículas em suspensão. O D é determinado analisando dados em diferentes tempos de amostragem. A partir desses dados e, juntamente com a temperatura absoluta (T) e a viscosidade do meio (η), é possível determinar o raio hidrodinâmico (R) das vesículas, por meio da equação de Stokes-Einstein (New, 1990):

$$D = \kappa T / (6 \pi \eta R)$$

onde κ é a constante de Boltzmann.

Para determinar o tamanho médio dos lipossomas de DODAC/FO-S, foi empregado o método por espalhamento quase elástico da luz. O volume de 1 mL de cada amostra foi aliquotado em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico. Em seguida, as amostras foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando-se o ZETASIZER NANO ZS90, MALVERN (Biotek Instruments EL800, EUA).

3.2.2. Determinação da carga de superfície dos lipossomas (DODAC/FO-S)

Nas dispersões coloidais, as forças de atração e repulsão na superfície do coloide determinam a sua estabilidade. Um dos maiores efeitos da superfície são os fenômenos eletrocinéticos. Os coloides apresentam cargas elétricas superficiais que podem aparecer devido a dissociação de grupos ionizáveis e adsorção diferencial de íons da solução (dispersante). A carga líquida na superfície de cada partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica: uma interna, com íons fortemente ligados a camada

de Stern, e outra externa, com uma distribuição de íons determinada pelo equilíbrio entre as forças eletrostáticas e o movimento térmico (New, 1990). O potencial entre as duas camadas é denominado potencial zeta. Essas cargas produzem forças de repulsão eletrostáticas entre colóides vizinhos e, se a carga for suficientemente grande, os colóides permanecem estáveis e dispersos em suspensão (New, 1990).

Para a determinação do potencial zeta, o volume de 1 mL de cada amostra foi aliquotado em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico. Posteriormente, as amostras foram analisadas no DLS no ZETASIZER NANO ZS90, MALVERN (Biotek Instruments EL800, EUA).

3.2.3. Determinação do teor de fosfato

As amostras de DODAC/FO-S 10 mM/2 mM e 2 mM/2 mM, respectivamente, foram passadas em coluna de Sephadex G-25 para separar os lipossomas da FO-S livre em solução, utilizando-se sacarose 2 mM como eluente. A concentração de FO-S foi determinada dosando-se o teor de fosfato nas amostras. Alíquotas das amostras de DODAC-FO-S foram adicionadas aos tubos de ensaio (previamente lavados em HCl concentrado) e secas em estufa, a 120 °C. Após secagem, adicionou-se 0,4 mL de ácido perclórico em cada amostra. Os tubos foram tampados com bolas de vidro e mantidos por uma hora em um digestor, a 180 °C, durante o período de tempo necessário para mineralizar totalmente os lipídeos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado as amostras 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio a 1,25 % (p/v). Os tubos foram agitados em vórtex. Em seguida, foi adicionado 0,4 mL de uma solução de ácido ascórbico a 3 % (p/v) e então as amostras foram mantidas em banho-maria, por cerca de 10 minutos. Após esse período, os tubos foram esfriados em água corrente e a absorbância lida em 797 nm. A curva padrão foi obtida em conjunto com as amostras, utilizando uma solução padrão de KH_2PO_4 0,001 M em água.

3.2.4. Morfologia ultraestrutural dos lipossomas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia ultraestrutural dos lipossomas de DODAC/FO-S foi analisada por MEV. A preparação da amostra foi realizada pelo gotejamento de 5 μL da formulação

lipossomal em lamínulas de vidro e posterior incubação em estufa, por 1 hora, a 50 °C. As lamínulas foram fixadas em porta-espécimes (“stubs”) com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 35 nm, em íon sputter coater, durante 2 minutos. Em seguida, as amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 Scanning (FEI company, Hillsboro, Oregon), operado em diversos aumentos (110 - 12000 vezes), sobre vácuo.

3.3. Ensaios *in vitro*

3.3.1. Cultura celular

As células de CHC murino Hepa1c1c7 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Christiane Pienna Soares (UNESP). As linhagens de melanoma murino B16F10 (CRL 6475), melanoma humano Skmel-28 (HTB-72) e células endoteliais humanas HUVEC (CRL 1730) foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (B16F10, Skmel-28 e HUVEC) ou em meio α MEM (Hepa1c1c7), pH 7.2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina). Os frascos de cultura de 75 cm² foram mantidos em estufa para incubação de células contendo atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37 °C. Após atingirem a confluência aproximada de 90%, as células foram subcultivadas para ampliação, realização de experimentos ou congelamento. Antes da execução dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de tripan (1%), que não penetra nas células viáveis que possuem membrana celular intacta. Apenas as células com viabilidade igual ou superior a 90% foram utilizadas nos ensaios.

As linhagens de melanoma murino e humano (B16F10 e Skmel) foram acrescentadas aos ensaios biológicos com o intuito de comparar os efeitos da FO-S e do DODAC/FO-S com os dados da literatura, pois os ensaios de citotoxicidade já realizados com a FO-S e que foram recentemente publicados utilizaram estas linhagens.

3.3.2. Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico de redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo]. As células foram semeadas em placas com 96 poços, na densidade de 2×10^4 e em quadruplicada, sendo cultivadas durante 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações da FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. Foram utilizados os lipossomas contendo DODAC 10 mM/FO-S 0,3 – 2,0 mM e DODAC/FO-S (1:1) 0,3- 2,0 mM ou FO-S sozinha (0,3 – 2,0 mM). Após o tratamento, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL). Após 3 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e acrescentado 100 µL de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate), no comprimento de onda de 540 nm, para a determinação da concentração inibitória (IC_{50%}).

3.3.3. Análises das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

As células de melanoma murino B16F10 e CHC murino Hepa1c1c7 foram plaqueadas em placas com 6 poços, na concentração de 1×10^5 . No dia seguinte, as células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S em diferentes concentrações, durante 24 horas para as células B16F10 e 12 horas para as células Hepa1c1c7. Os tratamentos foram realizados com FO-S (0,3 – 2,0 mM) ou com os lipossomas DODAC/FO-S (1:1) 0,3- 2,0 mM. Após os períodos de incubação, as células foram contadas e a concentração ajustada para 100.000 cel/mL. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos (1400 rpm) e o pellet ressuspense em 1 mL de “Cold GM” (glicose 6,1 mM; NaCl 137 mM; KCl 4,4 mM; 14 Na₂HPO₄ 1,5 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; EDTA 0,5 mM). Em seguida, adicionou-se lentamente etanol absoluto (4 °C), agitando-se lentamente. As células foram fixadas durante 30 minutos e posteriormente centrifugadas, lavadas com PBS contendo 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, EUA) e ressuspensas em uma solução contendo PBS (5 mM de EDTA), 18 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (Sigma Aldrich, EUA) e 0,3 mg/mL de RNase-A. As células foram mantidas a temperatura ambiente durante 1h, no escuro. A leitura foi realizada por citometria (FASC Calibur BD, EUA), no canal FL2-H. Os resultados obtidos demonstraram em qual

período do ciclo celular as células se encontravam (sub-G₁, G₀/G₁, S ou G₂/M) e os dados foram apresentados em porcentagem.

3.3.4. Determinação das proporções de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo (Anexina-V/PI)

As células Hepal1c7 apoptóticas foram quantitativamente determinadas utilizando o Kit FITC-Anexina V, que detecta as células com os resíduos de fosfatidilserina expostos na superfície celular. As células necróticas foram quantificadas com o fluorocromo PI, que penetra nas células cuja membrana esteja rompida. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do iodeto de propídeo; portanto, apresentam baixa fluorescência.

As células de CHC murino Hepal1c7 foram plaqueadas em placas contendo 6 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com FO-S e DODAC/FO-S (1:1), nas concentrações de 0,3-2,0 mM, durante 12 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas 3 vezes com PBS (4 °C) e suspensas em 100 µL de PBS, seguida da incubação com 4 µg/mL de Anexina V (Sigma Aldrich, EUA) e 1,8 µg/µL de PI (Sigma Aldrich, EUA), por 1 hora e a 37 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1x, fornecido pelo fabricante (Sigma Aldrich, EUA). A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur da BD®. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

3.3.5. Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Após o tratamento com FO-S, DODAC/FO-S e DODAC, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, por um período de 24 horas, as células das linhagens B16F10, Hepal1c7 e HUVEC foram fixadas em tampão FACSFlow com paraformaldeído (2,5%), durante 1 hora. A membrana celular foi permeabilizada com Triton X-100 (0,1%), por 30 minutos a 4 °C. As suspensões celulares foram lavadas e ressuspensas em tampão FACSFlow. Em seguida, adicionou-se 1 µg do anticorpo primário específico para as proteínas discriminadas abaixo (Tabela 1). Após 1 hora de incubação, as células foram centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos) e adicionou-se o anticorpo secundário marcado,

seguindo-se a incubação com o anticorpo anti-IgG de camundongo (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen; Ficoeritrina - Invitrogen; FITC - Invitrogen) com albumina do soro bovino (BSA) 0,2%, durante 1 hora, a 4 °C e protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FACSCFlow. A aquisição dos eventos celulares foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, nos canais de fluorescência FL2-H (PE) e FL1-H (FITC e Alexa Fluor 488).

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados e seus respectivos fabricantes.

Anticorpos primários	Fabricantes
anti-citocromo c	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA
anti-caspase-8	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-caspase-3	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-DR4	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA
anti-Bcl-2	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-ciclina D1	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
anti-CD44	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-CD90	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-p53	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-p21	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-p27	Abcam, Cambridge, MA, United States
anti-Bax	Abcam, Cambridge, MA, United States

3.3.6. Análise da internalização dos lipossomas fluorescentes DODAC/FO-S por microscopia confocal a laser

Para analisar a internalização, os lipossomas DODAC/FO-S (1:1) foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente, acrescentando 0,25 mol%, em relação ao DODAC, do marcador fluorescente Dil: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Life Technologies, CA, Estados Unidos). As células de CHC murino Hepa1c1c7 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 1×10^5 . Em seguida, as células foram tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, pelos períodos de 3 e 6 horas. Posteriormente, as lamínulas foram transferidas para lâminas de vidro, com o auxílio de uma pinça, sendo fixadas com ProLong® e armazenadas a -20 °C no escuro, até o momento da leitura, a qual foi realizada no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

3.3.7. Análise do potencial elétrico mitocondrial por microscopia confocal a laser

Para a análise do potencial mitocondrial utilizando a técnica de microscopia confocal, as células de CHC murino Hepa1c1c7 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 1×10^5 /poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FO-S e DODAC/FO-S (1:1) 0,3 e 2,0 mM, pelo período de 6 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura α MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), a 37 °C, e incubadas com 15 μ g/mL de rodamina-123 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA) durante 10 minutos, no escuro a 37 °C. O excesso de rodamina foi retirado por lavagem com meio de cultura, a 4 °C. A montagem das lâminas foi realizada com auxílio de uma pinça, com a qual as lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro, sendo fixadas com ProLong® e armazenadas a -20 °C, no escuro, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

3.3.8. Marcação de lisossomos por meio do fluorocromo laranja de acridina

As células de CHC murino Hepa1c1c7 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 1×10^5 /poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com FO-S e DODAC/FO-S (1:1), nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante 6 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura α MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), a 37 °C, e incubadas com 10 μ g/mL de laranja de acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), por 10 minutos e no escuro, a 37 °C. O excesso do fluorocromo foi retirado por lavagem com meio de cultura, a 37 °C. As lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro, com o auxílio de uma pinça, e fixadas com ProLong®. As lâminas foram armazenadas a -20 °C, no escuro, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

3.3.9. Análise da caspase 3 ativa por microscopia confocal a laser

As células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 1×10^5 /poço. Posteriormente, as células foram tratadas com FO-S e DODAC/FO-S (1:1), nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 1 µg do anticorpo anticaspase 3 (Santa Cruz, Biotechnology – SC 7272), conjugado com ficoeritrina (PE) (Calbiochem, Darmstadt Alemanha), na presença ou ausência do seu inibidor Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH. O excesso de marcador foi removido após lavagem com PBS. As lamínulas foram transferidas para lâminas de vidros com o auxílio de uma pinça e fixadas com ProLong®. As lâminas foram armazenadas a -20 °C, no escuro, até o momento da leitura, realizada no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

3.3.10. Análise da morfologia ultraestrutural das células tratadas com a formulação lipossomal por MEV

As células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de 1×10^5 /poço. Em seguida, as células foram tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM, durante o período de 24 horas, e posteriormente fixadas em 3% de glutaraldeído por 1 hora, a 4 °C, e pós-fixadas em OsO₄ 2% por 1 hora, a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações progressivas de etanol (10 a 100%), no decorrer de 10 minutos. As células foram secas com auxílio de um secador de ponto crítico, utilizando dióxido de carbono líquido, fixadas em porta espécie, com fita condutiva de cola de carbono, e metalizadas com uma camada de ouro de 35 nm (em íon “sputter coater”) durante 2 minutos. As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 Scanning (FEI company, Hillsboro, Oregon), operado em diversos aumentos (110-12000 vezes), sob condições de vácuo.

3.4. Ensaios *in vivo*

3.4.1. Animais

Os camundongos foram obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan e do Biotério Central da Faculdade de Medicina e mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada (22 ± 2 °C). As gaiolas eram de polipropileno, padrão para camundongo (49 x 34 x 16 cm), contendo tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante, havendo cinco animais por caixa, no máximo, as quais eram limpas duas vezes por semana, com troca de serragem e alimentação. Foi utilizada serragem esterilizada em autoclave e a alimentação consistiu em ração peletizada estéril para camundongos. O manejo dos camundongos obedeceu às normas estabelecidas pelos procedimentos operacionais padrão da Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e pelos princípios éticos da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Canadian Council on Animal Care (CCAC). Este projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética do Instituto Butantan e da Faculdade de Medicina da USP, protocolos número: 0982/12 e 112/14, respectivamente.

3.4.2. Delineamento experimental *in vivo*

Para avaliar a atividade antitumoral da formulação lipossomal DODAC/FO-S sobre o modelo de CHC ortotópico (Hepa1c1c7), foram utilizados 100 camundongos C57BL/6J, divididos em grupos de 5 animais por gaiola.

Padronização dos Experimentos – Os animais foram submetidos à contenção manual e anestesia (Xilazina 10 a 15 mg e Cetamina 100 a 150 mg/kg) para posterior inoculação das células tumorais hepáticas (Hepa1c1c7) (cultivadas conforme item 3.3.1.), cuja concentração foi de 1×10^6 /células em 100 µL, pela via intra-hepática (IH), utilizando seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (13 x 0,30 mm) (Figura 9). Após 21 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram tratados com os compostos, os quais foram injetados com intervalos de 120 horas (5 dias). O tratamento foi realizado durante

20 dias, com a FO-S na concentração de 17,5 mg/kg e a formulação lipossomal com 89,74 mg/kg (17,5 mg/kg de FO-S e 72,5 mg/kg de DODAC; mesma razão molar 1:1).

Após a realização dos tratamentos dos animais portadores de CHC com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, na concentração de 89,74 mg/kg, dois novos grupos foram estabelecidos, GP-X e GP-XI. Estes foram tratados com os lipossomas na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 de DODAC, mesma razão molar 1:1), afim de verificar se nesta menor concentração o tratamento antitumoral é mais eficaz, uma vez que a fluidez da formulação em menores concentrações é maior. Os animais foram tratados pelas vias intraperitoneal (IP) e intra-hepática (IH), utilizando seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (13 x 0,30 mm).

Figura 9: Estabelecimento do modelo ortotópico de CHC murino Hepa1c1c7. Os animais foram submetidos à contenção manual e anestesia para posterior inoculação das células tumorais hepáticas (Hepa1c1c7), na concentração de 1×10^6 /animal pela via intra-hepática.

Semanalmente foram avaliados o peso corpóreo e o perfil hematológico. Após o período de tratamento de 20 dias, os animais foram anestesiados (Xilazina 30 a 45 mg e Cetamina 300 a 450 mg/kg) e sacrificados para coleta da massa tumoral, órgãos internos (pulmão, baço, rins, linfonodos e fígado) e o sangue. Fragmentos do fígado foram coletados e mantidos em fixadores para posterior avaliação do ciclo celular e histologia. O manejo e o procedimento cirúrgico obedeceram às determinações da CEUAIB. Os animais foram divididos em números de 5 por grupo de tratamento, como descritos abaixo (Figura 10).

- I. **Grupo I controle** (n=5): Após inoculação das células tumorais Hepa1c1c7 para implantação do modelo ortotópico proposto, conforme descrito acima, os animais foram eutanasiados após 41 dias.
- II. **Grupo II tratado** (n=5) (DODAC com traçador fluorescente/FO-S): Os animais foram tratados com a formulação lipossomal contendo marcador, na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), com volume aproximado de 100 - 130 µL, pela via IP, a fim de verificar sua distribuição nos tecidos.
- III. **Grupo tratado III** (n=5) (DODAC com traçador fluorescente/FO-S): Os animais foram tratados com a formulação lipossomal contendo marcador, na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), com volume aproximado de 100 – 130 µL, pela via IH, a fim de verificar sua distribuição nos tecidos.
- IV. **Grupo IV tratado** (n=5) (DODAC/FO-S): Os animais foram tratados com a formulação lipossomal DODAC/FO-S (1:1), na concentração de 89,74 mg/kg (17,5 mg/kg de FO-S e 72,5 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), com volume entre 100 - 130 µL, pela via IP.
- V. **Grupo V tratado** (n=5) (DODAC/FO-S): Os animais foram tratados com a formulação lipossomal, na concentração de 89,74 mg/kg (17,5 mg/kg de FO-S e 72,5 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), com volume aproximado de 100-130 µL, pela via IH.
- VI. **Grupo tratado VI** (n=5) (repetição do grupo IV – menor concentração): Os animais foram com DODAC/FO-S, na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), pela via IP.
- VII. **Grupo tratado VII** (n=5) (repetição do grupo V – menor concentração): Os animais foram tratados com DODAC/FO-S, na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 mg/kg de DODAC, na mesma razão molar 1:1), pela via IH.
- VIII. **Grupo tratado VIII** (n=5) (DODAC vazio): Os animais foram tratados com DODAC vazio, na concentração de 36,25 mg/kg (equivalente ao número de moléculas de FO-S na concentração de 8,75 mg/kg), com volume aproximado de 100 µL, pela via IP

- IX. **Grupo tratado IX** (n=5) (DODAC vazio): Os animais foram tratados com DODAC vazio, na concentração de 36,25 mg/kg (equivalente ao número de moléculas de FO-S em concentração de 8,75 mg/kg), pela via IH.
- X. **Grupo tratado X** (n=5) (FO-S): Os animais foram tratados com a FO-S, na concentração de 8,75 mg/kg, com volume aproximado de 100 µL, pela via IP.
- XI. **Grupo tratado XI** (n=5) (FO-S): Os animais foram tratados com a FO-S, na concentração de 8,75 mg/kg, com volume aproximado de 100 µL, via IH.
- XII. **Grupo controle XII (Diluyente/ via intra-hepática)**: Os animais foram submetidos à contenção manual e procedimento cirúrgico (laparotomia). No entanto, nestes animais não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluyente dos compostos, no volume de 100 µL, pela via IH.
- XIII. **Grupo controle XIII (Diluyente/ via intraperitoneal)**: Os animais foram submetidos à contenção manual e procedimento cirúrgico (laparotomia). No entanto, nestes animais não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluyente dos compostos, no volume de 100 µL, pela via IP

3.4.3. Resumo esquemático dos grupos

Figura 10: Resumo dos grupos experimentais.

3.4.4. Análises hematológicas e bioquímicas

Após anestesia local com colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%) foi realizada (semanalmente) a coleta de 20 µL de sangue dos animais dos grupos tratados e controle, por punção retro-orbital, em tubos capilares contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), para determinação dos parâmetros hematológicos. Ao final do período do protocolo terapêutico, no momento da eutanásia, o sangue dos animais foi coletado em tubos contendo 5.000 UI de heparina sódica (Liquemine® Roche) e centrifugados durante 10 minutos (3500 rpm) para obtenção do plasma, o qual foi aliquoteado e armazenado a 20 °C, e utilizado para análises bioquímicas. Posteriormente, as amostras foram processadas em analisador bioquímico automático Liasys MAS®, aferindo-se as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e creatinina.

As análises hematológicas constaram do estudo da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e da contagem do número de plaquetas. No eritrograma foi realizada a contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma foi realizado a contagem global dos leucócitos e diferencial dos leucócitos mononucleados e polimorfonucleados.

3.4.5. Análises histopatológicas

Após o sacrifício, sob anestesia (Xilazina 30 a 45 mg e Cetamina 300 a 450 mg/kg), e necropsia dos animais dos grupos controles e tratados, os órgãos foram coletados, pesados e fixados para a realização das análises anatomopatológicas. Após 24 horas, as secções teciduais dos órgãos excisados, fixados em formalina tamponada pH 7,4, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo, os fragmentos foram seccionados na espessura de 5,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina, sendo examinados ao microscópio óptico para possibilitar a visualização das manifestações ocorridas no microambiente celular, como diferenciação celular, neoformação vascular, apoptose, necrose, regeneração tecidual, hemorragia, entre outras.

As massas tumorais foram avaliadas quanto a presença de áreas de necrose, figuras mitóticas, presença de corpos apoptóticos e infiltrado inflamatório por análise semiquantitativa, levando em consideração os seguintes critérios: (+) leve, (++) moderado e (+++) intenso, tendo como parâmetro a comparação entre os grupos.

3.4.6. Distribuição dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil nos camundongos

A formulação lipossomal DODAC/FO-S foi marcada com 0,25 mol% de Dil: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Life Technologies, CA, Estados Unidos), para o rastreamento da sua distribuição nos órgãos dos camundongos. Os animais foram tratados com os lipossomas DODAC/FO-S/Dil, na concentração de 45 mg/kg (8,75 mg/kg de FO-S e 36,25 de DODAC, mesma razão molar 1:1), no volume de 100 - 130 µL, pelas vias IP e IH. Posteriormente, para analisar a distribuição dos lipossomas, os animais foram anestesiados com isoflurano e posicionados em decúbito dorsal e/ou ventral. As imagens de raios-X e a luminescência foram realizadas por meio do aparelho in vivo CareStream MS FX PRO. O Raio-X foi empregado para identificar as regiões anatômicas do animal; a luminescência para o rastreamento dos lipossomas DODAC/FO-S/Dil, nos tempos de 1, 2, 3, 24, 48 e 72 horas, empregando-se os comprimentos de onda 490 (excitação) e 600 (emissão) nm.

3.4.7. Determinação das fases do ciclo celular das células da massa tumoral por citometria de fluxo

Fragmentos do tecido hepático (~50 mg) dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coletados e macerados mecanicamente. Posteriormente, as células obtidas foram ressuspensas em 300 µL de solução de tripsina 0,2% (Sigma Aldrich, EUA), a 37 °C, e bloqueada com a adição de meio de cultivo contendo SFB 20%. Em seguida, as células foram contadas e a concentração ajustada para 100.000 cel/mL. Posteriormente, a análise do ciclo foi realizada conforme o protocolo descrito no item 3.3.3.

3.4.8. Análise do perfil de expressão de RNAm por RT-PCR

Fragmentos do tecido hepático (~50 mg) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram coletados e mantidos em nitrogênio líquido, até o momento da análise. A extração, análise da qualidade e concentração do RNA total foram realizadas conforme descrito por Stefano et al. (2015). Posteriormente, as amostras foram pulverizadas com nitrogênio líquido, maceradas e transferidas para tubos tipo eppendorfs, contendo 1,0 mL de Trizol® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA). Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, DE) e as amostras foram vortexadas (40 segundos) e centrifugadas (15 minutos, 12.000 rpm, 4 °C). Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e acrescentou-se 500 µL de álcool isopropílico gelado (Merck, Darmstadt, DE). Após a incubação durante 10 minutos, a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm, 10 minutos, 4 °C), o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 1,0 mL de etanol 75%. Após a lavagem, as amostras foram centrifugadas (10 minutos, 10.000 rpm, 4 °C) e o sedimento de RNA resuspendido em 50 a 100 µL de água ultrapurificada estéril e livre de DNase/ RNase (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA). A concentração dos RNAs extraídos foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop™ (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EUA), pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizando-se como valor padrão 1 DO₂₆₀ = 40 µg/mL de RNA.

