

**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 JM-1**

Laura Helena Gasparini Fernandes

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Tit. 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 JM-1**

Laura Helena Gasparini Fernandes

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Tit. 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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a 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

F363a Fernandes, Laura Helena Gasparini  
Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células JM-1 / Laura Helena Gasparini Fernandes. - São Paulo, 2018.  
79 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Química  
Fundamental.  
Orientador: Moreno, Fernando Salvador

1. fígado. 2. carcinoma hepatocelular. 3. quimioterapia. I. T. II.  
Moreno, Fernando Salvador, orientador.

Laura Helena Gasparini Fernandes

**Avaliação da atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não  
ao sorafenibe em ratos *Fischer-344* implantados com células JM-1**

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

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

---

**1º examinador**

---

**2º examinador**

---

**3º examinador**

---

**4º examinador**

**São Paulo, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018**

## Resumo

FERNANDES, L. H. G. **Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos *Fischer-344* implantados com células JM-1.** 2018. – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o sexto mais frequente e a segunda maior causa de mortalidade por câncer no mundo, além de apresentar alta taxa de recidiva. A associação de sorafenibe (SO) com agentes quimiopreventivos representa uma estratégia importante para aumentar a eficácia do tratamento e minimizar a reincidência da doença. Em estudos anteriores demonstrou-se o potencial quimiopreventivo da tributirina (TB), pró-fármaco do ácido butírico (AB), em modelo de hepatocarcinogênese experimental. A atividade da TB tem sido relacionada à inibição do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, bem como à indução de apoptose. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação anticarcinogênica da TB e do SO, isoladamente ou em associação no HCC. Nesse sentido, implantes singênicos foram realizados no flanco de ratos *Fischer-344* a partir de células da linhagem neoplásica JM-1. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo controle isocalórico [CO; Maltodextrina (300 mg/100 g p.c.) e solução veículo (solução de etanol a 12.5% e Cremofor a 12.5% em água estéril)]; Grupo TB (200 mg/100 g p.c. e solução veículo); Grupo SO [Maltodextrina (300 mg/100 g p.c. tosilato de SO (3 mg/100 g p.c.) em solução veículo] e Grupo associação [AS; TB (200 mg/100 g p.c.) e tosilato de SO (3 mg/100 g p.c.) em solução veículo]. Os implantes de células JM-1 originaram neoplasias com características pouco diferenciadas. Os tratamentos com SO e AS retardaram ( $p < 0,05$ ) o desenvolvimento das neoplasias, além de reduzirem ( $p < 0,05$ ) suas massa e aumentem ( $p < 0,05$ ) a sobrevida em relação ao grupo CO. Não houve diferença na porcentagem de área necrótica das neoplasias entre os tratamentos. Porém, foi observada uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) entre o tamanho da neoplasia e a área necrótica, sendo que quanto menor a área da neoplasia maior a extensão da necrose, independente do tratamento. Foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) das concentrações hepáticas de AB nos grupos TB, SO e AS. Já na neoplasia, apenas os grupos TB e SO demonstraram aumento ( $p < 0,05$ ) na concentração de AB. Além disso, os tratamentos com SO e AS aumentaram ( $p < 0,05$ ) a concentração tecidual de SO na neoplasia em relação ao CO. Nesse sentido, foi observado que grupo AS apresentou 5 vezes mais SO na neoplasia quando comparado ao grupo SO. Os tratamentos com TB e SO isoladamente ou em associação reduziram ( $p < 0,05$ ) a expressão de CK19 em relação ao grupo CO. Em relação à avaliação

da proliferação celular, os grupos TB, SO e AS apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) do índice de proliferação celular quando comparados ao grupo CO. Foi observado por meio da análise imunohistoquímica para pERK, que os animais tratados com SO e AS reduziram ( $p < 0,05$ ) as áreas positivas quando comparadas às dos animais do grupo CO. Além disso, também foi observada por meio de marcação imunohistoquímica uma redução ( $p < 0,05$ ) nas áreas positivas para CK8 nos grupos SO e AS quando comparadas às do grupo CO. Em relação à caspase-3 clivada, foi observado por imunohistoquímica que o tratamento com TB aumentou ( $p < 0,05$ ) o índice de células positivas para caspase-3 clivada quando comparado ao CO. Esse dado foi comprovado pela análise de western blot. Foi observado por meio da análise imunohistoquímica para H3K9, um aumento ( $p < 0,05$ ) da acetilação no grupo TB quando comparado ao grupo CO. Em relação à expressão em nível proteico de pAKT, foi observado por meio da análise imunohistoquímica uma redução ( $p < 0,05$ ) no grupo TB em comparação ao grupo CO. O presente estudo demonstrou que os implantes de células JM-1 no flanco de ratos *Fischer-344* originaram neoplasias com características que lembram a organização hepatocítica de um HCC convencional. O tratamento com TB foi capaz de reduzir a proliferação celular e induzir apoptose. Os tratamentos com SO e com a AS foram capazes de retardar o desenvolvimento, aumentar a sobrevida, reduzir a massa das neoplasias, induzirem diferenciação celular e reduzirem a proliferação celular, melhorando o prognóstico da doença. Os tratamentos com SO e AS apresentaram atividade quimioterápica semelhante. No entanto, a coadministração de SO e TB foi capaz de aumentar a biodisponibilidade do SO para a neoplasia.

**Palavras-chave:** HCC, JM-1, Tributirina, Sorafenibe

## Abstract

FERNANDES, L. H. G. **Anticarcinogenic activity of tributyrinn associated or not with sorafenib in *Fischer-344* rats implanted with JM-1 cells.** 2018. - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2018.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most frequent and the second largest cause of cancer mortality in the world, besides presenting a high rate of recurrence. The association of sorafenib (SO) with chemopreventive agents represents an important strategy to increase the efficacy of the treatment and to minimize recurrence of the disease. In previous studies the chemopreventive potential of tributyrin (TB), a butyric acid prodrug (AB), was demonstrated in a model of experimental hepatocarcinogenesis. TB activity has been linked to inhibition of the development of pre-neoplastic lesions as well as to the induction of apoptosis. Thus, the present study aimed to evaluate the anticarcinogenic action of TB and SO, either alone or in combination in HCC. In this sense, syngeneic implants were performed on the flank of *Fischer-344* rats from cells of the JM-1 neoplastic lineage. The animals were divided into the following groups: Control group [CO; Maltodextrin (300 mg / 100g p.c.) and carrier solution (12.5% ethanol solution and 12.5% Cremophor in sterile water)]; TB group (200 mg / 100 g p.c. and carrier solution); Group SO [Maltodextrin (300 mg / 100 g pc tosylate of SO (3 mg / 100 g pc) in vehicle solution] and Association group [AS; TB (200 mg / 100 g pc) and SO tosylate (3 mg / 100 (p <0.05), the development of the neoplasms, as well as the reduction (p <0.05), and the survival rate was higher (p <0.05) than the CO group. There was no difference in the percentage of necrotic area of the neoplasms between the treatments. (p <0.05) of the hepatic AB concentrations in the TB, SO and AS groups, although the size of the neoplasia and the necrotic area were higher. In the neoplasia, only the TB and SO groups showed an increase (p <0.05) in AB concentration. In addition, treatments with SO and AS increased (p <0.05) the tissue concentration of SO in the neoplasia in relation to CO. In this sense, it was observed that AS group presented 5 times more SO in the neoplasia when compared to the SO group. Treatments with TB and SO alone or in combination reduced (p <0.05) the expression of CK19 in relation to the CO group. In relation to the evaluation of cell proliferation, the TB, SO and AS groups presented a reduction (p <0.05) in the cell proliferation index when compared to the CO group. It was observed by the immunohistochemical analysis for

pERK that the animals treated with SO and AS reduced ( $p < 0.05$ ) the positive areas when compared to the animals of the CO group. In addition, a reduction ( $p < 0.05$ ) in the CK8 positive areas in the SO and AS groups when compared to the CO groups was also observed by immunohistochemical labeling. In relation to the cleaved caspase-3, it was observed by immunohistochemistry that the TB treatment increased ( $p < 0.05$ ) the index of caspase-3 positive cells cleaved when compared to CO. This was confirmed by western blot analysis. It was observed by immunohistochemical analysis for H3K9, an increase ( $p < 0.05$ ) in the acetylation of the TB group when compared to the CO group. Regarding the protein level expression of pAKT, a reduction ( $p < 0.05$ ) in the TB group was observed through the immunohistochemical analysis when compared to the CO group. The present study demonstrated that JM-1 cell implants in the flank of *Fischer-344* mice originated neoplasms with features reminiscent of the hepatocyte organization of a conventional HCC. TB treatment was able to reduce cell proliferation and induce apoptosis. SO and AS treatments were able to delay the development, increase survival, reduce the mass of neoplasms, induce cell differentiation and reduce cell proliferation, improving the prognosis of the disease. SO and AS treatments showed similar chemotherapy activity. However, co-administration of SO and TB was able to increase the bioavailability of SO to the neoplasia.

**Palavras-chave:** HCC, JM-1, Tributyrin, Sorafenib.

## **Agradecimentos**

A Deus por me guiar, me proteger, me dar forças para continuar a seguir em frente nos momentos difíceis e por me dar a maior benção que eu poderia receber, a minha família.

Aos meus pais, Priscila Gasparini Fernandes e Nelson de Jesus Fernandes, e meu irmão, César Gasparini Fernandes, por me ensinarem coisas que não aprendemos em universidades, o valor da família e do amor. Obrigada por serem o meu porto seguro, por me apoiarem em qualquer situação, por toda a paciência e compreensão, principalmente no período do doutorado. Em especial ao César, por me salvar em momentos que o computador não cooperava.

Aos meus avós Rosina Penha Lázaro Gasparini e Alexandre Gasparini Netto por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador Fernando Salvador Moreno, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa como aluna de iniciação científica e pela confiança de me aceitar como aluna de doutorado direto. Foram 8 anos que estive sob sua orientação e em todo esse período se manteve presente e acessível. Obrigada por compartilhar um pouco do seu conhecimento e paixão pela ciência. Por nos ensinar que na pesquisa mais choramos do que rimos, mas temos que aproveitar ao máximo todas as risadas.

Ao Ms. Roberto Carvalho Yamamoto, que participou de todas as fases desse trabalho. Obrigada pela ajuda na parte técnica e no desenvolvimento da parte teórica, pela paciência, compreensão e apoio que me deu nesse período.

Ao meu grande amigo e parceiro de bancada Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares, por compartilhar sonhos, angústias, medos e conquistas. Obrigada por todas as risadas, conselhos e broncas desses 10 anos de amizade e por deixar o ambiente a sua volta sempre mais leve e divertido.

A Danieli Alessandra Gatto, que foi uma aluna de iniciação científica exemplar e contribuiu muito com a parte técnica deste trabalho.

Ao Ernesto Vargas Mendez, que foi responsável pela parte estatística do trabalho. Obrigada pelo tempo e paciência que dedicou às análises e a me explicar, por diversas vezes, como os testes estatísticos funcionam.

À doutora Gabriela Resende Costa por toda a sua ajuda, tempo e paciência que dispôs para nos ensinar as técnicas de cultura de células

Ao professor G.K. Michalopoulos da Universidade de Pittsburg, por doar as células JM-1.

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

À Dra. Tereza, por compartilhar seu conhecimento e pela ajuda nas primeiras culturas celulares da linhagem JM-1 no Brasil.

Ao professor Eduardo Purgatto pela ajuda nas análises de quantificação tecidual 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 e amigos de laboratório que direta ou indiretamente nesses longos anos, me auxiliaram nessa jornada, obrigada pelas conversas, risadas e aprendizado. Em especial à Kelly, Juliana, Aline e Fábria.

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 despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta fase.

