UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

**Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao
sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células GP7TB**

Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

**Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao
sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células GP7TB**

Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T231a	<p>Tavares, Paulo Eduardo Latorre Martins</p> <p>Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células GP7TB / Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares . - São Paulo, 2018. 71p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Moreno, Fernando Salvador</p> <p>1. Fígado : câncer 2. Quimioterapia I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.</p> <p>616.99436 CDD</p>
-------	--

Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares

Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células GP7TB.

**Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR**

**Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno
Presidente / Orientador**

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2018.

Resumo

TAVARES, P. E. L.M. **Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células GP7TB.** 2018. 79f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O câncer primário de fígado (CPF) apresenta mau prognóstico, o que torna importante sua quimioprevenção. Nesse sentido, a tributirina (TB), um pró-fármaco do ácido butírico (AB), presente em laticínios e no mel, mostrou-se um agente quimiopreventivo promissor da hepatocarcinogênese experimental. Os efeitos inibitórios da TB têm sido relacionados à inibição do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, bem como indução de apoptose e hiperacetilação de histonas. A quimioterapia é uma das abordagens mais comuns para o tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive o CPF. Neste caso, o tratamento com sorafenibe (SO) é capaz de prolongar a sobrevida média dos pacientes com a doença em fases avançadas em aproximadamente apenas três meses. Em vista disso, são necessários estudos da associação do sorafenibe com outros compostos que possam aumentar a eficácia do tratamento quimioterápico. Desta forma, a associação de fármacos anti-neoplásicos com compostos bioativos dos alimentos pode consistir em uma estratégia potencial para aumentar a eficácia contra o câncer. No presente estudo, foi avaliada a atividade anticarcinogênica da TB e do SO, isoladamente ou em associação, na etapa de progressão da hepatocarcinogênese. Para tanto, foram realizados implantes singênicos no flanco de ratos *Fischer-344* a partir de células da linhagem tumoral GP7TB. Quando as neoplasias atingiram 1 cm³, os animais foram aleatorizados em grupos experimentais: Grupo controle (CO), constituído por 10 ratos *Fischer 344* que receberam Maltodextrina (300mg/ 100 g. p. c.), controle isocalórico e solução de etanol à 12,5% e Cremofor à 12,5% em água estéril; Grupo Tributirina (TB), constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam TB (200mg/ 100 g. p. c.) e solução de etanol à 12,5% e Cremofor à 12,5% em água estéril; Grupo sorafenibe (SO) constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam Maltodextrina (300 mg/ 100 g. p. c.), controle isocalórico e tosilato de sorafenibe (3mg / 100 g. p. c.) em água estéril; Grupo associação da tributirina com o sorafenibe (AS) constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam TB (20 mg/ 100 g. p. c.) e tosilato de sorafenibe (3mg/ 100 g. p. c.); tratados por administração intragástrica (i.g) diariamente por 5 semanas consecutivas. As concentrações de AB e SO foram analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa e as neoplasias foram caracterizadas por imunoistoquímica. Em relação à evolução do tamanho das neoplasias o grupo AS apresentou menor ($p=0,009$) tamanho das mesmas em relação ao grupo CO. No entanto, estas diferenças não atingiram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos TB e CO, bem como entre os grupos SO e CO. Contudo, quando ajustados os valores do tamanho da neoplasia pela latência, observou-se alterações significativas ($p<0,05$) nos diversos grupos quando comparados ao grupo CO. O grupo SO aumentou a área necrótica das neoplasias, embora esta diferença não tenha atingido diferença significativa ($p>0,05$), enquanto que o grupo

TB reduziu essa área necrótica em relação ao grupo CO ($p=0,005$). O grupo TB e AS apresentaram significativamente maiores ($p<0,05$) concentrações hepáticas e neoplásicas de AB em relação ao grupo CO. O grupo SO e AS apresentaram significativamente maiores ($p<0,05$) concentrações neoplásicas de SO em relação ao grupo CO. Os grupos SO e AS reduziram a expressão de PTEN, quando comparados ao grupo CO, embora esta diferença não tenha atingido diferença significativa ($p>0,05$). O grupo TB por sua vez expressou maiores níveis de PTEN, embora esta diferença não tenha atingido significância estatística ($p>0,05$). Todos os grupos expressaram maiores níveis de caspase 3 clivada quando comparada ao grupo CO ($p>0,05$). OS grupos TB e SO reduziram a expressão de pERK $\frac{1}{2}$ quando comparados ao grupo CO. embora estas diferenças não tenham atingidos diferença estatística ($p>0,05$). O grupo AS apresentou maior expressão de pERK $\frac{1}{2}$ quando comparada ao grupo CO, embora esta diferença não tenha atingido diferença significativa ($p>0,05$). A caracterização das neoplasias do grupo CO foi padronizada por imunoistoquímica, apresentando-se positivas para CK 7, CK8, CK19 e Arginase e negativas para HepPar1 e CK18. Assim, os resultados sugerem que as neoplasias obtidas por implantes com células da linhagem GP7TB apresentam características de CPF oriundo de células tronco neoplásicas. Além disso, os grupos experimentais TB e AS apresentaram atividade anticarcinogênica promissora no modelo de implantes singênicos com células GP7TB, que eventualmente envolvem mecanismos de ação distintos da atividade quimioterápica apresentada pelo SO.

Palavras-chave: HCC, Xenoenxerto, GP7TB, Tributirina, Sorafenibe.

Abstract

TAVARES, P. E. L. M. **Evaluation of anticarcinogenic activity associated or not with sorafenib in Fischer-344 rats implanted with GP7TB cells.** 2018. 79f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Primary liver cancer (PLC) presents poor prognosis, which makes its chemoprevention important. In this sense, tributyrin (TB), a prodrug of butyric acid (AB), present in dairy products and honey, has been shown to be a promising chemopreventive agent for experimental hepatocarcinogenesis. The inhibitory effects of TB have been related to inhibition of the development of pre-neoplastic lesions, as well as induction of apoptosis and hyperacetylation of histones. Chemotherapy is one of the most common approaches for treating various types of cancer, including PLC. In this case, treatment with sorafenib (SO) is able to prolong the average survival of patients with the disease in advanced stages in approximately three months. In view of this, studies of the association of sorafenib with other compounds that may increase the efficacy of chemotherapeutic treatment are necessary. Thus, the association of anti-neoplastic drugs with bioactive compounds in food may be a potential strategy to increase efficacy against cancer. In the present study, the anticarcinogenic activity of TB and SO was evaluated, alone or in combination, in the progression stage of hepatocarcinogenesis. For this purpose, syngenic implants were performed on the flank of Fischer-344 mice from GP7TB tumor cells. When the neoplasms reached 1 cm³, the animals were randomized into experimental groups: Control group (CO), consisting of 10 Fischer 344 rats receiving Maltodextrin (300mg / 100 g.p.c), isocaloric control and 12.5% ethanol solution, and Cremofor to 12.5% in sterile water; Tributyrin group (TB), consisting of 9 Fischer 344 rats that received TB (200mg / 100 g.p.c) and 12.5% ethanol solution and Cremofor 12.5% in sterile water; Sorafenib group (SO) consisting of 9 Fischer 344 rats receiving maltodextrin (300 mg / 100 g, w / w), isocaloric control and sorafenib tosylate (3 mg / 100 g, w / w) in sterile water; The association group of tributyrin and sorafenib (AS) consisted of 9 Fischer 344 rats receiving TB (20 mg / 100 g p.o.) and sorafenib tosylate (3 mg / 100 g p.o.); treated intragastric (i.g) daily for 5 consecutive weeks. The concentrations of AB and SO were analyzed by gas chromatography associated with mass spectrometry and the neoplasms were characterized by immunohistochemistry. In relation to the evolution of the size of the neoplasias, the AS group presented smaller ($p = 0.009$) size of the same ones in relation to the CO group. However, these differences did not reach significant differences ($p > 0.05$) between the TB and CO groups, as well as between the SO and CO groups. However, when adjusted for size of the neoplasm by latency, significant changes ($p < 0.05$) were observed in the different groups when compared to the CO group. The SO group increased the necrotic area of the neoplasias, although this difference did not reach a significant difference ($p > 0.05$), while the TB group reduced this necrotic area in relation to the CO group ($p = 0.005$). The TB and AS groups presented significantly higher ($p < 0.05$) hepatic

and neoplastic AB concentrations than the CO group. The SO and AS groups presented significantly higher ($p < 0.05$) neoplastic concentrations of SO in relation to the CO group. The SO and AS groups reduced the PTEN expression when compared to the CO group, although this difference did not reach a significant difference ($p > 0.05$). The TB group in turn expressed higher levels of PTEN, although this difference did not increase statistical significance ($p > 0.05$). All groups expressed higher levels of caspase 3 cleaved when compared to the CO group ($p > 0.05$). The TB and SO groups reduced the expression of pERK $\frac{1}{2}$ when compared to the CO group, although these differences did not reach statistical difference ($p > 0.05$). The AS group presented higher pERK $\frac{1}{2}$ expression when compared to the CO group, although this difference did not reach a significant difference ($p > 0.05$). Characterization of the neoplasias of the CO group was standardized by immunohistochemistry, presenting positive for CK 7, CK8, CK19 and Arginase and negative for HepPar1 and CK18. Thus, the results suggest that the neoplasias obtained by implants with GP7TB cells present CPF characteristics originating from neoplastic stem cells. In addition, the experimental groups TB and AS presented promising anticarcinogenic activity in the model of syngeneic implants with GP7TB cells, which eventually involve mechanisms of action distinct from the chemotherapy activity presented by SO.

Key words: HCC, Xenograft, GP7TB, Tributirina, Sorafenib.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo apoio dado a cada passo da jornada. Aos meus pais Jairo e Leonor, obrigado por toda compreensão e por serem meu porto seguro, meus maiores exemplos de determinação, ambição e lealdade que me impulsionam sempre para frente.

Ao professor Fernando Salvador Moreno, meu orientador, por me receber e acolher em seu laboratório todos esses anos. Obrigado por compartilhar o seu conhecimento e experiências. Obrigado pela oportunidade de trabalhar com uma equipe de referência em ensino e pesquisa.

À doutoranda e grande amiga Laura Helena Fernandes Gasparini, por me entender verdadeiramente, compartilhar todo o nervosismo e sabedoria desde da graduação. Obrigada pelo apoio e estamos juntos.

Aos professores, Venâncio Avancini Ferreira Alves, Luís Fernando Barbisan e Bruno Cogliati pelo auxílio nas análises histológicas e marcações de imunoistoquímica.

Ao professor Dr. Willian B. Coleman da Universidade da Carolina do Norte, pela doação da linhagem GP7TB.

À pos-doutoranda Dra. Tereza, por ceder todo seu conhecimento e a sua atenção nas técnicas de cultivo celulares.

Ao professor Eduardo Purgatto pela ajuda nas análises de quantificação de ácido butírico e sorafenibe.

À professora Vladi Olga Consiglieri, pelo auxílio no preparo do Nexavar para uso neste estudo.

Ao técnico do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, Renato Heidor por toda a ajuda nos problemas técnicos e científicos.

Aos meus queridos colegas, amigos e membros do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, que direta ou indiretamente nesses longos anos, me auxiliaram nessa jornada, obrigado pela troca de experiências, pelas conversas intermináveis e pelo riso sempre presente. Em especial à Roberto, Juliana, Kelly, Mayara, Danieli, Ana e Ernesto, obrigado por toda a ajuda e pelas experiências trocadas de vocês.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários do Departamento de ciências dos alimentos pela atenção e dedicação ao aprendizado de seus alunos.

Aos meus queridos amigos Cléo, Edílson, Mônica, Roberta, Lurdes e Ivanir do Bloco 14, que jamais hesitaram em ajudar. Aos funcionários do biotério, pelos cuidados dispendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta fase.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio na forma de bolsa de doutorado e auxílio a pesquisa para o desenvolvimento deste projeto.

*“A vida só pode ser compreendida,
olhando-se para trás; mas só pode ser vivida,
olhando-se para frente”.*

(Soren Kierkegaard)

Sumário

1. Revisão da literatura	21
1.1 Epidemiologia	21
1.2 Origem celular do CPF	22
1.3 Panorama Clínico	25
1.4 Quimioterapia e quimioprevenção	25
2. Objetivo	32
3. Material e métodos	33
3.1 Cultura de células GP7TB	33
3.2 Ensaio biológico	33
3.2.1 Padronização dos implantes singênicos de células GP7TB em ratos <i>Fischer-344</i>	34
3.2.2 Tratamento das neoplasias de células GP7TB em ratos <i>Fischer-344</i>	34
3.2.3 Eutanásia	36
3.2.4 Variáveis do ensaio biológico consideradas nas análises estatísticas	36
3.3 Avaliação do crescimento das neoplasias de células GP7TB	36
3.4 Avaliação da massa da neoplasia	36
3.5 Avaliação semi-quantitativa da área necrótica	37
3.6 Avaliação quantitativa da área necrótica	37
3.7 Determinação da concentração tecidual de AB e SO	37
3.8 Imunoistoquímica para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1, Arginase e “Proliferating cell nuclear antigen” (PCNA)	38
3.9 Avaliação semi-quantitativa para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase ..	39
3.10 Avaliação e quantificação de CK19 e CK8	40
3.11 Avaliação e quantificação da proliferação celular	40
3.12 Extração de proteína total	41
3.13 Western blot para Caspase 3 clivada, PTEN e ERK fosforilado (pERK)	41
3.14 Análise estatística dos dados	42
4. Resultados	43
4.1 Avaliação do volume das neoplasias	43
4.2 Massa da neoplasia	44
4.3 Análise histológica – avaliação da área necrótica	45
4.4 Concentração tecidual de AB no fígado e na neoplasia	47

4.5 Avaliação da diferenciação celular por HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 dos animais do grupo CO	49
4.6 Marcação imunoistoquímica para CK19	51
4.7 Marcação imunoistoquímica para CK8	52
4.8 Análise da Proliferação Celular	53
4.9 Western Blot para Caspase 3 clivada.....	54
4.10 Western Blot para PTEN	55
4.11 Western Blot para pERK 1/2	56
5. Discussão	57
6. Conclusão	65
7. Referências	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição do carcinoma hepatocelular na América do Sul. (A) Número de casos de HCC por países, (B) distribuição do fator de risco para o HCC por país	22
Figura 2	Esquema representativo das origens das neoplasias hepáticas: o modelo estocástico e o hierárquico e seus eventuais biomarcadores	23
Figura 3	Estrutura do lóbulo do fígado e localização das CTHs nos canais de Hering	23
Figura 4	Estrutura molecular do Sorafenibe	26
Figura 5	Esquema representativo da ação do sorafenibe pela inibição da fosforilação de ERK na via MAPK; e a modulação da expressão de genes que promovem a proliferação	27
Figura 6	Representação do processo do AB como inibidor de desacetilases de histonas	29
Figura 7	Esquema da hidrólise de uma molécula de tributirina pela lipase para dar origem a três moléculas de ácido butírico	30
Figura 8	Imagem representativa do cultivo (A) e do ponto de confluência (B) de células da linhagem GP7TB em aumento microscópico de 100x.	33
Figura 9	Representação esquemática do ensaio biológico.	35
Figura 10	Sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890, utilizado para determinação da concentração tecidual de AB e SO.	38
Figura 11	Análise de Kaplan-Meier representando a fração de neoplasias com volume menor que 6-9 cm ³ nos animais implantados com células de linhagem GP7TB.	43
Figura 12	Imagens representativas das neoplasias de implantes com GP7TB nos animais dos grupos CO (A), TB (B), SO (C) e AS (D); (E) Efeito dos tratamentos na massa neoplásica em implantes com células GP7TB	45