As análises por RT-PCR da expressão gênica da p53, Bcl-2, Bax, caspases 3 e 8, ciclina B1 e receptor DR4 foram realizadas utilizando-se os aparelhos Rotor-Gene RG-3000 Thermocycler (Corbett Research, Sidney, Austrália) e o SuperScript III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. O GAPDH RNAm foi usado como controle endógeno. As condições dos PCRs em tempo real foram de 45°C por 10 min; 95 °C por 10 min, 40 ciclos [95 °C por 15 seg; 55 °C por 20 seg; 72 °C por 40 seg], seguindo-se o *melt*. A temperatura de anelamento foi de 65 °C. O nível relativo de expressão de cada gene foi determinado em relação ao transcrito GAPDH, utilizando o método comparativo $\Delta\Delta C_t$. Foram empregados os pares de primers descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Primers utilizados na reação de RT-PCR

Genes analisados	Primers forward	Primers reverse
GADPH	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT
TRP53	GTGTGGTGCAGATCGCAGT	ATCATGCCTTCGGACTTGATG
BCL-2	GCTACCGTCGTGACTTCGC	CCCCACCGAACTCAAAGAAGG
BAX	AGACAGGGGCCTTTTTGCTAC	AATTCGCCGGAGACACTCG
CICLINA B1	GCGTGTGCCTGTGACAGTTA	CTAGCGTTTTTGCTTCCCTT
CASPASE 3	CTCGCTCTGGTACGGATGTG	TCCCATAAATGACCCCTTCATCA
CASPASE 8	TGCTTGGACTIONACATCCCACAC	GTTGCAGTCTAGGAAGTTGACC

3.5. Análise estatística

Os valores numéricos foram expressos em média $\pm$ desvio (DP). O teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator) e de comparações múltiplas de Dunn foram realizados para identificar as diferenças estatísticas entre as medidas dos grupos estudados. Os gráficos foram obtidos por meio dos programas Prism versão 5.0, ModFi 3.2 e WinMDI 2.8. Os dados foram considerados significantes quando o valor de p foi *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4.RESULTADOS

4.1. Caracterização físico-química das suspensões lipossomais

4.1.1. Determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas DODAC/FO-S

A distribuição de tamanho da formulação lipossomal DODAC/FO-S foi determinada nos períodos de 0, 1, 8 e 15 dias após sua preparação, afim de verificar a sua estabilidade físico-química em relação ao tempo. Para a preparação dos lipossomos, inicialmente foi utilizada uma curva de concentração de 2, 4, 6, 8, 10 e 37 mM de FO-S e 10 mM de DODAC (em todas as amostras). Imediatamente após sua preparação, os valores obtidos para o diâmetro médio, destes lipossomas, foram: 59,61; 151,00; 162,50; 289,55; 371,05 e 613,90 nm (nanômetros), respectivamente. Os valores adquiridos no 8º dia após a preparação destes lipossomos foram de: 118,05; 382,00; 662,00; 937,65; 1546,50 e 1788,50 nm, respectivamente (Figura 11 A). A instabilidade desta formulação nas concentrações escolhidas, em relação ao tempo, conduziu a modificação e reajuste das preparações. Dessa maneira, novas concentrações foram propostas, visando uma maior estabilidade do sistema.

É possível observar que os lipossomas contendo 2,0 mM de FO-S apresentaram maior estabilidade entre as concentrações analisadas (Figura 11 A). Partindo desta concentração como valor referencial, duas novas preparações foram propostas e avaliadas. Na primeira, foi utilizada uma curva de concentração de 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM de FO-S e 10 mM de DODAC (padrão para todas as amostras). Na segunda, as concentrações de FO-S foram as mesmas descritas acima e as concentrações de DODAC foram proporcionais a FO-S, ou seja, a mesma razão molar (1:1). Os lipossomas formulados com 10 mM de DODAC e concentrações crescentes de FO-S (0,3 - 2,0 mM) apresentaram valores de diâmetro de 54,38; 48,63; 50,38; 47,34; 43,19 e 45,97 nm, respectivamente, após o preparo (T0). O diâmetro médio desta formulação lipossomal 15 dias após o preparo foi de 64,00; 66,84; 63,77; 60,94; 61,40 e 59,05 nm, respectivamente (Figura 11 B). Para os lipossomas com DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM), a distribuição de tamanho foi de 85,02; 122,50; 60,78; 80,01; 53,44 e 54,71 nm, respectivamente, após o preparo (T0). Os valores do diâmetro destes lipossomas 15 dias após foram de 140,15; 139,00; 105,05; 84,80; 72,97 e 68,705 nm, respectivamente (Figura 12 A).

O diâmetro dos lipossomas DODAC vazios, nas molaridades correspondentes as utilizadas para a formulação lipossomal DODAC/FO-S, também foi determinado utilizando-se os valores obtidos como referenciais. Os lipossomas DODAC vazios 10 mM apresentaram diâmetro médio entre 60 - 70 nm após o preparo (T0); no 15º dia os valores foram entre 70 - 80 nm (Figuras 11 A, B). Para os lipossomas DODAC vazios na curva de concentração de 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM, os valores foram de 87,49; 106,45; 103,22; 100,07; 103,85 e 96,62 nm, respectivamente, no dia 0. O diâmetro destes lipossomas após 15 dias foi de 69,18; 74,74; 83,05; 79,75; 90,91; 83,73 nm, respectivamente (Figura 12 B).

Figura 11: Distribuição de tamanho da formulação lipossomal DODAC/FO-S. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. A concentração de DODAC 10 mM foi padronizada para todas as amostras. **(A)** Distribuição da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (2,0 – 37 mM) e DODAC 10 mM vazio, em relação ao tempo (T=dias). **(B)** Distribuição da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM) e DODAC 10 mM vazio, em relação ao tempo (T= dias). Grau de significância estatística ***p<0.001, n.s = não significativo.

Figura 12: Distribuição de tamanho da formulação lipossomal DODAC/FO-S (razão molar 1:1) e DODAC vazio. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. **(A)** Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 (2,0 – 37 mM), em relação ao tempo (T=dias). **(B)** Distribuição dos lipossomas DODAC vazios (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias).

4.1.2. Determinação do Potencial Zeta

A carga de superfície da formulação lipossomal DODAC/FO-S foi determinada em 0, 1, 8 e 15 dias após o preparo. O potencial zeta foi inferido com o objetivo de se verificar a influência do meio dispersante e da FO-S na dissociação de espécies iônicas presentes nos anfifílicos de DODAC. Os lipossomas, nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 e 37 mM de FO-S e 10 mM de DODAC, padrão para todas as amostras, apresentaram potencial zeta de 54,00; 45,17; 43,03; 37,90; 36,00 e 33,20 milivolts (mV), respectivamente, após o preparo (T0). O potencial zeta da formulação lipossomal após 15 dias foi de 44,87; 41,67; 34,23; 35,90; 33,01; 26,57 e 29,47 mV, respectivamente (Figura 13 A). Corroborando os dados da determinação do raio hidrodinâmico, os valores do potencial zeta destes lipossomas sugerem menor estabilidade, pois mostram um decaimento no potencial com o aumento da concentração da FO-S, diminuindo assim as forças repulsivas entre as partículas - dados que reforçaram a substituição deste modelo.

Os lipossomas com 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM de FO-S e 10 mM de DODAC, padrão para todas as amostras, apresentaram valores médios do potencial zeta de 61,87; 54,47; 54,07; 67,90; 62,00 e 57,00 mV, respectivamente, no dia do preparo (T0). Após 15 dias, os valores médios do potencial zeta foram de 46,88; 34,17; 31,03; 55,83; 35,60 e 36,50 mV, respectivamente (Figura 13 B). Os lipossomas com DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM) tiveram valores médios de potencial zeta de 46,87; 54,20; 56,23; 69,73; 55,10 e 53,53 mV, respectivamente, no dia do preparo. Os valores médios obtidos no 15º dia (T15) foram de 44,05; 37,01; 38,03; 37,33; 34,43 e 36,40 mV, respectivamente (Figura 14 A).

O potencial zeta dos lipossomas de DODAC vazios, nas molaridades correspondentes as utilizadas para a formulação lipossomal DODAC/FO-S, também foi determinado, utilizando-se os valores obtidos como referenciais. Os lipossomas DODAC 10 mM vazios apresentaram potencial zeta de 65,03 mV (T0) e 55,10 mV (T15) (Figuras 13 A e B). Os lipossomas DODAC vazios, nas concentrações de 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM, tiveram valores médios de 41,73; 41,73; 64,00; 53,66; 58,50 e 60,36 mV, respectivamente, no dia 0. Após 15 dias, os valores foram de 43,63; 45,20; 43,40; 49,50; 44,07 e 50,90 mV, respectivamente (Figura 14 B). Os valores de potencial zeta para os lipossomas de DODAC vazios serviram de parâmetro comparativo para a formulação lipossomal DODAC/FO-S.

Figura 13: Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. **(A)** Potencial zeta dos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S (2,0 - 37 mM) e lipossomas de DODAC 10 mM vazios, em relação ao tempo (T=dias). **(B)** Potencial zeta dos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM) e lipossomas de DODAC 10 mM vazios, em relação ao tempo (T=dias).

Figura 14: Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S e DODAC vazios. O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes. **(A)** Potencial zeta da formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias). **(B)** Potencial zeta dos lipossomas DODAC vazios (0,3 – 2,0 mM), em relação ao tempo (T=dias).

4.1.3. Eficiência de encapsulação da FO-S

A concentração de FO-S foi determinada quantificando-se os íons fosfatos em solução, por espectrofotometria na região do visível. A FO-S possui apenas um átomo de fósforo por molécula, de modo que a concentração de fósforo determinada corresponde à de FO-S. As amostras de DODAC/FO-S foram submetidas a uma separação cromatográfica de exclusão por peso molecular, em coluna de Sephadex G-25, utilizando-se sacarose 2,0 mM como eluente. A dosagem de fosfato foi realizada para as amostras de DODAC 10 mM/FO-S 2,0 mM e DODAC/FO-S 2,0 mM (1:1), subsequentemente ao preparo (T0) e após 40 dias (T40). Foram utilizadas estas concentrações porque massas menores poderiam ser perdidas na coluna ou impossibilitar a separação da fração livre, em relação à encapsulada. Não foi possível separar os lipossomas por ultracentrifugação, uma vez que a carga superficial na membrana não permitiu a sua sedimentação dos lipossomas devido a força de repulsão entre eles.

A taxa de encapsulação da FO-S em lipossomas de DODAC (10 mM) foi de 44,98%, no dia do preparo (T0) (Figura 15 A). Em 40 dias, o teor de fosfato foi de 44,76% (Figura 15 B). Os lipossomas com 2,0 mM de DODAC/FO-S apresentaram média de 51,40% de teor de fosfato, no dia do preparo (T0) (Figura 16 A). O teor de fosfato permaneceu constante após 40 dias, com média de 49,6% (Figura 16 B), não havendo diferenças significativas neste período analisado.

Figura 15: Teor de fosfato na formulação lipossomal DODAC/FO-S. Teor de fosfato nos lipossomas DODAC 10 mM/FO-S 2,0 mM no dia 0 (A) e 40 dias após o preparo (B). O gráfico mostra a correlação da média de três experimentos independentes.

Figura 16: Teor de fosfato na formulação lipossomal DODAC/FO-S. Teor de fosfato nos lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM no dia 0 (A) e 40 dias após o preparo (B). O gráfico mostra a correlação da média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.1.4. Caracterização morfológica dos lipossomas DODAC/FO-S por MEV

As imagens obtidas por MEV fornecem um importante parâmetro para a avaliação da morfologia e do arranjo dos lipossomas, corroborando com os aspectos físicos e químicos obtidos por meio do DLS. Com este intuito, a MEV foi realizada para analisar a morfologia e disposição desses lipossomas.

Os lipossomas de DODAC vazios e a formulação lipossomal DODAC/FO-S (1:1) nas concentrações de 0,3 mM e 2,0 mM, apresentaram morfologia esférica e se distribuíram de forma polidispersa devido a carga presente na superfície (Figura 17 A-D). A formulação lipossomal DODAC/FO-S (Figura 17 C e D) apresentou maior homogeneidade morfológica, quando comparada aos lipossomas vazios (Figura 17 A e B). Também foi possível observar que os lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM tiveram padrões menores, em relação aos de 0,3 mM (Figura 17 C e D).

Figura 17: Eletromicrografia representativa dos lipossomas de DODAC vazios e da formulação lipossomal DODAC/FO-S por MEV. As eletromicrografias demonstram a morfologia e a distribuição dos lipossomas de DODAC/FO-S e DODAC vazio (0,3 e 2,0 mM). Lipossomas DODAC vazios com 0,3 mM (A) e 2,0 mM (B). Lipossomas DODAC/FO-S nas concentrações de 0,3 mM (C) e 2,0 mM (D).

4.2. Ensaios *in vitro*

4.2.1. Determinação da citotoxicidade nas células tumorais

O potencial citotóxico da FO-S, do carreador vazio DODAC e DODAC/FO-S, em diferentes concentrações, foi avaliado nas linhagens tumorais murinas de melanoma B16F10 e carcinoma hepatocelular (CHC) Hepalcl7 e melanoma humano Skmel-28, por meio do ensaio de redução do MTT, após 24 horas de tratamento. Este teste foi realizado com o intuito de determinar os valores da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das diferentes formulações.

A capacidade de induzir citotoxicidade da FO-S e da formulação lipossomal foi analisada e fotodocumentada, utilizando um microscópio óptico invertido. Após o período de tratamento com FO-S 0,3 e 2,0 mM, as células de melanoma murino B16F10 apresentaram perda da adesão, alterações da sua morfologia, retração citoplasmática e formação de corpos apoptóticos. As células tratadas com os lipossomas DODAC/FO-S (1:1) exibiram alterações morfológicas acentuadas, quando comparadas com as células tratadas apenas com FO-S, sendo possível observar a formação de precipitado e fragmentação celular (Figura 18 A-E).

Os resultados de avaliação da viabilidade celular na linhagem B16F10 demonstraram que a FO-S induziu citotoxicidade nas concentrações de 0,3 - 2,0 mM, com valor de IC₅₀ de 4,4 mM (Figura 19 A). Em contrapartida, os lipossomas DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM) promoveram citotoxicidade em todas as concentrações testadas, resultando no IC₅₀ de 1,2 mM (Figura 19 B). Os lipossomas DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM) também foram citotóxicos em todas as concentrações avaliadas, com IC₅₀ de 0,8 mM (Figura 19 C). Por outro lado, os lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM) não reduziram a viabilidade celular (Figura 19 D).

As células de CHC murino Hepalcl7 tratadas com FO-S (0,3 e 2,0 mM) e DODAC/FO-S (1:1) (0,3 - 2,0 mM) apresentaram alterações morfológicas similares as verificadas nas células de B16F10, descritas anteriormente (Figura 20 A-E). O tratamento destas células com FO-S (0,3 - 2 mM) resultou em citotoxicidade significativa, com valor de IC₅₀ de 2,9 mM (Figura 21 A). Os lipossomas DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM) e DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM) promoveram redução significativa no valor de IC₅₀, em comparação ao tratamento com FO-S, apresentando valores de 0,001 mM e 0,1 mM,

respectivamente (Figura 21 B e C). Os lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM) induziram citotoxicidade, havendo redução de $41.6 \pm 3.4\%$ da viabilidade celular na maior concentração testada (Figura 21 D).

O tratamento das células de melanoma humano Skmel-28 com FO-S (0,3 e 2,0 mM) e DODAC/FO-S 1:1, 0,3-2,0 mM também resultou em alterações morfológicas e na formação de debris celulares (Figura 22 A-E). A FO-S (0,3 – 2,0 mM) induziu citotoxicidade significativa a partir de 1,6 mM, apresentando IC_{50} de 1,8 mM (Figura 23 A). O tratamento com a formulação lipossomal DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM) e DODAC/FO-S 1:1 resultou em valores de IC_{50} de 1,12 mM e 1,64 mM, respectivamente (Figura 23 B e C). Similarmente, o tratamento com os lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM) resultou no IC_{50} de 1,8 mM (Figura 23 D).

Figura 18: Fotomicrografias das análises morfológicas das células de melanoma murino B16F10. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S **(B)** 0,3 mM e **(C)** 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) **(D)** 0,3 mM e **(E)** 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos, que correspondem aos lipossomas associados a fragmentos celulares e corpos apoptóticos (asterisco).

Figura 19: Determinação da citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazio (0,3 - 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s. = não significativo.

Figura 20: Fotomicrografias das análises morfológicas das células de CHC murino Hepa1c1c7. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos (asterisco).

Figura 21: Determinação da citotoxicidade em células de CHC murino Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio, durante o período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomos DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 22: Fotomicrografias das análises morfológicas das células de melanoma humano Skmel-28. (A) Controle, no qual as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S (B) 0,3 mM e (C) 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) (D) 0,3 mM e (E) 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos (seta). Nas células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM verifica-se a formação de precipitados lipídicos (asterisco).

Figura 23: Determinação da citotoxicidade em células de melanoma humano Skmel-28 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomos DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.2.2. Citotoxicidade na linhagem normal endotelial humana HUVEC

Levando em consideração que os compostos antineoplásicos devem ser mais seletivos para células tumorais, o efeito citotóxico da FO-S e da formulação lipossomal DODAC/FO-S foi avaliado na linhagem de células endoteliais humanas HUVEC. A viabilidade celular, após 24 horas de tratamento, foi analisada pelo ensaio de MTT.

Foi observado que as células endoteliais HUVEC, expostas a 0,3 e 2,0 mM de FO-S, mostraram baixa sensibilidade ao tratamento, havendo alterações discretas na morfologia e formação de corpos apoptóticos. Nas células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, ocorreu discreta formação de precipitado, fragmentos celulares e corpos apoptóticos, em comparação com os efeitos observados nas linhagens tumorais (Figura 24 A-D).

A FO-S (0,3 - 2 mM) não induziu citotoxicidade significativa nas células endoteliais HUVEC, promovendo uma redução média de 23,6% no número de células viáveis, com a maior concentração testada (Figura 25 A). A formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM) promoveu citotoxicidade significativa nas concentrações testadas, reduzindo em 59,8% o número de células viáveis, na maior concentração avaliada (Figura 25 B). Por outro lado, a formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM) apresentou menor citotoxicidade em relação a formulação anterior, reduzindo em 35,1% a viabilidade celular, na maior concentração (Figura 25 C). Os lipossomas de DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM) apresentaram maior citotoxicidade na ausência da FO-S, reduzindo em 53,2% o número de células viáveis, na concentração de 2,0 mM (Figura 25 D).

Devido à linhagem HUVEC ter sido mais sensível aos efeitos da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM), estes lipossomas foram excluídos dos estudos posteriores. A formulação que demonstrou maior efeito seletivo foi DODAC/FO-S 1:1, pois induziu citotoxicidade significativa nas linhagens tumorais sem comprometer significativamente a viabilidade das células endoteliais normais HUVEC (Figura 25 A-D).

Figura 24: Fotomicrografias das análises morfológicas das células endoteliais humanas HUVEC. (A) Controle, no qual observa-se as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com FO-S **(B)** 0,3 mM e **(C)** 2,0 mM; DODAC/FO-S (1:1) **(D)** 0,3 mM e **(E)** 2,0 mM. É possível visualizar a presença de corpos apoptóticos nas células tratadas com FO-S e DODAC/FO-S (seta).

Figura 25: Determinação da citotoxicidade em células endoteliais humanas HUVEC pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio, pelo período de 24 horas. Tratamento com (A) FO-S (0,3 - 2,0 mM); (B) DODAC (10 mM)/FO-S (0,3 - 2,0 mM); (C) DODAC/FO-S 1:1 (0,3 - 2,0 mM); (D) Lipossomas DODAC vazios (0,3 - 2,0 mM). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.2.3. Perfil de distribuição das células nas fases do ciclo celular na linhagem de melanoma B16F10 e CHC Hepa1c1c7

Os compostos foram avaliados quanto a capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de melanoma B16F10 e CHC murino Hepa1c1c7 foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S 1:1, nas concentrações de 0,3 mM e 2,0 mM. As células B16F10 foram incubadas por um período de 24 horas e as células de Hepa1c1c7 por 12 horas. O tempo de exposição aos compostos foi determinado levando-se em consideração o resultado da citotoxicidade, avaliada por meio do ensaio de MTT. Como as células Hepa1c1c7 apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S durante o período de 24 horas, então o tempo de exposição foi reduzido para se observar as mudanças na distribuição das células nas fases do ciclo celular.

A porcentagem de células B16F10 nas diferentes fases do ciclo celular foi quantificado após o tratamento por 24 horas. O número de células na fase sub-G₁ aumentou significativamente após o tratamento com DODAC (0,3 e 2,0 mM) e DODAC/FO-S (0,3 mM), apresentando valores percentuais de $28,3 \pm 2,8\%$, $43,0 \pm 5,6\%$ e $25,65 \pm 2,6\%$, respectivamente (Figura 26 A). Foi observada uma diminuição significativa na população de células na fase G₀/G₁, em todos os tratamentos, em relação ao grupo controle (Figura 26 A). O tratamento com FO-S 0,3 mM e 2,0 mM promoveu aumento significativo de células na fase S, com valores de $9,8 \pm 1,4\%$ (**p<0.01) e $13,1 \pm 1,4\%$ (***p<0.001), respectivamente. O tratamento com a FO-S (0,3 e 2,0 mM) e com DODAC/FO-S 1:1 (2,0 mM) aumentou significativamente a população de células na fase G₂/M, com percentual médio de $9,7\% \pm 1,4\%$, $14,4 \pm 1,3\%$ e $20,6 \pm 1,2\%$ (***p<0.001), respectivamente (Figura 26 B).

A distribuição das células de CHC murino Hepa1c1c7 nas diferentes fases do ciclo celular também sofreu alterações percentuais em relação ao grupo controle. Entretanto, não foi possível observar mudanças significativas na porcentagem de células na fase sub-G₁ entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 27 A). Após os tratamentos com DODAC/FO-S 0,3 mM e DODAC/FO-S 2,0 mM, o número de células na fase G₀/G₁ diminuiu significativamente em relação ao grupo controle ($74,7 \pm 1,1\%$), obtendo-se percentuais de $53,2 \pm 1,2\%$ e $58,9 \pm 3,5\%$, respectivamente (Figura 27 A).

Corroborando os dados obtidos a partir do tratamento da linhagem de B16F10, o percentual de células Hepa1c1c7 nas fases S e G₂/M aumentou subsequentemente ao tratamento com FO-S (0,3 mM e 2,0 mM) e DODAC/FO-S (0,3 mM e 2,0 mM). A porcentagem de células na fase S, após os tratamentos com FO-S 0,3 mM e 2,0 mM, foi de $3,2 \pm 0,9\%$ e $3,1 \pm 0,3\%$, respectivamente. (Figura 27 B). A exposição à formulação lipossomal promoveu elevação significativa das células na fase S, em comparação aos outros tratamentos, cujos percentuais foram de $7,1 \pm 1,9\%$ para o tratamento com DODAC/FO-S 0,3 mM e $9,1 \pm 0,8\%$ com DODAC/FO-S 2,0 mM. O percentual de células na fase G₂/M após o tratamento com FO-S 0,3 mM foi de $2,5 \pm 1,5\%$ e de $4,0 \pm 0,1\%$ na maior concentração (2,0 mM). Entretanto, um aumento significativo foi observado apenas no tratamento com a formulação lipossomal, obtendo-se valores de $14,3 \pm 1,7\%$ para DODAC/FO-S 0,3 mM e $14,3 \pm 2,1\%$ para DODAC/FO-S 2,0 mM (Figura 27 B).

Figura 26: Análise das fases do ciclo celular nas células de melanoma murino B16F10 tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos, por um período de 24 horas. O gráfico mostra a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. **(A)** População de células nas fases Sub-G₁ e G₀/G₁; **(B)** População de células nas fases S e G₂/M. Grau de significância estatística *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

Figura 27: Análise das fases do ciclo celular em células de CHC murino Hepa1c1c7 tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos, por um período de 12 horas. O gráfico mostra a correlação do efeito no ciclo celular expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. **(A)** População de células nas fases Sub-G₁ e G₀/G₁; **(B)** População de células nas fases S e G₂/M. Grau de significância estatística *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4.2.4. Proporções de células de CHC murino Hepa1c1c7 apoptóticas e necróticas

As células de CHC murino Hepa1c1c7 foram tratadas com FO-S, DODAC/FO-S 1:1 e DODAC, nas concentrações de 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,0 mM, durante o período de 12 horas. Posteriormente, as células nos estágios de apoptose, apoptose tardia e necrose foram quantificadas por citometria de fluxo, utilizando o kit FITC-Anexina V/PI.

A incubação com FO-S (0,3 e 2,0 mM) resultou no aumento significativo do número de células apoptóticas, como menor percentual de células necróticas. A porcentagem de células apoptóticas, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, foi de $13,9 \pm 3,4\%$ e $21,2 \pm 5,4\%$, respectivamente. A porcentagem de células necróticas, foi de $7,5 \pm 0,3\%$ e $9,6 \pm 0,8\%$, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, respectivamente. Apenas na maior concentração de 2,0 mM foi possível observar um aumento no número de células em apoptose tardia, apresentado valor percentual de $9,7 \pm 4,6\%$ (Figura 28 A e B).

O tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 0,3 mM e 2,0 mM aumentou significativamente o número de células necróticas, com valor de $9,6 \pm 0,14\%$ e $14,3 \pm 0,3\%$, respectivamente. Também houve uma elevação significativa no número de células em apoptose tardia, com percentual de $30,4 \pm 0,4\%$ para o tratamento com 0,3 mM e $31,0 \pm 1,3\%$ com 2,0 mM. O tratamento com o carreador vazio DODAC 0,3 mM aumentou o número de células necróticas, em menor proporção em comparação com os outros tratamentos, com valor percentual de $6,7 \pm 0,9\%$ (Figura 28 A e B). Na concentração de 2,0 mM, o DODAC não promoveu alterações significativas.

A

B

Figura 28: Avaliação do percentual de células nos estágios de apoptose, apoptose tardia e necrose, por citometria de fluxo. As células de CHC murino Hepal1c7 foram tratadas com diferentes concentrações de FO-S, DODAC/FO-S e DODAC, por um período de 12 horas. (A) Dot plots representativos demonstrando as diferentes populações de células em apoptose (Anexina V), necrose (PI) ou apoptose tardia (Anexina V/PI). (B) O gráfico de barras demonstra os valores expresso em média $\pm$ DP de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4.2.5. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular nas células de melanoma B16F10

As células de melanoma B16F10 foram tratadas com FO-S 2,0 mM, DODAC vazio e DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM, por um período de 24 horas, e avaliadas quanto a expressão do receptor de morte celular DR4, das caspases 3 e 8 ativas e liberação do citocromo c, por citometria de fluxo. As concentrações utilizadas foram as que apresentaram maior efetividade em induzir citotoxicidade significativa nas linhagens tumorais, sem comprometer a viabilidade das células normais.

A expressão do TRAL - receptor DR4 aumentou significativamente após a exposição ao DODAC (2,0 mM) e a DODAC/FO-S 1:1 (2,0 mM). Os respectivos percentuais foram de $7,5 \pm 1,3\%$ e $8,4 \pm 0,4\%$ (Figura 29 A e B). O tratamento com DODAC/FO-S (2,0 mM) foi efetivo em modular, de forma significativa, a expressão das caspases 3 e 8 ativas, com valores médios de $11,7 \pm 0,3\%$ (Figura 30 A e B) e $29,8 \pm 5,5\%$ (Figura 31 A e B), respectivamente. O DODAC vazio (2,0 mM) também aumentou significativamente a expressão da caspase 3 ativa; porém, em menor proporção em relação a formulação lipossomal, apresentando valor percentual de $3,4 \pm 0,6\%$, (Figura 30 A e B).

O tratamento com DODAC/FO-S (2,0 mM) e DODAC vazio (2,0 mM) ocasionou um aumento significativo do citocromo c livre no citoplasma, em relação ao grupo controle; os valores médios apresentados para DODAC/FO-S e DODAC vazio foram de $4,4 \pm 0,6\%$ e $2,5 \pm 0,7\%$, respectivamente (Figuras 32 A e B).

Figura 29: Modulação da expressão do TRAIL receptor-DR4 pela FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, avaliada por citometria de fluxo. As células melanoma murino B16F10 foram tratadas, por um período de 24 horas, com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 30: Modulação da atividade da caspase 3 pela FO-S, DODAC e DODAC/FO-S avaliada por citometria de fluxo. As células de melanoma murino B16F10 foram tratadas, por 24 horas, com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 3 ativa em função das concentrações (mM) dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 31: Análise da expressão da caspase 8 ativa em células de melanoma murino B16F10. A expressão da caspase 8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 8 ativa em função das concentrações (mM) dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 32: Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células de melanoma murino B16F10. A expressão de citocromo c foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo c. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.2.6. Expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de morte celular e controle do ciclo celular em células de CHC murino Hepa1c1c7

As células Hepa1c1c7 foram tratadas com FO-S (2,0 mM), DODAC (0,3 e 2,0 mM) e DODAC/FO-S (0,3 e 2,0 mM), durante o período de 24 horas, e analisadas a expressão do receptor de morte celular DR4, das caspases 3 e 8 ativas e liberação do citocromo c, por citometria de fluxo. Como a linhagem de células Hepa1c1c7 demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com a formulação lipossomal, a expressão de outras proteínas envolvidas no *checkpoint*, adesão celular, regulação do ciclo celular e via intrínseca de morte celular programada também foram quantificadas, sendo estas: p53, p21, p27, CD44, CD90, Bax, Bcl-2 e ciclina D1.

Após o período de tratamento, foi possível observar que a expressão da proteína p53 aumentou significativamente com DODAC/FO-S 2,0 mM ($38 \pm 1,7\%$) e DODAC vazio 2,0 mM ($22,9 \pm 1,3\%$) (Figura 33 A e B). Em contrapartida, a expressão da proteína ciclina D1 diminuiu com o tratamento FO-S 2,0 mM ($16,7 \pm 1,5\%$); DODAC/FO-S 2,0 mM ($14,8 \pm 1,5\%$) e DODAC vazio 2,0 mM ($21,4 \pm 0,1\%$) (Figura 34 A e B).

A expressão da proteína p21 aumentou significativa após o tratamento das células Hepa1c1c7 com a FO-S 2,0 mM ($1,9 \pm 0,1\%$), DODAC/FO-S (0,3 mM - $4,3 \pm 0,3\%$ e 2,0 mM - $25,5 \pm 0,7\%$) e DODAC vazio (0,3 mM - $1,6 \pm 0,3\%$ e 2,0 mM - $18,8 \pm 0,5\%$) (Figura 35 A e B). A proteína p27 também teve elevação significativa com FO-S 2,0 mM ($8,2 \pm 1,6\%$); DODAC/FO-S (0,3 mM - $16 \pm 1,2\%$ e 2,0 mM - $34,6 \pm 0,9\%$) (Figura 36 A e B).

Após o tratamento das células Hepa1c1c7, foi verificado o aumento significativo da expressão da proteína Bax com FO-S 2,0 mM ($9,1 \pm 1,2\%$), DODAC/FO-S 2,0 mM ($11,9 \pm 0,1\%$) e DODAC 2,0 mM ($6,5 \pm 0,2\%$) (Figura 37 A e B). Em contraste, a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 diminuiu significativamente após o tratamento com FO-S 2,0 mM ($1,1 \pm 0,9\%$), DODAC/FO-S (0,3 mM - $0,1 \pm 0,1\%$; 2,0 mM - $0,6 \pm 0,1\%$) e DODAC 2,0 mM ($1,7 \pm 0,1\%$) (Figura 38 A e B).

As células de CHC Hepa1c1c7 tiveram aumento significativo na expressão do receptor de morte celular DR4 após o tratamento com DODAC/FO-S 2,0 mM, no qual o valor médio foi de $11,4 \pm 0,1\%$ (Figura 39 A e B). A formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM demonstrou especificidade em modular a via apoptótica nesta linhagem, mediando o aumento

na expressão das caspases 3 e 8 ativas e a liberação do citocromo c, com valores percentuais de $13,5 \pm 0,5\%$ (Figura 40 A e B), $17,0 \pm 0,7\%$ (Figura 41 A e B) e $11,0 \pm 0,7\%$ (Figura 42 A e B), respectivamente. O tratamento com os lipossomas de DODAC vazios (2,0 mM) também induziu elevação significativa na expressão de citocromo c, apresentando valor percentual de $2,8 \pm 0,1\%$ (Figura 42 A e B).

Os marcadores CD90 e CD44 também foram quantificados subsequentemente ao período de tratamento. Foi possível verificar que a expressão do CD90 diminuiu após o tratamento com FO-S 2,0 mM ($1,5 \pm 0,9\%$) e DODAC/FO-S (0,3 mM - $1,3 \pm 0,1\%$; 2,0 mM - $1,7 \pm 0,9\%$) (Figura 43 A e B). Similarmente, a expressão do CD44 diminuiu significativamente com todos os tratamentos, não havendo diferença estatística entre os tratamentos (Figura 44 A e B).

Figura 33: Análise da expressão da proteína p53 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína p53 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína p53 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

Figura 34: Análise da expressão da proteína ciclina D1 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína ciclina D1 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína ciclina D1 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 35: Análise da expressão da proteína p21 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína p21 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína p21 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Figura 36: Análise da expressão da proteína p27 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína p27 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína p27 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Figura 37: Análise da expressão da proteína Bax em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína Bax foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína Bax em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Figura 38: Análise da expressão da proteína Bcl-2 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína Bcl-2 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da proteína Bcl-2 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 39: Análise da expressão do TRAIL - receptor DR4 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão do TRAIL - receptor DR4 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ***p<0.001.

Figura 40: Análise da expressão da caspase 3 ativa em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da caspase 3 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 3 ativa em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

Figura 41: Análise da expressão da caspase 8 ativa em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da caspase 8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 8 ativa em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

Figura 42: Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão de citocromo c no citoplasma foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo c no citoplasma em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 43: Análise da expressão da proteína CD90 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína CD90 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do marcador CD90 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

Figura 44: Análise da expressão da proteína CD44 em células de CHC murino Hepa1c1c7. A expressão da proteína CD44 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do marcador CD44 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.2.7. Expressão de proteínas envolvidas na apoptose em células endoteliais normais HUVEC

As células HUVEC foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S durante 24 horas, sendo subsequentemente avaliadas quanto a ativação do receptor de morte celular DR4, da caspases 3 e 8 ativas e da liberação do citocromo c. A modulação das proteínas analisadas, envolvidas nas vias apoptóticas extrínseca e intrínseca, ocorreu em proporções significativamente menores nas linhagens normais endoteliais HUVEC (Figuras 45 - 48), em comparação com as células tumorais.

O receptor DR4 apresentou aumento significativo apenas com o tratamento DODAC/FO-S 2,0 mM, com valor de $0,9 \pm 0,1\%$ (Figura 45). Em contrapartida, a expressão da caspase 3 não foi significativamente alterada após o tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S (Figura 46 A e B). A expressão da proteína caspase 8 aumentou após o tratamento com FO-S 2,0 mM e DODAC/FO-S 2,0 mM, apresentando valores de $1,1 \pm 1,2\%$ e $1,1 \pm 0,1\%$ (Figura 47), respectivamente. Apenas o tratamento com DODAC/FO-S 2,0 mM promoveu a elevação da expressão do citocromo c, com valor de $1,3 \pm 1,1\%$ (Figura 48).

Figura 45: Análise da expressão do TRAIL - receptor DR4 em células endoteliais normais HUVEC. A expressão do TRAIL - receptor DR4 foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do TRAIL - receptor DR4 em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$.

Figura 46: Análise da expressão da caspase 3 ativa em células endoteliais normais HUVEC. A expressão da caspase 3 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 3 ativa em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. n.s.= não significativo.

Figura 47: Análise da expressão da caspase 8 ativa em endoteliais normais HUVEC. A expressão da caspase 8 ativa foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S. (A) Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. (B) O gráfico de barras demonstra o nível de expressão da caspase 8 ativa em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

Figura 48: Análise da expressão de citocromo c no citoplasma em células endoteliais normais HUVEC. A expressão de citocromo c no citoplasma foi quantificada por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento com FO-S e DODAC/FO-S. **(A)** Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. **(B)** O gráfico de barras demonstra o nível de expressão do citocromo c no citoplasma em função das concentrações dos compostos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$.

4.2.8. Avaliação da internalização dos lipossomas DODAC/FO-S em células de CHC Hepa1c1c7

A internalização dos lipossomas DODAC/FO-S com o traçado fluorescente (Dil) foi analisada por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM. Os lipossomas marcados foram visualizados e distinguidos pela cor verde e o núcleo pela cor preta. Após o tratamento por um período de 3 horas, foi observada a presença dos lipossomas DODAC/FO-S 0,3 mM marcados no citoplasma das células Hepa1c1c7, comprovando que ocorreu a sua internalização em um curto período de tempo. Com o mesmo tratamento, durante um período de 6 horas, foi verificada uma maior internalização dos lipossomas, evidenciada pela maior emissão de fluorescência no citoplasma. As células tratadas com os lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM, durante os tempos de 3 e 6 horas, também internalizaram os lipossomas, sendo possível observá-los no citoplasma, a partir do menor tempo avaliado (Figura 49).

Figura 49: Fotomicrografias dos lipossomas DODAC/FO-S/Dil em células CHC murino Hepa1c1c7, analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com a formulação lipossomal (0,3 e 2,0 mM) contendo o marcador fluorescente durante os tempos de 3 e 6 horas. Os lipossomas marcados podem ser observados e distinguidos pela cor verde no citoplasma (seta) e o núcleo pela cor preta ao centro (asterisco).

4.2.9. Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células Hepa1c1c7

Para a análise do $\Delta\Psi_m$ foi utilizado a rodamina 123, um fluorocromo catiônico que possui a capacidade de transpor a membrana mitocondrial, usando como força eletrostática o gradiente negativo da organela e, deste modo, incorporando-se no seu interior e emitindo alta fluorescência nas células viáveis. Já nas células em apoptose, especificamente pela via intrínseca, ocorrem alterações do potencial transmembrânico, o que ocasiona o efluxo da rodamina 123 da mitocôndria, resultando na redução da fluorescência.

As células Hepa1c1c7 foram tratadas com a FO-S, DODAC/FO-S e DODAC vazio, por um período de 6 horas, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM. As células tratadas com a FO-S e DODAC/FO-S (0,3 mM e 2,0 mM), apresentaram redução no $\Delta\Psi_m$, em comparação com o grupo controle, que apresentou alta emissão de fluorescência. O tratamento apenas com a FO-S, na menor concentração, já demonstrou eficácia na redução do $\Delta\Psi_m$. As células que foram tratadas com o DODAC (0,3 mM e 2,0 mM) exibiram leve atenuação da fluorescência, em relação com o grupo controle. Entretanto, a marcação positiva demonstra que as células, provavelmente, possuem mitocôndrias funcionais e, portanto, ainda estão viáveis (Figura 50).

Figura 50: Fotomicrografias das células de CHC murino Hepa1c1c7 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde) e o núcleo com DAPI (azul), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período 6 horas. Controle (A, B); células tratadas com a FO-S 0,3 mM (C, D); FO-S 2,0 mM (E, F); DODAC/FO-S mM (G, H); DODAC/FO-S 2,0 mM (I, J); DODAC 0,3 mM (L, M); DODAC 2,0 mM (N, O).

4.2.10. Autofagia e alterações morfológicas nas células de CHC Hepa1c1c7

Os lisossomas possuem um interior caracterizado por baixo pH (conteúdo rico em enzimas digestivas), possibilitando a sua marcação pelo fluorocromo metacromático AO (laranja de acridina). Este, ao penetrar na membrana lisossomal e entrar em contato com o conteúdo ácido, é protonado e aprisionado. Sob excitação de luz azul, o AO fluoresce em vermelho (lisossomas) e verde (núcleo e citosol). Quando ocorre a ruptura dos lisossomas, a fluorescência verde citosólica aumenta, bem como a fluorescência vermelha dos lisossomas diminui.

As células Hepa1c1c7 foram tratadas com a FO-S, DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM, por um período de 6 horas. Posteriormente, os efeitos destes compostos sobre os lisossomos foram avaliados por microscopia confocal a laser, utilizando-se a marcação com AO e com o fluoróforo DAPI (que cora o núcleo). Este ensaio foi realizado apenas com as maiores concentrações dos compostos, as quais foram efetivas em induzir citotoxicidade.

Nas células do grupo controle foi observado a marcação intensa de alguns lisossomos com aspecto granular (fluorescência vermelha), distribuídos de forma uniforme no citoplasma. O mesmo padrão de distribuição foi observado nas células tratadas com a FO-S; entretanto, o tratamento induziu o aumento do número de lisossomos. Nas células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S houve uma diminuição no número de lisossomos e ocorreram alterações morfológicas correspondentes ao processo apoptótico, como os *bubbles* de membrana e a fragmentação nuclear. As células tratadas apenas com o DODAC apresentaram padrão de distribuição e marcação dos lisossomos semelhantes as células do grupo controle (Figura 51).

Figura 51: Fotomicrografias das células de CHC murino Hepa1c1c7 com lisossomos marcados com laranja de acridina (vermelho) e o núcleo com DAPI (azul), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período 6 horas. Controle (A); tratamentos com FO-S 2,0 mM (B, C); DODAC/FO-S 2,0 mM (D e E) e DODAC 2,0 mM (F).

4.2.11. Expressão da caspase 3 ativa nas células de melanoma B16F10

A ativação da caspase 3 foi avaliada por microscopia confocal a laser, nas células B16F10, a fim de se comparar as imagens com os resultados quantitativos obtidos por citometria.

As células tumorais B16F10 foram tratadas com FO-S, DODAC vazio e a formulação lipossomal DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, por 24 horas. As células do grupo controle não apresentaram caspase 3 ativa (Figura 52). A expressão da caspase 3 ativa foi positiva após todos os tratamentos, sendo este efeito dependente da concentração. Foi observado que a exposição a formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM ocasionou um maior aumento na expressão da caspase 3 ativa, em relação a FO-S. A expressão da caspase 3 ativa foi observada nos diferentes compartimentos celulares; isto se deve ao processo de apoptose no qual as caspases são localizadas ou associadas nos vários compartimentos intracelulares, incluindo citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (Figura 52).

Figura 52: Fotomicrografias da expressão da caspase 3 ativa em células de melanoma murino B16F10, analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com FO-S, DODAC e DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante um período de 24 horas. (A) Células do grupo controle, as quais não apresentam marcação para a caspase 3 ativa; (B, C) Células tratadas com FO-S 0,3 e 2,0 mM, respectivamente; (D, E) Células tratadas com DODAC 0,3 e 2,0 mM, respectivamente; (F, G) Células tratadas com DODAC/FO-S 0,3 e 2,0 mM, respectivamente. A expressão da caspase 3 ativa apresenta marcação concentração dependente.

4.2.12. Caracterização morfológica dos lipossomas e das células tratadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células tumorais de melanoma B16F10 foram tratadas durante 24 horas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, e posteriormente avaliadas quanto as alterações morfológicas, por MEV. A interação entre as células e os lipossomas foi visualizada no tempo de 24 horas mesmo após lavagens consecutivas com solução de PBS, na qual os lipossomas permaneceram aderidos em toda a superfície celular e mantiveram a sua morfologia esférica. Também foi possível observar lipossomas com morfologia inalterada no meio de cultura. As modificações morfológicas das células B16F10 correspondem às alterações ocasionadas pelo processo apoptótico, como o surgimento dos *bubbles* de membrana, perda de adesão celular e a formação de corpos apoptóticos (Figura 53).

Figura 53: Eletromicrografia representativa das células de melanoma murino B16F10 tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, analisadas por MEV. As células foram tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S nas concentrações de 0,3 e 2,0 mM, durante 24 horas, e posteriormente analisadas por MEV. (A, B, C) Células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 0,3 mM. (D, E, F) Células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM. Observa-se, 24 horas após o tratamento, agregados lipídicos aderidos à superfície da membrana celular (seta), alguns com morfologia esférica (seta vazada). Nota-se a perda da morfologia celular (E), retração citoplasmática e presença de corpos apoptóticos (F) (cabeça da seta).

4.3. Ensaios *in vivo*

4.3.1. Avaliação da probabilidade de sobrevida global dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Após o período de desenvolvimento do tumor, os animais foram tratados com as doses previamente estabelecidas, pelas vias intraperitoneal (IP) e intra-hepática (IH). Os animais dos grupos que foram expostos a formulação lipossomal DODAC/FO-S, na dose de 89,74 mg/kg, pelas vias IP e IH, apresentaram redução de 50% na sobrevida. As mortes de parte dos animais deste grupo ocorreram imediatamente após a primeira aplicação da dose. Seguindo-se a necropsia, foi possível constatar que os animais morreram devido a embolia causada pela quantidade de material lipídico (DODAC) inoculado. Contudo, os animais dos outros grupos de tratamentos e controle não morreram no decorrer do protocolo terapêutico. Dessa maneira, o grupo DODAC/FO-S, na dose de 89,74 mg/kg, IP e IH, foi excluído dos outros experimentos devido à alta viscosidade desta formulação lipossomal (Figura 54).

Figura 54: Análise da taxa de probabilidade de sobrevida global dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 89,74 mg/kg e 45 mg/kg; FO-S 8,75 mg/kg e DODAC 36,25 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas (5 dias), durante 20 dias. Foi realizada a análise estatística pelo método de *Kaplan-Meier* (** $p < 0,001$). Demais grupos = DODAC/FO-S 45 mg/kg; FO-S 8,75 mg/kg e DODAC 36,25 mg/kg, por ambas as vias.

4.3.2. Avaliação do peso corpóreo dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Após a inoculação das células Hepa1c1c7 nos camundongos C57BL/6J, o peso corporal foi mensurado semanalmente, antes e após o início do tratamento, até o momento da finalização do protocolo terapêutico. Inicialmente, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram peso médio de $23,0 \pm 1,0$ g, no dia 0 (Figura 55 A - C). Após o início do tratamento, os animais do grupo controle tumoral apresentaram aumentos significativos nos dias 14 e 21, com valores médios de peso de $24 \pm 0,6$ g e $24 \pm 1,0$ g, respectivamente (Figura 55 A - C).

Os animais dos grupos diluentes (IP e IH); DODAC/FO-S 45 mg/kg (IH); DODAC (IH) 36,25 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg (IH e IP) não apresentaram alterações significativas no peso, durante o período de tratamento (Figura 55 A - C). Contudo, foi possível observar um aumento significativo do peso médio dos animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP) e DODAC 36,25 mg/kg (IP), no dia 7, com valores médios de $27,6 \pm 1,0$ g e $27 \pm 1,0$ g, respectivamente (Figura 55 A e B). Após o término do protocolo terapêutico, estes grupos também demonstraram diferenças significativas, quando comparados com o grupo diluente (IP).

Figura 55: Determinação do peso dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg, DODAC 36,24 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. No decorrer do período de tratamento, os animais dos grupos controle e tratados tiveram seus pesos aferidos semanalmente. A curva mostra a comparação do peso dos animais dos grupos controle tumoral, diluentes e DODAC/FO-S (A); DODAC (B) e FO-S (C), por ambas as vias de tratamento. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$.

4.3.3. Determinação do peso dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Após o término do protocolo terapêutico, todos os animais foram eutanasiados e necropsiados, com a finalidade de se coletar os órgãos internos, os quais foram fotodocumentados e pesados. Verificou-se que não houve alteração significativa no peso médio do linfonodo, rins, baço, coração e pulmão, entre os grupos controles e tratados. Os valores médios para estes órgãos foram de $0,3 \pm 0,1$ g (linfonodo); $0,4 \pm 0,03$ g (rins); $0,1 \pm 0,05$ g (baço); $0,1 \pm 0,04$ g (coração); $1,2 \pm 0,1$ g (pulmão) (Figura 56 A e B). Estes valores descritos foram obtidos a partir da média de todos os grupos, já que não ocorreram alterações significativas entre eles. Por outro lado, o peso médio do fígado aumentou significativamente no grupo controle tumoral, apresentado valor médio de $1,5 \pm 0,1$ g, em relação aos grupos diluentes, que obtiveram valor médio de $1,2 \pm 0,1$ g (Figura 56 A). Em contrapartida, o peso médio do fígado dos animais dos grupos DODAC/FO-S (IH) e FO-S (IP e IH) reduziu significativamente, em comparação com o grupo controle tumoral ($1,5 \pm 0,1$ g), cujos valores médios corresponderam a $1,2 \pm 0,1$ g, $1,1 \pm 0,1$ g e $1,0 \pm 0,1$ g, respectivamente (Figura 56 A). Estes valores foram similares aos dos grupos diluentes. Os grupos DODAC vazio 36,25 mg/kg (IH e IP) e DODAC/FO-S (IP) não apresentaram diferença significativa no peso médio do fígado, em relação ao grupo controle tumoral (Figura 56 A).

Figura 56: Determinação do peso dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg, DODAC 36,24 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. Após o término do protocolo terapêutico, os órgãos foram coletados e pesados. Pesos do (A) coração, fígado e pulmão; (B) linfonodo, rins e baço. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Os animais foram tratados durante 20 dias com a FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro, o qual foi utilizado para a avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: creatinina, ureia, FA, AST e ALT, que são indicadores da função renal e hepática.

Os animais do grupo controle tumoral apresentaram uma redução significativa na concentração plasmática de ureia, quando comparados aos grupos diluentes IP e IH ($16,1 \pm 0,6$ mmol/L), apresentando valor de $8,7 \pm 0,4$ mmol/L (Figura 57). Em contrapartida, os grupos tratados com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 45 mg/kg (IH) e FO-S 8,75 mg/kg (IP e IH) tiveram aumento significativo na concentração de ureia, em relação ao grupo controle tumoral, com valores de $13 \pm 1,4$ mmol/L, $14,5 \pm 0,8$ mmol/L e $14,4 \pm 0,6$ mmol/L, respectivamente (Figura 57). Estes valores foram próximos aos obtidos para os grupos diluentes IP e IH. Contudo, os animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP) e DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH) não apresentaram alterações significativas, em comparação com o grupo controle tumoral. Os valores da concentração de ureia para estes grupos corresponderam a $10,8 \pm 2,0$ mmol/L, $7,0 \pm 0,5$ mmol/L e $2,3 \pm 0,6$ mmol/L, respectivamente (Figura 57).