Às Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), na qual me formei como Biomédica, e à todos os professores da minha graduação que compartilharam um pouco do seu conhecimento, me dando condições de ingressar no doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio na forma de bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa para o desenvolvimento deste projeto.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

## Sumário

1. Introdução.....	23
1.1 Epidemiologia do carcinoma hepatocelular (HCC).....	23
1.2 Caracterização do HCC.....	23
1.3 Panorama Clínico.....	24
1.4 Sorafenibe .....	25
1.5 Compostos Bioativos dos Alimentos e SO .....	28
1.6 Ácido butírico .....	28
1.7 Tributirina .....	30
2. Objetivo .....	32
3. Material e métodos .....	33
3.1 Cultura de células JM-1 .....	33
3.2 Ensaio biológico .....	34
3.2.1 Padronização dos implantes singênicos de células JM-1 em ratos <i>Fischer-344</i> ....	34
3.2.2 Tratamento das neoplasias de células JM-1 em ratos <i>Fischer-344</i> .....	35
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 JM-1.....	36
3.4 Avaliação da massa da neoplasia.....	37
3.5 Avaliação semi-quantitativa da área necrótica da neoplasia.....	37
3.6 Avaliação quantitativa da área necrótica da neoplasia .....	37
3.7 Determinação da concentração tecidual de AB e SO .....	37
3.8 Imunoistoquímica para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar, Arginase, <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA), pERK, H3K9ac e Caspase 3.....	38
3.9 Avaliação semi-quantitativa para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar e Arginase .....	39
3.10 Avaliação e quantificação de CK19, Arginase, CK18 e pERK.....	40
3.11 Avaliação e quantificação da proliferação celular.....	40
3.12 Avaliação e quantificação de H3K9ac e Caspase 3 .....	40
3.13 Análise estatística da Imunoistoquímica.....	40
3.14 Extração de proteína total .....	41
3.15 Western blot para Caspase 3 clivada e <i>Protein kinase B</i> fosforilada (pAKT) Ser473 .....	41
4. Resultados.....	42

4.1 Avaliação do crescimento das neoplasias de células JM-1.....	42
4.2 Avaliação da porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação do estudo (28 dias) .....	43
4.3 Massa da neoplasia .....	44
4.4 Análise histológica – avaliação da área necrótica.....	45
4.5 Concentração tecidual de AB e SO.....	48
4.6 Avaliação semi-quantitativa de HepPar-1, Arginase, CK7, CK19, CK8 e CK18 dos animais do grupo CO .....	51
4.7 Marcação imunistoquímica para CK19 .....	52
4.8 Marcação imunistoquímica para Arginase.....	53
4.9 Marcação imunistoquímica para CK8 .....	54
4.10 Análise da Proliferação celular .....	54
4.12 Marcação imunistoquímica para Caspase 3 clivada .....	56
4.13 Western blot para Caspase 3 clivada .....	56
4.14 Western Blot para pAKT .....	58
5. Discussão .....	60
6. Conclusão .....	71
7. Referências .....	72

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Sistema de estratégia terapêutica do HCC. Segundo a classificação de Barcelona existem cinco estágios do HCC. Pacientes com tumores precoces assintomáticos (estágios 0-A) são candidatos a terapias radicais (ressecção, transplante ou ablação local). Os pacientes assintomáticos com HCC multinodular (estágio B) são tratados com quimioembolização transarterial (TACE), enquanto os pacientes com tumores sintomáticos avançados e/ou um padrão tumoral invasivo (estágio C) são candidatos para o tratamento com sorafenibe. A doença em estágio final (estágio D) inclui pacientes com mau prognóstico que devem receber o melhor atendimento de suporte possível. DDLT, transplante hepático de doador falecido; ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*; LDLT, transplante de fígado de doador vivo; M1, metástase M1; N1, linfonodo N1; OS, sobrevida global (adaptado de LLOVET *et al*, 2016). 24
- Figura 2** Estrutura molecular do Sorafenibe. Adaptado de KEATING e SANTORO, 2009. 25
- Figura 3** Mecanismos moleculares envolvidos na atividade quimioterápica do sorafenibe (SO). (A) Mecanismos de ação do SO em células neoplásicas epiteliais. SO inibe RAF-1 e B-RAF que consequentemente inibe MEK e ERK, inibindo a proliferação celular. Além disso, SO inibe eIF4E que consequentemente inibe Mcl-1 e ativa BAK, induzindo a apoptose. (B) Mecanismos de ação do SO em células endoteliais associadas a neoplasias. SO inibe os receptores endoteliais VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR-  $\beta$ , inibindo a angiogênese. BAK - *Bcl-2 homologous antagonist/killer*; EIF4E - *eukaryotic initiation factors*; ERK - *extracellular signal-regulated kinase*; Mcl-1- *induced myeloid leukemia cell differentiation*; MEK - *extracellular signal-regulated kinase kinase*; PDGFR-  $\beta$  - *platelet-derived growth factor receptor- $\beta$* ; RAF - *rapidly accelerated fibrosarcoma*; RAS - *rat sarcoma*; VEGFR - *vascular endothelial growth factor receptors* (adaptado de GAUTHIER e HO, 2013). 27
- Figura 4** Papel da acetilação de histonas na remodelação da cromatina e na transcrição gênica. A enzima HAT acetila as histonas ocasionando um afrouxamento da estrutura da cromatina, o que permite o acesso de fatores de transcrição, promovendo a transcrição gênica. Esse processo pode ser revertido pela ação da enzima HDAC, que retira o grupamento acetil das histonas e assim a cromatina volta ao estado condensado, inibindo a transcrição gênica. HDAC - *desacetilases de histonas*; HAT - *acetiltransferases de histonas* (adaptado de MARGOLIS, 2005). 29
- Figura 5** Estrutura molecular da Tributirina (Adaptado de HEIDOR *et al.*, 2012). 30

- Figura 6** A) Foram utilizados ratos *Fischer-344*. (B) Os animais foram submetidos à hepatectomia parcial a dois terços. (C) Após 24 h da hepatectomia, administrou-se dietilnitrosamina [DEN (70 mg / kg)] por via intraperitoneal. (D) Duas semanas após a administração de DEN, foi adicionado à água dos animais fenobarbital de sódio (0,1 g / 100 ml). (E) Dez a doze meses após o tratamento com DEN a maioria dos animais apresentava neoplasias. (F) As neoplasias hepáticas primárias foram retiradas (G) e transplantadas subcutaneamente nas regiões inguinais de receptores singênicos, removidas e reimplantadas três vezes da mesma maneira. (H) Na quarta passagem, as células foram isoladas (I) e injetadas diretamente no fígado dos animais (J) As neoplasias se desenvolveram no fígado, (K) estas foram coletadas e linhagens celulares foram isoladas, dentre elas, a linhagem JM-1. 33
- Figura 7** Imagem representativa da cultura de células da linhagem JM-1 em aumento de 100x. 34
- Figura 8** Curvas de Kaplan-Meier representando a fração de neoplasias com volume menor do que 5-7% relativo ao p.c. nos animais implantados com células JM-1 dos grupos Controle (n=12), Tributirina (n=9), Sorafenibe (n=10) e Associação (n=12). (\*) diferença em relação ao grupo CO (p<0,05) segundo teste de *Log Rank*. 42
- Figura 9** Porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação do estudo (28 dias). CO = Grupo Controle (n=12), TB = Grupo Tributirina (n=9), SO = Grupo Sorafenibe (n=10), AS = Grupo Associação (n=12). \*Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) quando comparado com o grupo CO segundo teste Qui-quadrado. 44
- Figura 10** Imagens representativas das neoplasias de implantes com células JM-1 nos grupos (A) CO = Grupo Controle (n = 12), (B) TB = Grupo Tributirina (n = 9), (C) SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), (D) AS = Grupo Associação (n = 10); (E) Efeito dos tratamentos na massa neoplásica em implantes com células JM-1. O efeito dos tratamentos foi avaliado com análise de covariância (ANCOVA) e as comparações entre os grupos de tratamento foram feitas com o ajuste de *Sidak* para comparações múltiplas. As barras representam a média da massa da neoplasia ± erro padrão da média (EPM). \* Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) quando comparado com o grupo CO. 45
- Figura 11** Fotomicrografias representativas de (A) Aspecto morfológico geral dos implantes com células JM-1; (B) Detalhes morfológicos mostrando características das células neoplásicas com aspecto poligonal sugerindo a organização hepatocítica convencional; (C) Campo microscópico mostrando área necrótica (campo inferior 46

direito). Foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

**Figura 12** Porcentagem de animais com área de necrose inferior a 15%, de 15% a 75% ou superior a 75%. CO = Grupo Controle (n = 12), TB = Grupo Tributirina (n = 9), SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), AS = Grupo Associação (n = 12). As comparações foram feitas com modelos GLM. **47**

**Figura 13** Correlação da necrose com a massa da neoplasia. O gráfico de dispersão mostra a correlação inversamente proporcional ( $P=Rho=-0,423$ ;  $p=0,003$ ) entre as categorias de necrose e a massa da neoplasia. Cada ponto representa um animal e a linha corresponde à curva de melhor ajuste. CO = Grupo Controle (n = 12), TB = Grupo Tributirina (n = 9), SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), AS = Grupo Associação (n = 10). A correlação foi avaliada pelo teste não paramétrico de Spearman. **47**

**Figura 14** Porcentagem de necrose em relação à área viva do corte histológico. CO = Grupo Controle (n=12); TB = Grupo Tributirina (n=10); SO = Grupo Sorafenibe (n=12); AS = Grupo Associação (n=12). Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ) segundo teste de ANOVA de uma via. **48**

**Figura 15** Concentração de ácido butírico no fígado de animais dos grupos CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). Os dados foram avaliados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da massa da concentração de ácido butírico no fígado  $\pm$  EPM. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) quando comparado com o grupo CO. **49**

**Figura 16** Concentração de ácido butírico na neoplasia. CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). Os dados foram avaliados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da concentração de ácido butírico na neoplasia  $\pm$  EPM.\* Diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) quando comparado com o grupo CO. **49**

**Figura 17** Correlação positiva entre a concentração de ácido butírico no fígado e na neoplasia ( $r^2=0,4364$ ;  $p=0,0053$ ). A associação entre as concentrações de AB foi avaliada por correlações de Pearson. Cada ponto representa um animal e a linha reta corresponde a curva linear de melhor ajuste. No gráfico de dispersão se mostram as linhas correspondentes a intervalo de 95% de confiança (CI95). **50**

**Figura 18** Concentração de sorafenibe na neoplasia de animais dos grupos CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). As barras **51**

representam a média de  $\mu\text{g}$  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.

**Figura 19** Avaliação semi-quantitativa das proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase do grupo CO (n=12). Escore 0 representa 0% de células positivas; escore 1 representa  $\leq 10\%$  de células positivas; escore 2 representa 11 a 30% de células positivas; escore 3 representa 31 a 50% de células positivas; escore 4 representa 51 a 70% de células positivas e escore 5 representa  $\geq 71\%$  de células positivas. **52**

**Figura 20** Porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo ANOVA seguido do teste de Tukey. **53**

**Figura 21** Porcentagem de área positiva para Arginase em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para Arginase em relação à área viva  $\pm$  EPM. Foi realizado teste de Kruskal-Wallis. **53**

**Figura 22** Porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey. **54**

**Figura 23** Índice de proliferação celular. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de proliferação celular  $\pm$  EPM.\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey. **55**

**Figura 24** Porcentagem de área positiva para pERK em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para pERK em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey. **55**

Índice de células positivas para caspase 3 clivada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de células positivas para caspase 3 clivada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ), segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey. **Figura 25** 56

Expressão em nível proteico de caspase 3 clivada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). (A) *Imunoblots*. As concentrações de caspase 3 clivada foram normalizados pela expressão da  $\beta$ -Actina. (B) Razão de caspase 3 clivada em relação a  $\beta$ -Actina. As barras representam a média da razão de caspase 3 clivada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ) avaliada por GLM. **Figura 26** 57

Índice de células positivas para H3K9 acetilada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de células positivas para H3K9 acetilada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ), segundo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn. **Figura 27** 58

Expressão em nível proteico de pAKTSer 473. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). (A) *Imunoblots*. As concentrações de pAKT (Ser 473) foram normalizados pela expressão da  $\beta$ -Actina. (B) Razão de pAKT em relação a  $\beta$ -Actina. As barras representam a média da razão de pAKT  $\pm$  EPM. \*Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ) avaliada por GLM. **Figura 28** 59

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Representação esquemática dos grupos experimentais.	<b>35</b>
-----------------	---	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Representação dos escores em relação à porcentagem de células vivas	<b>39</b>
<b>Tabela 2</b>	Análise de regressão de Cox. Efeito do tratamento e da latência no tempo de crescimento da neoplasia até os implantes atingirem um volume de 5-7% relativo ao p.c. nos animais implantados com células JM-1..	<b>43</b>
<b>Tabela 3</b>	Avaliação semi-quantitativa das proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase do grupo CO	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido butírico
AIC	Critério de informação de Akaike
ANCOVA	Análises de covariância
AS	Associação
BAK	<i>Homologous antagonist / killer</i>
BIC	Critério de informação de Bayes
CBA	Compostos bioativos presentes nos alimentos
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CI95	Intervalo de 95% de confiança
CK	Citoqueratina
CO	Grupo controle
DEN	Dietilnitrosamina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic initiation factors</i>
EMEA	<i>European medicine agency</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLM	Modelos lineares generalizados
H&E	Hematoxilina e eosina
HAT	Enzimas acetilases de histonas
HCC	Carcinoma hepatocelular
HDAC	Desacetilases de histonas
HDACi	Inibidor da HDAC
HR	<i>Hazard ratio</i>

Log Link	Ligação logarítmica
LPN	Lesões pré-neoplásicas
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitogênicos
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation
MEK	<i>Extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
p.c.	Peso corpóreo
pAKT	<i>Protein kinase B fosforilada</i>
PDGFR- $\beta$	<i>Platelet-derived growth factor receptor-<math>\beta</math></i>
pERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase fosforilado</i>
PTEN	Fosfatase homologa a tensina
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
SO	Sorafenibe
TB	Tributirina
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptors</i>

## **1. Introdução**

### **1.1 Epidemiologia do carcinoma hepatocelular (HCC)**

O HCC é a sexta neoplasia mais comum e a segunda maior causa de mortalidade por câncer no mundo (CIDON, 2017), representando 90% das neoplasias hepáticas primárias. A etiologia do HCC pode variar geograficamente, porém sua incidência está aumentando em países ocidentais (KUMAR; ZHAO; WANG, 2011), devido ao aumento de casos de obesidade e diabetes, além do consumo excessivo de bebidas alcoólicas (BLONSKI; KOTLYAR; FORDE, 2010). Além disso, as infecções pelos vírus das hepatites B e C e o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas, também são importantes agentes etiológicos do HCC (CIDON, 2017).