Figura 13	Fotomicrografias representativas de (A) Aspecto morfológico geral dos implantes de células GP7TB; (B). Detalhes morfológicos mostrando características das células neoplásicas com aspecto fusiforme e com reação estromal; (C) Campo microscópico mostrando área necrótica.	46
Figura 14	Porcentagem de animais com área de necrose inferior a 15%, de 15% a 75% ou superior a 75%	46
Figura 15	Porcentagem de necrose em relação à área viva do corte histológico	47
Figura 16	Concentração de ácido butírico no fígado de animais dos grupos: CO, TB, SO e AS	48
Figura 17	Concentração de ácido butírico na neoplasia de animais dos grupos: CO, TB, SO, AS	48
Figura 18	Concentração de sorafenibe na neoplasia de animais dos grupos CO, TB, SO e AS	49
Figura 19	(A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos utilizados para análise de diferenciação celular contendo reação imunoistoquímica de: HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 nos animais do grupo CO. (B) Média dos escores obtidos das análises de diferenciação celular contendo reação imunoistoquímica de: HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 nos animais do grupo CO.	50
Figura 20	(A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para CK19. (B) Porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área total viva	51
Figura 21	(A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para CK8. (B) Porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área total viva	52

Figura 22	A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para PCNA. (B) Índice de proliferação celular	53
Figura 23	Níveis de Caspase 3 Clivada; (A) Imunoblots. (B) Quantificação de Caspase 3 Clivada	54
Figura 24	Níveis de PTEN; (A) Imunoblots. (B) Quantificação de PTEN	55
Figura 25	Níveis de pERK1/2; (A) Imunoblots. (B) Quantificação de pERK 1/2	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Representação esquemática dos grupos experimentais	35
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Representação dos escores em relação à porcentagem de células vivas	40
Tabela 2	Análise de regressão de Cox. Efeito do tratamento no volume das neoplasias e a latência até os implantes atingiram um volume de 6-9 cm ³ relativo ao p.c nos animais implantados com células GP7TB	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido butírico
AIC	Critério de informação de Akaike
ALDH1A	Aldeido desidrogenase 1A
ANCOVA	Análises de covariância
AS	Grupo Associação de Tributirina-Sorafenibe
BIC	Critério de informação de Bayes
CBAs	Compostos bioativos de alimentos
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CKs	Citoqueratinas
CO	Grupo controle
CPF	Câncer primário de fígado
CTH	Células tronco hepáticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMA	European Medicine Agency
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FLC	HCC fibrolamelar
GLM	Modelos lineares generalizados
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

H3K9	Histona H3 no resíduo de lisina 9
HAT	Enzimas acetilases
HBV	Hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCC-CCA	Colangiocarcinoma hepatocelular misto
HCV	Hepatite C
HDAC	Desacetilases de histonas
HDACi	Inibidor de desacetilases de histonas
iCCA	Colangiocarcinoma intra-hepático
Log Link	Ligação Logarítmica
MAPK	Cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEK	Extracellular signal-regulated kinase
OMS	Organização Mundial de Saúde
One-Way-ANOVA	Análise de Variância Unidimensional
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pERK	Extracellular signal-regulated kinase fosforilado
PTEN	Fosfatase homologa a tensina
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RFA	Radiofrequência ablativa
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo SDS
SHCC	HCC de tipo esquirroso
SO	Sorafenibe

TACE	Quimioembolização transarterial
TB	Tributirina
Thy-1	Thymus cell antigen - type 1
UNESP/Botucatu	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

1. Revisão da literatura

1.1 Epidemiologia

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (SIEGEL *et al.*, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer (INCA, 2014).

O câncer primário de fígado (CPF) é o quinto mais comum em homens, o nono mais comum em mulheres e a segunda causa geral de morte por câncer, representando 746 mil mortes em todo o mundo, com incidência que deverá aumentar nos próximos anos (FERLAY *et al.*, 2015; CIDON, 2017).

O CPF compreende um grupo heterogêneo de neoplasias malignas com diferentes características histológicas e um prognóstico desfavorável que apresenta variações como: carcinoma hepatocelular (HCC, sigla em inglês) e colangiocarcinoma intra-hepático (iCCA, sigla em inglês), colangiocarcinoma hepatocelular misto (HCC-CCA, sigla em inglês), HCC fibrolamelar (FLC, sigla em inglês) e hepatoblastoma pediátrico (WHO, 2010; TORRE *et al.*, 2012). Entre estes, HCC e iCCA são os CPF mais comuns; as outras neoplasias, incluindo os tumores mistos de HCC-CCA, representam menos de 1% dos casos (WILHELM *et al.*, 2004; TORRE *et al.*, 2012; JENS *et al.*, 2015). A incidência do CPF está aumentando globalmente e estima-se que possa haver 1 milhão de novos casos até 2030 (WHO, 2010). Nos Estados Unidos, nas ultimas duas décadas, o CPF tem representado uma das neoplasias com maior incidência e mortalidade (VENOOK *et al.*, 2010; TORRE *et al.*, 2012; LLOVET *et al.*, 2016).

A etiologia do HCC pode variar geograficamente, (KUMAR; ZHAO; WANG, 2011) (LLOVET *et al.*, 2003; MCGLYNN *et al.*, 2010); a hepatite B (HBV) e a exposição à aflatoxina é identificada como principal fator de risco na África Subsaariana, enquanto que a hepatite C (HCV) foi reconhecida como um importante fator de risco na América do Norte e no Japão (BLALOCK *et al.*, 2000; MCGLYNN *et al.*, 2010, DONG JANG *et al.*, 2015). Na América do Sul, os principais fatores de risco para o desenvolvimento do HCC estão relacionados com infecções causadas pelos HCV, mais frequente em homens mais velhos, e o HBV, mais frequente em pacientes com idade precoce (**Figura 1**). Além disso, a incidência e mortalidade do HCC esta aumentando na Europa Oriental e na Rússia

devido ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas (BLONSKI; KOTLYAR; FORDE, 2010; MARQUARDT *et al.*, 2012; CHAN *et al.*, 2014).

Figura 1: Distribuição do carcinoma hepatocelular na América do Sul. (A) Número de casos de HCC por países, (B) distribuição do fator de risco para o HCC por país (HBV, HCV, doença hepática não alcoólica (NAFLD), álcool, consumo atual de álcool). Adaptado de DEBES, *et al.*, 2017.

O desenvolvimento do HCC é complexo e consiste em alterações genéticas e epigenéticas (POGRIBNY e RUSYN, 2012). Este apresenta sobrevida média de apenas 6 meses após o diagnóstico, sendo que somente 5% dos pacientes sobrevivem por mais de 5 anos (BLONSKI *et al.*, 2010); assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de prevenção (BUENDIA & NEUVEUT, 2015).

1.2 Origem celular do CPF

Há duas hipóteses para explicar a origem do CPF: o modelo estocástico e o hierárquico (**Figura 2**). No modelo estocástico, uma população distinta de hepatócitos, que normalmente expressam Hepar 1, Arginase e HNF4, adquire mutações somáticas dando origem à neoplasia (FAUSTO; CAMPBELL, 2010; ZENDER *et al.* 2010; CHEN; CALVISI, 2014). No modelo hierárquico, por outro lado, as neoplasias primárias são originadas de um número pequeno de células tronco hepáticas (CTH) que adquire mutações e ficam conhecidas como células tronco neoplásicas ou “cancer stem cells” (CSC-sigla em inglês) (DURNEZ *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; JORDAN *et al.*, 2006; ODOUX *et al.*, 2008; ARAVALLI, *et al.*, 2010).

Figura 2: Esquema representativo das origens das neoplasias hepáticas: o modelo estocástico e o hierárquico e seus eventuais biomarcadores.

As CTHs estão localizadas nos terminais dos ramos do ducto biliar, conhecidos como canais de Hering e são caracterizadas como pluripotentes (**Figura 3**). Devido a sua capacidade de dar origem tanto às células epiteliais do ducto biliar quanto aos hepatócitos (OPIE, 1944; FARBER, 1956), foi proposto que as CTHs seriam responsáveis pela origem do HCC e iCCA.

Figura 3: Estrutura do lóbulo do fígado e localização das CTHs nos canais de Hering. Adaptado de SAI, *et al.*, 2017.

O grupo de CTHs pode atuar tanto no desenvolvimento quanto na progressão neoplásica (TARO; XIN WEI, 2013) já que a aquisição de um fenótipo desdiferenciado é essencial não apenas para a iniciação do tumor, mas também para o processo metastático e até para uma recidiva da neoplasia após a terapia (MAGEE *et al.*, 2012). Essas CTH são ativadas em resposta a agressões hepáticas (HSIA *et al.*, 1992; ROSKAMS, 2006; MEACHAM; MORRISON, 2013.).

Além disso, sugere-se que as CTH sejam resistentes a carcinógenos que, por sua vez, são citotóxicos para os hepatócitos diferenciados (MARQUARDT *et al.*, 2010; KAKARALA *et al.*, 2008; YONG *et al.*, 2013). Assim, quando expostos a esses carcinógenos ocorre uma resposta proliferativa das CTH, bem como das precursoras intermediárias dos hepatócitos maduros. O estado proliferativo crônico poderia favorecer a transformação destas células imaturas, que interromperiam seu processo de diferenciação em curso e se tornariam potencialmente neoplásicas, dando origem à neoplasia hepática (NAVES; MORENO, 2000; MARQUARDT; THORGEIRSSON, 2010).

A aplicação de uma variedade de protocolos experimentais de hepatocarcinogênese em roedores resultou na proliferação da progênie de células tronco hepáticas adultas, referidas também como células ovais, as quais expressam Thy-1 (*Thymus cell antigen, type 1*), Aldeído desidrogenase 1A (ALDH1A), OV-6 e, citoqueratinas (CKs – sigla do inglês) 7 e CK19, confirmando a origem hierárquica das neoplásias (CHEN-GUO KER *et al.*, 2011; SUKOWATI, *et al.*, 2013).

A falta de marcadores específicos para distinguir as origens das neoplasias é atualmente um grande problema para o tratamento adequado da neoplasia. Estudos mostraram que as CKs 8 e 18 são igualmente expressas pelos hepatócitos e células do ducto biliar, enquanto que as CKs 7 e 19 são consideradas marcadores de diferenciação colangiocítica (STRANG *et al.* 2008). No entanto, tem-se observado que alguns HCCs compostos por células progenitoras expressam CKs 7 e 19, bem como c-kit, um marcador de células tronco hepáticas (KIM *et al.*, 2004), exibindo assim um fenótipo de hepatocolangiocarcinoma.

A expressão anormal da CK19 no parênquima hepático é atribuída à remodelação de nódulos cirróticos e à proliferação de células hepáticas progenitoras (SU *et al.*, 2003), além de estar associada a um mau prognóstico do HCC (UENISHI *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2004; DURNEZ *et al.*, 2006). Andersen *et al.* (2010), também associaram a expressão de CK19 com malignidade e com a progressão tumoral de lesões pré-neoplásicas hepáticas em ratos. Assim, neoplasias compostas por hepatócitos menos diferenciados seriam

potencialmente mais agressivas (NAVES; MORENO, 2000; MARQUARDT; THORGEIRSSON, 2010).

1.3 Panorama Clínico

Na América do Sul a taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com HCC é particularmente reduzida devido ao diagnóstico tardio, à natureza quimiorresistente desses tumores aos tratamentos quimioterápicos e à presença de doença hepática subjacente. No Brasil, as estratégias mais utilizadas para tratamento do HCC diagnosticado ainda em estágio inicial são: a radiofrequência ablativa (RFA), o transplante de fígado e a ressecção da massa tumoral (THOMAS; ZHU, 2005; CRISSIEN; FRENETTE, 2014). Contudo, a taxa de reincidência de metástases ou de uma segunda neoplasia primária em até 5 anos é de 70% para esses pacientes (LLOVET *et al.*, 2016), que frequentemente atinge estágios mais agressivos do que a primeira neoplasia (LLOVET; BRUIX, 2008; BRUIX *et al.*, 2012).

Para pacientes em estágios intermediários a quimioembolização transarterial (TACE) é a melhor escolha. Já para estágios avançados tratamentos paliativos e tratamentos quimioterápicos são as únicas alternativas para prolongar a sobrevida desses pacientes, o último estágio do HCC é o terminal, quando deve ser dado apoio nutricional e psicológico para os pacientes e medicamentos para o controle da dor. Esses pacientes não são candidatos a nenhum ensaio clínico (LLOVET *et al.*, 2016).

1.4 Quimioterapia e quimioprevenção

A quimioterapia é uma das abordagens mais comuns para o tratamento do câncer (DIABY *et al.*, 2015). O principal mecanismo de agentes quimioterápicos é o de promover a morte da massa neoplásica através da apoptose de células tumorais (LIU *et al.*, 2006; Liver EAftSot, 2012; LIU *et al.*, 2013). No entanto, diversos tipos de neoplasias que acometem o fígado apresentam em geral uma reduzida eficácia a tratamentos quimioterápicos devido principalmente à toxicidade e a quimioresistência (LLOVET *et al.*, 2008).

O Sorafenibe (4 - [4 - [[4-cloro-3-(trifluorometil) fenil] carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida) (**Figura 4**) é um quimioterápico eficaz no tratamento de diversas neoplasias, aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EMEA

(*European Medicine Agency*) para o tratamento de pacientes com HCC avançado (BRENDDEL, 2011). No Brasil é comercializado com o nome de NEXAVAR.

Figura 4: Estrutura molecular do Sorafenibe. Adaptado de KEATING; SANTORO, 2009.

A dose de Sorafenibe (SO) recomendada é de 400 mg duas vezes ao dia, de preferência administrado em jejum ou com uma refeição com gordura moderada. As concentrações plasmáticas no estado estacionário são atingidas em cerca de 7 dias em pacientes com neoplasias sólidas avançadas. O SO tem uma meia-vida de eliminação de 25-48 horas. Após administração oral de solução de SO, 96% da dose são recuperadas em 14 dias, sendo que 77% são excretados nas fezes e 19% na urina como metabólitos glucuronidados. O SO inalterado pode ser encontrado nas fezes (51% da dose), mas não na urina (KEATING; SANTORO, 2009).