A concentração de creatinina dos animais do grupo controle tumoral se elevou significativamente, em comparação aos grupos diluentes ($37,3 \pm 3,0$ μ mol/L) IH e IP, apresentando valor de $60,1 \pm 7,6$ μ mol/L (Figura 58). Entretanto, nos animais tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH) e FO-S 8,75 (IP e IH) ocorreu redução significativa, em comparação com o controle tumoral, apresentando valores correspondentes a $33,59 \pm 7,6$ μ mol/L, $39,5 \pm 3,5$ μ mol/L, $37,7 \pm 3,2$ μ mol/L e $37,0 \pm 3,0$ μ mol/L, respectivamente (Figura 58). Os animais dos grupos de tratamentos DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH) não apresentaram alteração significativa, em relação ao grupo controle tumoral (Figura 58).

Nos animais portadores de CHC que não receberam tratamento, grupo controle tumoral, houve uma redução significativa na concentração de fosfatase alcalina, em comparação aos grupos diluentes ($223,9 \pm 28,5$ U/L), obtendo-se valor de $100 \pm 6,3$ U/L

(Figura 59). Após os tratamentos com DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH) e FO-S 8,75 mg/kg (IP e IH), os animais tiveram um aumento significativo na concentração sérica de fosfatase alcalina. Os valores para estes grupos foram de $185,3 \pm 7,9$ U/L, $190 \pm 22,6$ U/L, 196 ± 6 U/L e $217 \pm 2,4$ U/L, respectivamente (Figura 59). Os animais tratados com DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH) não exibiram diferença significativa na concentração de fosfatase alcalina, comparando-se com o grupo controle tumoral (Figura 59).

A concentração sérica de AST dos animais do grupo controle tumoral aumentou significativamente ao final do protocolo terapêutico, em relação aos grupos diluentes ($107,5 \pm 20,4$ U/L), com valor de $236,0 \pm 53,8$ U/L (Figura 60). Contudo, nos animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH) e FO-S 8,75 (IP e IH) ocorreu uma diminuição significativa na concentração de AST, obtendo-se valores próximos aos dos grupos diluentes (Figura 60). Esses valores corresponderam a $120 \pm 53,8$ U/L, 110 ± 41 U/L, $124 \pm 34,4$ U/L e $105,0 \pm 16,7$ U/L, respectivamente (Figura 60). Os animais tratados apenas com DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH) não apresentaram diminuição significativa na concentração de AST, quando comparamos ao grupo controle tumoral (Figura 60).

Após o término do protocolo de tratamento, não foi possível observar diferença significativa na concentração sérica de ALT, entre os grupos controles e tratados. O valor médio da concentração de ALT foi de $119 \pm 23,4$ U/L (Figura 61).

Figura 57: Determinação das concentrações séricas de ureia nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de ureia. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s. = não significativo.

Figura 58: Determinação das concentrações séricas de creatinina nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de creatinina. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. n.s. = não significativo.

Figura 59: Determinação das concentrações séricas de FA nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de FA. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. n.s. = não significativo.

Figura 60: Determinação das concentrações séricas de AST nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de AST. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. n.s. = não significativo.

Figura 61: Determinação das concentrações séricas de ALT nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH. Após o término do período de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para a separação do soro e posterior avaliação da concentração de AST. n.s. = não significativo.

4.3.5. Avaliação do perfil hematológico nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Durante o período de tratamento, semanalmente o sangue dos animais dos grupos controle e tratados foi coletado para a realização de avaliações hematológicas. As coletas foram efetuadas durante um intervalo de 24 horas, após o tratamento nos dias 1, 8, 15 e 21.

No dia 1, seguindo-se o início do protocolo terapêutico, foi possível observar que não houve, entre os grupos, diferença significativa no número de plaquetas, cujo valor médio foi de $1009 \pm 260,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Figura 62 A). Posteriormente, no dia 8, nos animais dos grupos: controle tumoral ($676,6 \pm 84,87 \times 10^3/\mu\text{L}$), DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $838,7 \pm 132,9 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $653,3 \pm 309,3 \times 10^3/\mu\text{L}$) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $773,0 \pm 155,4 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $727,0 \pm 103,2 \times 10^3/\mu\text{L}$) ocorreu uma diminuição significativa no número de plaquetas, em comparação com os grupos diluentes IP e IH ($1350 \pm 149,2 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Figura 62 B). Entretanto, no 15º dia, apenas os grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg IH ($672,8 \pm 124,7 \times 10^3/\mu\text{L}$) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $668,0 \pm 270,6 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $719,3 \pm 210,1 \times 10^3/\mu\text{L}$) permaneceram com o número reduzido de plaquetas (Figura C). Ao final do período experimental, todos os grupos tratados ($781,1 \pm 160,9 \times 10^3/\mu\text{L}$) apresentaram diminuição significativa no número de plaquetas, em relação aos grupos diluentes ($1267 \pm 82,75 \times 10^3/\mu\text{L}$). Neste mesmo período, não houve diferença entre os grupos controle tumoral e diluentes (Figura 62 D).

O número total de eritrócitos não sofreu alterações significativas entre os grupos analisados, nos dias 1, 8 e 15, cujos valores médios foram de $10,5 \pm 1,0 \times 10^6/\mu\text{L}$, $10,1 \pm 1,8 \times 10^6/\mu\text{L}$ e $10,1 \pm 1,0 \times 10^6/\mu\text{L}$, respectivamente (Figura 63 A - C). Ao término dos tratamentos, no 21º dia, apenas os grupos FO-S 8,75 mg/kg (IP - $4,7 \pm 2,1 \times 10^6/\mu\text{L}$; IH - $6,8 \pm 1,4 \times 10^6/\mu\text{L}$) apresentaram redução significativa no número de eritrócitos, comparando-se aos grupos controle tumoral ($10,3 \pm 0,4 \times 10^6/\mu\text{L}$) e diluentes ($11,2 \pm 0,4 \times 10^6/\mu\text{L}$) (Figura 63 D).

Similarmente aos resultados obtidos para a contagem total de eritrócitos, o percentual médio de hematócrito não sofreu alterações significativas entre os grupos avaliados, nos dias 1 ($48,9 \pm 6,1\%$), 8 ($45,8 \pm 8,2\%$) e 15 ($45,0 \pm 5,0\%$) (Figura 64 A - C). No dia 21, apenas os

animais tratados com a FO-S 8,75 mg/kg (IP - $21,0 \pm 9,2\%$; IH - $29,6 \pm 6,2\%$), exibiram redução significativa no percentual de hematócrito, em relação aos grupos controle tumoral ($46,8 \pm 1,6\%$) e diluentes ($51,25 \pm 2,15\%$) (Figura 64 D).

O volume corpuscular médio (VCM), expressos em fentolitros (fL), também foi avaliado durante o período de tratamento. Os resultados demonstraram que houve, no dia 1, uma diminuição significativa do VCM nos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $45,10 \pm 0,5$ fL; IH - $44,1 \pm 0,1$ fL), DODAC 36,25 mg/kg (IP - $43,9 \pm 0,2$ fL; IH $43,4 \pm 1,3$ fL) e FO-S 8,75 mg/kg (IP - $45,2 \pm 0,3$ fL; IH - $45,3 \pm 0,3$ fL), em relação aos grupos controle tumoral ($50,1 \pm 0,3$ fL) e diluentes ($49,9 \pm 0,1$ fL) (Figura 65 A). Após a primeira semana de tratamento (dia 8), apenas os grupos DODAC 36,25 mg/kg (IH - $44,0 \pm 0,3$ fL; IP - $43,4 \pm 1,3$ fL) apresentaram diminuição significativa do VCM, em comparação com os grupos controle tumoral ($45,6 \pm 1,0$ fL) e diluentes ($45,7 \pm 1,0$ fL) (Figura 65 B). Posteriormente, no dia 15, não ocorreu diferença significativa do VCM entre os grupos experimentais (Figura 65 C). Ao final do tratamento, os animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $44,1 \pm 1,3$ fL; IH - $43,2 \pm 1,0$ fL) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $44,5 \pm 0,3$ fL; IH - $44,4 \pm 1,1$ fL) exibiram redução do VCM, em relação aos grupos diluentes ($45,6 \pm 0,4$ fL) e controle tumoral ($46,0 \pm 0,3$ fL) (Figura 65 D).

Os valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) não apresentaram alteração significativa entre os grupos, durante todo o período experimental. Os valores médios para todos os grupos corresponderam a $14,05 \pm 0,4$ pg (dia 1), $14,16 \pm 0,4$ pg (dia 8), $14,07 \pm 0,5$ pg (dia 15) e $14,2 \pm 0,6$ pg (dia 21) (Figura 66 A - D).

Os animais dos grupos controle tumoral ($31,28 \pm 0,7$ g/ μ L) e tratamentos ($31,64 \pm 1,1$ g/ μ L) apresentaram um aumento significativo na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), em relação aos grupos diluentes ($28,0 \pm 0,5$ g/ μ L) (Figura 67 A). No dia 08, os grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $32,7 \pm 0,7$ g/ μ L; IH - $32,6 \pm 0,6$ g/ μ L) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $32,3 \pm 0,7$ g/ μ L; IH - $32,9 \pm 0,7$ g/ μ L) mantiveram os níveis aumentados de CHCM, em comparação com os outros grupos (Figura 67 B). Nos dias 15 e 21 não ocorreram diferenças significantes entre os grupos experimentais, cujos valores médios corresponderam a $31,6 \pm 1,4$ g/ μ L e $32,1 \pm 1,8$ g/ μ L, respectivamente (Figura 67 C e D).

O percentual de distribuição da largura das células vermelha (RDW), foi significativamente reduzido, no dia 1, após o tratamento dos animais com DODAC/FO-S 45

mg/kg IH ($12,6 \pm 0,5\%$), DODAC 36,25 mg/kg (IP $-13,2 \pm 0,3\%$; IH $-13,0 \pm 0,7\%$) e FO-S 8,75 mg/kg IH ($12,6 \pm 0,7\%$), em relação aos grupos diluentes ($14,5 \pm 0,3\%$) (Figura 68 A). Contudo, nos animais tratados com a FO-S 8,75 mg/kg IP ($15,4 \pm 0,3\%$), ocorreu um aumento significativo, em relação aos grupos diluentes. Apenas este grupo mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle tumoral ($13,6 \pm 0,3\%$). Em seguida, nos dias 8 e 15, não houveram diferenças significantes nos percentuais de RDW, entre os grupos analisados, nos quais os valores médios obtidos foram $13,0 \pm 0,7\%$ e $13,2 \pm 1,0\%$, respectivamente (Figura 68 B e C). Ao final do período de tratamento, no 21º dia, os animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP $-15,4 \pm 0,8\%$; IH $-15,4 \pm 0,2\%$) exibiram um aumento significativo no percentual de RDW, em comparação com o grupo controle tumoral ($13,9 \pm 1,0\%$). Em contrapartida, os grupos tratados com FO-S 8,75 mg/kg (IP $-11,50 \pm 0,6\%$; IH $-12,4 \pm 1,0\%$) apresentaram uma redução significativa, em comparando com os grupos controle tumoral e diluentes ($14,15 \pm 0,3\%$) (Figura 68 D).

Figura 62: Contagem de plaquetas dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 63: Contagem de eritrócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 64: Contagem de hematócrito dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 65: Análise do volume corpuscular médio dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (**A**), 8 (**B**), 15 (**C**) e 21 (**D**), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 66: Análise da hemoglobina corpuscular média dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 67: Contagem da concentração hemoglobina corpuscular média dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (**A**), 8 (**B**), 15 (**C**) e 21 (**D**), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 68: Avaliação da distribuição da largura das células vermelhas dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

4.3.5.1. Determinação do número de leucócitos e contagem diferencial nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC

Os animais dos grupos controle e tratados apresentaram variações no número de leucócitos totais, mas estas não se mostraram estatisticamente significantes, comparando-se aos grupos diluentes. No 1º dia ocorreram diferenças significativas entre os grupos tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $14,0 \pm 5,6 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $12,7 \pm 5,1 \times 10^3/\mu\text{L}$), DODAC 36,25 mg/kg (IP - $12,7 \pm 5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $12,6 \pm 5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) e FO-S 8,75 mg/kg (IP - $3,4 \pm 2,6 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $4,0 \pm 1,6 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Figura 69 A). Posteriormente, no dia 8, apenas os grupos DODAC 36,25 mg/kg (IP - $16,7 \pm 1,2 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $17,5 \pm 1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$) apresentaram aumento significativo, em relação aos grupos FO-S (IP - $6,2 \pm 2,0 \times 10^3/\mu\text{L}$; IH - $6,2 \pm 2,4 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Figura 69 B). Nos dias 15 e 21 não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, para os quais os valores médios de leucócitos foram de $9,6 \pm 5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $10,4 \pm 5,3 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente (Figura 69 C e D).

A contagem diferencial dos leucócitos também foi realizada durante todo o período experimental. No primeiro dia de tratamento não houve diferença significativa no número de linfócitos, cujo percentual médio, para todos os grupos experimentais, foi de $67,9 \pm 16,36\%$ (Figura 70 A). No dia 8, apenas os grupos tratados com FO-S 8,75 mg/kg (IP - $82,5 \pm 2,5\%$; IH - $80,8 \pm 3,2\%$) exibiram elevação significativa no percentual de linfócitos, em comparação com o grupo controle tumoral ($60 \pm 8,7\%$) (Figura 70 B). Em seguida, no 15º dia, os animais dos grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $50,3 \pm 7\%$; IH - $42 \pm 17,7$) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $57,7 \pm 11,3\%$ e IH - $59,2 \pm 5\%$), demonstram uma redução significativa, em relação ao grupo controle tumoral ($85,3 \pm 3,6\%$) (Figura 70 C). No dia 21, estes grupos apresentaram valores similares ao dia 14, havendo diferença significativa apenas entre os grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $61,8 \pm 10,9\%$; IH - $60,9 \pm 11,1\%$), DODAC 36,25 mg/kg (IP - $49,1 \pm 9,1\%$; IH - $56,3 \pm 6,1\%$) e controle tumoral ($85,4 \pm 3,6\%$) (Figura 70 D).

O percentual médio de monócitos, no 1º de tratamento, não sofreu alteração significativa entre os grupos, apresentando valor médio de $4,1 \pm 3,1\%$ (Figura 71 A). No dia 8, apenas os animais tratados com FO-S 8,75 mg/kg (IP - $2,0 \pm 0,2\%$; IH - $2,3 \pm 0,5\%$) exibiram redução significativa no percentual de monócitos, em comparação com o grupo controle tumoral ($8,8 \pm 4,0\%$) (Figura 71 B). No dia 15, não houve diferença estatística entre

os grupos, os quais apresentaram percentual médio de monócitos de $4,5 \pm 2,6\%$ (Figura C). Ao final do período experimental, foi observado um aumento significativo no percentual de monócitos, nos grupos controle tumoral ($8,0 \pm 3,2\%$), DODAC/FO-S 45 mg/kg IH ($8,5 \pm 1,4\%$) e DODAC IH ($6,8 \pm 2,0\%$), em relação aos grupos diluentes ($2,5 \pm 0,9\%$) (Figura 71 D).

Em relação ao percentual de granulócitos, foi possível verificar que não ocorreram diferenças significativa no primeiro dia de tratamento, obtendo-se valor médio de $25,93 \pm 11,53\%$ (Figura 72 A). Entretanto, no dia 8, os animais que foram tratados com a FO-S 8,75 mg/kg (IP - $15,4 \pm 2,4\%$; IH - $16,9 \pm 3,0\%$) apresentaram diminuição significativa, em relação ao grupo controle tumoral ($46,2 \pm 11,3\%$) (Figura 72 B). No 15º dia, os animais tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP - $37,6 \pm 10\%$; IH - $56,72 \pm 3,9\%$) e DODAC 36,25 mg/kg (IP - $42,4 \pm 13,3\%$; IH - $37,6 \pm 10,5\%$) apresentaram uma elevação significativa no percentual de granulócitos, em comparação com os grupos diluentes ($15,6 \pm 2,0\%$) (Figura 72 C). Neste período, os grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg IH e DODAC 36,25 mg/kg IP apresentaram aumento significativo, em comparando com o grupo controle tumoral ($22,8 \pm 5,6\%$). Contudo, ao final do protocolo terapêutico, apenas o grupo DODAC 36,25 mg/kg IP ($46,6 \pm 12,5\%$) manteve o percentual elevado de granulócitos, em relação aos grupos diluentes ($17,8 \pm 7,7\%$) (Figura 72 D).

Figura 69: Contagem de leucócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 70: Contagem de linfócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 71: Contagem de monócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. n.s.= não significativo.

Figura 72: Contagem de granulócitos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC.

Os animais foram tratados durante 20 dias com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg e DODAC/FO-S 45 mg/kg, pelas vias IP e IH, no intervalo de 120 horas. A coleta do sangue e a análise do hemograma foram realizadas nos dias 1 (A), 8 (B), 15 (C) e 21 (D), após o início dos protocolos terapêuticos. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

4.3.6. Avaliação dos aspectos macroscópicos dos órgãos internos dos camundongos portadores de CHC murino

Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram eutanasiados e necropsiados, para a coleta dos órgãos internos. Todo o procedimento foi fotodocumentado, buscando-se registrar as alterações macroscópicas existentes; apenas as modificações mais evidentes foram apresentadas.

Nos animais do grupo controle tumoral, não foram constatadas alterações macroscópicas evidentes (Figura 73 A e B). Contudo, foi possível observar o aumento do linfonodo inguinal. Nos animais tratados com DODAC/FO-S IP, ocorreu o acúmulo de lipossomas na cavidade abdominal e no peritônio (Figura 73 B e C). Já nos animais tratados com DODAC/FO-S pela via IH, foi verificada a presença de lipossomas no fígado e em algumas regiões da cavidade abdominal (Figura 73 D e E).

A comparação do aspecto morfológico do fígado dos animais dos grupos diluente IH, controle tumoral e DODAC/FO-S IH demonstram claramente as alterações deste órgão entre estes grupos (Figura 74 A-C). Os animais do grupo diluente IH não apresentaram modificações na morfologia e coloração do fígado, que permaneceu com aspecto normal (Figura 74 A). O fígado dos animais do grupo controle tumoral apresentou coloração mais enegrecida, enquanto que os animais tratados com DODAC/FO-S IP apresentaram alteração na estrutura e na morfologia, com modificação na arquitetura e coloração (Figura 74 B e C).

Figura 73: Fotodocumentação do aspecto macroscópico dos órgãos dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, pertencentes aos grupos controle tumoral e DODAC/FO-S 45 mg/kg IP e IH. Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram necropsiados para a coleta dos órgãos e posterior avaliação macroscópica. (A) Registro ilustrativo da condição corpórea do animal do controle tumoral; linfonodo inguinal apresentou aumento (seta). (B, C) Aspecto macroscópico da região abdominal do grupo DODAC/FO-S IP; foi possível observar o fígado sem alterações evidentes (asterisco) e lipossomas presentes na cavidade abdominal e no peritônio (seta); (D, E) Aspecto macroscópico da região abdominal dos animais do grupo DODAC/FO-S IH; foi verificada a presença de lipossomas no fígado e em algumas poucas regiões da cavidade abdominal (seta).

Figura 74: Fotodocumentação do aspecto morfológico do fígado dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC murino, pertencentes aos grupos controle tumoral, diluente IH e tratado com DODAC/FO-S IH. Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram necropsiados e o fígado foi coletado. Registro comparativo do aspecto morfológico do fígado dos animais dos grupos diluentes IH (A); controle tumoral (B) e DODAC/FO-S pela via IH (C).

4.3.7. Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados pela via IP

Os lipossomas de DODA/FO-S foram conjugados com o *probe* fluorescente (Dil), capaz de integrar-se à constituição polimérica dos lipossomas de DODAC. Os lipossomas contendo o traçador fluorescente foram utilizados para avaliar a cinética de distribuição desta formulação, no modelo ortotópico de CHC. Os animais portadores de CHC foram tratados com dose única (45 mg/kg), pela via IP. Os animais utilizados como controle negativo receberam apenas o *probe* Dil, para a avaliação da especificidade da distribuição dos lipossomas. Em seguida, a distribuição foi rastreada por exame de imagem PET Scan, em relação ao tempo (horas/dias).

Posteriormente a aplicação dos lipossomas DODAC/FO-S/Dil pela via IP, no tempo de 0 horas, a formulação foi absorvida na região do intestino (Figura 75). As imagens obtidas pelo PET Scan demonstram que os lipossomas se distribuíram rapidamente por toda a extensão do intestino, logo após a administração. No grupo controle negativo, é possível que o *probe* Dil, não apresenta especificidade, distribuindo-se praticamente em todos os órgãos (Figura 75). Duas horas após o tratamento, os lipossomas se concentraram em regiões do intestino, sendo constatados pelo menos 5 pontos de captação. Provavelmente os lipossomas também se distribuíram no baço. Já no controle negativo, neste tempo de análise, ocorreu menor fluorescência (Figura 76).

Vinte e quatro horas após os tratamentos dos animais com DODAC/FO-S IP, os lipossomas permaneceram na região do intestino; entretanto houve uma disposição mais homogênea, em comparação com o tempo de 2 horas. Nos animais do grupo controle negativo, o *probe* se concentrou no pulmão, intestino e, aparentemente, na região da bexiga (Figura 77). Posteriormente, após 48 horas, os lipossomas se concentraram em uma região específica do intestino - provavelmente no intestino delgado, e no linfonodo inguinal, como é demonstrado no exame de imagens. Os animais do grupo controle apresentaram distribuição homogênea do *probe*, sendo visualizado no intestino, fígado e pulmão (Figura 78).

Os animais tratados com DODAC/FO-S IP foram examinados até 72 horas após o tratamento com os lipossomas fluorescentes, conforme previsto no delineamento

experimental. Neste tempo, os lipossomas ainda foram detectados no intestino e/ ou cavidade abdominal; contudo, em menor quantidade, levando em consideração o decaimento significativo da fluorescência. O *probe*, que foi utilizado como controle negativo, diferentemente da formulação lipossomal, foi localizado em áreas distintas, como no pulmão/traqueia, intestino e região abdominal, evidenciando a inespecificidade da distribuição do *probe* isolado (Figura 79). Não foi possível visualizar o direcionamento, para o fígado, dos lipossomas inoculados pela via intraperitoneal, nos tempos analisados.

Após as aquisições das imagens, os camundongos foram eutanasiados e posteriormente necropsiados. Confirmando os dados obtidos com o exame de PET Scan, os lipossomas foram detectados na cavidade abdominal e no linfonodo inguinal (Figura 80 A - D).

Figura 75: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 0 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IP, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação nas áreas anatômicas correspondentes ao intestino/cavidade abdominal (seta).

Figura 76: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 2 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IP, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação de traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao intestino/cavidade abdominal/baço (seta).

Figura 77: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 24 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IP, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao intestino (seta).

Figura 78: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 48 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IP, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação de traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao linfonodo inguinal (seta); intestino/região abdominal (seta vazada).

Figura 79: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC murino, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IP, no intervalo de 72 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IP, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou uma diminuição significativa da captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao intestino/região abdominal (seta).

Figura 80: Fotodocumentação da localização macroscópica dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados pela via IP, no intervalo de 72 horas. Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram eutanasiados e necropsiados para a análise da localização dos lipossomas fluorescentes. **(A)** Lipossomas fluorescentes aderidos à musculatura femoral. **(B)** linfonodo inguinal com lipossomas fluorescentes. **(C e D)** Regiões do intestino com coloração avermelhada, provavelmente pela presença dos lipossomas. Lipossomas fluorescentes (seta).

4.3.8. Distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nos animais portadores de CHC, tratados pela via IH

Para a avaliação da distribuição da formulação lipossomal DODAC/FO-S/Dil nos animais portadores de CHC, tratados pela via IH, foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o grupo tratado com a formulação lipossomal pela via IP.

Após o tratamento, foi possível verificar, no tempo 0, os lipossomas concentrados no fígado e apenas dois pequenos pontos dispersos na região da cavidade abdominal. Nos animais do controle negativo, o traçador fluorescente se apresentou disperso na região da cavidade abdominal (Figura 81). Posteriormente, os lipossomas se distribuíram na região do fígado (microambiente tumoral), 2 horas após o tratamento. O controle negativo exibiu redistribuição do probe Dil, sendo possível visualizar marcação no fígado, neste tempo (Figura 82). Em seguida, com 3 horas após o tratamento, os lipossomas permaneceram no fígado e na região do intestino (Figuras 83).