### **1.2 Caracterização do HCC**

Embora os exames de imagem venham se modernizando e possibilitando o diagnóstico do HCC, a biópsia hepática continua a ser o padrão ouro de diagnóstico. A biópsia é uma técnica mais precisa por possibilitar a distinção das neoplasias por meio da análise de imunohistoquímica, onde é feito um painel com anticorpos para várias proteínas expressas em diferentes condições (FLEMMING; WILKENS; KREIPE, 2001). Dentre os marcadores imunohistoquímicos utilizados, destacam-se a HepPar-1, Arginase, citoqueratina (CK) 8, CK18, CK7 e CK19.

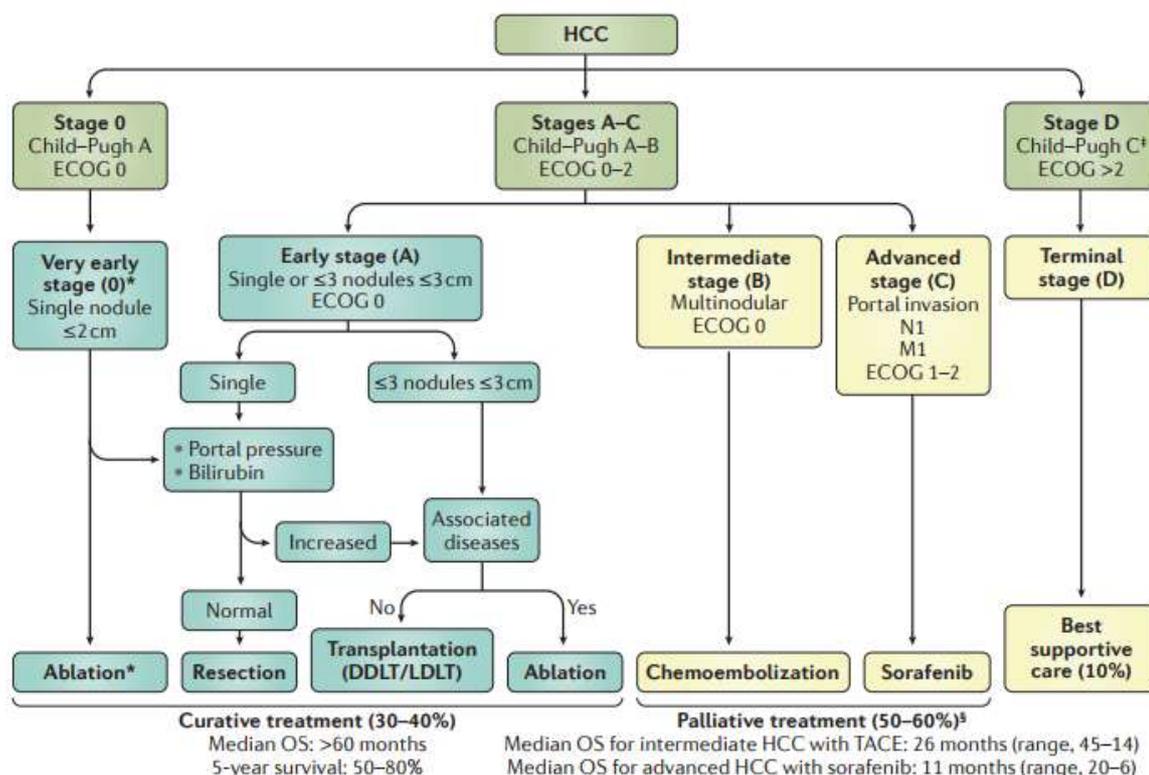
A HepPar-1 é uma proteína específica do citoplasma de hepatócitos. Essa proteína não é encontrada em células progenitoras ou colangiócitos, sendo assim considerada um marcador de diferenciação hepatocítica (SHIRAN, 2006). Além da HepPar-1, a Arginase também é considerada um marcador de diferenciação celular, porém mais sensível que HepPar-1 em HCCs pouco diferenciados (YAN, 2010).

Outro grupo de proteínas bastante utilizado para caracterização celular são as CKs. As CKs são proteínas de filamentos intermediários de células epiteliais que constituem proteínas do citoesqueleto celular. As CKs são expressas em pares, sendo obrigatoriamente uma CK do tipo 1 (CK9 à CK28) e outra do tipo 2 (CK1 à CK8 e CK71 à CK80) (OMARY et al, 2009; SCHEWEIZER et al, 2006). As células progenitoras hepáticas apresentam a expressão dos pares CK7/19 e CK8/18. Quando essas células se diferenciam em hepatócitos deixam de expressar CK7/19, expressando apenas CK8/18 (FELDSTEIN e

GORES, 2004). Assim, essas proteínas podem ser utilizadas para distinguir o grau de diferenciação e agressividade da neoplasia hepática.

### 1.3 Panorama Clínico

Pacientes com neoplasias hepáticas em estágios iniciais são candidatos a tratamentos como ablação, ressecção ou transplante hepático (**Figura 1**). Esses são considerados tratamentos curativos do HCC. Contudo, a utilização dessas técnicas está disponível a apenas 30% - 40% dos pacientes, sendo que 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 e BRUIX, 2008; BRUIX et al., 2012) e nenhuma terapia adjuvante é capaz de prevenir esta complicação (LLOVET et al, 2016).



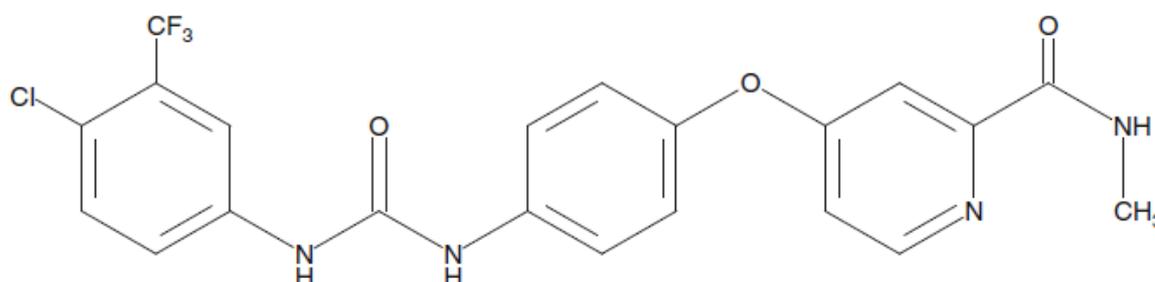
**Figura 1:** Sistema de estratégia terapêutica do HCC. Segundo a classificação de Barcelona existem cinco estágios do HCC. Pacientes com tumores precoces assintomáticos (estágios 0-A) são candidatos a terapias radicais (ressecção, transplante ou ablação local). Os pacientes assintomáticos com HCC multinodular (estágio B) são tratados com quimioembolização transarterial (TACE), enquanto os pacientes com tumores sintomáticos avançados e/ou um padrão tumoral invasivo (estágio C) são candidatos para o tratamento com sorafenibe. A doença em estágio final (estágio D) inclui pacientes com mau prognóstico que devem receber o melhor atendimento de suporte possível. DDLT, transplante hepático de doador falecido; ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*; LDLT, transplante de fígado de doador vivo; M1, metástase M1; N1, linfonodo N1; OS, sobrevida global (adaptado de LLOVET et al, 2016).

Para os pacientes com HCC em estágios intermediários é indicada a quimioembolização transarterial. Já para os pacientes com HCC avançado, quando a neoplasia é invasiva o tratamento de primeira escolha é o Sorafenibe (SO) (LLOVET et al, 2016). Esses tratamentos são considerados paliativos, já que não há uma terapia efetiva para neoplasias hepáticas nesse estágio (ZANG, 2010). 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. Porém esses pacientes não são candidatos a qualquer ensaio clínico (LLOVET et al, 2016) (**Figura 1**).

#### 1.4 Sorafenibe

O Sorafenibe (4 - [4 - [4-cloro-3-(trifluorometil) fenil] carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida) (**Figura 2**) foi o primeiro quimioterápico oral aprovado em 2007 pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicine Agency* (EMA) para o tratamento do HCC avançado (BRENDDEL et al., 2011).

A dose de 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 tumores sólidos avançados. O SO tem uma meia-vida 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 glicuronidados. O SO inalterado pode ser encontrado nas fezes (51% da dose), mas não na urina (KEATING e SANTORO, 2009).



**Figura 2:** Estrutura molecular do Sorafenibe. Adaptado de KEATING e SANTORO, 2009.

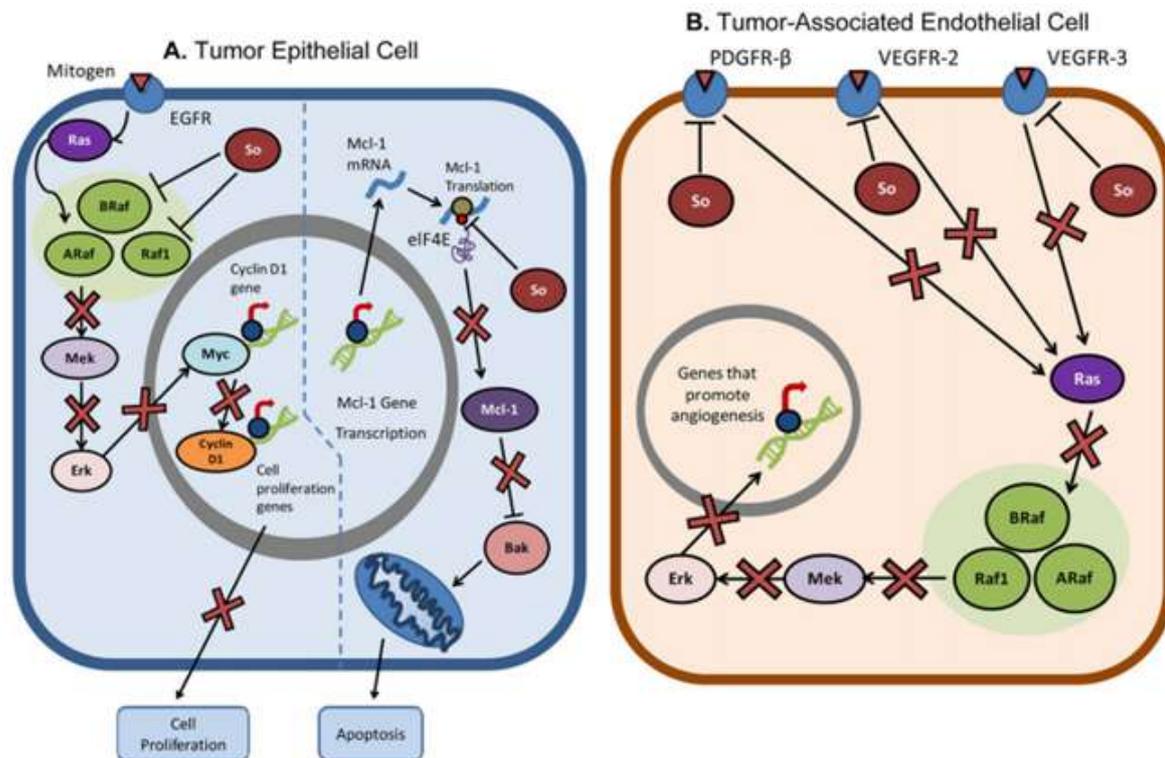
O SO é metabolizado principalmente no fígado via citocromo P450 (CYP) 3A4 e glicuronidação via uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT) 1A9. Dessa forma, há a

formação de oito metabólitos do SO, sendo o N-óxido de piridina, o principal metabólito circulante no plasma. Além disso, esse metabólito demonstrou, *in vitro*, potencial terapêutico semelhante ao do fármaco original. No estado estacionário, o SO corresponde a 70-85% dos analitos circulantes no plasma e o N-óxido de piridina a 9-16% (KEATING e SANTORO, 2009).

Este fármaco é um inibidor de múltiplas quinases, atuando principalmente na via das proteínas quinases ativadas por mitogênicos (MAPK) (**Figura 3**) (GAUTHIER e HO, 2013). A via MAPK tem início com a ligação de fatores de crescimento, citocinas, e hormônios nos receptores de superfície celular. Em resposta, 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 compostos por serina / treonina quinases, denominadas *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), para a membrana citoplasmática (WILHELM et al., 2004).

Assim, 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 ativa MEK, que posteriormente fosforila e ativa ERK. A ERK, por sua vez, 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 genes responsáveis por aumentarem a proliferação celular (**Figura 3 A**) (MARSHALL, 1994).

Desse modo, 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 (SCHMIDT et al, 1997; GAUTHIER e HO, 2013). O SO tem ação na via MAPK, principalmente, inibindo RAF-1 (C-RAF) (LYONS e WILHELM, 2001; WILHELM e CHIEN, 2002) e B-RAF (WILHELM et al, 2004; GAUTHIER e HO, 2013). Além disso, o SO age na angiogênese inibindo os receptores *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR) 1, 2 e 3 e *platelet-derived growth factor receptor- $\beta$*  (PDGFR- $\beta$ ) (GAUTHIER e HO, 2013) (**Figura 3 B**).