O mecanismo de ação do fármaco ocorre por meio da inibição de múltiplas quinases, que atuam principalmente na cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (MURRAY *et al.*, 2010; GAUTHIER; HO, 2013; LIU *et al.*, 2017).

A cascata MAPK envolve a via de proteínas RAS / RAF/ MEK / ERK; estas são frequentemente encontradas desreguladas e/ou ativadas em diversos tipos de cânceres humanos, inclusive no HCC (SCHMIDT *et al.*, 1997; AVILA, 2006; CALVISI, 2006; GAUTHIER; HO, 2013). Os mecanismos envolvidos nessa via molecular são diversos; dentre eles, angiogênese, proliferação e morte celular. O início da cascata ocorre com a ligação de fatores de crescimento, citocinas, e hormônios nos receptores de superfície da membrana citoplasmática celular. Em resposta a essa ligação, ocorre ativação de “rat sarcoma” (RAS) no interior das células (PEYSSONNAUX *et al.*, 2001) que, por sua vez, recruta e ativa uma família de dímeros citosólicos composto por serina / treonina quinases, denominadas "rapidly accelerated" fibrosarcoma (RAF), para a membrana citoplasmática (BLALOCK *et al.*, 2000; WEINSTEIN-OPPENHEIMER *et al.*, 2001; WILHELM *et al.*, 2004, SOKOLOSKY *et al.*, 2011; STEELMAN *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2011).

Com isso, quando ativada, RAF agrupa um complexo de sinalização de proteínas MAPK que consiste em duas classes de quinases: “extracellular signal-regulated kinase” (MEK) e "extracellular signal-regulated kinase" (ERK) (CHONG *et al.*, 2003). A cascata MAPK inicia quando RAF fosforila e, assim ativa, MEK, que por sua vez fosforila e ativa

ERK. A ERK se dissocia do complexo RAS / RAF / MEK / ERK e fosforila uma série de proteínas do citoesqueleto celular, quinases e fatores de transcrição, que promovem a expressão de oncogenes responsáveis, por exemplo por aumentar a proliferação celular (MARSHALL, 1994). Como a desregulação desta via é comumente observada em diversos tipos de neoplasias, a cascata MAPK mostra-se um alvo molecular promissor na terapia anticarcinogênica (REN H., *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* realizado com linhagens de HCC e câncer de pulmão demonstram que o Sorafenibe em concentrações de 3 a 10 mM é capaz de inibir a fosforilação de ERK (**Figura 5**) (LIU *et al*, 2006; Wang, 2015). Entretanto, o tratamento com Sorafenibe é capaz de prolongar em apenas três meses a sobrevida média dos pacientes com HCC avançado (LLOVET, RICCI, MAZZAFERRO *et al*, 2008; GAUTHIER; HO, 2012).

A escolha de compostos bioativos de alimentos (CBAs) na associação da quimioterapia tem demonstrado potencializar o efeito deste tratamento (SAK, 2012), reduzindo por exemplo também os efeitos citotóxicos do mesmo (GANSLSMAYER *et al*, 2004; MAI *et al*, 2007).

Figura 5: Esquema representativo da ação do sorafenibe pela inibição da fosforilação de ERK na via MAPK; e a modulação da expressão de genes que promovem a proliferação. (Adaptado de GAUTHIER; HO, 2012).

A vitamina K, um CBA presente em hortaliças verde escuro, ervas e óleos vegetais (PARK *et al.*, 2015), quando associada ao Sorafenibe, potencializou a eficácia do tratamento quimioterápico em comparação à administração dessas substâncias isoladamente (WEI, 2010). Essa associação apresentou efeito sinérgico na inibição do crescimento do HCC (ZHANG, 2012), bloqueando a ativação de ERK em ratos *Fischer-344* implantados com células JM-1 (ZHANG, 2012; WEI, 2010).

Outro CBA que demonstrou sinergismo quando associado ao SO foi a β -ionona, um isoprenóide presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e do ácido retinóico, que pode ser encontrada em uvas e aromatizantes de vinhos (STERMER; BIANCHINI; KORTH, 1994; SCOLASTICI *et al.*, 2014). No estudo de HUANG e colaboradores com células SK-Hep-1 de hepatoma humano, a associação da β -ionona com SO demonstrou efeito sinérgico na atividade anticarcinogênica dos compostos (HUANG *et al.*, 2012).

Embora estes estudos tenham demonstrado um efeito positivo da associação com o SO, mais investigações são necessárias para avaliar o aumento da eficácia do tratamento quimioterápico e a sobrevida do paciente (GAUTHIER; HO, 2012; JIAN-JUN *et al.* 2015).

Além de atuar potencializando a ação quimioterápica, os CBAs também estão envolvidos na quimioprevenção de neoplasias. Nos últimos 30 anos, o ácido butírico (AB), ácido graxo de cadeia curta produto da fermentação de fibras alimentares, vem sendo estudado como um agente no tratamento do câncer e de doenças hematológicas com base em resultados obtidos em culturas celulares (PRASAD, 1980; PAJAK, 2007). Responsável pelo fornecimento de 70 a 90% da energia consumida pelo colonócito (SCHEPPACH *et al.*, 1992), o AB também favorece a manutenção fisiológica do cólon (WATKINS *et al.*, 1999).

A atividade anticarcinogênica do AB foi observada *in vitro*, em linhagens celulares, como de câncer de mama (WALKER *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2009), estômago (LITVAK *et al.*, 2000), próstata (KUEFER *et al.*, 2004) e HCC (WATKINS *et al.*, 1999), por meio da redução da proliferação celular e aumento da apoptose (CANANI *et al.*, 2011). Além disso, o AB pode modular mecanismos epigenéticos como a acetilação de histonas (RIGGS *et al.*, 1977; BOFFA *et al.*, 1978).

Mecanismos epigenéticos podem também desempenhar papel importante no desenvolvimento do câncer (WORM; GULDBERG, 2002), como alterações estáveis e potencialmente herdáveis na expressão gênica que não afetam a sequência de nucleotídeos do DNA (JIANG *et al.*, 2004), tais como a metilação do DNA, “*imprinting*” genômico e modificações pós-traducionais em histonas (ESTELLER e ALMOUZNI, 2005). Histonas são proteínas básicas com um domínio globular e extremidades amino-terminais ricas em lisina, contendo a maior parte dos sítios que sofrem modificação pós-tradução (STRAHL; ALLIS, 2000; TURNER, 2005). Existem ao menos cinco tipos de modificações pós-traducionais frequentemente encontradas em histonas; estas incluem: acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e metilação (BHAUMIK, 2007). A acetilação de histonas neutraliza sua carga positiva e diminui a afinidade das histonas pela carga

negativa do DNA. Esse evento permite o desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina, favorecendo o acesso de fatores de transcrição (DRUESNE *et al.*, 2004). O processo de regulação do estado de acetilação se dá por meio de enzimas acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) desempenhando, respectivamente, ações promotoras e supressoras da expressão gênica (SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005).

O AB é um potente inibidor de desacetilases de histonas (HDACi) que promove a hiperacetilação de histonas, principalmente, da histona H3 no resíduo de lisina 9 (H3K9). Este mecanismo modula a transcrição de genes, como por exemplo, o aumento da expressão de genes supressores de tumor (**Figura 6**) (SHIN *et al.*, 2012).

Figura 6: Representação do processo do AB como inibidor de desacetilases de histonas. HAT: Acetil Transferase de Histonas, HDAC: Desacetilase de Histonas.

Nesse sentido, o AB aumenta a expressão de $p21^{cip/waf}$, um gene supressor de tumor que influencia diversos processos funcionais da célula, como a divisão, apoptose, reparo e diferenciação (DRUMMOND *et al.*, 2005). Assim, a modulação do estado epigenético de neoplasias mais agressivas é uma alternativa interessante para a sensibilização das células aos tratamentos quimioterápicos convencionais (KRIVTSOV; ARMSTRONG, 2012).

Contudo, a utilização do AB em estudos *in vivo* é limitada devido à sua meia-vida reduzida, de aproximadamente cinco minutos em roedores. Em seres humanos, a meia-vida do AB pode atingir 14 minutos quando ligado a proteínas plasmáticas, o que inviabiliza a administração de AB por via oral. No caso da via parenteral é necessário grande volume para se alcançar concentrações farmacológicas efetivas (DANIEL *et al.*, 1989).

Uma maneira de melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco é pelo uso de seu pró-fármaco. Pró-fármacos são moléculas que podem ser

clivadas e fornecer assim o fármaco para o organismo. Com isso, podem aumentar a estabilidade química e a solubilidade do fármaco (ALBERT, 1958).

A meia-vida plasmática do butirato pode ser consideravelmente aumentada se este é fornecido na forma de seu pró-fármaco, a tributirina (EGORIN *et al.* 1999). A tributirina (TB) é um triacilglicerol constituído por três moléculas de AB esterificadas com o glicerol; a hidrólise de um mol de TB pela lipase pancreática, pode gerar três moles de AB (**Figura 7**) (LAI *et al.*, 1997).

Figura 7: Esquema da hidrólise de uma molécula de tributirina pela lipase para dar origem a três moléculas de ácido butírico (Adaptado de HEIDOR *et al.*, 2012).

Em ratos, identificou-se que após administração oral, a meia-vida plasmática da TB corresponde a aproximadamente 40 minutos (ZHAO *et al.*, 2006). Além disso, a administração de TB por via oral a roedores resulta em concentrações plasmáticas detectáveis de AB logo após 5 min, atingindo seu valor máximo entre 15 e 60 minutos após o tratamento (EGORIN *et al.*, 1999) e pode ser mantida acima de 0,1 mM, por até 120 minutos (EGORIN *et al.*, 1999; MIYOSHI *et al.*, 2011). Camundongos apresentaram concentrações plasmáticas de AB entre 0,8 mM e 1 mM por até uma hora após a administração de TB na dose de 7,75g/Kg. Além disso, a TB não apresentou efeitos tóxicos nesses animais tratados por via oral ou intraperitoneal quando administrada na dose de 8,2 g/Kg (EGORIN *et al.*, 1999).

A ingestão da TB via oral consiste em uma vantagem, pois além de propriedades farmacocinéticas mais favoráveis, apresenta pequena toxicidade (EDELMAN *et al.*, 2003) e é melhor tolerada quando comparada ao AB (EGORIN *et al.* 1999). Desta forma, a TB tem se apresentado bastante promissora, e seu uso como aditivo em alimentos é aprovado em países como os Estados Unidos, Canadá e Brasil (CLARKE; FEINMAN; HARRISON 2001; HEIDOR *et al.*, 2012).

O tratamento com TB inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose em células de câncer de próstata (KUEFER *et al.*, 2004). A TB também induziu apoptose em linhagem de células de câncer gástrico (YAN; XU, 2003), câncer de mama (HEERDT *et al.*, 1999), câncer de cólon (CLARKE; FEINMAN; HARRISON, 2001) e de HCC (WATKINS *et al.*, 1999), sendo considerada um agente quimiopreventivo promissor (GASCHOTT *et al.*, 2001). Além disso, a atividade quimiopreventiva da TB foi observada na carcinogênese de cólon e fases iniciais da hepatocarcinogênese em animais (HEIDOR *et al.* 2014). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram *in vivo*, que a TB apresentou atividade quimiopreventiva quando administrada durante as fases de iniciação e promoção (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009; GUARIENTO *et al.*, 2014; HEIDOR *et al.*, 2016), bem como somente durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese (DE CONTI *et al.*, 2011). A indução da apoptose, diferenciação celular e a modulação de mecanismos epigenéticos são os principais mecanismos antineoplásicos encontrados da TB (HEIDOR *et al.*, 2012).

Os processos moleculares do HCC são bastante complexos e envolvem tanto vias desreguladas, como a via MAPK e a via PI3K/AKT/mTOR, quanto a expressão anormal de receptores de tirosina quinases e desacetilases de histonas (JIAN-JUN *et al.*, 2015). Assim, a associação de TB e SO parece ser promissora, uma vez que, a atividade de HDACi da TB poderia aumentar a eficácia da atividade quimioterápica do SO, e por se tratar de um agente quimiopreventivo, poderia, junto ao tratamento quimioterápico, prevenir uma possível reincidência da neoplasia. Nesse sentido, pretende-se avaliar a atividade anticarcinogênica da TB, associada ou não ao SO na etapa de progressão da hepatocarcinogênese em modelo de implante singênico com células de origem hierárquica da linhagem GP7TB. Assim, o uso de HDACis, como a TB, pode ser uma estratégia promissora quando administrado isoladamente ou combinado a outras terapias no tratamento do HCC (YOO e JONE, 2006).

2. Objetivo

Avaliar a atividade anticarcinogênica da TB, associada ou não ao SO em neoplasias de linhagem de células GP7TB implantadas de modo singênico no flanco de ratos *Fischer-344*

3. Material e métodos

3.1 Cultura de células GP7TB

Células GP7TB (**Figura 8 - A**) foram gentilmente doadas pelo Prof. Willian B. Coleman da Universidade da Carolina do Norte. Estas foram cultivadas em meio “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” [DMEM (Invitrogen, EUA)], suplementado com soro fetal bovino (Invitrogen, EUA) a 10% em ambiente controlado (CO₂ 5%, 37°C). As células foram tripsinizadas ao atingir confluência de 80 % (**Figura 8 – B**) e replicadas para novas garrafas ou congeladas em tubos criogênicos a uma concentração de 1×10^6 células / ml com 10% de DMSO e armazenadas em N₂ para uso futuro.

Figura 8: Imagem representativa do cultivo (**A**) e do ponto de confluência (**B**) de células da linhagem GP7TB em aumento microscópico de 100x.

3.2 Ensaio biológico

O experimento foi realizado nas dependências do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) / Instituto de Química da Universidade de São Paulo, após a devida aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FCF-USP (protocolo CEUA nº 420). Foram utilizados ratos *Fischer-344* machos provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade de Campinas.

3.2.1 Padronização dos implantes singênicos de células GP7TB em ratos *Fischer-344*

Para a padronização dos implantes foi realizado um experimento piloto no qual foram testadas as concentrações de 5×10^6 , 7×10^6 e 10×10^6 células GP7TB em meio de cultura DMEM, sem soro fetal, no flanco de ratos *Fischer-344* machos com oito semanas de idade. As neoplasias originadas de GP7TB eram palpáveis na segunda semana após o implante e mensuráveis na terceira semana. Finalmente, os implantes em meio DMEM nas concentrações de 7×10^6 foram escolhidos por apresentarem latência intermediária, sendo, portanto, mais adequados para o experimento.