Os exames realizados com 24 e 48 horas após o tratamento demonstraram que a maior taxa de fluorescência foi detectada no fígado (microambiente tumoral). Também ocorreu a distribuição de um pequeno percentual para outras regiões da cavidade abdominal (Figuras 84 e 85). Após 48 horas, não foi observada emissão de fluorescência no controle negativo (Figuras 85). Os resultados obtidos com 72 horas demonstraram que a maior taxa de fluorescência foi detectada no fígado, e também é possível verificar lipossomas na região do pulmão (Figura 86).

Considerando que a emissão de fluorescência permaneceu detectável até 72 horas após o tratamento, a distribuição dos lipossomas neste grupo experimental foi avaliada até haver o decaimento significativo da fluorescência. Sendo assim, apenas dois animais deste grupo foram eutanasiados e necropsiados, no tempo de 72 horas, para a avaliação da distribuição dos lipossomas nos órgãos. As análises macroscópicas evidenciaram que os lipossomas permaneceram aderidos ao fígado, neste período. Este órgão apresentou modificação na coloração devido ao acúmulo de lipossomas fluorescentes (Figura 87).

A análise da distribuição dos lipossomas, 6 dias após o tratamento, demonstrou o mesmo padrão de imagem obtido no período de 72 horas, havendo maior taxa de fluorescência no fígado e um pequeno percentual de lipossomas no pulmão (Figura 88).

Contudo, a emissão de fluorescência foi menor em relação aos primeiros dias, provavelmente, devido a degradação e excreção pelas fezes, nos dias anteriores.

Após 8 dias da aplicação da formulação lipossomal, a maior taxa de fluorescência ainda se concentrou no fígado, com taxas menores em outras áreas, como nas regiões do intestino e pulmão (Figura 89). Nos dias 9, 12 e 14, foi possível visualizar a taxa de fluorescência apenas na região do fígado (Figuras 90 - 92). Já no 16º dia, foi verificado uma redistribuição dos lipossomas, com maior detecção no pulmão, e menor percentual no fígado (Figura 93). Apenas 20 dias após o tratamento, os lipossomas não foram mais detectados (Figura 94).

Figura 81: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 0 hora, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta).

Figura 82: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 2 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta).

Figura 83: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 3 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta); região abdominal/intestino (seta vazada).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 84: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 24 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação de traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta); região abdominal/intestino/rim (seta vazada).

Figura 85: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 48 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação de Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 86: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 72 horas, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondentes ao fígado (seta) e pulmão (seta vazada).

Figura 87: Fotodocumentação da localização macroscópica dos lipossomas de DODAC/FO-S/Dil nos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados pela via IH, no intervalo de 72 horas. Os animais foram eutanasiados e necropsiados para a análise da localização dos lipossomas fluorescentes. **(A)** Fluorescência evidente na região ventral do animal, no interior da cavidade abdominal, correspondente a localização anatômica do fígado. **(B)** Lipossomas aderidos ao fígado. **(C)** Fígado com alteração na coloração devido a presença de lipossomas. Lipossomas (seta).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 88: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 6 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatômicas correspondes ao fígado (seta) e pulmão (seta vazada).

Figura 89: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 8 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) na área anatômica corresponde ao fígado (seta) e pulmão (seta vazada).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 90: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 9 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) na área anatômica corresponde ao fígado (seta).

Figura 91: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 12 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil na área anatômica corresponde ao fígado (seta).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 92: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 14 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) na área anatômica corresponde ao fígado (seta).

Controle negativo – Traçador Dil

Lipossomas DODAC/FO-S/Dil

Figura 93: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 16 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou alta captação do traçador Dil (verde) nas áreas anatómicas correspondes ao fígado (seta) e pulmão (seta vazada).

Figura 94: Imagem da tomografia por emissão de pósitron (PET-Scan) dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH, no intervalo de 20 dias, conjugados com o traçador fluorescente Dil. Os animais receberam dose única (45 mg/kg), pela via IH, para avaliação da cinética de distribuição desta formulação no modelo ortotópico de CHC. O exame demonstrou que não foi possível obter captação de traçador Dil (verde).

4.3.9. Perfil de distribuição das células da massa tumoral nas fases do ciclo celular

Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados, necropsiados e fragmentos do tecido hepático/massa tumoral (~50 mg) coletados para a avaliação das fases do ciclo celular.

Após a análise da distribuição das células da massa tumoral/parênquima hepático nas diferentes fases do ciclo celular, foi verificado que o percentual das populações celulares na fase Sub-G₁ não variou significativamente entre os diferentes grupos. O percentual médio de células nesta fase do ciclo celular, para todos os grupos, foi de $5,2 \pm 5,3\%$. Não houve diferença significativa entre os grupos tratamentos e diluentes.

Os animais dos grupos tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg IH ($77,5 \pm 1,8\%$) e FO-S 8,75 mg/kg IP ($78,3 \pm 7,8\%$) e IH ($77,1 \pm 14,2$) apresentaram aumento significativo no percentual de células na fase G₀/G₁, em comparação com o controle tumoral ($45,0 \pm 14,1\%$). Também foi possível observar que o tratamento com DODAC/FO-S 45 mg/kg IH ($16,1 \pm 5,3\%$) e FO-S 8,75 mg/kg IP ($16,7 \pm 6,7\%$) e IH ($17,4 \pm 8,4\%$) promoveu uma redução significativa no percentual de células na fase S, em relação ao grupo controle tumoral ($39,6 \pm 3,4\%$), que apresentou um percentual significativo de células nesta fase do ciclo celular. Os animais dos grupos diluentes exibiram percentuais de $15,9 \pm 5,7\%$ (IH) e $15,2$ (IP) $4,0\%$, de células na fase S.

O percentual de células na fase G₂/M não apresentou alteração significativa entre os diferentes grupos. Contudo, o percentual mais elevado de células na fase G₂/M foi verificado no grupo controle tumoral ($10 \pm 9,0\%$), sendo o valor médio para os outros grupos de $4,0 \pm 4,3\%$.

Figura 95: Análise das fases do ciclo celular das populações de células dos fragmentos dos fígados dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC. Os animais foram tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg, DODAC 36,25 mg/kg ou FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, durante 20 dias, no intervalo de 120 horas. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e necropsiados e fragmentos do tecido hepático/massa tumoral (~50 mg) foram coletados para avaliação das fases do ciclo celular. Populações de células nas fases Sub-G₁ (A); G₀/G₁ (B); S (C) e G₂/M (D). Grau de significância estatística *p<0.05, **p<0.01.

4.3.10. As alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos portadores de CHC

As alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos portadores de hepatocarcinoma e sadios foram avaliadas após os diferentes períodos de tratamento. Foram considerados os seguintes critérios qualitativos: (+) leve, (++) moderado e (+++) intenso, tendo como parâmetro a comparação entre os grupos.

Os animais dos grupos diluentes IP e IH, os quais não foram inoculados com as células tumorais Hepa1c1c7, apresentaram uma arquitetura normal do parênquima hepático, com todos os elementos celulares normais: hepatócitos, células de Kupffer, células endoteliais, entre outros (Figuras 96 e 97).

Os camundongos do grupo controle tumoral exibiram alterações evidentes no parênquima hepático (+++), características de CHC, sendo possível constatar o desenvolvimento de múltiplos focos de massa tumoral (+++) contendo células de contornos irregulares e com núcleo hipercromático, alteração da arquitetura do parênquima (+++) e algumas áreas de necrose (+) (Figura 98).

O tratamento dos camundongos portadores de CHC com os lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IP, resultou na formação de diversas áreas de necrose (++) e na tumefação nos hepatócitos (++) . Contudo, ainda foi possível visualizar focos de massa tumoral no parênquima (Figura 99) (++) . Em contrapartida, o tratamento com lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IH, promoveu a redução significativa dos focos de células neoplásicas presentes no parênquima hepático (+++); ocorreu também, tumefação dos hepatócitos (++) e a formação de grandes áreas de necrose (+++) (Figura 100).

Nos grupos tratados com FO-S 8,75 mg/kg, vias IP e IH, foi possível observar uma diminuição na formação dos focos de massa tumoral (+). Entretanto, ainda foi verificada a presença de células atípicas no parênquima (++) (Figuras 101 e 102). No grupo tratado com FO-S 8,75 mg/kg, via IH, ocorreu a formação de alguns focos de necrose (+) (Figura 102).

Nos animais tratados com DODAC 36,25 mg/kg, vias IH e IP, foram evidenciadas áreas com a formação de massa tumoral (+++), na qual a arquitetura do parênquima hepático se apresentou semelhante a encontrada no grupo tumoral. Não foi possível evidenciar áreas de necrose (Figuras 103 e 104).

Figura 96: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J do grupo diluente IP. Nestes animais, não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluente dos compostos, no volume de 100 μ L, pela via IP. (A-D) Parênquima hepática; apresentando arquitetura normal, com todos os elementos celulares que o constitui. VP= veia porta; VCL = veia centro lobular; hepatócitos (seta); sinusóides (seta vazada). Coloração de H&E.

Figura 97: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J do grupo diluente IH. Nestes animais, não houve inoculação de células tumorais, apenas a administração do diluente dos compostos, no volume de 100 μ L, pela via IH. (A-D) Parênquima hepática; apresentando arquitetura normal, com todos os elementos celulares que o constitui. VP = veia porta; hepatócitos (seta); sinusóides (seta vazada). Coloração de H&E.

Figura 98: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J do grupo controle tumoral. Os animais deste grupo não receberam tratamento. (A-D) Parênquima hepático demonstrando um CHC bem estabelecido, com múltiplos focos de formação de massa tumoral (asterisco), alteração da arquitetura do parênquima, dilatação sinusoidal (seta) e presença de células com contornos irregulares e núcleo hipercromático (seta vazada). Coloração de H&E.

Figura 99: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com DODAC/FO-S IP. Os camundongos receberam DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. **(A-D)** Parênquima hepático apresentando diversas áreas de necrose e redução das áreas de focos de massa tumoral. Tumefação dos hepatócitos (seta); áreas de necrose (seta vazada); massa tumoral (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 100: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com DODAC/FO-S IH. Os camundongos receberam DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepática; apresentando diversas áreas de necrose (asterisco). Não foi possível observar focos evidentes de massa tumoral. Coloração de H&E.

Figura 101: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com FO-S IP. Os camundongos receberam FO-S 8,75 mg/kg, pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. **(A-D)** Parênquima hepático, apresentando diminuição da formação de massa tumoral, em relação ao grupo controle tumoral. Não foi possível observar áreas evidentes de necrose. Massa tumoral (seta). Coloração de H&E.

Figura 102: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com FO-S IH. Os camundongos receberam FO-S 8,75 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. **(A-D)** Parênquima hepático, apresentando diminuição da formação de massa tumoral, em relação ao grupo controle tumoral, e várias áreas de necrose (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 103: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com DODAC IP. Os camundongos receberam DODAC 36,25 mg/kg pela via IP, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. **(A-D)** Parênquima hepático, apresentando alterações semelhantes as evidenciadas no grupo controle tumoral, como dilatação sinusoidal (seta) e a formação de massa tumoral (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 104: Fotomicrografias do aspecto histológico do parênquima hepático dos camundongos C57BL/6J portadores de CHC, tratados com DODAC IH. Os camundongos receberam DODAC 36,25 mg/kg, pela via IH, no intervalo de 120 horas, durante 20 dias. (A-D) Parênquima hepático, apresentando alterações semelhantes as evidenciadas no grupo controle tumoral, como dilatação sinusoidal (seta) e a formação de massa tumoral (asterisco). Coloração de H&E.

4.3.11. Determinação do perfil de expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de CHC

Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os fragmentos do tecido hepático (~50 mg) foram coletados para a avaliação da expressão gênica de p53, Bcl-2, Bax, caspases 3 e 8, ciclina B1 e receptor DR4. O nível relativo de expressão de cada gene foi determinado em relação ao transcrito GAPDH. Para estas análises, foram utilizados apenas os grupos controle tumoral, diluente IH, FO-S 8,75 mg/kg IH e DODAC/FO-S 45 mg/kg IH, pois a via de administração IH foi a mais efetiva na distribuição dos lipossomas no microambiente tumoral. O grupo DODAC IH não foi utilizado por não ter sido eficaz em reduzir o volume tumoral.

A expressão do gene p53 aumentou significativamente após os tratamentos com FO-S IH e DODAC/FO-S IH, nos quais os valores foram de $39,25 \pm 4,4$ e $16,62 \pm 4,2$, respectivamente. Os valores para os grupos controle tumoral e diluente IH corresponderam a $4,2 \pm 1,3$ e $1,3 \pm 0,6$, respectivamente (Figura 105 A).

O gene da caspase 8 apresentou um aumento significativo na expressão apenas nos animais tratados com os lipossomas DODAC/FO-S IH ($2,2 \pm 0,09$). Os grupos controle diluente IH ($1,4 \pm 0,2$), controle tumoral ($1,2 \pm 0,1$) e FO-S IH ($0,9 \pm 0,3$) não exibiram expressão significativa (Figura 105 B). Similarmente, a expressão do gene caspase 3 aumentou significativamente após o tratamento com DODAC/FO-S IH ($3,2 \pm 0,1$). Os outros grupos não demonstraram diferenças significantes na expressão da caspase 3 (Figura 105 C).

O grupo controle tumoral ($8,5 \pm 1,6$) apresentou aumento significativo na expressão da ciclina B1, em relação ao grupo diluente IH ($1,7 \pm 0,6$). Nos animais tratados com FO-S IH e DODAC/FO-S IH houve uma diminuição significativa na expressão da ciclina B1, em comparação com o grupo controle tumoral. A expressão deste gene, nos grupos FO-S IH ($2,9 \pm 0,9$) e DODAC/FO-S ($3,2 \pm 1,8$) foi compatível ao valor obtido para o grupo diluente IH (Figura 106 A).

A expressão dos genes Bax e Bcl-2 não exibiu diferenças significativas entre os grupos avaliados, sendo os valores médios para todos os grupos de $1,3 \pm 0,5$ e $1,7 \pm 0,4$, respectivamente (Figura 106 B e C).

Figura 105: Análise do perfil de expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de CHC. Estas avaliações foram realizadas nos grupos controle tumoral, diluente IH, FO-S 8,75 mg/kg IH e DODAC/FO-S 45 mg/kg IH. Expressão gênica relativa (mRNA) da p53 (**A**), caspase 8 (**B**) e caspase 3 (**C**). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

Figura 106: Análise do perfil de expressão gênica de fragmentos de tecido hepático dos camundongos portadores de CHC. Estas avaliações foram realizadas nos grupos controle tumoral, diluente IH, FO-S 8,75 mg/kg IH e DODAC/FO-S 45 mg/kg IH. Expressão gênica relativa (mRNA) da ciclina B1 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C). Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n.s.= não significativo.

5. DISCUSSÃO

Os AFTs têm surgido como novos agentes antitumorais promissores, os quais apresentam propriedades antiproliferativas e não possuem como alvo o DNA, mas atuam modificando o *turnover* na membrana celular e induzindo morte por apoptose, com alta seletividade para as células tumorais (Ríos-Marco et al., 2011; Marco et al., 2014). A Edelfosina, ilmofofina, miltefosina, perifosine, erucilfosfocolina e erufosina são os representantes desta nova classe de agentes antitumorais (Van Blitterswijk e Verheij, 2008; Van Blitterswijk e Verheij, 2013; Marco et al., 2014; Ríos-Marco et al., 2017).

A FO-S (fosfoetanolamina sintética) é uma molécula envolvida no *turnover* dos fosfolipídios, atuando como um precursor na síntese de fosfolipídios de membrana. Estudos demonstraram que este composto apresenta amplo potencial antitumoral, induzindo citotoxicidade em diversas linhagens de células tumorais, como por exemplo: EAT (tumor ascítico de Ehrlich); células B16F10 (melanoma murino); células MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); células H292 (carcinoma de pulmão humano); células Skmel-28 e Mewo (melanoma humano) (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira, 2013a; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c; Ferreira et al., 2013d).

Apesar dos AFTs consistirem em uma nova classe promissora de agentes antitumorais, efeitos secundários, tais como toxicidade gastrointestinal, hemólise e disfunções hepáticas e renais são descritos para edelfosina, ilmofofina e miltefosina (Van Blitterswijk et al., 2013). Lipossomas encapsulando paclitaxel e mitelfosina propiciaram um efeito sinérgico em células de glioblastoma humano resistentes à quimioterapia, havendo uma liberação sustentada dos fármacos e favorecendo a reversão da resistência destas células àqueles agentes (Thakur et al., 2013). Os sistemas de nanocarreadores revolucionaram as estratégias para a liberação de fármacos e representam um importante impacto no desenvolvimento de agentes anticâncer mais seletivos e efetivos (Kumar et al., 2012; Mattheolabakis et al., 2012; Urbinati et al., 2012; Drbohlavova et al., 2013; Pandey et al., 2016).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as moléculas de DODAC interagem com a FO-S em solução aquosa, após serem submetidas à T_m (Temperatura de transição de fase) e posterior sonicação, originando uma formulação lipossomal DODAC/FO-S. A interação entre o DODAC e a FO-S ocorre devido à hidratação do contra-íon cloreto, possibilitando a liberação do sítio polar da cadeia do DODAC para uma possível interação eletrostática com o grupo fosfato da FO-S. Lipossomas catiônicos,

entre eles o DODAC, possuem carga positiva na sua superfície, o que possibilita a interação com moléculas carregadas negativamente, como o grupo fosfato da FO-S. Devido a esta característica, este tipo de lipossomas têm sido amplamente utilizados para terapia gênica (Shim et al. 2013; Ulrich, 2002; Majzoub et al., 2016).

Os dados deste estudo demonstram que a concentração da FO-S foi determinante na modulação do raio hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas. A instabilidade físico-química da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S 2,0 - 37 mM ocorreu, provavelmente, devido a constante interação eletrostática da FO-S com o DODAC, o que resultou em menor potencial zeta, e consequente obtenção de vesículas de maior tamanho. No entanto, os lipossomas com concentração de 2,0 mM de FO-S demonstraram ser estáveis em relação ao tempo. Como a estabilidade físico-química é um parâmetro importante para a disponibilidade no tecido alvo e a toxicidade seletiva para células tumorais, as demais concentrações foram excluídas e uma nova curva de concentração de 0,3 a 2,0 mM de FO-S foi adotada.

A interação eletrostática entre os compostos da formulação lipossomal DODAC 10 mM/FO-S 0,3 - 2,0 mM e DODAC/FO-S 0,3 - 2,0 mM (1:1) demonstrou estabilidade 15 dias após a preparação. Além disto, as formulações DODAC 10 mM/FO-S 2,0 mM e DODAC/FO-S (1:1) 2,0 mM foram eficientes na encapsulação da FO-S, com taxas de encapsulação média superior a 50%, após o preparo. Esta taxa não diminuiu significativamente 40 dias após a primeira dosagem.

A taxa de encapsulação da FO-S em vesículas de DODAC é considerada eficiente para a metodologia empregada e as características dos lipossomas catiônicos. Entre as técnicas utilizadas para preparação de formulações lipossomais, a hidratação do filme lipídico ou método de Bangham é uma das mais empregadas (Bozzuto e Molinari, 2015). No entanto, a eficiência de encapsulação de compostos solúveis em água é relativamente baixa (5% - 15%). Além disto, este procedimento produz vesículas multilamelares grandes e não homogêneas, exigindo processos de extrusão e ultrasonicação para a obtenção de vesículas unilamelares pequenas e homogêneas (Akbarzadeh et al., 2013). Nesta perspectiva, devido a característica solúvel da FO-S e a metodologia empregada no preparo dos lipossomas DODAC/FO-S, que consistiu da hidratação do filme lipídico seguido de sonicação, a taxa de encapsulação da FO-S pelas vesículas de DODAC é considerada de alta eficiência.

A utilização de lipossomas catiônicos em formulações lipossomais permitem uma eficiência de encapsulação superior a 40%, quando se utiliza métodos de coextrusão, e maior que 95%, com o uso de técnicas mais sofisticadas (MacLachlan et al, 2007; Buyens et al., 2009; Siddiqui et al., 2012; Saffari et al., 2013; Abu Lila e Ishida, 2017). Jain et al. (2014) demonstraram que o uso dos lipídicos catiônicos estearilamina ou 1,2-di-oleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP), em lipossomas, resultou em altas taxa de eficiência de encapsulação (50% - 65%) de iloprost (análogo estável da prostaciclina) (Jain et al., 2014). Formulações similares, inicialmente preparadas com lipossomas de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) combinados com colesterol e CTA [colest-5-en-3-ol(3 beta)(trimetil amônio) acetato] ou DODAB (brometo de dioctadecildimetil amônio), em várias razões molares, por meio do método de filme de clorofórmio com sonicação, apresentaram taxas de 62,72% de encapsulação de insulina humana, utilizando a combinação DPPC/CTA/DDAB (razão molar de 7:2:1) e o método de lipossomos vazios liofilizados (FDELs) (Manosroi et al., 2011). Deste modo, a eficiência de encapsulação para os lipossomas DODAC 10 mM/FO-S 2,0 mM e DODAC/FO-S (1:1) 2,0 mM foi similar a encontrada em outras formulações que utilizam lipossomas catiônicos.

Como nas formulações lipossomais DODAC/FO-S 1:1 e DODAC 10 mM/FO-S (0,3 - 2,0 mM) as concentrações da FO-S não chegaram a ser maiores que a de DODAC, não foi possível observar uma correlação direta entre o diâmetro dos lipossomas com a massa molar da FO-S. Contudo, foi verificado, pelas fotoeletromicrografias e por meio do DLS, que os lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM (1:1) tendem a formar vesículas com diâmetro menores, em comparação com concentrações menores. Isto pode ter ocorrido pela influência do número de moléculas de água que hidratam as cabeças lipídicas e as forças da interação água-lipídeo nas propriedades dos lipossomas. Neste caso, sabe-se que podem ocorrer vários tipos de interações água-lipídio. Por exemplo, algumas moléculas de água hidratam uma porção da bicamada, cabeças polares e poucos carbonos da cadeia alquílica, enquanto que outras podem permanecer no compartimento aquoso interno (Hauser, 1975a; Hauser, 1975b, Gonçalves, 2006; Monteiro et al., 2014).

Os tamanhos dos lipossomas DODAC/FO-S obtidos neste estudo, com valores médios entre 60 - 100 nm, são considerados ideais para o tratamento antitumoral. Isso porque o endotélio vascular dos tecidos saudáveis é formado por fenestrações entre 5 e 10 nm, com a exceção das fenestras do endotélio dos sinusóides hepáticos que são maiores, enquanto que os neovasos dos tumores apresentam fenestrações bem maiores

(100 a 780 nm) (Fang et al., 2011; Taurin et al., 2012; Deshpande et al., 2013; Bozzuto e Molinari, 2015). Dessa forma, os lipossomas com tamanho médio entre 100 - 200 nm conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos vasos tumorais, mas não penetram nas fenestrações estreitas do endotélio dos tecidos saudáveis. O resultado deste processo é o maior acúmulo de lipossomas, preferencialmente, nos tecidos tumorais (Trédan et al., 2007; Oliveira et al., 2014; Hyodo et al., 2013; Deshpande et al., 2013; Bozzuto e Molinari, 2015).

Além do diâmetro, o potencial elétrico dos lipossomas DODAC/FO-S pode favorecer a interação com os vasos sanguíneos associados aos tumores, pois os lipossomas catiônicos exibem propensão para se direcionarem seletivamente para estes vasos (Ho et al., 2010). Estudos têm mostrado que isso ocorre, provavelmente, devido a interações eletrostáticas dos lipossomas catiônicos com as glicoproteínas negativamente carregadas das células endoteliais vasculares (Dellian et al., 2000; Campbell et al., 2002; Schmitt-Sody et al., 2003; Stylianopoulos et al., 2013).

Os ensaios de citotoxicidade demonstram que a FO-S livre, nas concentrações testadas, foi citotóxica para todas as linhagens tumorais estudadas neste projeto, corroborando os dados descritos na literatura (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c). Estes resultados indicam que a FO-S promove seus efeitos antitumorais por meio de um mecanismo que, provavelmente, é comum em todas as linhagens, sem promover efeitos citotóxicos significativos nas células normais HUVEC. Os nossos dados comportam a hipótese de que a sensibilidade e os valores de IC_{50%} obtidos para as células tumorais independem do perfil molecular destas, tais como, resistência e agressividade (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2014; Luna et al., 2016). Apesar dos efeitos antitumorais da FO-S, a sua forma encapsulada nos anfifílicos catiônicos DODAC apresentou vantagens significativas, reduzindo os valores de IC_{50%} nas linhagens tumorais.

Apesar dos efeitos antitumorais dos lipossomas DODAC/FO-S serem mais significativo, em relação a FO-S não encapsulada, sabe-se que anfifílicos catiônicos livres, de um modo geral, são reconhecidamente tóxicos tanto para células procarióticas como para as eucarióticas (Carmona-Ribeiro, 2003; Knudsen et al., 2015). Entretanto, a citotoxicidade dos lipossomas DODAC vazios foi menor, em comparação aos lipossomas DODAC/FO-S. Além disto, a interação eletrostática do grupo fosfato da FO-S com o

DODAC pode reduzir a capacidade do DODAC interagir com outras moléculas, havendo uma diminuição da citotoxicidade do carreador. Dessa maneira, Bhattacharya e Bajaj (2009) descrevem que as cabeças dos fosfolipídios naturais podem se tornar uma opção para diminuir a toxicidade dos lipídeos catiônicos.