**Figura 3:** Mecanismos moleculares envolvidos na atividade quimioterápica do sorafenibe (SO). (A) Mecanismos de ação do SO em células neoplásicas epiteliais. SO inibe RAF-1 e B-RAF que consequentemente inibe MEK e ERK, inibindo a proliferação celular. Além disso, SO inibe eIF4E que consequentemente inibe Mcl-1 e ativa BAK, induzindo a apoptose. (B) Mecanismos de ação do SO em células endoteliais associadas a neoplasias. SO inibe os receptores endoteliais VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR-  $\beta$ , inibindo a angiogênese. BAK - *Bcl-2 homologous antagonist/killer*; EIF4E - *eukaryotic initiation factors*; ERK - *extracellular signal-regulated kinase*; Mcl-1- *induced myeloid leukemia cell differentiation*; MEK - *extracellular signal-regulated kinase kinase*; PDGFR-  $\beta$  - *platelet-derived growth factor receptor- $\beta$* ; RAF - *rapidly accelerated fibrosarcoma*; RAS - *rat sarcoma*; VEGFR - *vascular endothelial growth factor receptors* (adaptado de GAUTHIER e HO, 2013).

Além de inibir a proliferação celular e angiogênese, o SO age induzindo a apoptose pela inibição da fosforilação de *eukaryotic initiation factors* (eIF4E). EIF4E é uma proteína que participa do início da tradução do gene *induced myeloid leukemia cell differentiation* (Mcl-1), responsável por suprimir a apoptose pela inibição de *Bcl-2 homologous antagonist / killer* (BAK). Assim, com a inibição de eIF4E há a consequente inibição de Mcl-1 e ativação de BAK, o que induz o processo de apoptose (**Figura 3A**). Em estudos *in vivo* de fase 3, o SO foi capaz de prolongar a sobrevida média dos pacientes de 7,9 meses para 10,7 meses. (LLOVET et al, 2008; GAUTHIER e HO, 2013). Assim, são necessários estudos da associação do SO com outros compostos que possam aumentar a eficácia do tratamento quimioterápico (GAUTHIER e HO, 2013).

## 1.5 Compostos Bioativos dos Alimentos e SO

Os compostos bioativos presentes nos alimentos (CBA) representam uma classe importante de substâncias com potencial para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade da quimioterapia em pacientes (GANSLEY, et al, 2004; MAI, et al, 2007), uma vez que diversos estudos epidemiológicos ou com animais já relacionaram a alimentação à incidência de neoplasias, sendo que o consumo de frutas e hortaliças revelou atividade preventiva contra diversos tipos de neoplasias, inclusive o HCC (SPORN e SUH, 2002).

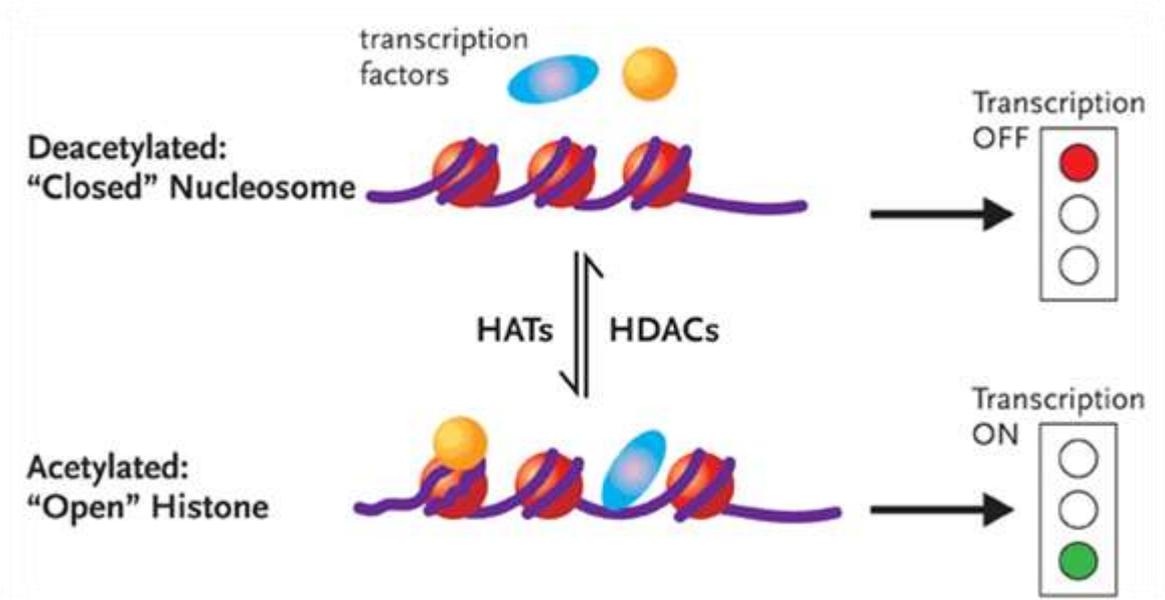
A vitamina K, um CBA presente em hortaliças verde escuro, ervas e óleos vegetais (PARK et al., 2015), quando associada ao SO, potencializa a eficácia do tratamento quimioterápico em comparação à administração dessas substâncias isoladamente (WEI et al., 2010). Essa associação apresenta efeito sinérgico na inibição do crescimento do HCC (ZHANG et al., 2012), bloqueando a ativação de ERK em ratos *Fischer-344* implantados com células JM-1 (WEI et al., 2010;ZHANG et al., 2012). Estas células foram isoladas de HCC primário de ratos *Fischer-344*. A vantagem da utilização desta linhagem de células é o favorecimento, especificamente, do desenvolvimento de uma neoplasia hepática primária (NOVICKI; JIRTLE; MICHALOPOULOS, 1983).

Além da vitamina K, o SO também foi associado com a  $\beta$ -ionona (HUANG et al; 2012), um CBA presente em uvas e aromatizantes de vinhos (STERMER; BIANCHINI; KORTH, 1994). Assim, em estudo conduzido *in vitro* com células de hepatoma humano SK-Hep-1, a associação demonstrou efeito sinérgico na atividade anticarcinogênica dos compostos (HUANG et al., 2012).

## 1.6 Ácido butírico

Dentre os CBAs com propriedades anticarcinogênicas, destaca-se o ácido butírico (AB), um ácido graxo de cadeia curta produto da fermentação de fibras alimentares. É responsável pelo fornecimento de 70 a 90% da energia consumida pelo colonócito (SCHEPPACH et al., 1992), além de favorecer a manutenção fisiológica do cólon (WATKINS et al., 1999). A atividade anticarcinogênica do AB pode ser observada *in vitro*, em linhagens celulares, como de câncer de mama (WALKER et al., 2001; ANDRADE et al, 2012), 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).

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 (**Figura 4**)(SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005).



**Figura 4:** Papel da acetilação de histonas na remodelação da cromatina e na transcrição gênica. A enzima HAT acetila as histonas ocasionando um afrouxamento da estrutura da cromatina, o que permite o acesso de fatores de transcrição, promovendo a transcrição gênica. Esse processo pode ser revertido pela ação da enzima HDAC, que retira o grupamento acetil das histonas e assim a cromatina volta ao estado condensado, inibindo a transcrição gênica. HDAC - desacetilases de histonas; HAT - acetiltransferases de histonas (adaptado de MARGOLIS, 2005).

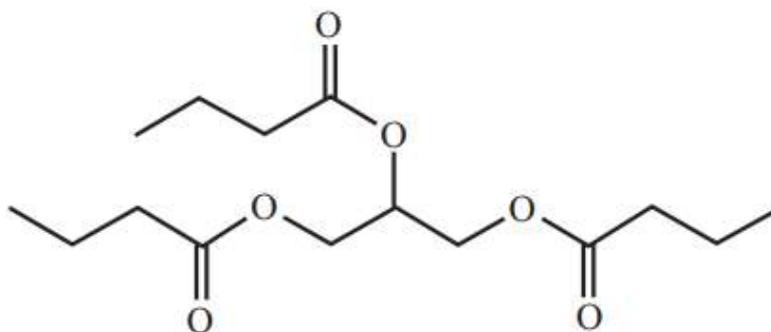
O AB, inibidor de HDAC (HDACi), promove a hiperacetilação de histonas, principalmente da histona H3 no resíduo de lisina 9 (H3K9), modulando a transcrição de diversos genes (SHIN et al., 2012), como por exemplo, o aumento da expressão de genes supressores de tumor. Nesse sentido, o AB aumenta a expressão de  $p21^{cip/waf}$ , um gene supressor de tumor que influencia diversos processos funcionais da célula, como a divisão, apoptose, reparo e diferenciação celular (DRUMMOND et al., 2005).

Contudo, a utilização do AB *in vivo* é limitada devido à sua meia-vida reduzida, de aproximadamente 5 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). A tributirina (TB), pró-fármaco do AB, apresenta propriedades farmacocinéticas favoráveis para administração *in vivo*, quando comparada ao AB (EDELMAN et al., 2003).

### 1.7 Tributirina

A TB é um triacilglicerol constituído por três moléculas de AB esterificado ao glicerol (**Figura 5**). A hidrólise completa de 1 mol de TB por lipases fornece 2 mols de butirato (AB ligado a uma molécula de sódio) e 1 mol de 2-monobutirilglicerol. A meia-vida do AB, após a administração por via oral de TB em roedores aumenta para 40 minutos (SU et al., 2006). Além disso, a administração de TB em roedores, por via parenteral ou oral, não apresentou efeitos tóxicos (EGORIN et al., 1999).



**Figura 5:** Estrutura molecular da Tributirina (Adaptado de HEIDOR et al., 2012).

A TB apresentou ação quimiopreventiva *in vitro* (CHEN e BREITMAN, 1994; WATKINS et al., 1999; MAIER et al., 2000; CLARKE; FEINMAN; HARRISON; 2001; SCHRÖDER e MAURER, 2002) e, *in vivo* (KUEFER et al., 2004; KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011; HEIDOR et al., 2012; GUARIENTO et al.; 2014; HEIDOR et al.; 2016). 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). Entre os mecanismos da TB, destacam-se a indução da apoptose, diferenciação celular e a modulação de mecanismos epigenéticos (HEIDOR et al., 2012).

A indução de apoptose consiste em um mecanismo importante na quimioprevenção da hepatocarcinogênese. Os efeitos pró-apoptóticos da TB são consideráveis em linhagem de câncer de próstata, quando comparada à administração em concentração equimolar de AB (KUEFER et al., 2004), bem como em estudos *in vivo* (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011). Além disso, este efeito é específico em células pré-neoplásicas ou neoplásicas e não afeta as células consideradas “normais” (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011). Assim como o AB, a TB age como HDACi, promovendo principalmente a hiperacetilação da histonas H3K9 especificamente em LPN, modulando a transcrição de vários genes, como por exemplo, o aumento da expressão do gene p21<sup>cip/waf</sup> (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2011).

Assim, torna-se interessante o estudo da associação entre TB e SO, uma vez que sua atividade de HDACi poderia aumentar a eficácia da quimioterapia, 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 possível atividade anticarcinogênica da TB, associada ou não ao SO na etapa de progressão da hepatocarcinogênese em modelo de implante singênico com células da linhagem JM-1.

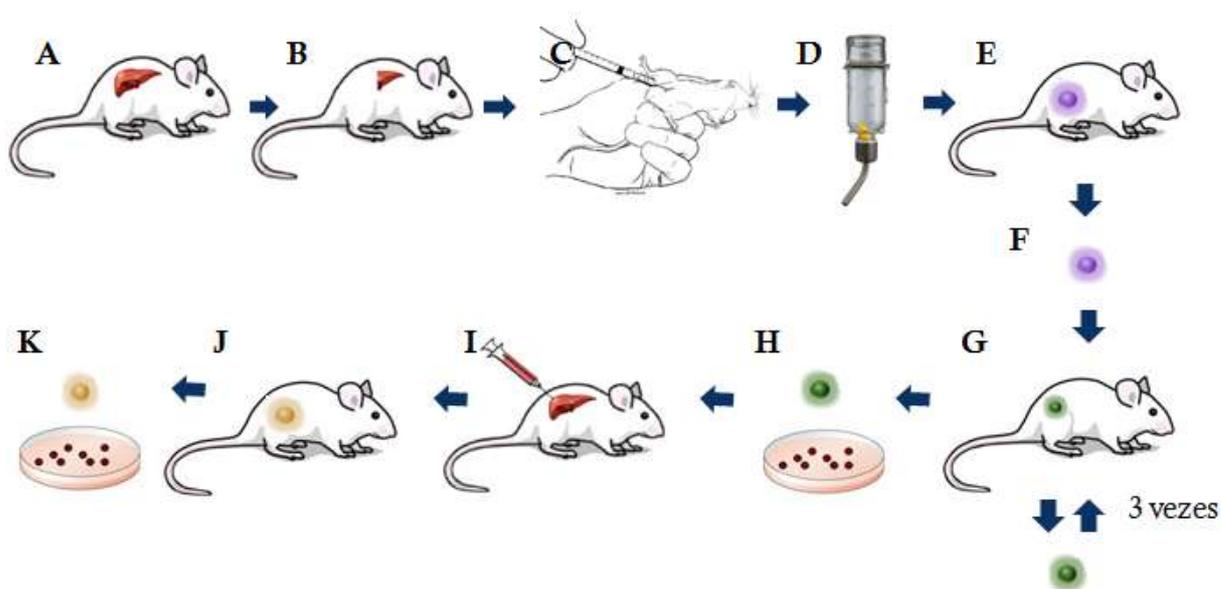
## **2. Objetivo**

Avaliar a atividade anticarcinogênica da TB, associada ou não ao SO em neoplasias de linhagem de células JM-1 implantadas de modo singênico no flanco de ratos *Fischer-344*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Cultura de células JM-1

As células JM-1 foram doadas pelo Prof. G.K. Michalopoulos da Universidade de Pittsburg, EUA. Estas células foram isoladas de HCC primário de ratos *Fischer-344* induzido quimicamente por seu grupo de pesquisa (NOVICKI; JIRTLE; MICHALOPOULOS, 1983), como demonstrado na **Figura 6**.