3.2.2 Tratamento das neoplasias de células GP7TB em ratos *Fischer-344*

Foram implantadas 7×10^6 células GP7TB no flanco de 37 ratos *Fischer-344* machos com oito semanas de idade com média de peso de 150 g. Após os implantes, os animais foram monitorados até as neoplasias tornarem-se visíveis e mensuráveis. Os volumes das neoplasias foram mensurados duas vezes por semana com auxílio de paquímetro digital, utilizando-se a fórmula: (comprimento) x (largura)² x 0,4 (LACHENMAYER *et al.*, 2012).

Quando as neoplasias atingiram 1 cm³, os animais foram aleatorizados em 4 grupos experimentais: controle (CO) constituído por 10 ratos *Fischer 344* que receberam Maltodextrina (Sigma, EUA) (300mg / 100 g. p. c.) e solução de etanol à 12,5% e Cremofor à 12,5% em água estéril, tributirina (TB) (Sigma, EUA) constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam TB (200mg / 100 g. p. c.) e solução de etanol à 12,5% e Cremofor à 12,5% em água estéril, sorafenibe (SO) constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam Maltodextrina (300 mg / 100 g. p. c.) e tosilato de sorafenibe (Bayer, Alemanha) (3mg / 100 g. p. c.) em água estéril ou associação da tributirina (Sigma, EUA) com o sorafenibe (Bayer, Alemanha) (AS) constituído por 9 ratos *Fischer 344* que receberam TB (20 mg / 100 g. p. c.) e tosilato de sorafenibe (3mg / 100 g. p. c.); conforme descrito na **Quadro 1**. Os ratos foram tratados por gavagem diariamente por cinco semanas consecutivas (**Figura 9**).

Figura 9: Representação esquemática do ensaio biológico.

Quadro 1: Representação esquemática dos grupos experimentais.

Grupo Controle (CO)	Constituído por 10 ratos <i>Fischer-344</i> que receberam Maltodextrina (300 mg/ 100 g p.c. [KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009]) e solução de etanol à 12.5% e Cremofor à 12.5% em água estéril].
Grupo Tributirina (TB)	Constituído por 9 ratos <i>Fischer-344</i> que receberam TB (200 mg/ 100 g p.c.) e solução de etanol à 12.5% e Cremofor à 12.5% em água estéril].
Grupo Sorafenibe (SO)	Constituído por 9 ratos <i>Fischer-344</i> que receberam Maltodextrina (300 mg/ 100 g p.c.) e tosilato de sorafenibe [(3 mg/100 g p.c.) LACHENMAYER, 2012].
Grupo Associação (AS)	Constituído por 9 ratos <i>Fischer-344</i> que receberam TB (200 mg/ 100 g p.c.) e tosilato de sorafenibe (3 mg/100 g p.c.).

A maltodextrina, controle isocalórico da TB, e a TB foram administradas 2 h antes do tratamento com SO e seu respectivo controle (veículo + excipiente). Os animais permaneceram em jejum entre os tratamentos para evitar eventuais interferências na biodisponibilidade do quimioterápico.

3.2.3 Eutanásia

No final do período experimental de 35 dias, todos os animais foram eutanasiados. No momento da eutanásia, as neoplasias foram mensuradas e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) ou fixadas em formol tamponado para posterior realização de cortes histológicos.

3.2.4 Variáveis do ensaio biológico consideradas nas análises estatísticas

O experimento foi realizado em quatro lotes devido ao número reduzido de animais fornecidos. Assim, foram realizados cortes verticais no experimento e este foi realizado quatro vezes a fim de completar um número (n) adequado para o estudo, sendo esse critério considerado nas análises estatísticas. Assim, como o tempo de latência da neoplasia até atingir 1 cm³, idade dos animais, p.c., massa da neoplasia e lote do animal também foram considerados como variáveis nas análises estatísticas.

3.3 Avaliação do crescimento das neoplasias de células GP7TB

A evolução do volume das neoplasias foi avaliada pela análise de Kaplan-Meier (GraphPad Software Inc, EUA) quando os implantes alcançaram um volume menor que 6-9 cm³ relativo ao p.c. As curvas foram comparadas aos pares usando-se para tanto o teste não paramétrico Log-Rank. Para determinar a interferência de variáveis não controladas experimentalmente (tempo de latência da neoplasia, peso, idade e lote do animal) na evolução do volume das neoplasias, foram realizadas análises de regressão de Cox. Cada variável de interesse foi avaliada individualmente (análise univariada) para determinar o eventual efeito de cada uma delas na evolução global do volume das neoplasias. As análises estatísticas foram realizadas por profissional em análise de dados.

3.4 Avaliação da massa da neoplasia

As neoplasias foram coletadas no momento da eutanásia e pesadas em balança de precisão (Marte Científica - São Paulo, Brasil). As comparações entre as massas das neoplasias foram realizadas por análises de covariância (ANCOVA, Stata 13). A latência da neoplasia, o tempo de tratamento, p.c., a idade e o lote dos animais foram avaliados como eventuais fatores de interferência na massa da neoplasia.

3.5 Avaliação semi-quantitativa da área necrótica

A análise da área necrótica foi realizada em cortes de tecido neoplásico corados por hematoxilina e eosina (H&E), e avaliados pelo patologista Professor Dr. Luís Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP/Botucatu) que considerou de modo qualitativo o grau de necrose em: < 15%, 15% a 75% e > 75% de área ocupada na lâmina no corte. As categorias de necrose foram correlacionadas com a massa da neoplasia pelo teste não paramétrico de Spearman e de tendência (*trendtest*, Stata 13).

3.6 Avaliação quantitativa da área necrótica

A análise quantitativa da área necrótica foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision (Zeiss, Alemanha).

Foram mensuradas a área total e a área viva de cada corte histológico. Além disso, foi realizada uma relação de porcentagem entre os dados e estes foram expressos em forma de gráfico de porcentagem de área necrótica.

3.7 Determinação da concentração tecidual de AB e SO

Para a extração de AB foram utilizadas amostras de tecido hepático e neoplásico, enquanto que para extração de SO foram utilizadas apenas amostras de tecido neoplásico.

A extração do AB foi conduzida de acordo com estudo anterior (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009). Amostras de tecido hepático e neoplásico foram pulverizadas em gral de porcelana com N₂ líquido e homogeneizadas em *potter* com 10 mM PMSF (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 µL de ácido etilbútrico (Sigma-Aldrich, EUA) em acetonitrila. Já para a extração de SO as amostras de tecido neoplásico foram pulverizadas em gral de porcelana com N₂ líquido e homogeneizadas em *potter* com 10 mM PMSF (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 µL de Imantinibe (Sigma-Aldrich, EUA) em acetonitrila.

Os homogenatos, tanto para a extração de AB quanto para a extração de SO, foram centrifugados a 13.000 g a 4° C durante 15 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em *vials* a -20°C até o momento da injeção no cromatógrafo. Foram injetados 2 µL em sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890

(Agilent, EUA) (**Figura 10**) equipado com coluna CP Wax 58 – FFAP (Varian, 25 m x 0,32 mm x 0,2 µm). A injeção foi realizada em modo splitless a 200° C. O gás de arraste foi hélio no fluxo de 1 mL / minuto. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 3 minutos e elevada a 250°C na razão de 20°C / minuto. O efluente foi monitorado pelo detector seletivo de massas HP5973 (Agilent, EUA) com ionização de impacto de elétrons com uma fonte de íons a 70 V a 200°C.

Figura 10: Sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890 (Agilent, EUA), utilizado para determinação da concentração tecidual de AB e SO.

Os efeitos dos tratamentos na concentração de AB e SO foram avaliados por modelos lineares generalizados (GLM). Pela distribuição dos dados o modelo GLM foi ajustado com um termo de erro com distribuição gama (Família γ) e uma função de ligação Logarítmica (Log Link). O tempo de tratamento e a massa da neoplasia foram avaliados como covariáveis dentro dos modelos e o ajuste foi avaliado pelos parâmetros “Critério de informação de Akaike” (AIC) e “Critério de informação de Bayes” (BIC).

3.8 Imunoistoquímica para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1, Arginase e “Proliferating cell nuclear antigen” (PCNA)

Fragmentos representativos de fígados e neoplasias foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização e reidratação, foi realizada a recuperação antigênica em câmara pascal (CelerisRiptide, CA, USA) por três minutos com tampão citrato (ácido cítrico 0,1 M e citrato de sódio 0,1 M).

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato a 1% [PBS (NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 10mM; KCl 2,68mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4)]. Em seguida, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS 1% durante 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulhando as lâminas em solução de leite em pó desnatado a 3% (Molico®, Nestlé, Brasil) em PBS 1% durante 1 hora.

Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-CK7 (diluição 1:200; Cell Signaling, EUA), anti-CK8 (diluição 1:100; Cell Signaling, EUA), anti-CK18 (diluição 1:100; Cell Signaling, EUA), anti-CK19 (diluição 1:200; Cell Signaling, EUA), anti- HepPar-1 (diluição 1:50; Cell Signaling, EUA), anti- Arginase (diluição 1:1000; Cell Signaling, EUA), PCNA (diluição 1:100; Cell Signaling, EUA) em câmara úmida à 4°C durante 16 h e, posteriormente, incubadas com anticorpo secundário universal biotilado (anti-mouse/rabbit) (DAKO Dinamarca) por uma hora. Após a lavagem do anticorpo foi realizada a revelação pela diaminobenzidina (DAB) (Sigma – EUA) por 40 segundos e, contra-colaração com hematoxilina de Harris por 60 segundos. Para a montagem das lâminas utilizou-se *Faramount Aqueous* (DAKO, Dinamarca).

Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos dos cortes em PBS 1%. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por albumina sérica bovina em PBS 1%.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision (Zeiss, Alemanha). As análises foram realizadas de forma semi-quantitativa.

3.9 Avaliação semi-quantitativa para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase

A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision (Zeiss, Alemanha). Os dados morfométricos para a análise semi-quantitativa do grupo CO referente às proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase foram expressos na forma Escore de 0 a 5 de acordo com a **Tabela 1**. Já para a análise quantitativa, as proteínas CK8, CK19, Arginase e pERK foram expressas em porcentagem de área marcada por área viva do corte.

Tabela 1: Representação dos escores em relação à porcentagem de células viva

Escore	% de células positivas
0	0
1+	≤ 10
2+	11 a 30
3+	31 a 50
4+	51 a 70
5+	≥ 71

3.10 Avaliação e quantificação de CK19 e CK8

A expressão em nível protéico de células e áreas marcadas para CK 8 e CK 19 foi avaliada por meio de marcação imunoistoquímica em tecido neoplásico. A leitura para CK 8 foi realizada pela contagem de células marcadas percorrendo-se 5 campos por lâmina (cerca de 5000 células), e o resultado foi expresso em porcentagem. Já a leitura para CK 19 foi realizada medindo-se a área viva de pelo menos 10 campos de cada lâmina e em seguida foi feita a medição da área positiva para a proteína de interesse. Para ambas leituras, foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.11 Avaliação e quantificação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente corados) (FOLEY *et al.*, 1993). A leitura foi realizada percorrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 2000 células) e o resultado foi expresso em porcentagem (índice de proliferação celular). Para tanto, foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.12 Extração de proteína total

Para a obtenção de extratos protéticos de frações celulares, foi utilizado o kit de extração T-PER® (Pierce, EUA), segundo o manual de instruções do fabricante. Para tanto, foram pesados cerca de 50 mg de tecido neoplásico. Em seguida, foi realizada a lise celular e purificação do extrato para obtenção da fração proteica. Posteriormente, o extrato foi armazenamento a -80°C.

3.13 Western blot para Caspase 3 clivada, PTEN e ERK fosforilado (pERK)

As amostras de proteína total foram submetidas ao sistema de eletroforese vertical (BIO-RAD, EUA) em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose pelo sistema, Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD, EUA) e incubadas com os anticorpos anti-PTEN (diluição 1:1000; Cell Signaling, EUA), anti- pERK (diluição 1:1000; Cell Signaling, EUA), e anti Caspase 3 clivada (diluição 1:500; Cell Signaling, EUA).

Após a incubação das membranas com os anticorpos primários específicos, foi realizada a reação com os anticorpos secundários IgG (ECL, Amersham Biosciences, Suécia) e na sequência com o segundo anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:10.000), que consiste em controle constitutivo, seguindo-se novamente a incubação com o anticorpo secundário específico.

Entre todas as etapas foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada, com tampão fosfato. A detecção dos imunocomplexos ocorreu por quimioluminescência com o conjunto de reagentes específico (ECL - AmershamBiosciences, Suécia). A intensidade das bandas foi quantificada em um densitômetro (Modelo GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA).

As densitometrias das bandas nas membranas foram comparadas por modelos GLM. As comparações dos tratamentos foram feitas usando o grupo CO como referência. A latência, o tempo de tratamento, a massa da neoplasia, a massa corporal e o lote foram avaliados como eventuais covariáveis que poderiam ter modificado o efeito dos tratamentos.

3.14 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos, as comparações foram realizadas com o teste paramétrico de Análise de Variância Unidimensional (One-Way-ANOVA) seguida do teste de Tukey. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, adotou-se teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de 5%. O software utilizado foi o STATISTICA 8.0).

4. Resultados

4.1 Avaliação do volume das neoplasias

Foi observado que somente os animais do grupo AS apresentaram uma diminuição no volume das neoplasias até estas atingirem o volume de 6-9 cm³ relativo ao p.c. quando comparado aos animais do grupo CO (p=0.009). A diminuição do volume das neoplasias dos animais dos grupos TB ou SO não apresentaram diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) (**Figura 11**) em comparação ao grupo CO.

Figura 11: Análise de Kaplan-Meier representando a fração de neoplasias com volume menor que 6-9 cm³ nos animais implantados com células de linhagem GP7TB. (a) diferença entre os animais do grupo AS e os do grupo CO (p=0,009).

Para determinar a interferência de variáveis não controladas experimentalmente na evolução do volume das neoplasias foram realizadas análises de regressão de Cox para os animais implantados com as células GP7TB (**tabela 2**). Cada variável de interesse foi avaliada uma a uma (análise univariada) para determinar o potencial efeito de cada uma delas na evolução global do volume das neoplasias.

A latência das neoplasias mostrou efeito significativo na análise univariada nos animais implantados com células GP7TB, sendo que quanto maior o tempo de latência até atingir um cm³, menor é o crescimento do tumor por unidade de tempo (HR=0,70; p=0,014). Ajustando assim o efeito do tratamento no volume das neoplasias pela latência (análise multivariada) foram observadas alterações significativas no tratamento dos

animais implantados com células GP7TB (**tabela 2**). Os animais dos grupos TB, SO e AS apresentaram uma diminuição significativa ($p > 0,05$) no tempo de crescimento das neoplasias quando comparados aos animais do grupo CO.