Embora os lipossomas DODAC/FO-S (1:1) 0,3 - 2,0 mM tenham promovido citotoxicidade significativa em todas as linhagens tumorais estudadas, a que apresentou maior sensibilidade ao tratamento com esta formulação foi a linhagem de CHC murino Hepa1c1c7. Neste contexto, vários estudos demonstram que formulações lipossomais tendem a se acumular nos tumores, fígado e baço (Silva, 2011; Bozzuto e Molinari, 2015). O fígado consiste em um alvo já conhecido dos lipossomas, pois muitos receptores de LDL, HDL e a asialoglicoproteína são expressos na superfície dos hepatócitos (El-Aneed, 2004). Como HDL e LDL mostram alta afinidade e se acumulam em células tumorais, eles têm sido utilizados como carreadores para entrega de agentes antineoplásicos no CHC (Tokui et al., 1995; Versluis et al., 1996; El-Aneed, 2004; Morille et al., 2008; McMahon et al., 2015; Nam et al., 2016).

Masquelier et al. (1986) demonstraram, que antineoplásicos carreados com HDL e LDL são melhor direcionados para as células tumorais, as quais apresentam alta expressão dos receptores de lipoproteínas (Tokui et al. 1995; Morille et al., 2008; Moura et al. 2011; Kretzer et al., 2012; McMahon et al., 2015; Nam et al., 2016). Neste aspecto, níveis elevados de expressão dos receptores de LDL têm sido atribuídos às taxas aceleradas de mitose que são fundamentais na fisiopatologia do câncer (Contente et al., 2014). Portanto, neste trabalho, a maior sensibilidade das células de CHC Hepa1c1c7 ao tratamento com os lipossomas pode estar correlacionada à interação do DODAC com os receptores lipídicos destas células, possibilitando maior disponibilidade do DODAC carreando a FO-S. Reforçando esta hipótese, Oliveira et al. (2014) verificaram que formulações lipossomais baseadas na associação da monooleína com lipídios catiônicos da família do dioctadecildimetilamônio são absorvidos, predominante, por um processo ativo, sendo a endocitose a principal via de internalização (Oliveira et al., 2014).

Os lipossomas DODAC/FO-S 1:1 (0,3 e 2,0 mM) foram mais eficazes em desencadear a apoptose, no estágio tardio, nas células Hepa1c1c7, do que a FO-S livre. Isto demonstra a capacidade da formulação lipossomal em promover citotoxicidade de forma mais eficiente, em relação ao tratamento apenas com FO-S. Além disto, a exposição aos lipossomas DODAC vazios não induziu morte por apoptose, ocasionando

apenas um pequeno aumento no número de células necróticas, quando utilizado na maior concentração. A capacidade da FO-S em promover apoptose, em diferenças linhagens de células tumorais, tem sido demonstrada em diversos estudos publicados (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2014; Luna et al., 2016). Interessantemente, a apoptose desencadeada pela vitamina K2, em células de leucemia aguda humana Jurkat, foi atribuída ao acumulado intracelular de fosfoetanolamina (Dhakshinamoorthy et al., 2015).

Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo evidenciaram que a FO-S inibiu a proliferação e migração, levando ao acúmulo das células B16F10 e MCF-7 na fase G₂/M do ciclo celular (Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2016). Deste modo, a FO-S atende a uma das pretensões do desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos, que é obter compostos que possam atuar no *checkpoint* do ciclo celular, promovendo o controle da proliferação celular. Tem havido um crescente interesse neste mecanismo de controle como um alvo para o tratamento antitumoral (Gabrielli et al., 2012; Visconti et al., 2016). A maioria dos quimioterápicos usuais, que causam danos ao DNA, não matam diretamente a célula tumoral; agem, inicialmente, ativando os *checkpoints* e bloqueando a progressão do ciclo celular. Como resultado, as células desencadeiam mecanismos que promovem o reparo do DNA ou, na presença de danos cromossômicos, o bloqueio da síntese de DNA ou da divisão celular, resultando na ativação da cascata apoptótica (Dijkstra et al., 2010; Gabrielli et al., 2012; Visconti et al., 2016).

Corroborando o conjunto de resultados obtidos e já publicados com a FO-S (Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2016), assim como as perspectivas para formulações de novos antitumorais, os resultados observados, a partir do tratamento das células tumorais B16F10 e Hepa1c1c7 com a formulação lipossomal DODAC/FO-S (1:1), demonstraram que estes lipossomas foram mais eficazes do que a FO-S em promover o aumento de células paradas nas fases S e G₂/M do ciclo celular. Nas células tumorais Hepa1c1c7, este efeito dos lipossomas no ciclo celular foi obtido em todos os tratamentos, enquanto que nas células B16F10 ocorreu apenas na maior concentração. Estes dados demonstram, novamente, a sensibilidade das células de CHC murino Hepa1c1c7 ao tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, salientando que os resultados foram obtidos já no tempo de 12 horas de tratamento (enquanto que na B16F10 ocorreu após 24 horas).

Em comparação com os resultados alcançados com os lipossomas DODA/FO-S, os tratamentos realizados apenas com lipossomas DODAC vazios proporcionaram um aumento no número de células na fase sub-G₁, na linhagem B16F10 e, em menor proporção, no número de células na fase S, nas células Hepa1c1c7. Entretanto, não elevou, em ambas as linhagens, o número de células paradas na fase G₂/M, pois este é um efeito especificamente mediado pela FO-S (Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2016). Assim, foi verificado que o efeito inespecífico do DODAC em promover citotoxicidade, está correlacionado, provavelmente, com a capacidade deste composto em interagir com moléculas carregadas eletronegativamente, entre elas, o DNA (Ulrich, 2002; Oliveira et al., 2014; Abu Lila e Ishida, 2017).

O possível mecanismo pelo qual a formulação lipossomal DODAC/FO-S induziu parada na fase G₂/M e apoptose nas células tumorais Hepa1c1c7 envolveu a ativação da via intrínseca de morte, pela modulação da atividade da proteína p53, a qual, provavelmente, foi responsável pelo aumento das proteínas Bax e p21, e diminuição da expressão da ciclina D1. A modulação da expressão destas proteínas foi observada após o tratamento com os lipossomas. Este mecanismo também envolveu o aumento da proteína pró-apoptótica p27 e a redução da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Além disto, a expressão das proteínas envolvidas no *checkpoint*, regulação do ciclo celular e apoptose foi maior nas células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 2,0 mM do que nas que foram expostas apenas à FO-S. Isto demonstra que o tratamento com os lipossomas é mais eficaz do que o tratamento apenas com a FO-S.

Sabe-se que o mecanismo pelo qual a proteína p53 regula a transição da fase S para a G₂/M envolve a regulação da quinase Cdc2, essencial para a célula entrar em mitose (Taylor e Stark, 2001; Rhind e Russell, 2012; Joerger e Fersht, 2016). Em resposta a danos no DNA, vias independentes da p53, bem definidas, também podem inibir a atividade da Cdc2. Altos níveis de expressão de p53 inibem a transcrição da ciclina B e da Cdc2, parcialmente reprimindo diretamente seus promotores, o que resulta na redução ou eliminação do complexo Cdc2/ciclina B. A p53 também ativa a transcrição da p21 e das proteínas 14-3-3 e GADD45, que inibem a atividade da Cdc2/ciclina B. Os mecanismos de *checkpoint* dependentes da proteína p53 são considerados mais estáveis do que os processos independentes dela (Kuang e Wang, 2009; Joerger e Fersht, 2016).

Neste aspecto, a regulação do ciclo celular exercida pela FO-S encapsulada nos lipossomas parece ser um processo dependente da proteína p53.

Similarmente aos resultados encontrados para modulação da proteína p53 pela FO-S encapsulada, Ferreira et al. (2013c) demonstraram que a FO-S promoveu parada no ciclo celular, mediada pela p53, e induziu a redução da Bcl-2, na linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Além disto, o tratamento com a FO-S aumentou a expressão da proteína Bax nas células de adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células (H460/Bcl-2), o que indica que a FO-S é capaz de recrutar mediadores envolvidos na apoptose desencadeada pela via mitocondrial (Ferreira, 2013a).

Neste estudo, o tratamento com a FO-S 2,0 mM não promoveu aumento significativo da p53. Este efeito não foi observado, provavelmente, pelo tempo de exposição das células a FO-S, pois a expressão das proteínas que tem ativação transcricional regulada pela p53, como Bax e p21, foi alterada. Entretanto, nas células tratadas com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, o efeito regulatório sobre a p53 foi sustentado, o que demonstra a eficácia desta formulação em mediar mecanismos que resultam em parada do ciclo celular e posterior indução de morte.

O mecanismo de *checkpoint* mediado pela p53 pode ocasionar o reparo dos danos no DNA ou levar a ativação dos mecanismos de morte celular programada, mediados pelo aumento das proteínas pró-apoptóticas, como Bax, PUMA e Noxa, e redução das proteínas antiapoptóticas, entre elas a Bcl-2 (Joerger e Fersht, 2016). Neste estudo, o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 foi capaz de promover a ativação dos mecanismos de apoptose, uma vez que houve elevação na expressão da proteína Bax e diminuição da proteína Bcl-2.

Os tratamentos com os lipossomas DODAC vazios induziram o aumento da expressão das proteínas p53, p21 e Bax e diminuição da Bcl-2; entretanto, em menor proporção que o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S. Como descrito anteriormente, o DODAC pode interagir com o DNA e outras moléculas carregadas eletronegativamente; isto provavelmente induziu a atividade da proteína p53 e, consequentemente, a atividade da p21, Bax e Bcl-2 (Carmona-Ribeiro 2003, Knudsen et al., 2015). Entretanto, este carreador não foi citotóxico para as células normais endoteliais HUVEC, nas mesmas concentrações que foram utilizadas nas linhagens de células tumorais B16F10, Skmel e Hepa1c1c7. Sendo assim, provavelmente, o mesmo poderá servir como adjuvante nos efeitos antitumorais exercidos pela FO-S.

O aumento significativo da expressão da proteína p27 após o tratamento com a formulação DODAC/FO-S 1:1 2,0 mM, em relação a FO-S, demonstra um importante mecanismo pelo qual estes lipossomas exercem a regulação do ciclo celular e da apoptose, pois esta proteína atua como inibidor de quinases dependentes de ciclinas, regulando negativamente a progressão do ciclo celular da fase G₁ para S. Em diversas neoplasias, os níveis nucleares da p27 estão reduzidos (Le e Bast Jr, 2009, Berton et al., 2017). A baixa regulação da p27 acontece durante o processo de tumorigênese, consistindo em um fator prognóstico negativo para a resposta ao tratamento. Em células normais, a p27 bloqueia a progressão do ciclo celular por inibir a atividade da ciclina 2-CDK2 e da ciclina A - CDK2 (Le e Bast Jr, 2009; Berton et al., 2017). A indução da expressão da p27 é um importante biomarcador da resposta ao tratamento quimioterápico.

Considerando a importância da redução da ciclina D1 no tratamento antitumoral, a formulação lipossomal DODAC/FO-S e a FO-S 2,0 mM se mostraram eficazes para este fim, pois estes compostos promoveram a diminuição da expressão da ciclina nas células tumorais Hepa1c1c7. Em concordância, estudos recentes demonstraram a capacidade da FO-S em mediar a redução do RNAm da ciclina D1 nas células MCF-7 (Ferreira et al., 2013c) e de reduzir a expressão da CDK4/6 no modelo de células de carcinoma de pulmão de não pequenas células H460/Bcl-2 (Ferreira, 2013a). Neste aspecto, sabe-se ainda que a ciclina D1 é um importante regulador da progressão da fase G₁ para S em diversas linhagens celulares e que, juntamente com seus ligantes (CDK4 e CDK6), formam complexos ativados que possibilitam a progressão do ciclo pela fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (pRb) (Musgrove et al., 2011; Chen et al., 2017; Núñez et al., 2017; Teixeira Mendes et al., 2017). Alguns agentes terapêuticos têm mostrado induzir a degradação de ciclina D1 *in vitro*, oferecendo uma via útil para intervenção terapêutica (Alao, 2007; Musgrove et al., 2011; Chen et al., 2017; Núñez et al., 2017; Teixeira Mendes et al., 2017). Por estes motivos, há uma grande relevância na diminuição da ciclina D1 pelo tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S e FO-S.

A indução de morte celular pela via intrínseca nas células tumorais Hepa1c1c7, exercida pela formulação lipossomal (0,3 mM e 2,0 mM), foi confirmada pela avaliação do potencial elétrico mitocondrial. As células tratadas com a formulação lipossomal reduziram, de forma expressiva, o potencial elétrico mitocondrial. As células tratadas apenas com os lipossomas DODAC vazios apresentaram mitocôndrias funcionais. Corroborando os dados, Ferreira et al. (2013c) verificaram que as células de

adenocarcinoma de mama humano MCF-7 tratadas com a FO-S tiveram perturbação no potencial elétrico mitocondrial.

Além da modulação da via intrínseca e da regulação do ciclo celular, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S 2,0 mM, nas linhagens de células tumorais B16F10 e Hepa1c1c7, foi capaz de aumentar a expressão do receptor DR4 e ativar as caspases 8 e 3, resultando na liberação do citocromo c, sendo mais eficaz do que o tratamento apenas com a FO-S. A expressão destas proteínas nas células HUVEC ocorreu em proporções não significativas.

Estudos preliminares com a FO-S têm relatado a sua provável capacidade de formar um complexo com os receptores DR4 e DR5 (Ferreira, 2013a), representando um mecanismo pelo qual os AFTs são internalizados no citoplasma pela formação de coagregação com os receptores da família TNF, em especial o FasL (Lee et al., 2012). Nas células de adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células (H460wt), a FO-S, provavelmente, induz apoptose via TRAIL, ativando a via extrínseca da apoptose por meio da ativação da caspase 8. Receptores da família TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), estão frequentemente associados à morte por apoptose, envolvendo a dos receptores DR4 e DR5 (Nagane et al., 2010; Goldar et al., 2015).

Nas células tumorais B16F10 houve um aumento na expressão do receptor DR4, após o tratamento com DODAC 2,0 mM. Isto se deve, provavelmente, porque o DODAC e DODAB podem apresentar atividade imunomoduladora. É possível empregar o DODAC como um importante imunoadjuvante eficiente, principalmente para uso veterinário e humano (Carmona Ribeiro, 2003). Além disto, a injeção intraperitoneal de lipoplexos catiônicos em ratos imunocompetentes resultou na infiltração de células inflamatórias, secreção de interferon gama e aumento da atividade das células natural killer na cavidade peritoneal. Lipoplexos de DODAC e DOTMA podem modular respostas inflamatórias semelhantes, com duração de, pelo menos, 5 dias (Bramson et al., 2000).

O aumento das caspases 8 e 3 ativas, do receptor- DR4 e a liberação do citocromo c nas linhagens tumorais (B16F10 e Hepa1c1c7) demonstraram a eficácia da formulação lipossomal em maximizar o potencial apoptótico mediado pela FO-S. Na maioria dos eventos apoptóticos são requeridas a participação das caspases, as quais são divididas em iniciadoras (8, 9 e 12) e executoras (3, 6 e 7), sendo estas últimas as responsáveis pelas alterações morfológicas no núcleo e no citoesqueleto (Elmore, 2007; Goldar et al., 2015).

Estudos mostraram que a FO-S induziu a morte celular por apoptose, promovendo o aumento da expressão da pró-caspase 3 e do tBid, indicativos de que a via intrínseca foi recrutada em resposta a ativação da caspase 8 (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b).

Os dados obtidos nas linhagens estudadas comprovam que a utilização do DODAC como carreador pode maximizar os efeitos citotóxicos da FO-S. Isto foi demonstrado pela translocação do citocromo c para o citoplasma e a ativação da caspase 3. Nas células tumorais B16F10, a análise por microscopia confocal a laser demonstrou a presença de caspase 3 ativa em diversos compartimentos celulares; isto porque, nas células em processo de apoptose, as caspases são localizadas ou associadas com vários compartimentos intracelulares, incluindo citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático, ou no aparelho de Golgi (Nicholson, 2000; Elmore, 2007; Goldar et al., 2015).

Nas células tumorais Hepa1c1c7, tratadas com a FO-S 2,0 mM, foi observado um aumento no número de lisossomas. Contudo, o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 1:1 2,0 mM não promoveu este efeito, mas induziu fragmentação nuclear e cromossômica, e condensação dos cromossomos, como foi observado pelo ensaio de laranja de acridina. Dessa maneira, é possível que o aumento no número lisossomas pode não ter sido observado por causa do tempo prolongado de tratamento destas células, pois neste período já haviam alterações na morfologia e nas estruturas celulares.

Sabe-se que os lisossomas podem iniciar a morte celular em resposta a muitas condições favorecem o rompimento da sua integridade estrutural, um processo conhecido como permeabilização da membrana lisossomal (Galluzzi et al., 2014). Estes estímulos incluem vários agentes lisossomotrópicos. A permeabilização da membrana lisossomal pode culminar na liberação (e permite a ativação) das hidrolases ácidas no citosol, que por sua vez catalisam (ou inibem a atividade) a transformação de vários substratos envolvidos na regulação da morte celular. Por exemplo, o aumento da acidez citosólica possibilita a ativação de proteases tóxicas, incluindo a catepsina, que promove apoptose por meio da clivagem de uma variedade de substratos, incluindo outras catepsinas (Galluzzi et al., 2014).

Curiosamente, estudos recentes demonstraram que o processo apoptótico deflagrado por TRAIL, em células de carcinoma hepatocelular (Huh-7, Hep3B), foi associado com a permeabilização lisossomal e subsequente aumento da catepsina B no citosol. A internalização do TRAIL e seus receptores pode recrutar fatores que induzem

a permeabilização da membrana lisossomal, resultando na liberação da catepsina B para o citosol (Werneburg et al., 2007; Guicciardi, 2007; Guicciardi, 2014). Neste contexto, os resultados obtidos sugerem que a via lisossomal possa estar envolvida na ativação da morte celular mediada pela FO-S e, provavelmente, a formulação lipossomal DODAC/FO-S, tendo em vista que estes tratamentos promoveram o aumento na expressão do receptor DR4 nas linhagens tumorais estudadas. Entretanto, novos estudos devem ser realizados, afim de confirmar a participação da via lisossomal como mecanismo de ação dos lipossomas DODAC/FO-S.

Interessantemente, a internalização dos lipossomas DODAC/FO-S (0,3 e 2,0 mM) nas células tumorais Hepa1c1c7, com apenas 3 horas de tratamento, foi confirmada por microscopia confocal a laser. Foi observado que os lipossomas são rapidamente internalizados, o que os tornam um grande potencial para o tratamento antitumoral. Após 6 horas, ainda é possível observar os lipossomas no citosol. Entretanto, neste tempo de tratamento, algumas células já apresentam alterações morfológicas, correspondentes ao processo apoptótico.

A análise morfológica por MEV, das células tumorais B16F10 tratadas com os lipossomas DODAC/FO-S, evidenciou que as células morrem após a ativação de mecanismos pró-apoptóticos, conforme discutido anteriormente e relatado nas publicações com a FO-S (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Ferreira et al., 2013b; Ferreira et al., 2013c; Luna et al., 2014; Dhakshinamoorthy et al., 2015; Luna et al., 2016). Diversos trabalhos descrevem as alterações que ocorrem nas células apoptóticas, como a formação de bolhas na membrana, seguida por cariorrexia, e a separação de fragmentos de células em corpos apoptóticos, durante um processo chamado "*budding*" (Elmore, 2007; Goldar et al., 2015). Nesse contexto, a formação de corpos apoptóticos foi observada nas células tratadas com a formulação lipossomal. A presença dos lipossomas aderidos à membrana das células B16F10, após 24 horas de exposição, pode favorecer a manutenção da atividade citotóxica.

Um outro efeito verificado após o tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S (0,3 e 2,0 mM) e a FO-S 2,0 mM foi a redução significativa da expressão dos marcadores CD90 e CD44, nas células tumorais Hepa1c1c7. Nesta temática, estudos realizados com amostras de tumores de pacientes com tumores hepáticos demonstraram que todos os tumores, em 91,6% das amostras de sangue, eram CD45⁻ e CD90⁺. As células CD44⁺/CD90⁺ apresentaram um fenótipo mais agressivo que às células CD90⁺/CD44⁻,

formando lesões metastáticas no pulmão de ratos imunodeficientes. O bloqueio da expressão do CD44 evitou a formação local e metastática de nódulos tumorais pelas células CD90+ (Yang et al., 2008). No nosso estudo, a quantificação destes biomarcadores nas células tumorais Hepa1c1c7 confirmou o perfil tumorigênico, agressivo e metastático desta linhagem celular, havendo a redução após o tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S e a FO-S. Nas células tratadas com os lipossomas de DODAC vazios (0,3 e 2,0 mM) não ocorreu redução significativa na expressão do marcador CD90; sendo assim, estas células ainda apresentaram potencial tumorigênico.

Apesar dos resultados promissores *in vitro*, as comprovações destes efeitos *in vivo* são necessárias. Sendo assim, foi desenvolvido um modelo animal experimental de CHC ortotópico para avaliar o potencial terapêutico da FO-S e dos lipossomas DODAC/FO-S. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que apenas os animais dos grupos controle tumoral, DODAC/FO-S IP (45 mg/kg) e DODAC IP (36,25 mg/kg) apresentaram aumento significativo na massa corpórea, após o protocolo terapêutico. Contudo, não houve diferença significativa entre estes grupos e os animais saudáveis (grupo diluente IH). O aumento de peso dos animais dos grupos DODAC/FO-S IP e DODAC IP pode estar correlacionado ao acúmulo da formulação lipossomal dentro da cavidade abdominal. Nos outros grupos experimentais, não houve alteração significativa na massa corpórea dos animais.

A manutenção do peso dos animais é um indicativo da baixa toxicidade sistêmica do tratamento antitumoral com os lipossomas DODAC/FO-S e a FO-S, nas condições e doses utilizadas, preservando-se a musculatura e/ou tecido adiposo dos animais. Estes resultados, representam uma vantagem em relação aos quimioterápicos tradicionalmente utilizados para o tratamento do carcinoma hepatocelular, como a doxorrubicina, os quais possuem, como efeito colateral, a perda de massa corpórea (Johnson, 2005; Barreto et al., 2016).

Tratamentos mais avançados também ocasionam a perda de peso nos pacientes, como por exemplo, o Sorafenib. Em caso de carcinoma hepatocelular avançado, o Sorafenib consiste no tratamento indicado e aprovado, sendo considerado a terapia padrão para estes casos. O Sorafenib é um inibidor de serina/treonina quinase Raf e dos receptores tirosina quinase associados com os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) 2 e 3, receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) β , Flt-3 e c-Kit e outras vias de sinalização, incluindo STAT3

(Shaaban et al., 2014; Kuczynski et al., 2015). Apesar dos efeitos antitumorais, estudos clínicos de fase III, randomizados, com pacientes portadores de CHC avançado, demonstraram que o tratamento com o Sorafenib promoveu o aumento da sobrevida global em apenas 2,8 a 2,3 meses (Llovet et al., 2008; Cheng et al., 2009). Um estudo recente, utilizando o modelo xenográfico de carcinoma hepatocelular Hep3B-hCG em camundongos atímicos, evidenciou que o tratamento com o Sorafenib, com escalonação da dose de 30 a 60 mg/kg, melhorou o tratamento antitumoral; entretanto diminuiu a sobrevivência devido à perda de peso corporal excessiva (Kuczynski et al., 2015). Em contrapartida, os dados obtidos no nosso estudo demonstraram que o tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S, em concentrações similares, não acarretaram na perda de peso dos animais.

Juntamente com os resultados da manutenção do peso dos animais, após o período de tratamento foi possível observar que não houveram alterações significativas no peso dos órgãos dos animais, com exceção do peso do fígado. O peso deste órgão diminuiu significativamente após o tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH), FO-S 8,75 mg/kg (IP e IH) e DODAC 36,25 mg/kg (IP). Dessa maneira, existe uma correlação entre a diminuição do peso do fígado e a redução da massa tumoral, uma vez que, após o tratamento, os valores foram aproximados aos obtidos para os animais saudáveis. Entretanto, deve ser levado em consideração que, nos animais tratados pela via IH, há a adesão dos lipossomas a este órgão, como foi possível visualizar nas imagens obtidas a partir do exame de imagem PET Scan. Sendo assim, não é possível estabelecer uma correlação precisa com a diminuição do peso do fígado e a redução da massa tumoral. Neste aspecto, estudos mostram que os lipossomas catiônicos tendem a se localizar na neovascularização tumoral, mas a sua carga superficial positiva leva a interações inespecíficas com as espécies aniônicas e resulta em baixa capacidade de circulação (Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Zhao et al., 2011).