**Figura 6:** (A) Foram utilizados ratos *Fischer-344*. (B) Os animais foram submetidos à hepatectomia parcial a dois terços. (C) Após 24 h da hepatectomia, administrou-se dietilnitrosamina [DEN (70 mg / kg)] por via intraperitoneal. (D) Duas semanas após a administração de DEN, foi adicionado à água dos animais fenobarbital de sódio (0,1 g / 100 ml). (E) Dez a doze meses após o tratamento com DEN a maioria dos animais apresentava neoplasias. (F) As neoplasias hepáticas primárias foram retiradas (G) e transplantadas subcutaneamente nas regiões inguinais de receptores singênicos, removidas e reimplantadas três vezes da mesma maneira. (H) Na quarta passagem, as células foram isoladas (I) e injetadas diretamente no fígado dos animais (J) As neoplasias se desenvolveram no fígado, (K) estas foram coletadas e linhagens celulares foram isoladas, dentre elas, a linhagem JM-1.

As células (**Figura 7**) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM (Invitrogen, EUA)], suplementado com soro fetal bovino (Invitrogen, EUA) a 10% em ambiente controlado (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C). Estas foram tripsinizadas ao atingir confluência de 80% e replicadas para novas garrafas ou congeladas em tubos criogênicos a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células / ml com 10% de dimetilsufóxido e armazenadas em N<sub>2</sub> líquido para uso futuro.



**Figura 7:** Imagem representativa da cultura de células da linhagem JM-1 em aumento 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 JM-1 em ratos *Fischer-344***

Para a padronização dos implantes foi realizado um experimento piloto em que foram testadas as concentrações de  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  e  $10 \times 10^6$  células JM-1 em meio de cultura DMEM, sem soro fetal, no flanco de ratos *Fischer-344* machos com 6 semanas de idade. As neoplasias originadas de JM-1 eram palpáveis na primeira semana após o implante e mensuráveis na segunda semana. Finalmente, os implantes em meio DMEM nas concentrações de  $5 \times 10^6$  foram escolhidos por apresentarem latência intermediária, sendo, portanto, mais adequado para o experimento.

Inicialmente, foi proposto tratar os animais por 6 semanas a partir da data em que a neoplasia atingisse 3 cm<sup>3</sup>. Porém, as neoplasias das células JM-1, atingiram o volume limite proposto pelo comitê de ética [10% do peso corpóreo (p.c.)] antes do final do tempo de observação do experimento. Portanto, foi necessário reduzir o volume da neoplasia para o início do tratamento a 1 cm<sup>3</sup> e o tempo de tratamento a 4 semanas. Além disso, foi necessário adotar também o volume da neoplasia como critério de eutanásia. Assim, como os ratos foram eutanasiados à medida que suas neoplasias atingiam 10% do p. c., estes apresentaram diferentes tempos de tratamento, o que foi considerado na análise estatística.

### 3.2.2 Tratamento das neoplasias de células JM-1 em ratos *Fischer-344*

Foram implantadas 5x10<sup>6</sup> células JM-1 no flanco de 43 ratos *Fischer-344* machos com 6 a 7 semanas de idade com média de peso de 140 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)<sup>2</sup> x 0,4 (LACHENMAYER et al., 2012). Quando as neoplasias atingiram 1 cm<sup>3</sup>, os animais foram aleatorizados em 4 grupos experimentais, sendo estes em grupo controle (CO), grupo TB, grupo SO e grupo associação [TB com o SO (AS)]. Os ratos foram tratados por gavagem diariamente por 4 semanas consecutivas aproximadamente, conforme descrito no **Quadro 1**.

<b>Grupo Controle (CO)</b> n=12	Constituído por 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].
<b>Grupo Tributirina (TB)</b> n=9	Constituído por 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].
<b>Grupo Sorafenibe (SO)</b> n=10	Constituído por 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].
<b>Grupo Associação (AS)</b> n=10	Constituído por ratos <i>Fischer-344</i> que receberam TB (200 mg/ 100 g p.c.) e tosilato de sorafenibe (3 mg/100 g p.c.).

**Quadro 1:** Representação esquemática dos grupos experimentais.

A TB e maltodextrina foram administradas 2 h antes do tratamento com SO e seu respectivo controle (veículo + excipiente). Os animais permaneceram em jejum entre os tratamentos.

### **3.2.3 Eutanásia**

Durante o experimento houve várias eutanásias, em decorrência do volume das neoplasias atingirem o limite proposto pela Comissão de Ética. No final do período de observação de 4 semanas, todos os animais foram eutanasiados independentemente do volume da neoplasia.

Quando das eutanásias, as neoplasias foram mensuradas e armazenadas em freezer -80°C ou fixadas em formol tamponado para posterior confecção de cortes histológicos.

### **3.2.4 Variáveis do ensaio biológico consideradas nas análises estatísticas**

Uma vez que alguns animais foram eutanasiados durante o experimento à medida que as neoplasias atingiam 10% do p.c., estes apresentaram diferentes tempos de tratamento, o que foi considerado como variável nas análises estatísticas. O tempo de latência da neoplasia até atingir 1 cm<sup>3</sup>, idade dos animais, p.c., massa da neoplasia e lote do animal [foram realizados 4 cortes verticais no experimento a fim de completar o número de ratos (n) adequado para o estudo] também foram considerados como variáveis nas análises estatísticas.

### **3.3 Avaliação do crescimento das neoplasias de células JM-1**

A evolução do volume das neoplasias foi avaliada pela análise *Time-to-event analysis* [Curvas de Kaplan-Meier, teste de Log Rank e regressões de Cox, Stata 13, (Statacorp., EUA)] até os implantes alcançarem volume relativo ao p.c. de 5 a 7%. As neoplasias que não atingiram o volume estabelecido até o fim do período de observação foram consideradas como dados censurados.

As curvas de Kaplan-Meier 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, p.c., 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.

Posteriormente foi realizada a avaliação da porcentagem de animais que sobreviveram até o final do período de observação do estudo pelo teste de *Qui*-quadrado.

### **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 da neoplasia**

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

### **3.6 Avaliação quantitativa da área necrótica da neoplasia**

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. As comparações foram analisadas pelo teste de ANOVA de uma via.

### **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 N<sub>2</sub> 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 N<sub>2</sub> 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 como 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) equipado com coluna CP Wax 58 – FFAP (Varian, 25 m x 0,32 m 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.

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  $\gamma$ ) 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, Arginase, *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), pERK, H3K9ac e Caspase 3.**

Fragmentos representativos de fígados e tumores foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização e reidratação, foi realizada a recuperação antigênica em câmara pascal (Celerus RIPTIDE – Celerus Diagnostics, Estados Unidos) 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; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KCl 2,68mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4)]. Em seguida, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 (1:200), anti-CK8 (1:100), anti-CK18 (1:100), anti-CK19 (1:200), anti-HepPar-1 (1:50), Arginase (1:1000), PCNA (1:100), pERK (1:80), H3K9ac (1:100) ou caspase 3 (1:100) 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-coloração 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%.

### 3.9 Avaliação semi-quantitativa para CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar 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 de 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 vivas

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, Arginase, CK18 e pERK**

A expressão em nível proteico da área marcadas para CK19, Arginase, CK8, e pERK foi avaliada por meio de marcação imunoistoquímica em tecido neoplásico. A leitura 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 cada proteína de interesse. O resultado foi expresso em porcentagem de área positiva em relação á área viva. Para tanto, 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 Avaliação e quantificação de H3K9ac e Caspase 3**

A expressão em nível proteico de células marcadas para H3K9ac e Caspase 3 foi avaliada por meio de marcação imunoistoquímica em tecido neoplásico. A leitura foi realizada pela contagem de células marcadas percorrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 2000 células), e o resultado foi expresso em porcentagem. Para tanto, foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

### **3.13 Análise estatística da Imunoistoquímica**

A escolha do teste estatístico foi baseada nas análises gráficas da distribuição dos dados e o ajuste dos resíduos à normalidade e à homocedasticidade. Após avaliação da possível interferência das outras variáveis além do tratamento foi escolhido análise de ANOVA no caso de dados com distribuição normal ou *Kruskall-Wallis* no caso de dados sem distribuição normal. Em seguida foram feitos os pós testes de *Tukey* e de *Dunn*

respectivamente. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de 5%. O software utilizado foi o STATISTICA 8.0.

### **3.14 Extração de proteína total**

Para a obtenção de extratos protéicos 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 armazenado a -80°C.

### **3.15 Western blot para Caspase 3 clivada e *Protein kinase B* fosforilada (pAKT) Ser473**

As amostras de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos anti-pAKT Ser 473 (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- $\beta$ -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, Amersham Biosciences, 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).

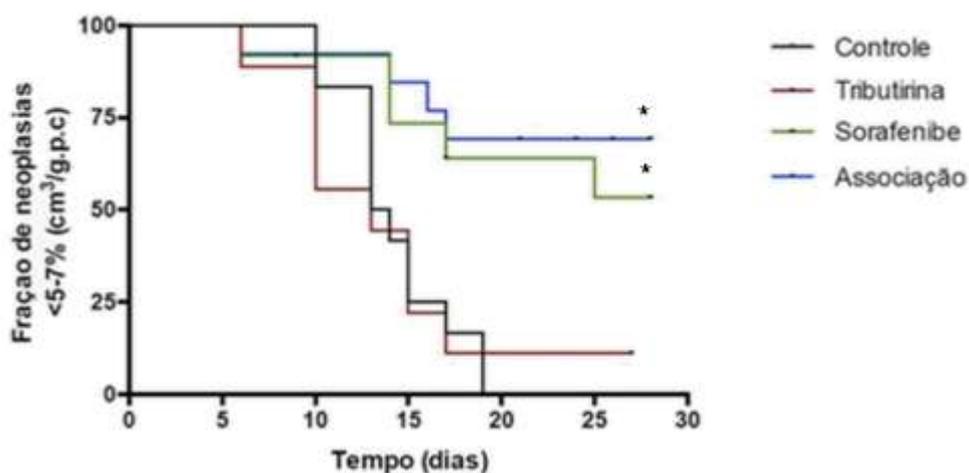
As densitometrias das bandas de interesse foram ajustadas pelas densitometrias da proteína constitutiva e foram comparadas por modelos GLM. As comparações dos tratamentos foram feitas usando o grupo CO como referência. A latência, o tempo de tratamento, a massa da neoplasia, a massa corporal e o lote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

## 4. Resultados

Para a avaliação da atividade antineoplásica da TB e do SO isoladamente ou em associação foram utilizados parâmetros macroscópicos de evolução do crescimento das neoplasias, avaliação da porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação do estudo e avaliação da massa neoplásica quando da eutanásia.

### 4.1 Avaliação do crescimento das neoplasias de células JM-1

Em relação à evolução do crescimento das neoplasias, o tratamento com SO e AS retardaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento até o volume de 5-7% relativo ao p.c. quando comparados ao grupo CO. O tratamento com TB não apresentou diferença ( $p \geq 0,05$ ) na evolução do crescimento da neoplasia em relação ao grupo CO (**Figura 8**).



**Figura 8:** Curvas de Kaplan-Meier representando a fração de neoplasias com volume menor do que 5-7% relativo ao p.c. nos animais implantados com células JM-1 dos grupos Controle (n=12), Tributirina (n=9), Sorafenibe (n=10) e Associação (n=12). (\*) diferença em relação ao grupo CO ( $p < 0,05$ ) segundo teste de *Log Rank*.

Para determinar se houve interferência das variáveis nos resultados de evolução da neoplasia foram realizadas análises de regressão de Cox com os dados de tempo de latência, p.c., idade dos ratos e lote dos animais na evolução do volume das neoplasias. Nesse sentido, estes resultados estão de acordo com os dados de Kaplan-Meier, onde os tratamentos com SO e AS retardaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento das neoplasias em relação ao grupo CO. Não foram observadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre os grupos TB e CO (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Análise de regressão de Cox. Efeito do tratamento e da latência no tempo de crescimento da neoplasia até os implantes atingirem um volume de 5-7% relativo ao p.c. nos animais implantados com células JM-1.