As variáveis p.c., idade e lote dos animais não apresentaram efeito significativo no tempo de evolução das neoplasias quando analisadas nos modelos univariados de regressão de Cox ($p > 0,05$) adicionais para as variáveis (dados não apresentados).

Tabela 2: Análise de regressão de Cox. Efeito do tratamento no volume das neoplasias e a latência até os implantes atingiram um volume de 6-9 cm³ relativo ao p.c. nos animais implantados com células GP7TB.

	Univariada			Multivariada/Ajustada*		
	HR (95% IC)	Coeficiente de Regressão	Valor de p	HR (95% IC)	Coeficiente de Regressão	Valor de p
Tratamento						
Controle	-	-	-	-	-	-
Tributirina	0.50 (0.20-1.25)	-0.690	0.138	0.37 (0.14-0.95)	-0.9914	0.039
Sorafenibe	0.38 (0.14-0.97)	-0.978	0.043	0.28 (0.11-0.75)	-1.2667	0.011
Associação	0.28 (0.10-0.78)	-1.253	0.014	0.27 (0.097-0.73)	-1.3172	0.011
Latência	0.91 (0.86-0.97)	-0.088	0.002	0.91 (0.86-0.96)	-0.0951	0.001

4.2 Massa da neoplasia

Além do desenvolvimento, também foi avaliada a massa da neoplasia logo após a eutanásia como parâmetro da eficácia dos tratamentos. Os animais tratados com a TB apresentaram uma redução de 13,46% da massa da neoplasia em relação ao grupo CO. Embora sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os animais tratados com SO apresentaram uma redução de 38,46% ($p=0,026$) e os tratados com AS apresentaram uma redução de 55,76% ($p=0,01$) da massa da neoplasia em relação ao grupo CO (**Figura 12**).

As comparações foram feitas com análises de covariância (ANCOVA), avaliando como eventuais fatores de interferência a massa corporal dos animais. A massa corporal

dos animais não resultou em nenhuma interferência significativa no efeito dos tratamentos em relação à massa das neoplasias.

Figura 12: Imagens representativas das neoplasias de implantes com GP7TB nos animais dos grupos CO (A), TB (B), SO (C) e AS (D); (E) Efeito dos tratamentos na massa neoplásica em implantes com células GP7TB. O efeito dos tratamentos foi avaliado com análise de covariância e as comparações entre os grupos de tratamento foram feitas com o ajuste de Sidak para comparações múltiplas. Houve redução da massa tumoral das neoplasias dos animais tratados com SO ($p=0,026$) e com AS ($p=0,001$) quando comparadas às dos animais do grupo CO.

4.3 Análise histológica – avaliação da área necrótica

Os implantes de células neoplásicas hepáticas das linhagens GP7TB no flanco dos animais levaram ao desenvolvimento de massas neoplásicas de crescimento expansivo com invasão de tecidos adjacentes. Pode-se observar que as neoplasias apresentavam aspectos fusiformes e com deposição de matriz extracelular, sugerindo aspecto esquizoide, semelhantes à de HCCs esquizoideos em humanos (Figura 13-A e B). Mitoses e apoptoses estavam presentes em todas as amostras neoplásicas analisadas. Não foram observadas metástases em nenhum dos animais deste estudo. Na análise histológica das neoplasias foram observadas extensas áreas de necrose que variaram entre 10 a 85% da massa neoplásica. (Figura 13- C).

Figura 13: Fotomicrografias representativas de (A) Aspecto morfológico geral dos implantes de células GP7TB; (B). Detalhes morfológicos mostrando características das células neoplásicas com aspecto fusiforme e com reação estromal; (C) Campo microscópico mostrando área necrótica (campo superior direito). Foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

A análise semi-quantitativa da área necrótica demonstrou um aumento do percentual de necrose nos grupos SO e AS, porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (**Figura 14**) em relação ao grupo CO.

Figura 14: Porcentagem de animais com área de necrose inferior a 15%, de 15% a 75% ou superior a 75%.

Para revalidar os dados da análise semi-quantitativa, foi realizada uma análise quantitativa da porcentagem de necrose em relação à área viva, onde a TB apresentou uma redução de 36% ($p=0,005$) em relação ao grupo CO. O grupo SO apresentou uma redução de 16% e o grupo AS apresentou uma redução de 8% relação ao grupo CO; no entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (**Figura 15**) nestes últimos casos.

Figura 15: Porcentagem de necrose em relação à área viva do corte histológico. CO (n=10); TB (n=9); SO (n=9); AS (n=8). Diferença estatística segundo teste de ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.4 Concentração tecidual de AB no fígado e na neoplasia

A TB, pró-fármaco do AB, pode ser administrada por via oral e fornece concentrações significativas de AB no fígado, como demonstrado em estudos anteriores pelo nosso grupo em fases pré-neoplásicas (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009; de CONTI *et al.*, 2011; GUARIENTO *et al.*, 2014). Assim, avaliou-se no presente estudo a concentração de AB tanto no fígado (**Figura 16**) como na neoplasia (**Figura 17**).

No fígado e na neoplasia, animais dos grupos TB e AS (TB e AS) apresentaram concentrações maiores ($p \leq 0,05$) de AB quando comparados aos animais do grupo CO. No entanto, os animais do grupo SO também apresentaram um aumento ($p \leq 0,05$) nas concentrações hepáticas de AB. Assim, sugere-se que o AB presente nas amostras teciduais dos animais do grupo SO tenha sido proveniente, do mesmo modo que nas amostras dos animais do grupo CO, da fermentação de fibras alimentares e que o aumento de AB em relação aos animais do grupo CO se deva a uma eventual interferência do SO no metabolismo do AB.

Figura 16: Concentração de ácido butírico no fígado de animais dos grupos: CO, TB, SO e AS. Os dados foram analisados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da massa da neoplasia $\pm$ EPM (n=4). * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CO, segundo Test t de Student.

Figura 17: Concentração de ácido butírico na neoplasia de animais dos grupos: CO, TB, SO, AS. Os dados foram avaliados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da massa da neoplasia $\pm$ EPM (n=4). * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CO.

As diferenças observadas nas concentrações de AB, tanto no fígado quanto na neoplasia em cada tratamento, são independentes das variáveis do experimento, que foram: latência da neoplasia, do tempo de tratamento, da massa da neoplasia e do peso do animal (dados não apresentados).

A fim de avaliar se a concentração de AB poderia interferir nos dados da massa das neoplasias, os resultados obtidos da concentração de AB no fígado e na neoplasia foram incluídos na análise de COX como possíveis covariáveis. Uma vez usados como possíveis covariáveis na análise de COX, os dados da concentração de AB quando ajustadas como variáveis não demonstrou interferir no efeito dos tratamentos.

Também foram avaliadas as concentrações teciduais de SO na neoplasia. Como esperado, os grupos que não receberam SO (CO e TB) não apresentavam quantidades de SO detectáveis na neoplasia e os grupos tratados com SO (SO e AS) tiveram aumento ($p \leq 0,05$) das concentrações teciduais de SO na neoplasia em relação ao grupo CO (**Figura 18**).

Figura 18: Concentração de sorafenibe na neoplasia de animais dos grupos CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam a média de µg de SO / g de tecido neoplásico $\pm$ EPM. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo SO, segundo Test t de Student.

4.5 Avaliação da diferenciação celular por HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 dos animais do grupo CO

Com o propósito de melhor caracterizar as neoplasias oriundas de células GP7TB e relacionar os aspectos morfológicos das neoplasias com o processo de diferenciação celular, foi realizado um painel de proteínas pela análise imunoistoquímica semi-quantitativa para avaliação de: HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 nos animais do grupo CO (**Figura 19**). A padronização dos sistemas de imunodeteção no foram

realizadas no LIM-14, FMUSP, sob supervisão do Prof. Venâncio A. F. Alves. As análises qualitativas foram realizadas independentemente pelos professores Dr. Bruno Cogliati (FMVZ-USP) e Dr. Venâncio A. F. Alves, enquanto as semi-quantitativa foram efetuadas pelo professor Dr. Bruno Cogliati.

As amostras neoplásicas do grupo CO foram negativas para HepPar-1 e CK18 (escore 0/5). No entanto, foram positivas para Arginase (escore: 1,00/5), CK8 (escore: 1,90/5), CK 7 (escore: 0,20/5) e CK19 (escore: 0,90/5).

Figura 19: (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos utilizados para análise de diferenciação celular contendo reação imunoistoquímica de: HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 nos animais do grupo CO. Como controle da técnica foi realizada a marcação em cortes histológicos de fígado de ratos *Fischer-344*. Foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). (B) Média dos escores obtidos da análise de diferenciação celular contendo reação imunoistoquímica de: HepPar-1, Arginase, CK8, CK18, CK7 e CK19 nos animais do grupo CO.

4.6 Marcação imunoistoquímica para CK19

Foi realizada análise quantitativa de CK19 em todos os grupos experimentais. O grupo TB apresentou uma redução de 58,07% da porcentagem de área positiva para CK19 em relação ao grupo CO, embora sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Já o grupo SO apresentou uma redução de 86% ($p \leq 0,01$) e o grupo AS apresentou uma redução de 85,8% ($p \leq 0,01$) da porcentagem de área positiva para CK19 em relação ao grupo CO. (**Figura 20**). O peso do animal, latência e peso do tumor não interferiram nas análises. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 20: (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para CK19. (B) Porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área total viva. CO = Grupo Controle (n=6); TB = Grupo Tributirina (n=6). Embora sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$); SO = Grupo Sorafenibe (n=6) * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo CO; AS = Grupo Associação (n=6) * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo CO; Segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.7 Marcação imunoistoquímica para CK8

Foi realizada análise quantitativa de CK8 em todos os grupos experimentais. O grupo TB apresentou uma redução de 67,5% ($p < 0,01$), o grupo SO apresentou uma redução de 60,5% ($p \leq 0,05$) e o grupo AS apresentou uma redução de 63,7% ($p < 0,01$) da porcentagem de área positiva para CK8 em relação ao grupo CO. (**Figura 21**). O peso do animal, latência e peso da neoplasia não interferiram nas análises. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados estão de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 21: (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para CK8. (B) Porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área total viva. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6) * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo CO; SO = Grupo Sorafenibe (n=6) * Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo CO; AS = Grupo Associação (n=6) * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo CO, segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.8 Análise da Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente corados) (FOLEY *et al.*, 1993) em todos os grupos experimentais. O grupo TB apresentou uma redução de 41,2%, o grupo SO apresentou uma redução de 13,5% em relação ao grupo CO, embora estas diferenças não tenham atingido diferença estatística ($p > 0,05$). Já o grupo AS apresentou uma redução de 68,4% ($p \leq 0,05$) no índice de proliferação celular em relação ao grupo CO (**Figura 22**). O peso do animal, latência e peso do tumor não interferiram nas análises. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 22: (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos positivos para PCNA. (B) Índice de proliferação celular, CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6). Embora estas diferenças não tenham atingido diferença estatística ($p > 0,05$). AS = Grupo Associação (n=6). * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CO, segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.9 Western Blot para Caspase 3 clivada

As amostras foram submetidas à extração proteica e em seguida avaliadas pela técnica de Western blot para avaliação dos níveis proteicos de Caspase 3 clivada. O grupo TB apresentou um aumento de 30% ($p=0,025$), o grupo SO apresentou um aumento de 50% ($p < 0,001$) e o grupo AS apresentou um aumento de 40% ($p=0,001$) nos níveis proteicos de caspase 3 clivada em relação ao grupo CO (**Figura 23**). As diferenças não sofreram interferências do peso do animal, latência e peso do tumor. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados estão de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 23: Níveis de Caspase 3 Clivada; (A) Imunoblots. Os níveis de proteínas foram normalizados pela expressão da β -Actina. (B) Quantificação de Caspase 3 Clivada. (a) Diferença em relação ao grupo CO ($p=0,025$). (b) Diferença em relação ao grupo CO ($p<0,001$). (c) Diferença em relação ao grupo CO ($p=0,001$), segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.10 Western Blot para PTEN

As amostras foram submetidas à extração proteica e em seguida avaliadas pela técnica de Western blot para avaliação dos níveis proteicos de PTEN. O grupo TB apresentou um aumento de 20%, o grupo SO apresentou uma redução de 60% e o grupo AS apresentou uma redução de 50%, nos níveis proteicos de PTEN quando comparados ao grupo CO. Essas diferenças não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (**Figura 24**). O peso do animal, latência e peso do tumor não interferiram nas análises. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados estão de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 24: Níveis de PTEN; (A) Imunoblots. Os níveis de proteínas foram normalizados pela expressão da β -Actina. (B) Quantificação de PTEN. Embora estas diferenças não tenham atingido diferença estatística ($p > 0,05$), segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.11 Western Blot para pERK 1/2

As amostras foram submetidas à extração proteica e em seguida avaliadas pela técnica de Western blot para avaliação dos níveis de pERK1/2. O grupo TB reduziu os níveis de pERK1/2, o grupo SO apresentou uma redução de 30% e o grupo AS aumentou os níveis de pERK1/2 quando comparados ao grupo CO. Essas diferenças não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (**Figura 25**). O peso do animal, latência e peso do tumor não interferiram nas análises. Assim, não foram necessários ajustes. Todos os resultados estão de acordo com testes de regressões lineares.

Figura 25: Níveis de pERK1/2; **(A)** Imunoblots. Os níveis de proteínas foram normalizados pela expressão da β -Actina. **(B)** Quantificação de pERK 1/2. Estas diferenças não tenham atingido diferença estatística ($p > 0,05$), segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

5. Discussão

O CPF é a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo e, portanto, um grande desafio para a saúde pública. Este compreende HCC, iCCA e outras neoplasias raras, incluindo o carcinoma fibrolamelar, esquirroso e hepatoblastoma (LLOVET *et al.*, 2008). O HCC é o subtipo histológico mais comum de CPF, representando cerca de 80% dos casos de CPF (GUO *et al.*, 2014). A taxa de sobrevivência dos pacientes com HCC é particularmente baixo devido ao diagnóstico tardio, à natureza quimioresistente de tais neoplasias e à presença de doença hepática subjacente.

Estratégias de tratamento potencialmente curativas para o HCC, como ressecção tumoral, transplante de fígado ou ablação local percutânea, só são possíveis em estágio inicial (DURNEZ *et al.*, 2006; RYERSON *et al.*, 2016). Uma vez que a doença evoluiu, a quimioembolização transarterial (TACE) e a quimioterapia com SO são as únicas escolhas de estratégias.

Dois grandes estudos realizaram ensaios aleatorizados e duplamente cegos de fase III, demonstrando melhora na sobrevida e tempo de progressão para pacientes com HCC que foram tratados com SO em comparação com o grupo placebo (DONG *et al.*, 2015; WEINSTEIN-OPPENHEIMER *et al.*, 2001). Isso resultou na aprovação do medicamento para o tratamento de HCC. No entanto, o tratamento com SO só pode prolongar a sobrevida do paciente em até 3 meses de vida (LLOVET *et al.*, 2008; VENNOK *et al.*, 2010; GAUTHIER; HO, 2013), ou seja, não existe ainda uma terapia sistêmica efetiva para pacientes com essa doença em estágio avançado (ZANG, 2010).