O tratamento de pacientes oncológicos, por meio da administração de medicamentos intencionalmente projetados para serem citotóxicos, inevitavelmente causa consequências negativas, sendo a hepatotoxicidade uma reação frequentemente imprevisível ou idiossincrática à quimioterapia (Grigorian et al., 2014). Deste modo, o monitoramento da função hepática é aconselhável para os pacientes que iniciam um regime quimioterápico, pois níveis anormais das enzimas hepáticas podem indicar disfunções hepáticas ou alteração no fluxo biliar (Grigorian et al., 2014). A lesão no

fígado, seja aguda ou crônica, eventualmente resulta em aumento das concentrações séricas das transaminases AST e ALT e da FA (Giannini et al., 2005; Grigorian et al., 2014). Neste contexto, os tratamentos com a formulação lipossomal DODAC/FO-S, a FO-S e o DODAC (pelas vias IP e IH) não provocaram a elevação das transaminases, demonstrando a baixa hepatotoxicidade destes compostos, nas doses e condições utilizadas.

Interessantemente, os tratamentos com DODAC/FO-S 45 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, diminuíram a concentração sérica de AST, obtendo-se valores compatíveis com os animais sadios (grupos diluentes). De modo semelhante, Ferreira (2013a) demonstrou que os animais portadores de tumor dorsal de carcinoma renal murino RENCA, tratados com a FO-S (40 e 80 mg/kg) apresentaram uma redução nos níveis de AST (Ferreira, 2013a). O aumento de AST, no grupo controle tumoral, pode ser em decorrência do desenvolvimento do tumor, pois lesões no fígado, sejam agudas ou crônicas, eventualmente resultam em aumento das concentrações séricas de aminotransferases (Giannini et al., 2005). Entretanto, é preciso levar em consideração que um nível anormal é geralmente definido como um valor acima dos limites de referência, uma vez que não há significância clínica para ocorrência de baixos níveis de marcadores bioquímicos, com exceção da albumina sérica (Giannini et al., 2005; Gowda et al., 2009).

A função renal também foi avaliada por meio das concentrações séricas de creatinina e ureia. Curiosamente, o tratamento com DODAC/FO-S 45 mg/kg e FO-S 8,75 mg/kg, pelas vias IP e IH, promoveu a diminuição da creatinina e o aumento da ureia, ambos compatíveis com os obtidos para os animais sadios (grupos diluentes). Estes resultados comprovam a baixa toxicidade renal do tratamento com estes compostos. O aumento dos níveis de creatinina no grupo controle tumoral pode apontar para um quadro de injúria renal, proveniente da presença de focos metastáticos. Isto porque, não há uma correlação direta entre o aumento de creatinina com o desenvolvimento do CHC, pois no quadro de acometimento de doença hepática crônica existe uma redução nos níveis séricos de creatinina, devido a uma diminuição de 50% da produção hepática de creatina (Slack et al, 2010; Agarwal e Davenport, 2014). Em relação ao nível de ureia, a sua diminuição no grupo controle tumoral pode estar correlacionada com um quadro de disfunção hepática (Lum e Leal-Khoury, 1989; Slack et al, 2010; Agarwal e Davenport, 2014).

A baixa toxicidade sistêmica do tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 45 mg/kg e o DODAC 36,25 mg/kg, por ambas as vias de administração, foi demonstrada pelas análises hematológicas. Após o protocolo terapêutico, o número de plaquetas, eritrócitos, percentual de hematócrito e os índices hematimétricos (VCM, HCM, RDW e CHCM) não apresentaram alterações que resultem em um significado biológico, pois os valores não sofreram modificações ou estão dentro da faixa considerada normal para a espécie (Barrios et al., 2009; Araújo, 2012; Spinelli et al., 2014). Neste aspecto, estes resultados mostram que este tratamento é seguro.

A redução no número de plaquetas, verificada no 7º dia, não apresenta correlação direta com o protocolo de tratamento, pois os animais do grupo controle tumoral também exibiram o mesmo percentual de redução obtido para os grupos DODAC/FO-S 45 mg/kg (IH e IH) e DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH). Estudos demonstram que pacientes com doenças hepáticas crônicas e CHC podem desenvolver plaquetopenia (Carr e Guerra, 2013a). Neste contexto, foi possível observar que, nos dias 14 e 24, os camundongos do grupo controle tumoral tiveram um aumento significativo no número de plaquetas, enquanto que os grupos de tratamentos apresentaram valores significativamente menores.

Estudos demonstram que o aumento no número de plaquetas têm sido relacionado a muitos tipos de tumores, cujos níveis elevados são sugestivos para o diagnóstico de câncer, na ausência de anemia ferropriva e doença inflamatória benigna (Hwang et al., 2004; Carr e Guerra, 2013b). Esta associação com o câncer de fígado é devido a este órgão, bem como os seus tumores, apresentarem a capacidade de sintetizar a trombopoetina, um dos principais fatores na produção de plaquetas. Dessa maneira, os CHCs podem induzir a trombocitose paraneoplásica (Okubo et al., 2000; Jelkmann, 2001).

Por outro lado, as plaquetas possuem a capacidade de interagir com as células tumorais e promover o aumento da taxa de crescimento (Labelle et al., 2011; Buergey et al., 2012; Naina e Harris, 2012; Carr e Guerra, 2013a). Especificamente no CHC, as plaquetas são conhecidas por produzirem fatores de crescimento para este tumor, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), serotonina e o fator de crescimento de fibroblasto e seus receptores (Stock et al., 2007; Soll et al., 2010; Gauglhofer et al., 2011; Nalesnik e Michalopoulos, 2012; Carr e Guerra, 2013b). Dessa maneira, os números reduzidos de

plaquetas verificados nos grupos de tratamentos DODAC/FO-S e FO-S, em relação ao grupo controle tumoral, podem estar correlacionados com a redução da massa tumoral.

Também foi possível constatar que os lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH) demonstraram menor toxicidade em relação a FO-S (IP e IH), a qual promoveu redução significativa no número de eritrócitos e do percentual de hematócrito e RDW. Os valores obtidos para estes parâmetros, ao final do protocolo experimental, indicam um quadro de anemia leve nos animais tratados com a FO-S. Para isto, foi levado em consideração que a anemia em camundongos C57BL/6 é, geralmente, definida como o valor da contagem de RBC, hemoglobina ou hematócrito abaixo de duas vezes o desvio padrão (Raabe et al., 2011). Também foi levado em consideração que, se a massa de células vermelhas diminuir substancialmente (25-20%), a entrega de oxigênio aos tecidos periféricos é afetada, caracterizando a definição funcional de anemia (Everds et al., 2007).

Sabe-se que a quimioterapia é um dos principais tratamentos contra o câncer, mas pode apresentar diversos efeitos colaterais, sendo a leucopenia um efeito adverso comum (Nian et al., 2016). Contudo, neste estudo, os camundongos portadores de CHC tratados com FO-S 8,75 mg/kg, DODAC/FO-S 8,75 mg/kg e DODAC 36,25 mg/kg, pelas vias IP e IH, não apresentam redução no número de leucócitos, demonstrando a baixa capacidade destes compostos promoverem leucopenia.

Na contagem diferencial de leucócitos, foi constatado que apenas os animais tratados com a formulação lipossomal DODAC/FO-S 45 mg/kg (IP e IH) e DODAC 36,25 mg/kg (IP e IH) apresentaram redução significativa do número de linfócitos, em relação aos demais grupos. Esta variação no número de linfócitos está correlacionada com a toxicidade proveniente da carga dos lipossomas catiônicos, visto que eles podem interagir com proteínas séricas carregadas negativamente, o que pode ocasionar inflamação e, quando administrados em altas concentrações, linfocitopenia e trombocitopenia (Tousignant et al., 2000; Behlke, 2006). Em relação ao número de monócitos, as variações entre os diferentes grupos não apresentam correlação significativa com os tratamentos ou com desenvolvimento tumoral, pois os animais sadios exibiram as mesmas taxas de variações; sendo assim, não foi possível observar um padrão confiável de resposta.

No grupo de animais tratados com DODAC IP, foi verificado um aumento no percentual de granulócitos, ao final do tratamento. Este efeito, pode ser resultado da

capacidade dos lipossomas catiônicos modularem respostas inflamatórias (Bramson et al., 2000).

Considerando a carga dos lipossomas e sua baixa motilidade, o tratamento dos animais pela via intra-hepática se mostrou mais eficaz para disponibilizar, no microambiente tumoral, os lipossomas carreando FO-S. Este fato foi comprovado durante a necropsia dos animais tratados com a formulação lipossomal, pela via IH, na qual foi verificada que os lipossomas permaneceram aderidos ao fígado, estando presentes na cápsula de Glisson e no parênquima hepático. Adicionalmente, também induziu alteração na morfologia do fígado, provavelmente devido a redução do volume tumoral. Por outro lado, o tratamento pela via IP não proporcionou a interação dos lipossomas com o fígado, sendo possível observá-los na cavidade abdominal, aderidos aos órgãos. Corroborando estes resultados, a cinética de distribuição dos lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg, que foi avaliada por meio do exame de imagem PET Scan, demonstrou que os animais tratados pela via IH apresentaram marcação positiva no fígado, até 16 dias. Neste tempo, os lipossomas também se distribuíram no pulmão. Dessa maneira, os lipossomas DODAC/FO-S inoculados pela via IH podem representar uma estratégia eficiente para o tratamento do CHC, permanecendo no microambiente tumoral e diminuindo a possibilidade de toxicidade sistêmica.

Em relação a via de administração, considera-se que a via intratumoral, que foi utilizada neste estudo, é promissora, uma vez que apresenta um potencial significativo no tratamento anticâncer. A viabilidade de administração direta no microambiente tumoral tem sido bastante destacada recentemente. Além disto, os lipossomas têm sido amplamente estudados para administração intratumoral visando a entrega gênica (Bao et al., 2006). Adicionalmente, trabalhos evidenciam que lipossomas formulados com DODAC apresentam uma propensão para alvejar seletivamente os vasos sanguíneos associados ao tumor (Ho et al., 2010). Em estudos futuros, o acréscimo de polietileno glicol (PEG) poderá ser empregado aos lipossomas DODAC/FO-S, obtendo-se uma nova formulação lipossomal que pode possibilitar o aumento do tempo de circulação dos lipossomas e melhorar a distribuição nos focos metastáticos, além de propiciar a inoculação destes por outras vias. Estudos mostram que a adição do PEG a lipossomas catiônicos melhorou o tempo de circulação e as propriedades de impregnação destes aos vasos tumorais (Ho et al., 2010).

A distribuição das células do parênquima hepático e/ou da massa tumoral nas diferentes fases do ciclo celular evidenciou que os tratamentos com a formulação lipossomal DODAC/FO-S (IH) e a FO-S (IH e IP) foram efetivos em reduzir o número de células em progressão no ciclo celular, especialmente na fase S. Este resultado pode estar correlacionado, indiretamente, com a diminuição da capacidade proliferativa do tumor. Similarmente, Ferreira et al. (2012a) demonstraram que o tratamento de células do tumor ascítico de Ehrlich com a FO-S, aumentou a fração apoptótica sub-G1 e inibiu a progressão para a fase S do ciclo celular (Ferreira et al., 2012a). Neste sentido, estudos mostram que as células progridem da fase G₁ para a S após superar o ponto de restrição (R), no qual o complexo ciclina D/CDK4/6 é ativado e fosforila a proteína do Retinoblastoma (Rb), permitindo o desligamento da Rb do fator de transcrição E2F. Assim, a E2F pode ativar a transcrição gênica. Contudo, algumas células tumorais exibem uma capacidade eficiente de passar pelo ponto R e facilitar a síntese de DNA e a divisão celular, o que, eventualmente, pode ocasionar um encurtamento de G₁ ou a aceleração da progressão de G₁/S durante a proliferação celular (Nevins et al., 2001; Gutierrez et al., 2002; Erenpreisa et al., 2007; Kim et al., 2010).

Em concordância com os resultados anteriormente descritos, a eficácia do tratamento antitumoral utilizando os lipossomas DODAC/FO-S 45 mg/kg, pela via IH, também foi demonstrada nos exames histopatológicos, no qual foi possível observar uma redução da formação de massa tumoral e vastas áreas de necrose, em proporções significativamente maiores do que nos outros grupos de tratamentos. Entretanto, os animais tratados pela via IP também apresentaram diminuição dos focos de massa tumoral. Este resultado pode ter ocorrido, provavelmente, pela dissociação da FO-S das vesículas lipossomais, após a inoculação por esta via, uma vez que a fluorescência visualizada condiz apenas com a parte lipídica dos lipossomas. Sendo assim, após a dissociação, é possível que a FO-S migre para o microambiente tumoral. Os resultados também demonstram que o tratamento com a FO-S 8,75 mg/kg (IP e IH) reduziu a formação de focos de massa tumoral, mas em menor proporção que o tratamento com DODAC/FO-S IH.

Os resultados *in vivo* deste estudo estão em consonância com os achados descrito para a FO-S por Ferreira et al. (2012a), nos quais foi demonstrado que o tratamento de ratos portadores de tumor ascítico de Ehrlich tiveram uma redução no crescimento tumoral e o aumento na taxa de sobrevivência, após o tratamento com a FO-S (35 e 70 mg /

kg). Em outro estudo, foi demonstrado que o tratamento com 40 mg/kg/dia de FO-S inibiu completamente o aparecimento de focos metastáticos no pulmão de camundongos Balb/c inoculados com células Renca (Ferreira et al., 2013d). Dessa maneira, os achados do presente trabalho demonstraram que, nos animais portadores de CHC que foram tratados com a formulação lipossomal 45 mg/kg (IH), a qual contém 8,75 mg de FO-S, ocorreu a redução dos focos tumorais em dose e frequência de administração menores do que as relatadas na literatura.

Interessantemente, os animais tratados com DODAC/FO-S 45 mg/kg e FO-S 8,75 mg, pela via IH, apresentaram aumento significativo na expressão gênica da p53 e ciclina B1. O aumento da expressão do mRNA da caspase 8 e 3 ocorreu apenas no tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S. Estes resultados são similares aos encontrados nos nossos estudos *in vitro* e aos dados descritos na literatura com o tratamento com a FO-S (Ferreira, 2013a, Ferreira et al. 2013c). Dessa maneira, os achados apontam para a participação da p53 no mecanismo antitumoral mediado pela formulação lipossomal. Conforme discutido anteriormente, altos níveis de expressão de p53 podem inibir a transcrição da ciclina B e da quinase Cdc2, reprimindo parcialmente seus promotores, havendo consequente redução ou eliminação do complexo Cdc2/ciclina B (Taylor e Stark, 2001; Rhind e Russell, 2012; Joerger e Fersht, 2016).

O fator de transcrição p53 desempenha um papel central no ciclo celular e é, indiscutivelmente, o supressor de tumoral mais importante (Joerger e Fersht, 2016). Surpreendentemente, Liedtke et al. (2003) demonstraram que a p53 é capaz de ativar o promotor gênico da caspase 8, após a entrega exógena de p53 em células de CHC Hep3B deficientes em p53. Em sequência, estudos mostraram que, após o tratamento com TRAIL, fragmentos gerados do domínio de morte da caspase 8 podem ser estabilizados e translocados para o núcleo, onde interagem com a proteína TOPORS (uma proteína de ligação a p53 e a topoisomerase I) e, possivelmente, ocasionam a dissociação da p53 de TOPORS, permitindo que p53 estimule a expressão do gene da caspase 8 (Yao et al., 2007). Consequentemente, a forma ativa da caspase 8 induz a ativação das pro-caspases 3 e 7, que são proteínas efetoras da apoptose, resultando na morte celular. Além disso, a proteína P53 pode promover a apoptose de forma independente, por meio da transcrição de genes pró-apoptóticos e de bloqueio do ciclo celular (Elmore, 2007; Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015; Cuda et al., 2016).

A expressão dos genes Bax e Bcl-2, nos animais tratados com FO-S e DODAC/FO-S, pode não ter sido alterada devido ao tempo de análise, visto que apresentam regulação gênica dependente da proteína p53 (Elmore, 2007; Ouyang et al., 2012; Goldar et al., 2015; Cuda et al., 2016).

Estudos adicionais deverão ser conduzidos, afim de elucidar o mecanismo de ação diretamente envolvido no efeito apoptótico da FO-S e dos lipossomas DODAC/FO-S no CHC. Contudo, os dados apresentados demonstram, de forma efetiva, o envolvimento das vias intrínseca e extrínseca da apoptose mediada pela formulação lipossomal DODAC/FO-S (IH) e pela FO-S (IH). O conjunto de todos os resultados evidenciam que o tratamento com a formulação lipossomal DODAC/FO-S (IH) apresenta maior potencial antitumoral, sem efeitos adversos significativos.

6. CONCLUSÕES

- 6.1.A formulação lipossomal DODAC/FO-S, nas concentrações avaliadas, exibiu alta eficiência de encapsulação da FO-S e foi estável até 40 dias após a preparação;
- 6.2.A formulação lipossomal DODAC/FO-S foi a que promoveu maior citotoxicidade, nas linhagens tumorais estudadas, em comparação com FO-S; Além disto, ocasionou parada nas fases S e G₂/M, nas células tumorais B16F10 e Hepa1c1c7;
- 6.3.As células tumorais Hepa1c1c7 foram as mais sensíveis ao tratamento com os lipossomas DODAC/FO-S, os quais foram internalizados em até 6 horas;
- 6.4.Os lipossomas DODAC/FO-S foram efetivos em induzir morte nas células Hepa1c1c7, modulando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose e promovendo: diminuição de CD90, CD44, ciclina D1 e Bcl-2, aumento de p53, p21, p27, Bax e caspases 8 e 3 ativas e liberação do citocromo c, em proporções maiores que a FO-S livre;
- 6.5.Nas células tumorais (B16F10 e Skmel-28) a formulação lipossomal promoveu o aumento significativo das caspases 8 e 3 ativas, expressão do receptor DR4 e a liberação do citocromo c;
- 6.6.Os resultados *in vivo* demonstram a que a formulação lipossomal DODAC/FO-S e a FO-S não foram hepatotóxicas e nefrotóxicas e não promoveram caquexia. Adicionalmente, os lipossomas DODAC/FO-S não induziram mielossupressão e hemólise, apresentando menor toxicidade em relação a FO-S livre (vias IP e IH);
- 6.7.O tratamento dos animais pela via intra-hepática se mostrou mais eficaz para disponibilizar os lipossomas carreando FO-S no microambiente tumoral, no qual permaneceram por até 16 dias. Os lipossomas DODAC/FO-S (IH) e a FO-S (IH e IP) foram efetivos em diminuir o número de células em progressão no ciclo celular, especialmente na fase S;

- 6.8. Os lipossomas DODAC/FO-S (IH) foram efetivos em reduzir os focos tumorais e promover a formação de áreas de necrose, em doses e frequência de administração da FO-S menores do que as relatadas na literatura, em proporções significativamente maiores em relação aos outros grupos de tratamentos;
- 6.9. Os lipossomas DODAC/FO-S e a FO-S, via IH, foram efetivos em promover a expressão gênica da p53 e ciclina B1. Além disto, os lipossomas também induziram a expressão das caspases 8 e 3.
- 6.10. Os resultados demonstraram, de forma efetiva, o envolvimento das vias intrínseca e extrínseca da apoptose mediada pela formulação lipossomal DODAC/FO-S (IH) e pela FO-S (IH). O conjunto dos resultados evidenciam que a formulação lipossomal DODAC/FO-S (IH) apresenta maior potencial antitumoral, sem promover efeitos adversos significativos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Conduzir estudos com diferentes associações de lipossomas catiônicos DODAC/FO-S e polietileno glicol (PEG), a fim de possibilitar o aumento do tempo de circulação destes lipossomas e melhorar a sua disponibilidade nos focos metastáticos, além de propiciar a inoculação por outras vias;
- Conduzir estudos com inibidores das vias de sinalização estudadas e discutidas neste estudo, com o intuito de verificar e confirmar o mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral dos lipossomas DODAC/FO-S.

8. REFERÊNCIAS

Abu Lila AS, Ishida T. liposomal delivery systems: design optimization and current applications. *Biol Pharm Bull*, 2017; 40(1):1-10.

Agarwal B, Davenport A. Difficulties in diagnosing acute kidney injury post liver transplantation using serum creatinine based diagnostic criteria. *World J Hepatol*. 2014; 6(10):696-703.

Aggarwal BB, Danda D, Gupta S, Gehlot P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78(9):1083-94.

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki k. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8(1):102.

Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*, 2007; 6:24.

Andreesen R, Modolell M, Weltzien HU, Eibl H, Common HH, Löhr GW, Munder PG. Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res*. 1978; 38(11):3894-9.

Araújo FTM. *Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ* [dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ; 2012.

Arias JL, Clares B, Morales ME, Gallardo V, Ruiz MA. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. *Curr Drug Targets*, 2011; 12(8):1151-65.

Asham EH, Kaseb A, Ghobrial RM. Management of hepatocellular carcinoma. *Surg Clin North Am*. 2013; 93(6):1423-50.

Awapara J. Alanine and Taurine Formation from Injected Cysteine in the Rat. *Nature*, 1950; 165(4185):76-77.

Baguley BC. The paradox of cancer cell apoptosis. *Front Biosci. (Landmark Ed)*, 2011; 16: 1759-67.

Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*, 2016; 3:41-53.

Bao A, Phillips WT, Goins B, Zheng X, Sabour S, Natarajan M, et al. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *Int J Pharm*. 2006; 316(1-2):162-9.

Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME. The death effector domain protein family. *Oncogene*, 2003; 22(53):8634-44.

- Barreto R, Mandili G, Witzmann FA, Novelli F, Zimmers TA, Bonetto A. Cancer and Chemotherapy Contribute to Muscle Loss by Activating Common Signaling Pathways. *Front Physiol.* 2016; 7:472.
- Barrios M, Rodríguez-Acosta A, Gil A, Salazar AM, Taylor P, Sánchez EE, Arocha-Piñango CL, Guerrero B. Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thromb Res.* 2009; 124(3):338-43.
- Batey RG, Burns T, Benson RJ, Byth K. Alcohol consumption and the risk of cirrhosis. *Med J Aust.* 1992; 156(6):413-6.
- Batista CM, Carvalho CMBD, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007; 43(2):167-179.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, 1981; 2 (8256):1129-33.
- Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther.* 2006; 13(4):644-70.
- Berton S, Cusan M, Segatto I, Citron F, D'Andrea S, Benevol S, et al. Loss of p27(kip1) increases genomic instability and induces radio-resistance in luminal breast cancer cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1):595.
- Bhattacharya S, Bajaj A. Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. *Chem Commun (Camb)*, 2009; 21(31):4632-56.
- Biemar F, Foti M. Global progress against cancer-challenges and opportunities. *Cancer Biol Med.* 2013; 10(4):183-6.
- Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm.* 2012; 738432.
- Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2003; 22(33): 5093-107.
- Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Crit Rev Microbiol.* 2010; 36(2):91-133.
- Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 2015; 10:975-99.
- Bramson JL, Bodner CA, Graham RW. Activation of host antitumoral responses by cationic lipid/DNA complexes. *Cancer Gene Ther*, 2000; 7(3):353-9.
- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*, 2012; 13(8):790-801.
- Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut.* 2014; 63(5):844-55.

Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 2016; 150(4):835-53.

Bruix J, Sherman M, Diseases AAFTSOL. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011; 53(3):1020-2.

Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*, 2012; 130(12):2747-60.

Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol*, 2009; 48(6):811-21.

Busto JV, Sot J, Goñi FM, Mollinedo F, Alonso A. Surface-active properties of the antitumour ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (edelfosine). *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768(7):1855-60.

Buyens K, Demeester J, De Smedt SS, Sanders NN. Elucidating the encapsulation of short interfering RNA in PEGylated cationic liposomes. *Langmuir*, 2009; 25(9):4886-91.

Byam J, Renz J, Millis JM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2013; 2(1):22-30.

Callaghan R, Crowley E, Potter S, Kerr ID. P-glycoprotein: so many ways to turn it on. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(3):365-78.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003; 348(17):1625-38.

Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, Delogu S, Zimmermann A, Ericsson J, Brozzetti S, Staniscia T, Chen X, Dombrowski F, Evert M. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2011; 140(3):1071-83.

Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, Mazzola LM, Izumi Y, Jain RK, Torchilin VP, Munn LL. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Res*. 2002; 62(23):6831-6.

Carmona-Ribeiro AM. Bilayer-forming synthetic lipids: drugs or carriers?. *Curr Med Chem*. 2003;10(22):2425-46.

Carr BI, Guerra V. HCC size: platelets, gamma glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Oncology*, 2013a; 85(3): 10.1159/000354416.

Carr BI, Guerra V. Thrombocytosis and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2013b; 58(6):1790-6.

Carrasco MP, Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Segovia JL, Marco C. Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues. *Br J Pharmacol*. 2010; 160(2):355-66.