	Univariada		Multivariada/ Ajustada	
	HR (95% CI)	valor de p	HR (95% CI)	valor de p
<b>Tratamento</b>				
Controle (n=12)	-	-	-	-
Tributinina (n=9)	0.71 (0.26-1.93)	0.816	1.09 (0.37-3.22)	0.880
Sorafenibe (n=10)	0.15 (0.05-0.52)	<b>0.003</b>	0.12 (0.036-0.44)	<b>0.001</b>
Associação (n=10)	0.17 (0.54-0.51)	<b>0.002</b>	0.12 (0.036-0.44)	<b>0.001</b>
<b>Latência</b>	0.70 (0.52-0.93)	<b>0.014</b>	0.59 (0.41-0.86)	<b>0.007</b>

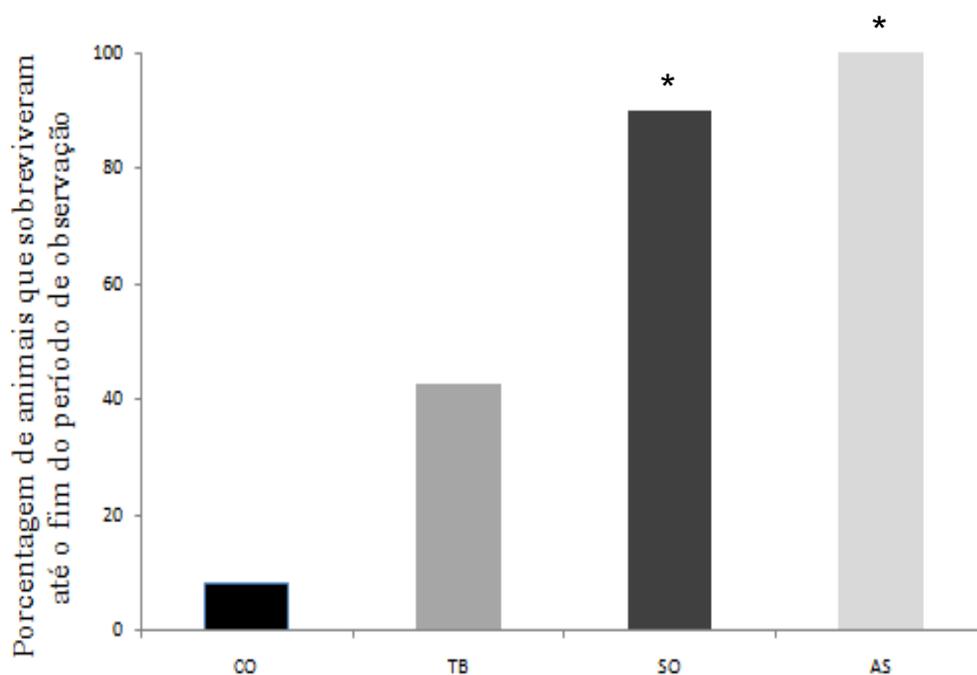
As variáveis p.c., idade dos ratos e lote dos animais não apresentaram efeito significativo ( $p \geq 0,05$ ) no tempo de evolução das neoplasias quando analisadas por meio de modelos univariados de regressão de Cox adicionais para as variáveis (**Tabela 2**).

A análise univariada mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na latência, sendo que quanto maior o tempo de latência para atingir  $1 \text{ cm}^3$ , menor foi o crescimento da neoplasia por unidade de tempo [*Hazard Ratio* (HR)=0,70;  $p=0,014$ ]. Ajustando-se o efeito do tratamento no tempo de evolução das neoplasias pela latência, não se observaram alterações significativas ( $p \geq 0,05$ ) no tratamento dos animais (**Tabela 2**).

#### **4.2 Avaliação da porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação do estudo (28 dias)**

Uma vez que as neoplasias de implante de células JM-1 apresentaram crescimento acelerado, foi necessário realizar eutanásias ao longo dos 28 dias de tratamento de acordo com o volume das neoplasias. Os animais foram eutanasiados quando as neoplasias atingiam 10% do p.c., limite estabelecido pela Comissão de Ética em Pesquisa. Assim, foi realizada uma análise da porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação (**Figura 9**).

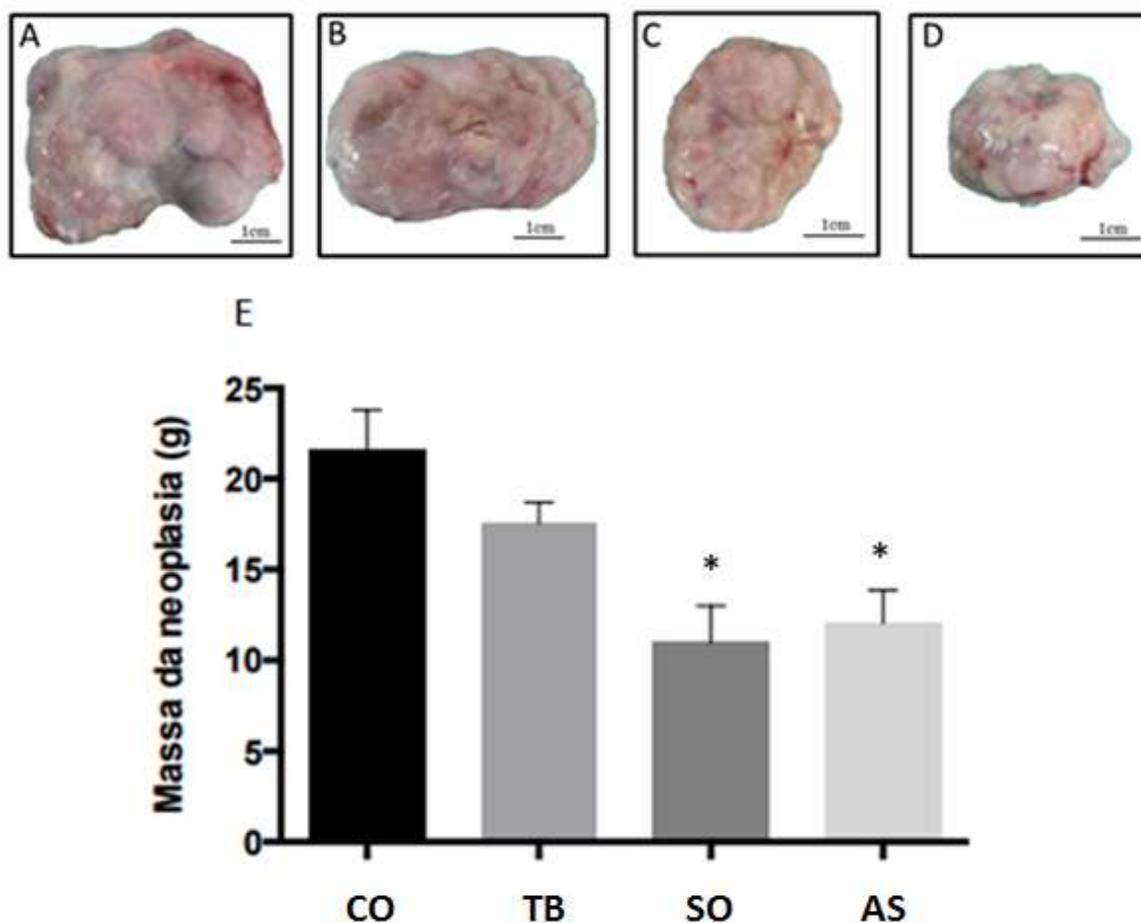
No grupo CO, apenas 8% dos animais atingiram o final do estudo. Já no grupo TB esse número aumentou para 43% e no grupo SO para 90%. Foi observado que no grupo AS 100% dos animais sobreviveram até o final do estudo. Nesse sentido, pode ser observado que os grupo SO e AS apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de animais que sobreviveram até o fim do período quando comparados ao grupo CO.



**Figura 9:** Porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação do estudo (28 dias). CO = Grupo Controle (n=12), TB = Grupo Tributirina (n=9), SO = Grupo Sorafenibe (n=10), AS = Grupo Associação (n=12). \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO segundo teste *Qui*-quadrado.

### 4.3 Massa da neoplasia

Além do desenvolvimento, também foi avaliada a massa da neoplasia logo após a eutanásia como parâmetro da eficácia dos tratamentos. Os grupos SO e AS apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) massa da neoplasia em comparação ao grupo CO. Já o grupo TB não apresentou diferença ( $p \geq 0,05$ ) da massa da neoplasia em relação ao grupo CO (**Figura 10**). O tempo de latência da neoplasia, p.c., idade, lote do animal e o tempo de tratamento não interferiram significativamente ( $p \geq 0,05$ ) no efeito dos tratamentos em relação à massa das neoplasias.

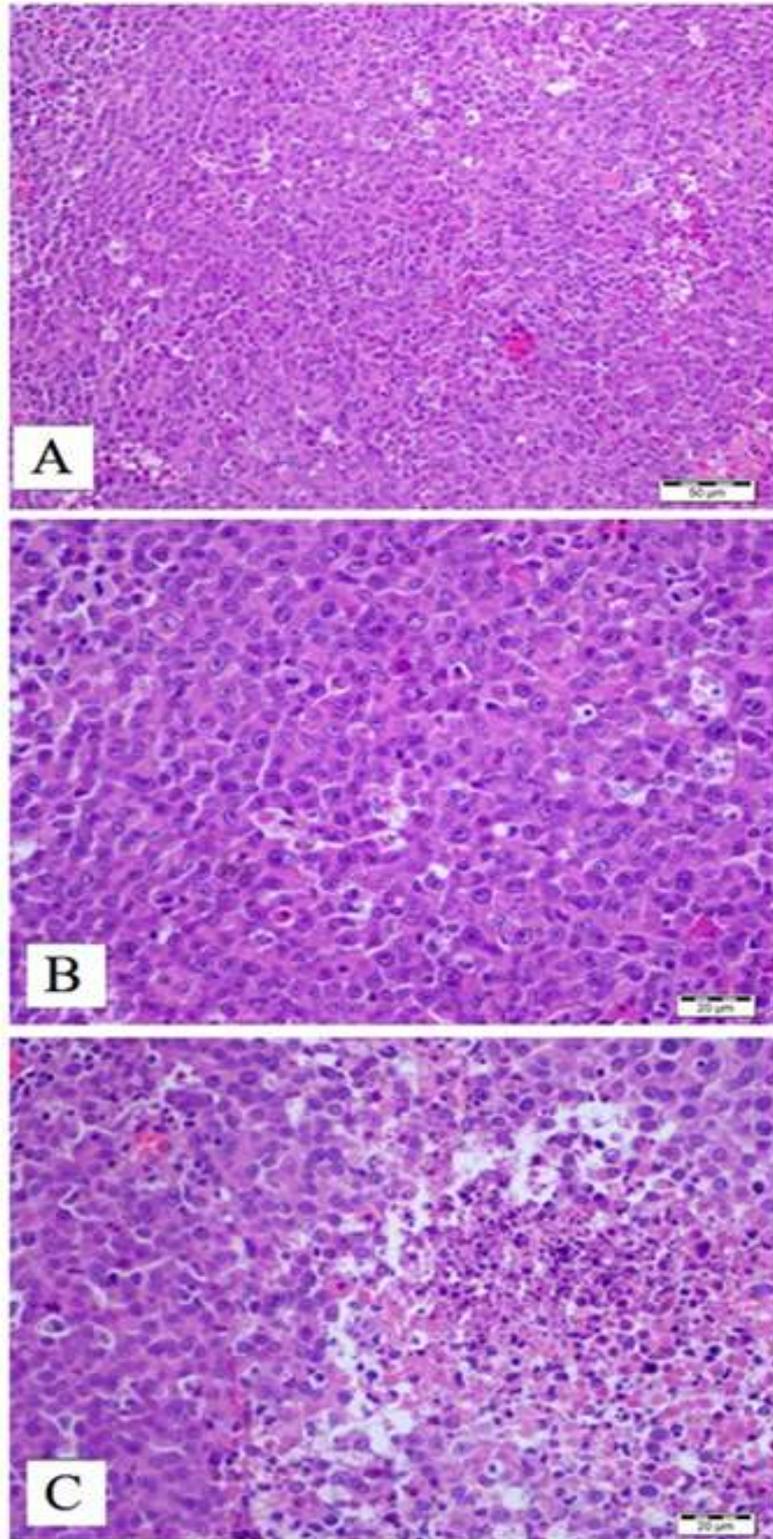


**Figura 10:** Imagens representativas das neoplasias de implantes com células JM-1 nos grupos (A) CO = Grupo Controle (n = 12), (B) TB = Grupo Tributirina (n = 9), (C) SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), (D) AS = Grupo Associação (n = 12); (E) Efeito dos tratamentos na massa neoplásica em implantes com células JM-1. O efeito dos tratamentos foi avaliado com análise de covariância (ANCOVA) e as comparações entre os grupos de tratamento foram feitas com o ajuste de *Sidak* para comparações múltiplas. As barras representam a média da massa da neoplasia ± erro padrão da média (EPM). \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO.