Além disso, o tratamento com SO só é bem para pacientes com melhor função hepática (KÖHLER *et al.*, 2017), visto que o HCC é frequentemente acompanhado de uma disfunção hepática, o que dificulta a metabolização de fármacos e assim do quimioterápico também (CIDON, 2017).

Foram realizados estudos comparando a atividade quimioterápica do SO e outros fármacos (JOHNSON *et al.*, 2013; CAINAP *et al.*, 2015). O Brivanib apresentou atividade antineoplásica semelhante ao SO, porém este último mostrou menos efeitos colaterais, sendo melhor tolerado (JOHNSON *et al.*, 2013). Já o tratamento com Linifanib resultou em tempo de sobrevida similar ao SO, porém, o tratamento com SO mostrou-se mais seguro (CAINAP *et al.*, 2015). Além disso, foi realizado um estudo da associação do SO com outro quimioterápico, o Erlotinib. No entanto, observou-se que a associação destes fármacos não aumentou a sobrevida de pacientes com HCC. Assim, o SO continua a ser o

tratamento de primeira escolha para o HCC avançado (ZHU *et al.*, 2015). Dessa forma, são realizados cada vez mais estudos de associação do SO com outros compostos a fim de aumentar a eficácia quimioterápica (GAUTHIER; HO, 2013).

Neste estudo, avaliou-se a eficácia do tratamento com SO associado à TB, um pró-fármaco do AB com atividade quimiopreventiva comprovada (WATKINS *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 2001; KUEFER *et al.*, 2004; CANANI *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). Foi utilizado um modelo de xenoenxerto com células GP7TB em ratos *Fischer-344*. Essas células foram isoladas de CPF de ratos *Fischer-344*, constituindo assim um implante singênico.

Os resultados macroscópicos desse experimento comprovam que tanto o tratamento com SO e TB quanto com a AS foram capazes de retardar o crescimento da neoplasia e reduzir a massa neoplásica, apresentando efeito antineoplásico semelhante.

Estudos *in vivo* com camundongos avaliaram a eficácia antineoplásica do SO no tratamento de diferentes tipos de neoplasias. Em modelos de xenoenxerto, o tratamento com tosilato de SO inibiu o crescimento de melanomas originados de células UACC 903 e 1205 (SHARMA *et al.*, 2005), neoplasias de pulmão de células H460 e A549, neoplasias de mama originadas de células MDA-MB-231 em 42% (WILHELM, 2004), neoplasias renais originadas de células 786-O (CHANG, 2007) e células Renca e neoplasias de cólon originadas de células HCT-116 (WILHELM; CHIEN, 2002; WILHELM, 2004).

Em neoplasias de fígado, foi constatado que 10 mg / kg de tosilato de SO foram capazes de inibir em 49% o crescimento de neoplasias de células de HCC humano PLC/PRF/5 implantadas em camundongos. Na dosagem de 30 mg / kg, o tosilato de SO inibiu completamente o crescimento tumoral. Já na dosagem de 100 mg / kg, este fármaco além de inibir o crescimento tumoral, também induziu regressões tumorais parciais em 50% dos camundongos (LIU *et al.*, 2006).

Além disso, outro estudo demonstrou que o tratamento com SO inibiu o crescimento de neoplasias de HCC ortotópicas de células JM-1 em ratos *Fischer-344* (WEI *et al.*, 2010). Assim, os resultados de evolução e massa da neoplasia deste experimento estão de acordo com a literatura onde se conclui que tratamento com SO é eficaz na redução do crescimento da neoplasia, e a associação de TB e SO apresentou atividade anticarcinogênica semelhante ao SO.

Outro parâmetro estudado nesse trabalho foi a necrose da massa neoplásica. O papel da necrose como indicador da efetividade da quimioterapia não é bem estabelecido, uma vez que células que sofrem esse processo perdem a integridade da membrana celular,

de modo que os materiais intracelulares são liberados para o meio extracelular, resultando em respostas inflamatórias. Nesse sentido, a consequente inflamação local poderia promover o crescimento da neoplasia e assim piorar o prognóstico clínico (OUYANG *et al.*, 2012;)

Por outro lado, descreve-se que a morte celular por necrose também representa um mecanismo a ser explorado para eliminar células neoplásicas (OUYANG *et al.*, 2012). Desse modo, acredita-se que a utilização da necrose neoplásica como parâmetro de avaliação da eficácia quimioterápica com SO em HCC, demanda uma investigação mais aprofundada (SPIRA *et al.*, 2011).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que o tratamento com SO induz a necrose (WILHELM *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2007), no presente estudo, os tratamentos com SO e AS não interferiram significativamente com a porcentagem de área necrótica da neoplasia e curiosamente somente o tratamento com TB foi capaz de diminuir ($p=0,005$) o percentual de área necrótica da neoplasia em relação ao grupo CO, deixando o tecido mais íntegro e as células resistentes a esse fenômeno.

Também foram avaliadas as concentrações teciduais de TB e SO. Uma vez que a TB é um pró-fármaco do AB, foi avaliada a concentração tecidual de AB no fígado e na neoplasia proveniente do implante subcutâneo de células GP7TB em ratos *Fischer-344*.

De acordo com a definição de ADRIEN ALBERT (1958), pró-fármacos são moléculas que podem ser clivadas e fornecer o fármaco para o organismo. Além disso, podem melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como, aumentar a estabilidade química e a solubilidade do fármaco.

A TB pode ser administrada por via oral e fornece concentrações significativas de AB no fígado, como demonstrado em estudos anteriores pelo nosso grupo em fases pré-neoplásicas da hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009; de CONTI *et al.*, 2011; GUARIENTO *et al.*, 2014).

Os grupos TB, SO e AS apresentaram maior concentração tecidual de AB no fígado quando comparados ao grupo CO. Assim, de forma inesperada, sugere-se que o AB presente no grupo SO tenha sido proveniente, do mesmo modo que no grupo CO, da fermentação de fibras alimentares, e que, o aumento de AB em relação ao grupo CO seja devido a uma eventual interferência do SO na via do metabolismo e/ou absorção do AB.

Como esperado, os resultados da concentração tecidual de AB na neoplasia apresentam o mesmo padrão de fígado. Os grupos TB, SO e AS evidenciaram maiores concentrações teciduais de AB na neoplasia em relação do grupo controle isocalórico, CO.

Foi também avaliada nesse estudo a concentração tecidual de SO somente na neoplasia e, como esperado, os animais tratados com SO e AS apresentaram maiores concentrações teciduais de SO na neoplasia em relação aos animais CO.

A análise histológica revelou que todos os grupos apresentaram um tecido semelhante ao HCC esquirroso. De acordo com as classificações da OMS, o HCC com fibrose difusa é subclassificado como HCC de tipo esquirroso (SHCC) (HIROHASHI *et al.*, 2000). O desenvolvimento de fibrose difusa (alteração esquirrosa) no carcinoma HCC é um fenômeno bem conhecido em casos de tratamentos com terapias anticancerígenas, tais como a quimioterapia, irradiação e embolização arterial transcutânea.

Histologicamente, esse fenômeno é caracterizado por uma fibrose difusa ao longo dos espaços sinusoidais sanguíneos e com diferentes graus de atrofia das trabéculas tumorais. Macroscopicamente, o SHCC é de cor esbranquiçada, sólido, lobulado e não encapsulado, mas bem demarcado. Microscopicamente, as células neoplásicas no SHCC, apresentam citoplasma eosinófilo e núcleos com nucléolos proeminentes (JULIEN *et al.*, 2017).

Para compreender melhor as neoplasias de células GP7TB e relacionar os aspectos morfológicos das neoplasias com o processo de diferenciação celular, foi realizado um painel de proteínas pela análise imunoistoquímica com amostras dos animais do grupo CO. Os resultados demonstram expressão característica de neoplasias pouco diferenciadas, uma vez que não há a expressão de HepPar-1 e CK18 considerados marcadores de diferenciação celular hepática (SHIRAN, 2006; YAN, 2010). No entanto a expressão de Arginase foi positiva, mostrando que este tecido contém origens hepáticas. Além disso, observou-se que as neoplasias foram positivas para CK8, CK7 e CK19, combinação importante de marcadores presentes em células progenitoras hepáticas (FELDSTEIN; GORES, 2004).

Além da caracterização das neoplasias do grupo CO, foi realizada uma análise imunoistoquímica quantitativa para a proteína CK19. No presente estudo, os tratamentos com TB e SO, isolados ou em associação, foram capazes de reduzir os níveis de CK19.

A CK19 é uma proteína do citoesqueleto celular presente no processo de diferenciação em células hepáticas progenitoras e colangiócitos. Isso porque, quando a célula hepática progenitora se diferencia em hepatócito a expressão de CK19 é inibida e a célula começa a expressar outras proteínas como a HepPar-1, sendo esta considerada um marcador de diferenciação celular hepático. Assim, em um estudo realizado com fígados de cães demonstrou-se que 100% dos hepatócitos de um fígado normal se apresentaram

positivos para HepPar-1, enquanto que não houve a expressão de CK19 (VAN SPRUNDEL *et al.*, 2010).

Além disso, o mesmo estudo avaliou a expressão de HepPar-1 em neoplasias tanto positivas quanto negativas para CK19. As neoplasias CK19 negativas mostraram-se fortemente positivas para HepPar-1, enquanto que neoplasias com taxas superiores a 10% de marcação para CK19 tinham a expressão de HepPar-1 completamente silenciada (VAN SPRUNDEL *et al.*, 2010). Dessa forma, os dados de caracterização das neoplasias do grupo CO deste experimento estão de acordo com a literatura, onde as neoplasias apresentavam escore de 0,9 para CK19 e escore 0 para HepPar-1.

A reduzida taxa de diferenciação celular das neoplasias CK19 positivas tem importantes consequências clínico-patológicas, como maior taxa de metástases e pior prognóstico do HCC (KOWALIK *et al.*, 2015). Até mesmo quando as neoplasias CK19 positivas são diagnosticadas em fases iniciais, quando o paciente é candidato a tratamentos como a ressecção cirúrgica ou ablação por radiofrequência, a taxa de reincidência de uma segunda neoplasia primária é maior para esses indivíduos em comparação a pacientes com neoplasias CK19 negativas. Já para os pacientes que não se enquadram em tratamentos cirúrgicos, a presença de CK19 foi relacionada à menor sobrevida (VAN SPRUNDEL *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que a redução da expressão de CK19 em 5% já tem impacto no prognóstico do paciente (DURNEZ *et al.*, 2006). Além disso, células neoplásicas silenciadas para CK19 demonstraram significativa redução da invasão celular e as neoplasias apresentaram-se mais sensíveis à ação de fármacos antineoplásicos, como o SO (GOVAERE, 2014). Assim, o estudo de compostos que reduzem a expressão de CK19 e consequentemente induzem a diferenciação celular são de extrema importância para o prognóstico do paciente. No presente estudo, os tratamentos com TB, SO e AS reduziram a expressão de CK19 em relação ao grupo CO, no entanto sem diferenças estatisticamente significante. Sugere-se assim que os tratamentos são eventualmente capazes de reduzir a expressão de CK19 quando administrados isoladamente e em associação, melhorando assim o prognóstico da doença.

Também foi realizada a análise quantitativa da CK8 em todos os grupos experimentais. A CK8 é uma queratina que tem sua expressão alterada em vários tipos de câncer. (CHU; WEISS, 2002). Contudo, sua expressão varia de acordo com o tipo de neoplasia. Neoplasias humanas de mama e de cólon apresentam expressão de CK8 reduzida (KNOSEL *et al.*, 2006; WOELFLE *et al.*, 2004). No entanto, foi relatado um

aumento da expressão de CK8 em neoplasias de cabeça e pescoço (GIRES *et al.*, 2006), carcinomas da cavidade oral (FILLIES; WERKMEISTER; PACKEISEN, 2006) e carcinomas do trato urinário (SOUTHGATE; HARNDEN, 1999).

Nesse sentido, dados da literatura demonstraram que o aumento de CK8 foi associado a processos de progressão do câncer, como a migração celular (MAKINO *et al.*, 2009; FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2013), adesão celular (GALARNEAU *et al.*, 2007) e resistência à fármacos (FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2013; WANG *et al.*, 2008). Sendo, portanto, associada a um mau prognóstico (FILLIES; WERKMEISTER; PACKEISEN, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não estão bem estabelecidos.

No presente estudo, o grupo CO apresentou aumento nos níveis de área positiva para CK8 e os animais dos grupos TB, SO e AS foram capazes de reduzir os níveis de CK8. Esses dados sugerem que a marcação de CK8 fortemente marcada no grupo CO possa estar relacionada a um mau prognóstico do HCC, e os tratamentos com TB, SO e AS poderiam atenuar o prognóstico da doença.

Outro parâmetro importante a ser analisado é a proliferação celular. Foi demonstrado em um estudo *in vitro* que o AB é eficaz em reduzir a proliferação celular em linhagens de câncer cervical (GABRIELLI *et al.*, 2004). Além disso, em estudos *in vitro* a TB também se revelou um potente inibidor da proliferação celular, principalmente em linhagens de câncer de colo de útero, mama, leucemia (VECCHIA *et al.*, 1997), próstata (MAIER *et al.*, 2000), adenocarcinoma de cólon (NAKANO *et al.*, 1997; SCHRÖDER *et al.*, 2002), e de HCC (SAITO *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1998).

Em estudos *in vivo* observou-se que a TB também reduziu o índice de proliferação celular em LPN quando administrada nas etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009), bem como quando administrada somente na etapa de promoção (DE CONTI *et al.*, 2012; GUARIENTO, *et al.*, 2013; HEIDOR *et al.*, 2016; ORTEGA *et al.*, 2016).

Além da TB, o SO também apresenta efeito antiproliferativo já comprovado. Estudos *in vitro* demonstraram a eficácia do tratamento com SO em reduzir a proliferação celular em células neoplásicas ATC de tireoide (SALVATORE *et al.*, 2006), células 11 e RS4-11 de leucemia (AUCLAIR *et al.*, 2007), células neoplásicas MDA-MB-231 de mama (WILHELM *et al.*, 2006), células neoplásicas LNCaP, PC3 e LNCaP-IL6C de próstata (WILHELM *et al.*, 2012), células UACC 903, SK-MEL 2, SK-MEL 28 e A2058 de

melanoma (SHARMA *et al.*, 2005; WILHELM *et al.*, 2008) e células HepG2 e PLC/PRF/5 de HCC (WILHELM *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005).