- Carrasco MP, Jiménez-López JM, Segovia JL, Marco C. Hexadecylphosphocholine interferes with the intracellular transport of cholesterol in HepG2 cells. *FEBS J.* 2008; 275(8):1675-86.
- Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(3):319-26.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatocellular carcinoma - United States, 2001-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010; 59(17):517-20.
- Chen H, Xu X, Wang G, Zhang B, Wang G, Xin G, Liu J, Jiang Q, Zhang H, Zhang C5. CDK4 is degraded by APC/C in mitosis and reaccumulates in early G1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2017; 292(24):10131-10141.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10(1):25-34.
- Choi YH, Yu AM. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(5):793-807.
- Ciavarella S, Milano A, Dammacco F, Silvestris F. Targeted therapies in cancer. *BioDrugs.* 2010; 24(2):77-88.
- Contente TC, Kretzer IF, Filippin-Monteiro FB, Maria DA, Maranhão RC. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014; 66(12):1698-709.
- Crissien AM, Frenette C. Current management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol.* 2014; 10(3):153-61.
- Cuda CM, Pope RM, Perlman H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12(9):543-58.
- Dasmahapatra GP, Didolkar P, Alley MC, Ghosh S, Sausville EA, Roy KK. In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(15):5242-52.
- Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53(3):153-159.
- Dellian M, Yuan F, Trubetskoy VS, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br J Cancer,* 82(9):1513-8.
- Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine,* 2013; 8(9):1509-28.

Detmar M, Geilen CC, Wieder T, Orfanos CE, Reutter W. Phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis of human epidermal keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol*. 1994; 102(4):490-4.

Dhakshinamoorthy S, Dinh NT, Skolnick J, Styczynski MP. Metabolomics identifies the intersection of phosphoethanolamine with menaquinone-triggered apoptosis in an in vitro model of leukemia. *Mol Biosyst*. 2015; 11(9):2406-16.

Dijkstra KK, Cristophe B, Boonstra J. Evasion of G1 Checkpoints in Cancer. . In: Siddik AH. *Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy*. New York: Humana Press; 2009. p.3-26.

Drbohlavova J, Chomoucka J, Adam V, Ryvolova M, Eckschlager T, Hubalek J, Kizek R. Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. *Curr Drug Metab*. 2013; 14(5):547-64.

Duque-Parra JE. Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anat Rec B New Anat*. 2005; 283(1):2-4.

Eibl H, Arnold D, Weltzien HU, Westphal O. [On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs]. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1967; 709:226-30.

El-aneid, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release*, 2004; 94(1):1-14.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.

Elrod HA, Lin YD, Yue P, Wang X, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(7):2029-38.

Erenpreisa J, Cragg MS. Cancer: a matter of life cycle?. *Cell Biol Int*. 2007; 31(12):1507-10.

Everds N. Hematology of the laboratory mouse. In: Fox J, editor. *The mouse in biomedical research*. Waltham (MA): Academic Press; 2007, p.135–163.

Fabbri M. MicroRNAs and cancer: towards a personalized medicine. *Curr Mol Med*. 2013; 13(5):751-6.

Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63(3):136-51.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010; 127(12):2893-917.

Ferreira AK, Freitas VM, Levy D, Ruiz JL, Bydlowski SP, Rici RE, Filho OM, Chierice GO, Maria DA. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. *PLoS One*, 2013d; 8(3):e57937.

Ferreira AK, Meneguelo R, Marques FL, Radin A, Filho OM, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. *Biomed Pharmacother*. 2012b; 66(7):541-8.

Ferreira AK, Meneguelo R, Neto SC, Chierice GO, Maria DA. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. *J Cancer Sci Ther*. 2011; 3:053-059.

Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Filho OM, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. *Biomed Pharmacother*, 2013c 67(6):481-7.

Ferreira AK, Meneguelo R, Pereira A, Mendonça Filho O, Chierice GO, Maria DA. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. *Anticancer Res*. 2012a; 32(1):95-104.

Ferreira AK, Santana-Lemos BA, Rego EM, Filho OM, Chierice GO, Maria DA. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *Br J Cancer*, 2013b; 109(11):2819-28.

Ferreira AK. *Alquil fosfatado sintético precursor dos fosfolipídios de membrana celular com potencial efeito antitumoral e apoptótico em modelos de tumores experimentais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013a.

Ferreira Ddos S, Lopes SC, Franco MS, Oliveira MC. pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Ther Deliv*. 2013e; 4(9):1099-123.

Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017; 3(4):524-54.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*, 2010; 10(2):147-56.

Folsch G, Osterberg R. The apparent acid ionization constants of some O-phosphorylated peptides and related compounds. *J Biol Chem*. 1959; 234(9):2298-303.

Fu L, Kim YA, Wang X, Wu X, Yue P, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy. *Cancer Res*. 2009; 69(23):8967-76.

Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010; ID214074.

Gabrielli B, Brooks K, Pavey S. Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. *Front Pharmacol*. 2012; 3:9.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol*. 2014; 16(8):728-36.

Galuschka C, Proynova R, Roth B, Augustin HG, Müller-Decker K. Models in Translational Oncology: A Public Resource Database for Preclinical Cancer Research. *Cancer Res*. 2017; 77(10):2557-2563.

Gao C, Fang L, Zhao HC, Li JT, Yao SK. Potential role of diabetes mellitus in the progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a cross-sectional case-control study from Chinese patients with HBV infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2013; 12(4):385-93.

Gaughhofer C, Sagmeister S, Schrottmaier W, Fischer C, Rodgarkia-Dara C, Mohr T. Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology*, 2011; 53(3):854-64.

Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 2005; 172(3):367-79.

Giantonio BJ, Derry C, McAleer C, McPhillips JJ, O'Dwyer PJ. Phase I and pharmacokinetic study of the cytotoxic ether lipid ilmofosine administered by weekly two-hour infusion in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(4):1282-8.

Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 2010; 62(6):414-28.

Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*. 2010; 596:47-76.

Gills JJ, Zhang C, Abu-Asab MS, Castillo SS, Marceau C, LoPiccolo J, Kozikowski AP, Tsokos M, Goldkorn T, Dennis PA. Ceramide mediates nanovesicle shedding and cell death in response to phosphatidylinositol ether lipid analogs and perifosine. *Cell Death Dis*. 2012; 3:e340.

Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015; 16(6):2129-44.

Gonçalves LM. *Um modelo para detoxificação de organofosforados: efeito de micelas e vesículas na oximólise de p-nitrofenildifenilfosfato* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2006.

Goodson WH, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Manaf Ali A, Lopez de Cerain Salsamendi A, et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. *Carcinogenesis*, 2015; 36(1):254-96.

Gowda S, Desai PB, Hull VV, Math AA, Vernekar SN, Kulkarni SS. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med.* 2009; 3(17).

Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(12):a006080.

Grigorian A, O'brien CB. Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. *J Clin Transl Hepatol.* 2014; 2(2):95-102.

Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(5):G1337-46.

Guicciardi ME, Werneburg NW, Bronk SF, Franke A, Yagita H, Thomas G, Gores GJ. Cellular inhibitor of apoptosis (cIAP)-mediated ubiquitination of phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) negatively regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity. *PLoS One*, 2014; 9(3):e92124.

Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Castellano MM, del Pozo JC. G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol.* 2002;5(6):480-6.

Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2010; 10(8):561-74.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5):646-74.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100(1):57-70.

Hauser H, Water A. Comprehensive treatise. In: Franks F, editor. *Lipids*. New York: Plenum; 1975, p.209-303.

Hauser HRDD. Water/Phospholipid Interactions. In: Duckworth R, editor. *Water Relations of Food*. New York: Elsevier Science; 1975, p.37-71.

Hennessey BT, Lu Y, Poradosu E, Yu Q, Yu S, Hall H, Carey MS, Ravoori M, Gonzalez-Angulo AM, Birch R, Henderson IC, Kundra V, Mills GB. Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(24):7421-31.

Ho EA, Ramsay E, Ginja M, Anantha M, Bregman I, Sy J, Woo J, Osooly-Talesh M, Yapp DT, Bally MB. Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties. *J Pharm Sci.* 2010; 99(6):2839-53.

Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 2014; 6(3):1769-92.

Huang WC, Chen CL, Lin YS, Lin CF. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *J Lipids*, 2011; ID565316.

- Huang Y, Hemmer E, Rosei F, Vetrone F. Multifunctional Liposome Nanocarriers Combining Upconverting Nanoparticles and Anticancer Drugs. *J Phys Chem B*. 2016; 120(22): 4992-5001.
- Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*, 2010; 464(7291):993-8.
- Hwang SJ, Luo JC, Li CP, Chu CW, Wu JC, Lai CR, Chiang JH, Chau GY, Lui WY, Lee CC, Chang FY, Lee SD. Thrombocytosis: a paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(17):2472-7.
- Hyodo K, Yamamoto E, Suzuki T, Kikuchi H, Asano M, Ishihara H. Development of liposomal anticancer drugs. *Biol Pharm Bull*. 2013; 36(5):703-707.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro (RJ): Ministério da Saúde; 2016.
- Jain PP, Leber R, Nagaraj C, Leitinger G, Lehofer B, Olschewski H, Olschewski A, Prassl R, Marsh LM. Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *Int J Nanomedicine*, 2014; 9:3249-61.
- Jelkmann W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13(7):791-801.
- Jiménez-López JM, Carrasco MP, Marco C, Segovia JL. Hexadecylphosphocholine disrupts cholesterol homeostasis and induces the accumulation of free cholesterol in HepG2 tumour cells. *Biochem Pharmacol*, 2006; 71(8):1114-21.
- Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis*. 2010; 9:33.
- Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem*. 2016; 85:375-404.
- Johnson PJ. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 2005; 7(1):50-55.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26(4):239-57.
- Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 2002; 181-182: 471-4.
- Kim H, Kang M, Lee SA, Kwak TK, Jung O, Lee HJ, Kim SH, Lee JW. TM4SF5 accelerates G1/S phase progression via cytosolic p27Kip1 expression and RhoA activity. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 803(8):975-82.
- Kim JU, Shariff MI, Crossey MM, Gomez-Romero M, Holmes E, Cox IJ, Fye HK, Njie R, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers. *World J Hepatol*. 2016; 8(10):471-84.

Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol.* 2016; 37(7):8471-86.

Knudsen KB, Northeved H, Kumar PE, Permin A, Gjetting T, Andresen TL. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine*, 2015; 11(2): 467-77.

Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(11):1093-103.

Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. *Cell Onco.* 2012; 35(6):451-60.

Kuang J, Wang R. Mechanisms of G2 Phase Arrest in DNA Damage-Induced Checkpoint Response. In: Siddik AH. *Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy*. New York: Humana Press; 2009. p.37-52.

Kuczynski EA, Lee CR, Man S, Chen E, Kerbel RS. Effects of Sorafenib Dose on Acquired Reversible Resistance and Toxicity in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2015; 75(12):2510-9.

Kumar P, Gulbake A, Jain SK. Liposomes a vesicular nanocarrier: potential advancements in cancer chemotherapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012; 29(5):355-419.

Kunstfeld R, Wickenhauser G, Michaelis U, Teifel M, Umek W, Naujoks K, Wolff K, Petzelbauer P. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. *J Invest Dermatol.* 2003; 120(3):476-82.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*, 2011; 20(5):576-90.

Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(20):3145-67.

Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer*, 2007; 97(7):1005-8.

Le XF, Jr. Bast RC. p27Kip1 as a Biomarker and Target for Treatment of Cancer. In: Siddik AH. *Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy*. New York: Humana Press; 2009. p.215-233.

Lee BS, Kang SU, Hwang HS, Kim YS, Sung ES, Shin YS, Lim YC, Kim CH. An agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in head and neck cancer cells through mitochondrial ROS generation. *Cancer Lett.* 2012; 322(1):45-57.

- Lee CH. Reversing Agents for ATP-Binding Cassette Drug Transporters. *Methods Mol Biol.* 2009; 596:325-340.
- Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(10):a003236.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 2008; 27(48): 6194-206.
- Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C. The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2003; 278(30):27593-604.
- Llovet JM1, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008; 359(4):378-90.
- Lum G, Leal-Khoury S. Significance of low serum urea nitrogen concentrations. *Clin Chem.* 1989; 35(4):639-40.
- Luna AC, Saraiva GK, Filho OM, Chierice GO, Neto SC, Cuccovia IM, Maria DA. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. *Int J Nanomedicine*, 2016; 11:1577-91.
- Luna ACL, D'Agostino LG, Saraiva GKV, Claro Neto S, Cuccovia IM, Maria DA. Potential antitumoral of the novel DODAC/PHO-S liposome. In: Méndez-Vilas ADJ. *Microscopy: advances in scientific research and education*. Badajoz: Formatex Press; 2014. p.557-563.
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 2009; 136(5)823-37.
- MacLachlan I. Liposomal Formulations for Nucleic Acid Delivery. In: Crooke ST, editor. *Antisense drug technology principles strategies and applications*. London: Taylor and Francis Group; 2007, p.242-249.
- Majzoub RN, Ewert KK, Safinya CR. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016; 374(2072); 20150129.
- Manosroi A, Khositsuntiwong N, Komno C, Manosroi W, Werner RG, Manosroi J. Chemical stability and cytotoxicity of human insulin loaded in cationic DPPC/CTA/DDAB liposomes. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; 7(2):308-16.
- Marco C, Ríos-Marco P, Jiménez-López JM, Segovia JL, Carrasco MP. Antitumoral alkylphospholipids alter cell lipid metabolism. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014; 14(4):545-58.
- Masquelier M, Vitols S, Peterson C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo fate of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Research.* 1986; 46(8)3842-7.

- Mattheolabakis G, Rigas B, Constantinides PP. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine*, 2012; 7(10):1577-90.
- McMahon KM, Foit L, Angeloni NL, Giles FJ, Gordon LI, Thaxton CS. Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles as cancer therapy. *Cancer Treat Res*. 2015; 166:129-50.
- Moffitt KL, Martin SL, Walker B. From sentencing to execution-the processes of apoptosis. *J Pharm Pharmacol*. 2010; 62(5):547-62.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, 2010; 29(26):3748-57.
- Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface*, 2014; 11(101):20140459.
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 2008; 29(24-25):3477-96.
- Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*, 2011; 6(1):2285-95.
- Munder PG, Modolell M, Andreesen R, Weltzien HU, Westphal O. Lysophosphatidylcholine (Lysolecithin) and its Synthetic Analogues. Immunomodulating and Other Biologic Effects. In: Chedid L, Miescher PA, Mueller-Eberhard HJ, editores. *Immunostimulation*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 1980, p.177-193.
- Muñoz-Martínez F, Torres C, Castanys S, Gamarro F. The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1778(2):530-40.
- Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011; 11(8):558-72.
- Nagane M, Shimizu S, Mori E, Kataoka S, Shiokawa Y. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor 2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. *Neuro Oncol*. 2010; 12(7):687-700.
- Naina HV, Harris S. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366(19):1840.
- Nalesnik MA, Michalopoulos GK. Growth factor pathways in development and progression of hepatocellular carcinoma. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012; 4:1487-515.

- Nam DE, Kim OK, Park YK, Lee J. Synthetic High-Density Lipoprotein-Like Nanocarrier Improved Cellular Transport of Lysosomal Cholesterol in Human Sterol Carrier Protein-Deficient Fibroblasts. *J Med Food*, 2016; 19(1):62-7.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(3):220-8.
- Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(7):699-703.
- New RRC. Liposomes – A practical Approach, 1ed. New York: Oxford Univ. Press; 1990.
- Nian J, Sun X, Guo J, Yan C, Wang X, Yang G, Yang L, Yu M, Zhang G. Efficacy and safety of acupuncture for chemotherapy-induced leucopenia: protocol for a systematic review. *BMJ Open*, 2016; 6(5):e010787.
- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 2000; 407:810-816.
- Núñez KG, Gonzalez-Rosario J, Thevenot PT, Cohen AJ. Cyclin D1 in the Liver: Role of Noncanonical Signaling in Liver Steatosis and Hormone Regulation. *Ochsner J*. 2017 17(1):56-65.
- Ocker M, Höpfner M. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res*. 2012; 48(3):111-20.
- Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4(8):592-603.
- Okubo M, Shiota G, Kawasaki H. Thrombopoietin levels in serum and liver tissue in patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)*, 2000; 99(3):207-14.
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011; 351(1-2):41-58.
- Oliveira AC, Martens TF, Raemdonck K, Adati RD, Feitosa E, Botelho C, Gomes AC, Braeckmans K, Real Oliveira ME. Dioctadecyldimethylammonium:monoolein nanocarriers for efficient in vitro gene silencing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014; 6(9):6977-89.
- Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci*. 2011; 119(1):3-19.
- Outhouse EL. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. *Biochem J*. 1936; 30(2) 197-201.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012; 45(6):487-98.

- Pandey H, Rani R, Agarwal V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Braz Arch Biol Technol*. 2016; 59: e16150477.
- Patel JN, Mcleod HL, Innocenti, F. Implications of genome-wide association studies in cancer therapeutics. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76(3):370-80.
- Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*. 2015; 115(19):10938-66.
- Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol*. 2011; 3(4):279-96.
- Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 2011; 1813(1):238-59.
- Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2000; 2(4):291-9.
- Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, Lovaglio J, Fortman JD. Effects of weekly blood collection in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011; 50(5), 680-5.
- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290(5):852-8.
- Rhind N, Russell P. Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012; 4(10): a005942.
- Riaz M. Liposomes preparation methods. *Pak J Pharm Sci*. 1996; 9(1):65-77.
- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*, 313(22): 2263-73.
- Ríos-Marco P, Jiménez-López JM, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP. Antitumoral alkylphospholipids induce cholesterol efflux from the plasma membrane in HepG2 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011; 336(3):866-73.
- Ríos-Marco P, Marco C, Gálvez X, Jiménez-López JM, Carrasco MP. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*, 2017; S0005-2736(17):30070-6.
- Ríos-Marco P, Ríos A, Jiménez-López JM, Carrasco MP, Marco C. Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. *Biochem Pharmacol*, 2015; 96(1):10-9.
- Rosenthal E, Poizot-Martin I, Saint-Marc T, Spano JP, Cacoub P; DNX Study Group. Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma. *Am J Clin Oncol*. 2002; 25(1):57-9.
- Rueda Domínguez A, Olmos Hidalgo D, Viciana Garrido R, Torres Sánchez E. Liposomal cytarabine (DepoCyt) for the treatment of neoplastic meningitis. *Clin Transl Oncol*. 2005; 7(6):232-8.

- Rueff J, Rodrigues AS. Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint. *Methods Mol Biol.* 2016; 1395: 1-18.
- Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, Bazan V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol.* 2006; 17(7):115-23.
- Saffari M, H Shirazi F, Oghabian MA, Moghimi HR. Preparation and in-vitro Evaluation of an Antisense-containing Cationic Liposome against Non-small Cell Lung Cancer: a Comparative Preparation Study. *Iran J Pharm Res.* 2013; 12:3-10.
- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(10): 4873-8.
- Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer*, 2010; 10(1):59-64.
- Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6):2335-41.
- Sengupta S, Tyagi P, Velpandian T, Gupta YK, Gupta SK. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res.* 2000; 42(5):459-64.
- Shaaban S, Negm A, Ibrahim EE, Elrazak AA. Chemotherapeutic agents for the treatment of hepatocellular carcinoma: efficacy and mode of action. *Oncol Rev.* 2014; 8(1):246.
- Shim G, Kim M-G, Park JY, Oh Y-K. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian J Pharm Sci.* 2013; 8(2):72-80.
- Siddiqui A, Gupta V, Liu YY, Nazzal S. Doxorubicin and MBO-asGCS oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES). *Int J Pharm.* 2012; 431(1-2): 222-9.
- Silva SML. *Lipossomas ph-sensíveis contendo complexo de ciclodextrina catiônica/dna plasmidial: otimização do método de preparo, caracterização físico-química e estudo de transfecção* [tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- Slack A, Yeoman A, Wendon J. Renal dysfunction in chronic liver disease. *Crit Care.* 2010; 14(2):214.
- Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today*, 2012; 17(3-4):160-6.
- Soll C, Jang JH, Riener MO, Moritz W, Wild PJ, Graf R, Clavien PA. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*, 2010; 51(4): 1244-54.
- Sonnenschein C, Soto AM. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J Biosci.* 2013; 38(3):651-63.

Spinelli MO, Motta MC, Cruz RJ, Godoy CMSC. Reference intervals for hematological parameters of animals bred and kept at the vivarium of the Faculty of Medicine of the State University of São Paulo. *Acta Sci Anim Sci*. 2014; 36(1):1-4.

Sprong H, Van Der Sluijs P, Van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(7):504-13.

Stathopoulos GP, Boulikas T. Lipoplatin formulation review article. *J Drug Deliv*. 2012; ID581363.

Stefano JT, Pereira IV, Torres MM, Bida PM, Coelho AM, Xerfan MP, et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48(5):408-14.

Stock P, Monga D, Tan X, Micsenyi A, Loizos N, Monga SP. Platelet-derived growth factor receptor-alpha: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(7):1932-41.

Straub CS. Targeting IAPs as an approach to anti-cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11(3):291-316.

Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M. Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer*, 2004; 110(1):117-24.

Stylianopoulos T, Soteriou K, Fukumura D, Jain RK. Cationic nanoparticles have superior transvascular flux into solid tumors: insights from a mathematical model. *Ann Biomed Eng*. 2013; 41(1):68-77.

Sun Y, Peng ZL. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*. 2009; 85(1001):134-40.

Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65(2):157-70.

Taurin S, Nehoff H, Greish K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link?. *J Control Release*, 2012; 164(3):265-75.

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 2001; 20(15):1803-15.

Teixeira Mendes LS, Peters N, Attygalle AD, Wotherspoon A. Cyclin D1 overexpression in proliferation centres of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2017; jclinpath-2017-204364.

Thakur A, Joshi N, Shanmugam T, Banerjee R. Proapoptotic miltefosine nanovesicles show synergism with paclitaxel: Implications for glioblastoma multiforme therapy. *Cancer Lett*. 2013; 334(2):274-83.

Tokui T, Takatori T, Shinozaki N, Ishigami M, Shiraishi A, Ikeda T, Tsuruo T. Delivery and cytotoxicity of RS-1541 in St-4 human gastric cancer cells in vitro by the low-density-lipoprotein pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995; 36(1):1-6.

Tousignant JD, Gates AL, Ingram LA, Johnson CL, Nietupski JB, Cheng SH, Eastman SJ, Scheule RK. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther*. 2000; 8(11): 2493-513.

Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(19):1441-1454.

Trojan J, Zangos S, Schnitzbauer AA. Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. *Visc Med*. 2016; 32(2):116-20.

Tuzlak S, Kaufmann T, Villunger A. Interrogating the relevance of mitochondrial apoptosis for vertebrate development and postnatal tissue homeostasis. *Genes Dev*. 2016; 30(19):2133-2151.

Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*. 2002; 22(2):129-50.

Urbinati G, Marsaud V, Renoir JM. Anticancer drugs in liposomal nanodevices: a target delivery for a targeted therapy. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(15):1693-712.

Van Blitterswijk WJ, Klarenbeek JB, van der Luit AH, Alderliesten MC, van Lummel M, Verheij M. Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyllysophospholipid resistance: partial role of associated sphingomyelin deficiency. *Biochem J*. 2009; 425(1):225-34.

Van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(21):2061-74.

Van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1831(3):663-74.

Van Der Luit AH, Budde M, Verheij M, Van Blitterswijk WJ. Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem J*. 2003; 374(3):747-53.

Van der Luit AH, Vink SR, Klarenbeek JB, Perrissoud D, Solary E, Verheij M, van Blitterswijk WJ. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(8):2337-45.

Van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G, van Gaal EV. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(10):1284-98.

Versluis AJ, van Geel PJ, Oppelaar H, van Berkel TJ, Bijsterbosch MK. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br J Cancer*. 1996; 74(4):525-32.

Visconti R, Della Monica R, Grieco D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016; 35(1):153.

Vogler WR, Shoji M, Hayzer DJ, Xie YP, Renshaw M. The effect of edelfosine on CTP:cholinephosphate cytidyltransferase activity in leukemic cell lines. *Leuk Res*. 1996; 20(11-12):947-51.

Waller LP, Deshpande V, Pyrsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. *World J Hepatol*. 2015; 7(26):2648-63.

Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem*. 2007; 282(39):28960-70.

Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol*. 2012; 34(3):192-9.

Witkowska A, Jahn R. Rapid SNARE-mediated Fusion of Liposomes and Chromaffin Granules with Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys J*. 2017; S0006-3495(17):30299-0.

Wong R, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology*. 2014; 59(6):2188-95.

Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol*. 2008; 1(2):93-105.

Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics*. 2016; 6(9):1336-52.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. 2008; 13(2):153-66.

Yao Z, Duan S, Hou D, Heese K, Wu M. Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *Embo J*. 2007; 26(4):1068-80.

Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol*. 2013; 4:28.

Zhao W, Zhuang S, Qi XR. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:3087-98.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. *J Intern Med*. 2010; 268(5):395-409.

Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1551(2):1-37.