#### 4.4 Análise histológica – avaliação da área necrótica

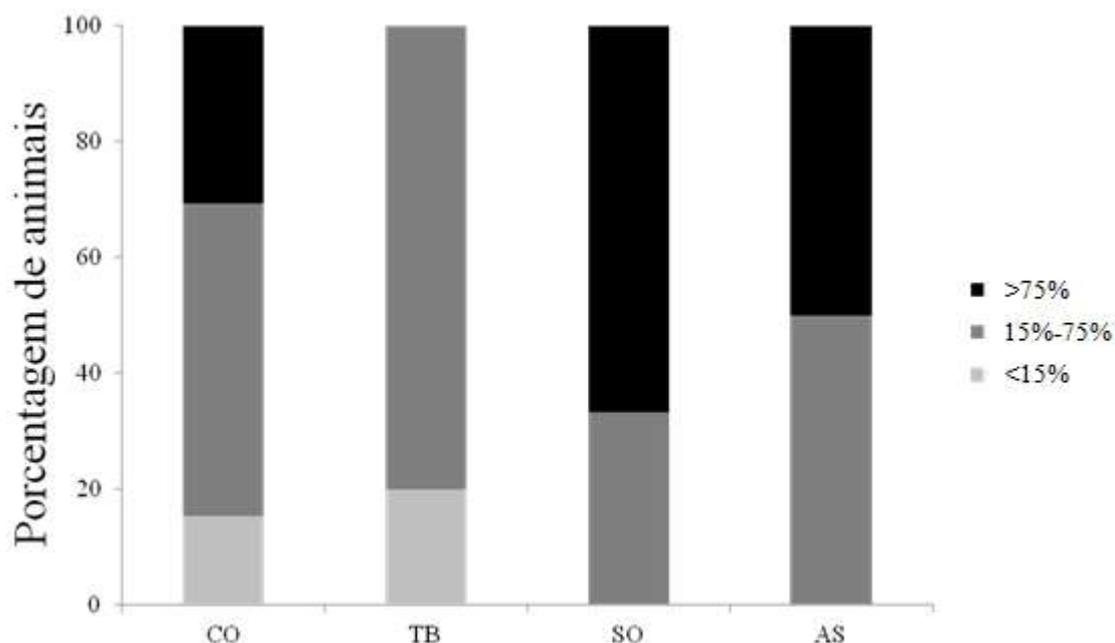
Os implantes de células neoplásicas hepáticas das linhagens JM-1 no flanco dos animais, levaram ao desenvolvimento de massas neoplásicas de crescimento expansivo com invasão de tecidos adjacentes, que frequentemente ocasionavam ulcerações na pele.

Pode-se observar que as células neoplásicas apresentam aspecto poligonal e morfologia semelhantes às de hepatócitos, como em HCCs convencionais (Figura 11 - A e B). Áreas de necrose (Figura 11 - C), mitoses e apoptoses estavam presentes em todas as amostras neoplásicas analisadas. Não foram observadas metástases em quaisquer um dos animais deste estudo. Na análise histológica das neoplasias foram observadas extensas áreas de necrose que variaram entre 10 a 85% da massa neoplásica.



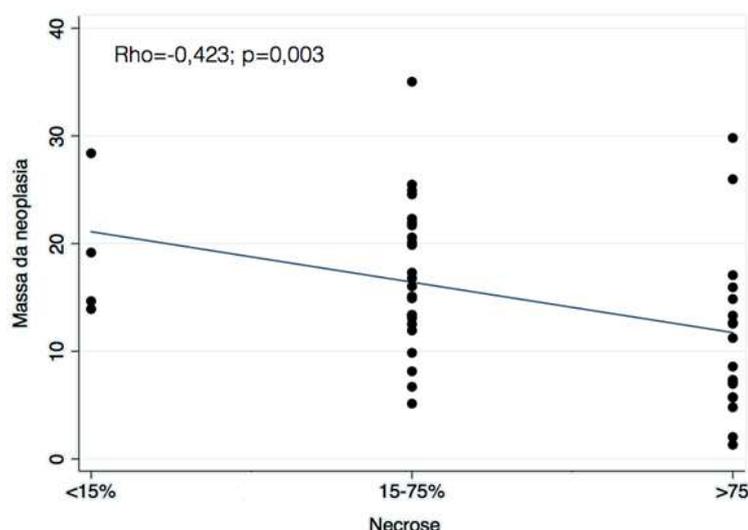
**Figura 11:** Fotomicrografias representativas de (A) Aspecto morfológico geral dos implantes com células JM-1; (B) Detalhes morfológicos mostrando características das células neoplásicas com aspecto poligonal sugerindo a organização hepatocítica convencional; (C) Campo microscópico mostrando área necrótica (campo inferior direito). Foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

A análise semi-quantitativa da área necrótica demonstrou uma redução do percentual de necrose no grupo TB e um aumento nos grupos SO e AS, porém as diferenças não foi estatisticamente significante ( $p \geq 0,05$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12:** Porcentagem de animais com área de necrose inferior a 15%, de 15% a 75% ou superior a 75%. CO = Grupo Controle (n = 12), TB = Grupo Tributirina (n = 9), SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), AS = Grupo Associação (n = 10). As comparações foram feitas com modelos GLM.

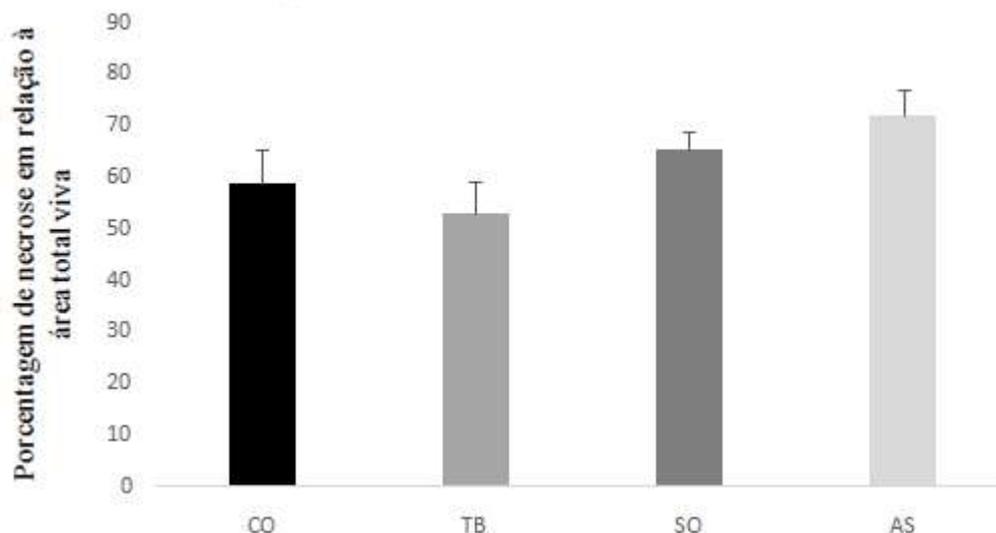
Foi observada correlação inversa entre a massa da neoplasia e a área necrótica (**Figura 13**), ou seja, quanto maior o tamanho da neoplasia, menor a extensão da necrose, independente do tratamento.



**Figura 13:** Correlação da necrose com a massa da neoplasia. O gráfico de dispersão mostra a correlação inversamente proporcional ( $P=Rho=-0,423$ ;  $p=0,003$ ) entre as categorias de necrose e a massa da neoplasia. Cada ponto representa um animal e a linha corresponde à curva de melhor ajuste. CO = Grupo Controle (n = 12), TB = Grupo Tributirina (n = 9), SO = Grupo Sorafenibe (n = 10), AS = Grupo Associação (n = 10).

10), AS = Grupo Associação (n = 10). A correlação foi avaliada pelo teste não paramétrico de Spearman.

Assim, foi realizada uma análise quantitativa da porcentagem de necrose em relação à área viva, onde a TB apresentou valores inferiores ao grupo CO. Já os grupos SO e AS apresentaram valores maiores em relação ao grupo CO (**Figura 14**). No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p \geq 0,05$ ).

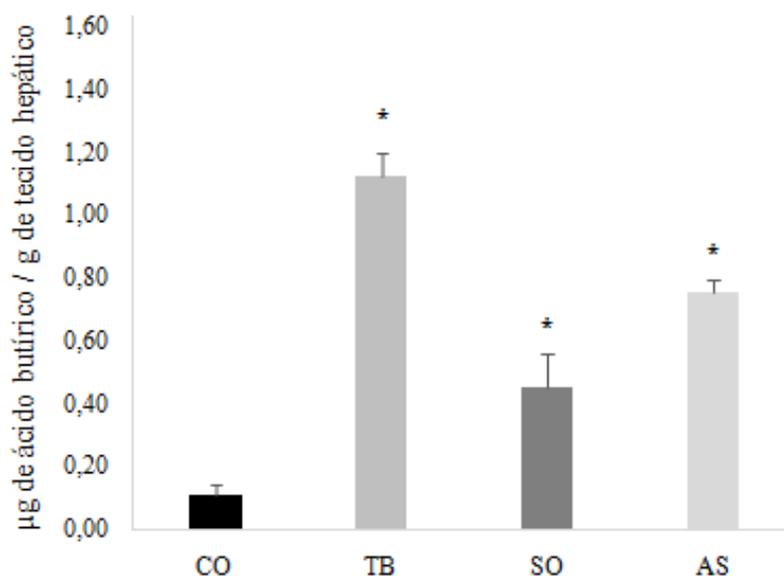


**Figura 14:** Porcentagem de necrose em relação à área viva do corte histológico. CO = Grupo Controle (n=12); TB = Grupo Tributirina (n=10); SO = Grupo Sorafenibe (n=12); AS = Grupo Associação (n=12). Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) segundo teste de ANOVA de uma via.

#### 4.5 Concentração tecidual de AB e SO

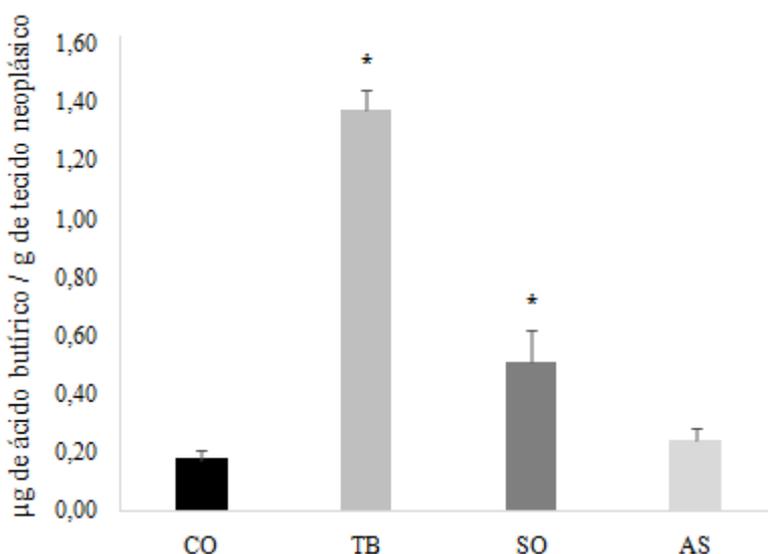
Uma vez que a TB é um pró-fármaco do AB, foi avaliada a concentração tecidual hepática e neoplásica de AB em todos os grupos experimentais.

No fígado, os grupos que receberam TB (grupo TB e AS) apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) concentração tecidual de AB em relação ao grupo CO, como esperado. No entanto, os animais do grupo SO também apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) concentração tecidual de AB quando comparado aos animais do grupo CO (**Figura 15**).



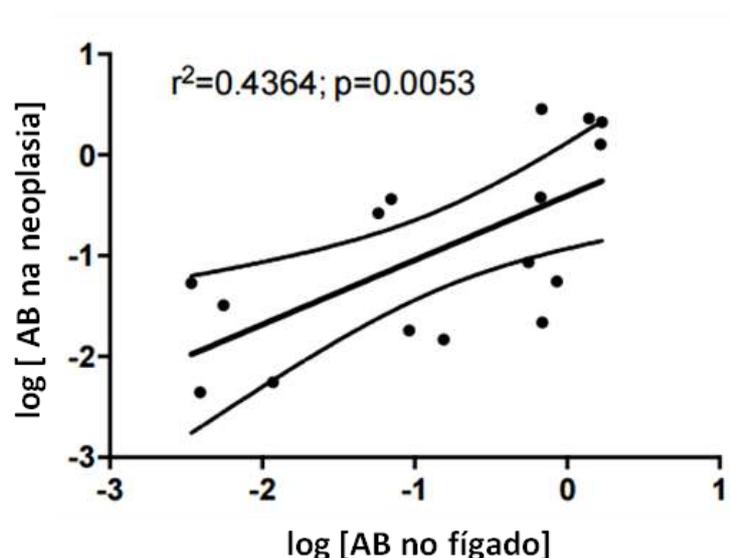
**Figura 15:** Concentração de ácido butírico no fígado de animais dos grupos CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). Os dados foram avaliados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da massa da concentração de ácido butírico no fígado  $\pm$  EPM. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO.

Na neoplasia, os grupos TB e SO apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações teciduais de AB quando comparados ao grupo CO. Porém, não houve diferença ( $p \geq 0,05$ ) na concentração de AB nas neoplasias do grupo AS quando comparadas às do grupo CO (Figura 16).



**Figura 16:** Concentração de ácido butírico na neoplasia. CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). Os dados foram avaliados por GLM (distribuição gama, função de ligação log). As barras representam a média da concentração de ácido butírico na neoplasia  $\pm$  EPM.\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO.

Além disso, em relação à concentração tecidual de AB, foi observada uma correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre ambos os tecidos, ou seja, quanto maior a concentração de AB no fígado, maior a concentração de AB na neoplasia (**Figura 17**).