Nesse experimento, embora sem diferença estatística, os grupos tratados com TB e SO foram capazes de reduzir o índice de proliferação celular em relação ao grupo CO. Já o grupo AS reduziu em 68,4% ($p < 0,05$) o índice de proliferação celular em relação ao grupo CO sugerindo assim um eventual efeito antiproliferativo *in vivo* destes compostos quando associados.

A proteína ERK integra uma cascata de proteínas que são ativadas por fosforilação mediada por quinases. Essa cascata de proteínas também é conhecida como via MAPK. O aumento dos níveis da fosforilação de ERK pode resultar em alterações na motilidade celular e alterações de expressão de genes que promovem a proliferação, sobrevivência, diferenciação celular, capacidade de imortalização e angiogênese (MERCER e PRITCHARD, 2003).

A ativação anormal da cascata RAS / RAF / MEK / ERK é comumente observada em vários tipos de neoplasias, inclusive no HCC (GAUTHIER; HO, 2013). Essa via está relacionada à inibição da apoptose, angiogênese, proliferação celular, carcinogênese (WILHELM *et al.*, 2004) e a resistência a quimioterapias (ZHANG *et al.*, 2009).

O SO tem ação na via MAPK, principalmente, inibindo RAF-1 (C-RAF) (WILHELM; CHIEN, 2002) e B-RAF (WILHELM *et al.*, 2004; GAUTHIER; HO, 2013). No presente estudo, tanto o grupo TB quanto o grupo SO apresentaram diminuição na fosforilação da proteína ERK. Já os animais tratados com AS apresentaram, os níveis de ERK fosforilados aumentados.

O HCC pode ser originado em decorrência de vários tipos de mutações. Portanto, são encontradas diferentes concentrações de pERK entre os diversos HCC. Nesse sentido, um estudo de fase clínica comparou a resposta do tratamento com SO em HCCs com elevada ou reduzida concentração de pERK. Foi demonstrado que, após o tratamento com SO, os pacientes com HCC e altas concentrações de pERK apresentaram maior tempo de sobrevivência em relação aos pacientes portadores de HCC com reduzidas concentrações de pERK.

Assim, sugere-se que a atividade anticarcinogênica observada pelo grupo AS possa ser devido a mecanismos distintos da atividade anticarcinogênica observada tanto nos animais tratados com TB como nos tratados com o SO e poderia sensibilizar a neoplasia à ação quimioterápica do SO.

Diversos compostos com atividade inibitória de HDAC mostraram-se eficientes na indução da apoptose em experimentos *in vitro* e *in vivo* (NAUGLER *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2011). A apoptose é um mecanismo importante na atividade anticarcinogênica da TB (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009; DE CONTI *et al.*, 2011) e pode ser induzida por estímulos externos, por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (via extrínseca ou via de receptor de morte celular), ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial). Ambas as vias ativam caspases (BERGANTINI *et al.*, 2005) e, especificamente, a clivagem de caspase 3 é considerada o ponto irreversível do fenômeno de morte celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com AB em células de câncer de cólon induziu apoptose via ativação de caspase 3 (MANDAL; ADAM; KUMAR 1999). Além disso, foi descrito que a ação pró-apoptótica da TB também ocorre pela ativação de caspase 3 em células neoplásicas de cólon (CLARKE; FEINMAN; HARRISON, 2001) e mama (HEERDT *et al.*, 1999). De forma semelhante, foi observado em estudos ainda não publicados pelo nosso grupo, que a TB induziu apoptose via ativação de caspase 3 em fases pré-neoplásicas de modelo de hepatocarcinogênese química em ratos *Wistar*. Assim sugere-se que no presente estudo a diminuição nas massas neoplasias de animais implantados com GP7TB e tratados com TB, SO e com AS esteja relacionada a mecanismos apoptóticos por meio da ativação de caspase 3 clivada.

6. Conclusão

Os implantes de células GP7TB no flanco de ratos *Fischer-344* originaram neoplasias com características que apresentam aspecto fusiforme e reação estromal, lembrando um CPF de origem hierárquica. Nesse mesmo sentido, as neoplasias apresentaram marcadores de células progenitoras hepáticas que caracterizam um mau pronóstico.

Os grupos TB, SO e AS apresentaram uma atividade anticarcinogênica por reduzir a proliferação celular e induzir apoptose nas neoplasias implantadas em ratos *Fisher 344*. Assim, os grupos TB, SO e AS foram capazes de retardar o desenvolvimento, reduzir a massa das neoplasias, induzirem diferenciação celular e reduzirem a proliferação celular, melhorando o prognóstico da doença.

Os grupos SO e AS apresentaram atividade quimioterápica semelhante. Entretanto o grupo AS apresentou mecanismo de ação diferente do grupo SO. Isso sugere a ocorrência após tratamento com a AS de mecanismos distintos dos tratamentos com SO, e eventualmente decorrentes de uma interação entre os dois compostos.

7. Referências

ALBERT, A. Chemical aspects of selective toxicity. **Nature**, v. 182, n. 4633, p. 421-2, 1958.

ANDERSON, J.; LOI, R.; PERRA, A. *et al.* Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. **Hepatology**, v.51, p.1401–1409, 2010.

ANDRADE, F. O. *et al.* Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 9, p. 841-850, 2012.

ARAVALLI, R. N.; STEER, C. J.; SAHIN, M. B.; CRESSMAN, E.N. Stem cell origins and animal models of hepatocellular carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, p. 1241-1250, 2010.

AVILA, M. A.; BERASAIN, C.; SANGRO, B.; PRIETO, J. New therapies for hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 25, p. 3866–3884, 2006.

BERGANTINI, A. P. *et al.* Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 120-125, 2005.

BHAUMIK, S. R.; SMITH, E.; SHILATIFARD, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, p.1008-1016, 2007.

BLALOCK W. L.; PEARCE M.; STEELMAN, L. S.; FRANKLIN, R. A.; MCCARTHY, S. A.; CHERWINSKI, H.; MCMAHON, M.; MCCUBREY, J. A. A conditionally-active form of MEK1 results in autocrine transformation of human and mouse hematopoietic cells. **Oncogene**. v. 19, p.526–536, 2000.

BLANCO-APARICIO, C.; RENNER, O.; LEAL, J.F.; CARNERO, A. PTEN, more than the AKT pathway. **Carcinogenesis**. v.28, p.379-86, 2007.

BLONSKI, W.; KOTLYAR, D. S.; FORDE, K. A. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 29, p. 3603-15, 2010.

BOFFA, L. C. *et al.* Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 10, p. 3364-6, 1978.

BRENDEL, E.; LUDWIG, M.; LATHIA, C.; ROBERT, C.; ROPERT, S.; SORIA, J. C.; ARMAND, J. P. Pharmacokinetic results of a phase I trial of sorafenib in combination with dacarbazine in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 53–61, 2011.

BUENDIA, M.; NEUVEUT, C. Hepatocellular Carcinoma. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.5, n.2, p 1-12, 2015.

BRUIX, J.; HAN, K. H.; GORES, G.; LLOVET, J. M; & MAZZAFERRO, V. Liver cancer: approaching a personalized care. **Journal of Hepatology**, v. 62, p.144–156, 2015.

CANANI, R. B. *et al.* Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519-28, 2011.

CALVISI, D. F.; LADU, S.; GORDEN, A.; FARINA, M.; CONNER, E. A.; LEE, J. S.; FACTOR, V. M.; THORGEIRSSON, S. S. Ubiquitous activation of Ras and Jak/stat pathways in human HCC. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1117–1128, 2006.

CARLO-STELLA, C.; LOCATELLI, S.L.; GIACOMINI, A.; CLERIS, L.; SABA, E.; RIGHI, M.; GUIDETTI, A.; GIANN, A.M. Sorafenib inhibits lymphoma xenografts by targeting MAPK/ERK and AKT pathways in tumor and vascular cells. **PloS One**, v. 8, 19;8. 2013.

CHAN AW, TONG JH, CHAN SL, LAI PB, TO KF. Expression of stemness markers (CD133 and EpCAM) in prognostication of hepatocellular carcinoma. **Histopathology**. v. 64, p. 935– 50, 2014.

CHEN, Y. L.; LV, J.; YE, X. L.; SUN, M. Y.; XU, Q.; LIU, C. H; MIN, L. H.; LI, H. P.; LIU, P.; DING, X. Sorafenib inhibits transforming growth factor b1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. **Hepatology**, v. 53, p. 1708–18, 2011.

CHEN, G. K.; KONG-KAI K.; WEN-TSAN C.; JONG-SHYONG C.; KING-TER L.; SHEAU-FANG Y.; CHUN, C. W.; CHEE-YIN C. Clinical significance of hepatic cancer stem cells. **Formosan Journal of Surgery**. v. 44, p. 205-210, 2011.

CHEN, X.; CALVISI, D. F. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. **American Journal of Pathology**, V.184, p. 912–923 2014.

CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K. L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cell Signal**, v. 15, p. 463-469, 2003.

CLARKE, K. O.; FEINMAN, R.; HARRISON, L. E. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. *Cancer Letters*, v. 28, p. 57-65, 2001.

DANIEL, P.; *et al.* Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clin CHIM Acta**, v. 181, n.3, p. 255-63, 1989.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.** v. 15, p. 2905-27, 1999.

DE CONTI, A.; KUROIWA, J.; HORST, M. A.; BASSOLI, B. K.; CHAGAS, C. E.; PURGATTO, E.; CAVALHER, F. P.; CAMARGO, A. A.; JORDAO, A. A. JR.; VANNUCCHI, H.; SCOLASTICI, C.; ONG, T. P.; MORENO, F. S. Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 860-866, 2011.

DE CONTI, A.; TRYNDYAK, V.; KOTURBASH, I.; HEIDOR, R.; KUROIWA-TRZMIELINA, J.; ONG, T. P.; BELAND, F. A.; MORENO, F.S.; POGRIBNY I.P. The chemopreventive activity of the butyric acid prodrug tributyrin in experimental rat hepatocarcinogenesis is associated with p53 acetylation and activation of the p53 apoptotic signaling pathway. **Carcinogenesis**, 2013.

DEBES, J. D; CHAN, A. J; BALDERRAMO, D; *et al.*, Hepatocellular carcinoma in South America: Evaluation of risk factors, demographics and therapy. **Liver International**. v.8, p-1-8, 2017.

DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, v. 18. p. 387-390, 2000.

DING S.J.; LI Y.; TAN Y.X. *et al.* From proteomic analysis to clinical significance – overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. **Mol. Cell. Proteomics**, v.3, p. 73-81, 2004.

DONG JANG, J.; GYEDU, A.; AFIHENE M.; DUDUYEMI B.; DEBES, J.; ROBERTS, L. Hepatocellular carcinoma occurs at an earlier age in Africans, particularly in association with chronic hepatitis B. **Am J Gastroenterol**. v.110, p. 1629-1631, 2015.

DRUMMOND, D. C. *et al.* Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 495-528, 2005.

DURNEZ, A.; VERSLYPE, C.; NEVENS, F. *et al.* The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. **Histopathology**, v. 49, p. 138–151, 2006.

EGORIN, M. J. *et al.* Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 445-53, 1999.

EDELMAN, M. J. *et al.* Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, n. 5, p. 439-44, 2003.

ESTELLER M.; ALMOUZNI G. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. **EMBO**, v.6, p. 624-628, 2005.

FARBER, E. Carcinoma of the liver in rats fed ethionine. **AMA Arch. Pathol.** v. 62, p. 445–453 1956.

FAUSTO, N; CAMPBELL, J. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin. Liver Dis.** v.30, p. 87–98, 2010.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT R. *et al.*, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**. 2015; 136: E359-E386.

GAUTHIER, A.; HO, M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. **Hepatology Research**. v. 43, n. 2, p. 147-54. 2013.

GANSLMAYER, M.; OCKER, M.; ZOPF, S.; LEITNER, S.; HAHN, E. G.; SCHUPPAN, D.; HEROLD, C. A quadruple therapy synergistically blocks proliferation and promotes apoptosis of hepatoma cells. **Oncology Report**, v.11 p. 943–950, 2004.

GASCHOTT, T.; STEINHILBER, D.; MILOVIC, V.; STEIN, J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1839-1843, 2001.

GUARIENTO, A. H. *et al.* Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 1, p. 7-18, 2014.

GUO, Z.; LI, L. Q.; JIANG, J. H.; OU, C.; ZENG, L. X.; XIANG, B. D. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**. v.20, p. 2098–106, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HE, B.; ZHANG, H.; SHI, T. A comprehensive analysis of the dynamic biological networks in HCV induced hepatocarcinogenesis. **PLoS One**, v. 6, e18516, 2011.

HEERDT, B. G.; HOUSTON, M. A.; ANTHONY, G. M.; AUGENLICHT, L. H. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. **Cancer Research**, v. 59, p. 1584–1591, 1999.

HEIDOR, R.; FURTADO, K. S.; ORTEGA, J. F. ; OLIVEIRA, T. F. ; TAVARES, P. E. L. M. ; VIEIRA, A. ; MIRANDA, M. L. P. ; PURGATTO, E. ; MORENO, Fernando Salvador . The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 129-135, 2014.

HIROHASHI S, ISHAK KG, KOJIRO M *et al.*, Hepatocellular carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System**. Lyon: IARC, p. 159–72. 2000.

HSIA C.; EVARTS R.; NAKATSUKASA H.; MARSDEN E.; THORGEIRSSON S. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B associated human hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v. 16, p.1327-1333, 1992.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, **Coordenação de Prevenção e Vigilância**, p. 124, 2014.

JENS U.; MARQUARDT, J. B.; ANDERSEN, S. S.; THORGEIRSSON, A. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver câncer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, p 653 -654, 2015.

JIANG, Y.H.; BRESSLER, J.; BEAUDET, A.L. Epigenetics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v. 5, p. 479-510, 2004.

JIAN-JUN, G; ZHEN-YAN, S; JU-FENG, X; YOSHINORI, I; WEI, T. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 42, p. 12059-12070, 2015.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M.; NOBLE, M. Cancer stem cells. **N Engl J Med**. v.12, p.1253–1261, 2006.

JULIEN, C.; GABRIELLE, C.; SANDRINE, I.; PAULETTE, B.; JEAN, C.; JESSICA, Z.; Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. **Journal of Hepatology**, v. 67, p.727–738, 2017.

HUANG, C. S.; LYU, S. C.; HU, M. L. Synergistic effects of the combination of β -ionone and sorafenib on metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells. **Investigational New Drugs**, v. 30 p. 1449–1459, 2012.

KAKARALA, M.; WICHA, M. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **J. Clin. Oncol**. v. 26, p. 2813–2820, 2008.

KIM, H.; PARK, C.; HAN, K; *et al.* Primary liver carcinoma of intermediate (hepatocyte-cholangiocyte) phenotype. **Journal of Hepatology**, v.40, p. 298–304, 2004.

KÖHLER, B. C.; WALDBURGER, N.; SCHLAMP, K.; JÄGER, D.; WEISS, K. H.; SCHULZE-BERGMANN, H.; SCHIRMACHER, P.; SPRINGFELD, C. Liver cancers with stem/progenitor-cell features – a rare chemotherapy-sensitive malignancy. **Oncotarget**. V.8; N.3; p. 5991-5998; 2017.

KRIVTSOV, A. V.; ARMSTRONG, S. A. Cancer. Can one cell influence cancer heterogeneity? **Science**, v. 338 p. 1035-1036, 2012.

KUEFER, R.; HOFER, M. D.; ALTUG, V.; ZORN, C.; GENZE, F.; KUNZI-RAPP, K.; HAUTMANN, R. E.; GSCHWEND, J. E. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 535-541, 2004.

KUMAR, M.; ZHAO, X.; WANG, X. W. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine? **Cell Bioscience**. Jan 24;1(1):5. doi: 10.1186/2045-3701-1-5. 2011.

KUROIWA-TRZMIELINA, J.; DE CONTI, A.; SCOLASTICI, C.; PEREIRA, D.; HORST, M.A.; PURGATTO, E.; ONG, T. P. MORENO, F. S. Chemoprevention of rat

hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin a butyric acid prodrug. **International Journal of Cancer**, v. 124, p. 2520-2527, 2009.

KUSHIDA, M.; KAMENDULIS, L.; PEAT, T.; KLAUNIG, J. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. **Toxicol. Pathology**. v.39, p.776–786, 2011.

LACHENMAYER, A.; TOFFANIN, S.; CABELLOS, L.; ALSINET, C.; HOSHIDA, Y.; VILLANUEVA, A.; MINGUEZ, B.; TSAI, H. W.; WARD, S. C.; THUNG, S.; FRIEDMAN, S. L.; LLOVET, J. M. Combination therapy for hepatocellular carcinoma: Additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 6, p.1343-50, 2012.

LAI, D. T.; MACKENZIE, A. D.; O'CONNOR, C. J.; TURNER, K. W. Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 2249-2257, 1997.

LEE, J.; HEO, J.; LIBBRECHT, L. *et al.* A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. **Nat. Med.** v. 12, p. 410–416, 2006.

LEE, J. O.; YANG, H.; GEORGESCU, M. M.; DI CRISTOFANO, A.; MAEHAMA, T.; SHI, Y.; DIXON, J. E.; PANDOLFI, P.; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell**, v.29, p.323-34, 1999.

LITVAK, D. A. *et al.* Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. **Anticancer Research**, v. 20, n. 2A, p. 779-84, 2000.

LIU, F.; LIU, D.; YANG, Y.; ZHAO, S. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. **Oncology Letters**. v. 4, p.1261-1265, 2013.

LIU, L.; CAO, Y.; CHEN C.; ZHANG, X.; MCNABOLA, A.; WILKIE, D.; WILHELM, S.; LYNCH, M.; CARTER, C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. **Cancer Research**. v. 66, p.11851-58, 2006.

LIU L, CAO Y, CHEN C, ZHANG X, MCNABOLA A, WILKIE D, *et al.* Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and Clin. **Cancer Res**, v.23(19), p. 5727, 2017.

LIVER EAFTSOT, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-

EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 56, p. 908–43, 2012.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; SANTORO, A.; RAOUL, J. L.; FORNER, A.; SCHWARTZ, M.; PORTA, C.; ZEUZEM, S.; BOLONDI, L.; GRETEN, T. F.; GALLE, P. R.; SEITZ, J. F.; BORBATH, I.; HÄUSSINGER, D.; GIANNARIS, T.; SHAN, M.; MOSCOVICI, M.; VOLIOTIS, D.; BRUIX, J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **The New England Journal of Medicine**. v.359, p. 378–90, 2008.

LLOVET, J. M; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**. 362:1907-1917. 2003.

LLOVET, J. M.; ZUCMAN-ROSSI, J.; PIKARSKY, E. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, 2:16018. 2016.

MAI, Z.; BLACKBURN, G. L.; ZHOU, J. R. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. **Carcinogenesis**, v. 28, p.1217–1223, 2007.

MANDAL, M.; ADAM, L.; KUMAR, R. Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, n.3, p.775-80, 1999.

MAGEE, J.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p.283–296, 2012.

MARSHALL, C. J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 82–89, 1994.

MARQUARDT, J. U.; THORGEIRSSON, S. S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: Evidence from genomic data. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 1, p. 26-34, 2010.

MARQUARDT, J. U.; GALLE, P.; TEUFEL, A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): an emerging field for advanced technologies. **Journal of Hepatology**, v. 56, p. 267–275, 2012.

MCGLYNN KA, PETRICK JL, LONDON WT. Global epidemiology of hepato- cellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. **Clin Liver Dis**. 19:223-238. 2015.

MEACHAM, C.; MORRISON, S. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, v.501 p.328–337, 2013.

MERCER, K.E.; Pritchard, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1653, p. 25-40, 2003.

MIYOSHI, M. et al. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. **Clin Nutr**, v.30, p. 252-58, 2011.

MURRAY, C. J.; VOS, T.; LOZANO, R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2197–2223, 2012.

NAUGLER, W.E.; SAKURAI, T.; KIM, S.; MAEDA, S.; KIM, K.; ELSHARKAWY, A.M.; KARIN, M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 121–124, 2007.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. DIFERENCIAÇÃO CELULAR: IMPORTÂNCIA NA HEPATOCARCINOGENÊSE E PAPEL MODULADOR DO β -CAROTENO. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-399, 2000.

ODOUX, C.; FOHRER, H.; HOPPO, T.; GUZIK, L.; STOLZ, D. B.; LEWIS, D. W.; GOLLIN, S. M.; GAMBLIN, T. C.; GELLER, D. A.; LAGASSE, E. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. **Cancer Research**, v.68, n.17, p. 6932-6941, 2008.

OPIE, E. L. The pathogenesis of tumors of the liver produced by butter yellow. **J. Exp. Med.** v. 80, p. 231–246, 1944.

OUYANG, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n.6, p.487-98, 2012.

PAJAK, B.; ORZECOWSKI, A.; GAJKOWSKA, B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. **Advances in Medical Sciences**, v. 52, p. 83-88, 2007.

PARK, J. N. *et al.* Association Between Usual Vitamin K Intake and Anticoagulation in Patients Under Warfarin Therapy. **Clinical Nutrition Research**, v. 4. n. 4, p. 235–241, 2015.

PEYSSONNAUX, C.; EYCHENE, A. The Raf/MEK/ERK pathway: New concepts of activation. **Biol Cell**, v. 93, p. 53-62, 2001

PRASAD, K. N. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. **Life Sciences**, v. 27, p. 1351-1358, 1980.

POGRIBNY, I.; P.; RUSYN, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**. Feb 2, 2012.

QUIVY.; VAN LINT, C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. **Biochem Pharmacol**. 15:1221-9, 2004.

REN, H.; GUO, H.; THAKUR, A.; ZHANG, S.; WANG, T.; LIANG, Y.; SHI, P.; GAO, L.; LIU, F.; FENG, J.; CHEN, T.; YANG, T.; SHANG, D. *et al.* Blockade efficacy of MEK/ERK-dependent autophagy enhances PI3K/Akt inhibitor NVP-BKM120's therapeutic effectiveness in lung cancer cells. **Oncotarget**. v.7, p. 67277–67287, 2016.

RIGGS, M. *et al.* n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. **Nature**, v. 268, n. 5619, p. 462-4, 1977.

ROSKAMS, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. **Oncogene**, v.25, n. 27, p. 3818–3822, 2006.

SCOLASTICI, C. *et al.* beta-ionone inhibits persistent preneoplastic lesions during the early promotion phase of rat hepatocarcinogenesis: TGF-alpha, NF-kappaB, and p53 as cellular targets. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 2, p. 234-41, 2014.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur Journal of Cancer**, v. 41, n. 16, p. 2381-402, 2005.

SAI, D.; VILLANUEVA, A.; FRIEDMAN, S. L.; LLOVET, J. M. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. **Gastroenterology**; v. 152, p. 745–761, 2017.

SCHEPPACH, W. *et al.* Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 43-8, 1992.

SCHMIDT, C. M. *et al.* Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 1, p. 54-8. 1997.

SHIN, S. Y. *et al.* 2'-Hydroxyflavanone induces apoptosis through Egr-1 involving expression of Bax, p21, and NAG-1 in colon cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 5, p. 761-74, 2012.

SHAH, S. A.; CLEARY, S. P.; WEI, A. C.; YANG, I.; TAYLOR, B. R.; HEMMING, A. W.; LANGER, B.; GRANT, D. R.; GREIG, P. D.; GALLINGER, S. Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: Risk factors, treatment, and outcomes. **Original communications**, v. 141, n. 3, p. 330-339, 2007.

SIMS, R.J.; REINBERG, D. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**, v. 9, p. 815-20, 2008.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012.

SILINS, I.; HÖGBERG, J.; STENIUS, U. Dietary sphingolipids suppress a subset of preneoplastic rat liver lesions exhibiting high PTEN, low phospho-Akt and high levels of ceramide species. **Food Chemical Toxicology**. V. 44, p. 1552-61, 2006.

SINGH, S. *et al.* Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 1, p. 45-54, Jan 2013.

SPIRA, D. *et al.* Comparison of different tumor response criteria in patients with hepatocellular carcinoma after systemictherapy with the multikinase inhibitor sorafenib. **Academic Radiology**, v.18. n.1, p.89-96. 2011.

SOKOLOSKY, M. L.; STADELMAN, K. M.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; MARTELLI, A. M.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; NICOLETTI, F.; DROBOT; L. B.; FRANKLIN, R. A.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. Involvement of Akt-1 and mTOR in sensitivity of breast cancer to targeted therapy. **Oncotarget**. v.2, p. 538–550, 2011.

STEELMAN, L. S.; NAVOLANIC, P.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; WONG, E. W. T.; MARTELLI, A. M.; COCCO, L.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; NICOLETTI, F.; DROBOT, L. B.; FRANKLIN, R. A.; MCCUBREY, J. A. Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic- and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells. **Cell Cycle**. v.10, p. 3003–3015, 2011.

STERMER, B. A.; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K. L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **Journal of Lipid Research**, v.35, p. 1133-1140, 1994.

STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v.403:41-45, 2000,

SU, Q.; FU, Y.; LIU, YF.; ZHANG, W.; LIU, J.; WANG, C. Laminin induces the expression of cytokeratin 19 in hepatocellular carcinoma cells growing in culture. **World Journal Gastroenterology**, v. 9, p. 921-929, 2003.

SUKOWATI, C. et al. The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. **PLoS One**. v.8, n.10, p. 1-11.

TARO, Y; XIN WEI, W. Cancer stem cells in the development of liver câncer. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 123, 1911-1918, 2013.

TAYLOR, J. R.; LEHMANN, B. D.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. Cooperative effects of Akt-1 and Raf-1 on the induction of cellular senescence in doxorubicin or tamoxifen treated breast cancer cells. **Oncotarget**. v.2, p. 610–626, 2011.

THOMAS, M. B.; ZHU, A. X. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. **J Clin Oncol**, v.23, p. 2892–9, 2005.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L, et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin**. 65:87–108 2015.

TURNER, B.M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. **Nat. Struct. Mol. Biol**, v. 12, p. 110-112, 2005.

UENISHI, T.; KUBO, S.; YAMAMOTO, T.; *et al.* Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. **Cancer Sci**. v. 94, p. 851–857, 2003.

WALKER, G. E. *et al.* Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3817-27, 2001.

WANG, X.; HUANG, H.; YOUNG, K. H. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. **Aging (Albany NY)**. v.7, p.1032–1049, 2015.

WATKINS, S. M.; CARTER, L. C.; MAK, J.; TSAU, J.; YAMAMOTO, S.; GERMAN, B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 559-567, 1999.

WEI, G.; WANG, M.; HYSLOP, T.; WANG, Z.; CARR, B. I. Vitamin K enhancement of Sorafenib-mediated HCC cell growth inhibition *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Cancer**, v. 127, p.2949-58, 2010.

WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C. R.; HENRÍQUEZ-ROLDÁN, C. F.; DAVIS, J.; NAVOLANIC, P. M.; SALEH, O. A.; STEELMAN, L. S.; FRANKLIN, R. A.; ROBINSON, P. J.; MCMAHON, M.; MCCUBREY, J. A. Role of the Raf signal transduction cascade in the *in vitro* resistance to the anticancer drug doxorubicin. **Clin Cancer Res.** v.7, p. 2892–2907, 2001.

WHO, World Health Organization. **Classification of tumours of the digestive system.** Lyon, France: IARC, 2010.

WILHELM, S. M. *et al.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 1, n.64, p. 7099-109, 2004.

WILHELM, S. M.; ADNANE, L.; NEWELL, P; VILLANUEVA, A; LLOVET, J. M.; LYNCH, M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. **Molecular Cancer Therapy**. v.7, n. 10, p.3129-40, 2008.

WILHELM, S. M.; CARTER, C. ; TANG, L.; WILKIE, D.; MCNABOLA, A.; RONG, H.; CHEN, C.; ZHANG, X.; VINCENT, P. ; MCHUGH, M.; CAO, Y.; SHUJATH, J.; GAWLAK, S.; EVELEIGH, D.; ROWLEY, B.; LIU, L.; ADNANE, L.; LYNCH, M.; AUCLAIR, D.; TAYLOR, I.; GEDRICH, R.; VOZNESENSKY, A.; RIEDL, B.; POST, L. E.; BOLLAG, G.; TRAIL, P. A. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. **Cancer Research**. v. 1, n.64, p. 7099-109. 2004.

WILSON, A. J.; HOLSON, E.; WAGNER, F.; ZHANG, Y. L.; FASS, D. M.; HAGGARTY, S. J.; BHASKARA, S.; HIEBERT, S. W.; SCHREIBER, S. L.; KHABELE, D. The DNA damage mark pH2AX differentiates the cytotoxic effects of small molecule HDAC inhibitors in ovarian cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 6, p. 484-493, 2011.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J. Oral Pathol. Med**, v.31: 443-449, 2002.

YAN, J.; XU, Y. H. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 660-664, 2003.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews, drug discovery**, v. 5, p. 37-50, 2006.

VENOOK, A. P.; PAPANDREOU, C.; FURUSE, J.; DE GUEVARA, L. L. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. **Oncologist**. v.15(Suppl 4) p.5-13, 2010.

ZENDER, L.; *et al.* Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 52, p. 921–929, 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, A.; ZHAO, Y.; ZHAO, J.; LIU, J.; GAO, J.; FANG, D.; RAO, Z. Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. **Clinics**, v. 67 n. 9, p.1093-9, 2012.

ZHAO, Y.; *et al.* Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression. Of p21 (Waf1/Cip1). **Mol Cell Bio**, v. 26, p.2782-90, 2006.