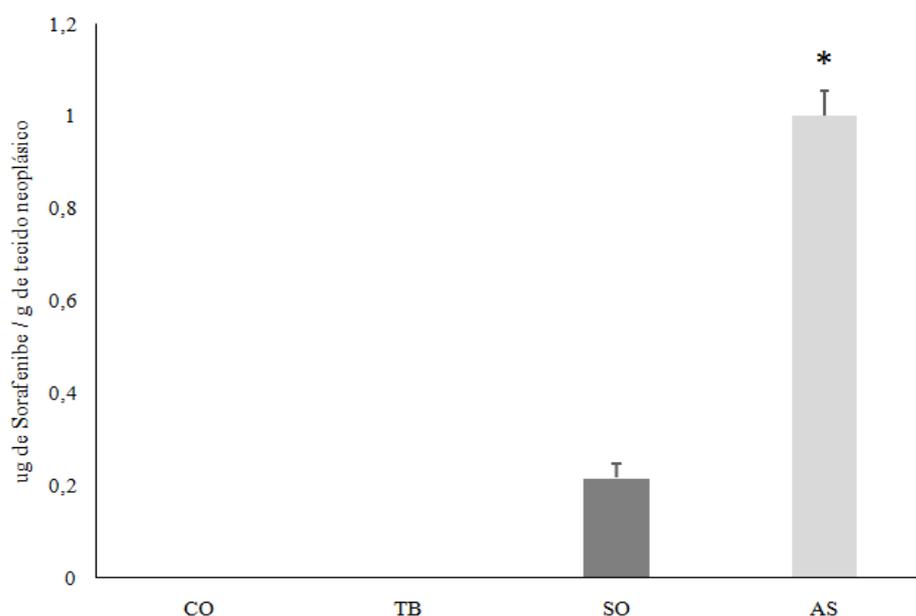


**Figura 17:** Correlação positiva entre a concentração de ácido butírico no fígado e na neoplasia ( $r^2=0,4364$ ;  $p=0,0053$ ). A associação entre as concentrações de AB foi avaliada por correlações de Pearson. Cada ponto representa um animal e a linha reta corresponde a curva linear de melhor ajuste. No gráfico de dispersão se mostram as linhas correspondentes a intervalo de 95% de confiança (CI95).

As diferenças observadas nas concentrações de AB, tanto no fígado quanto na neoplasia em cada tratamento, são independentes das covariáveis p.c., idade, lote e latência ( $p \geq 0,05$ ).

Uma vez obtidos os resultados da concentração de AB no fígado e na neoplasia, esses dados foram adicionados como covariáveis na análise de COX, a fim de avaliar se a concentração tecidual de AB interferiria na massa das neoplasias. Foi observado que esses dados não interferiram no efeito dos tratamentos, ou seja, fica invariável a relação já observada de menor massa das neoplasias nos grupos SO e AS ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao grupo CO. Assim como a diferença não significativa ( $p \geq 0,05$ ) da TB também em relação ao CO.

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 ( $p < 0,05$ ) das concentrações teciduais de SO na neoplasia em relação ao grupo CO. No entanto, o grupo AS apresentou uma concentração tecidual de SO na neoplasia 5 vezes maior do que o grupo SO (**Figura 18**).

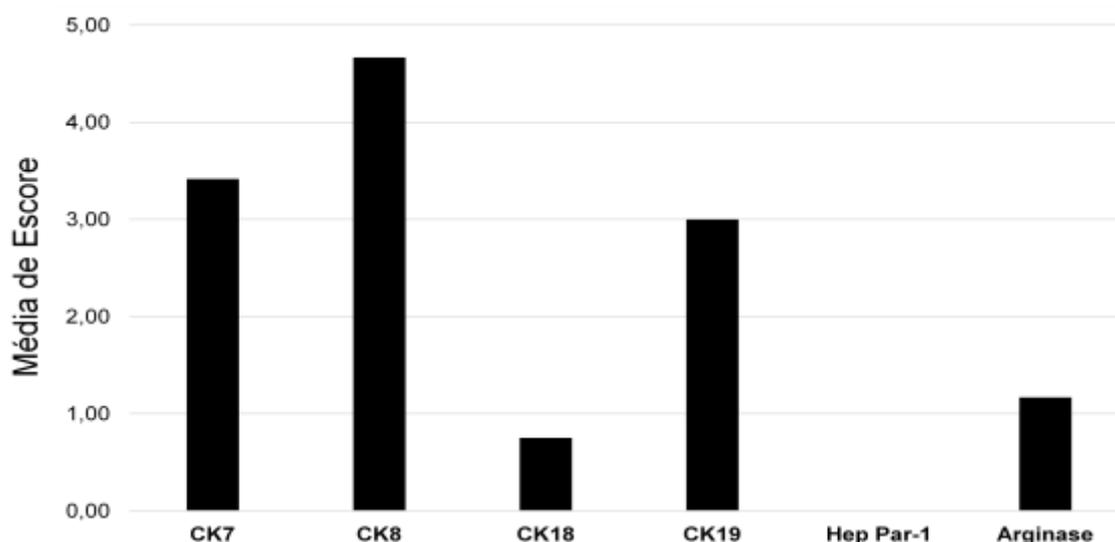


**Figura 18:** Concentração de sorafenibe na neoplasia de animais dos grupos CO = Grupo Controle (n=4), TB = Grupo Tributirina (n=4), SO = Grupo Sorafenibe (n=4), AS = Grupo Associação (n=4). As barras representam a média de µg de SO / g de tecido neoplásico ± EPM. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o grupo SO, segundo Test *t* de Student.

#### 4.6 Avaliação semi-quantitativa de CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase dos animais do grupo CO

Com o propósito de melhor caracterizar as neoplasias de células JM-1, foi realizada análise imunistoquímica semi-quantitativa para avaliação das proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase nos animais do grupo CO (**Figura 19** e **Tabela 3**).

As neoplasias de células JM-1 do grupo CO foram negativas para HepPar-1. No entanto, foram positivas para CK 7 (média do score: 3,42), CK8 (média do score: 4,67), CK18 (média do score: 0,75), CK19 (média do score: 3) e Arginase (média do score: 1,17).



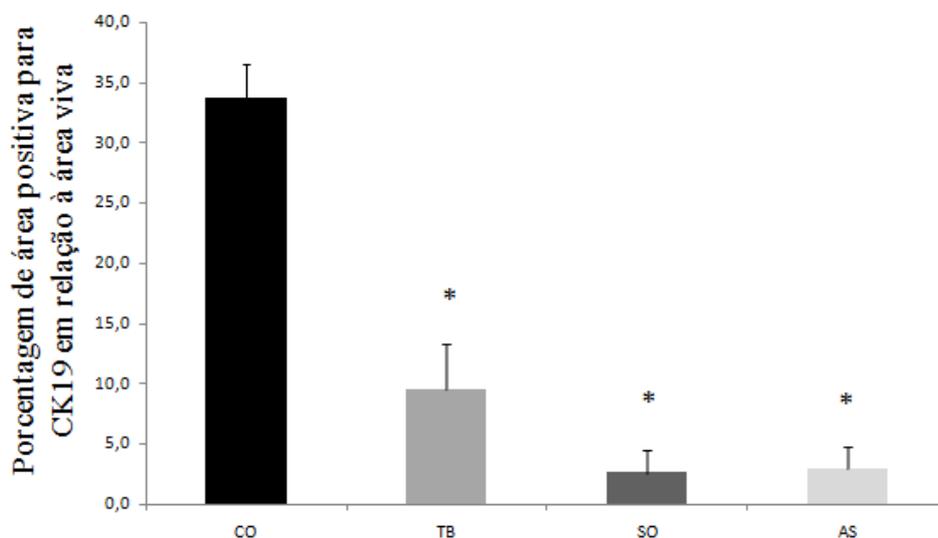
**Figura 19:** Avaliação semi-quantitativa das proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase do grupo CO (n=12). Escore 0 representa 0% de células positivas; escore 1 representa  $\leq$  10% de células positivas; escore 2 representa 11 a 30% de células positivas; escore 3 representa 31 a 50% de células positivas; escore 4 representa 51 a 70% de células positivas e escore 5 representa  $\geq$  71% de células positivas.

**Tabela 3.** Avaliação semi-quantitativa das proteínas CK7, CK8, CK18, CK19, HepPar-1 e Arginase do grupo CO

		CK7 (%)	CK8 (%)	CK18 (%)	CK19 (%)	HepPar-1 (%)	Arginase (%)
Escore	0	0	0	33	0	100	83
	1	0	0	50	0	0	17
	2	8	0	17	16,5	0	0
	3	58	0	0	67	0	0
	4	17	33	0	16,5	0	0
	5	17	67	0	0	0	0

#### 4.7 Marcação imunistoquímica para CK19

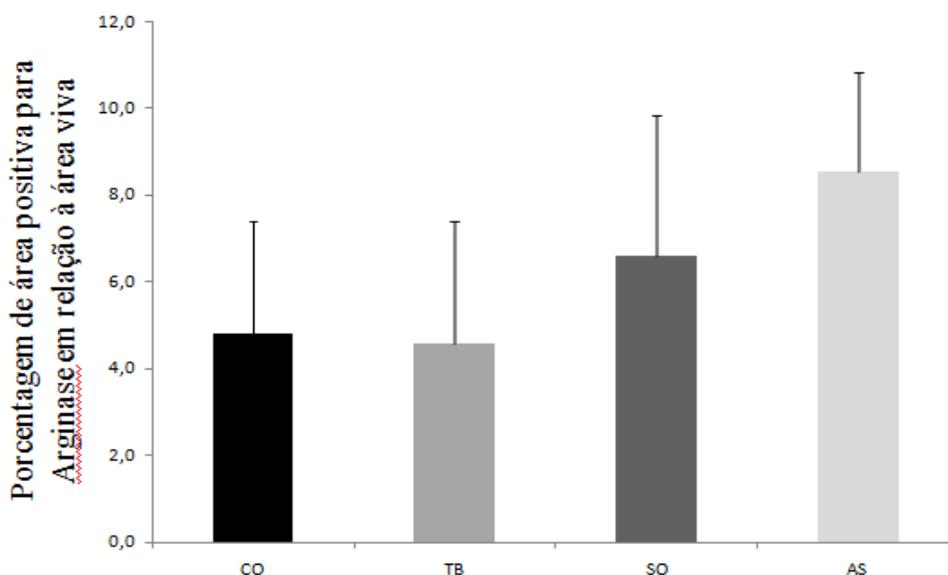
Foi realizada análise quantitativa de CK19 em todos os grupos experimentais. Os tratamentos com TB, SO e AS apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) porcentagem de área positiva para CK19 em relação ao grupo CO (**Figura 20**).



**Figura 20:** Porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para CK19 em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### 4.8 Marcação imunistoquímica para Arginase

Os grupos SO e AS apresentaram aumento na porcentagem de área positiva para Arginase, sendo que o tratamento com SO aumentou a marcação de Arginase em 37,55 e AS em 77%. No entanto, esses dados não foram estatisticamente significantes ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 21).

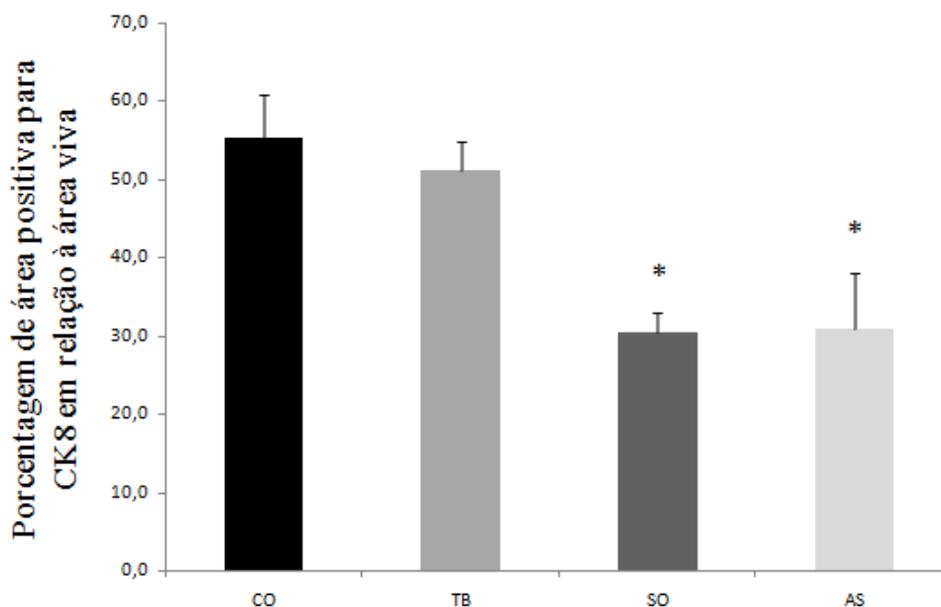


**Figura 21:** Porcentagem de área positiva para Arginase em relação à área viva. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo

Associação (n=6). As barras representam a média da porcentagem de área positiva para Arginase em relação à área viva  $\pm$  EPM. Foi realizado teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.9 Marcação imunoistoquímica para CK8

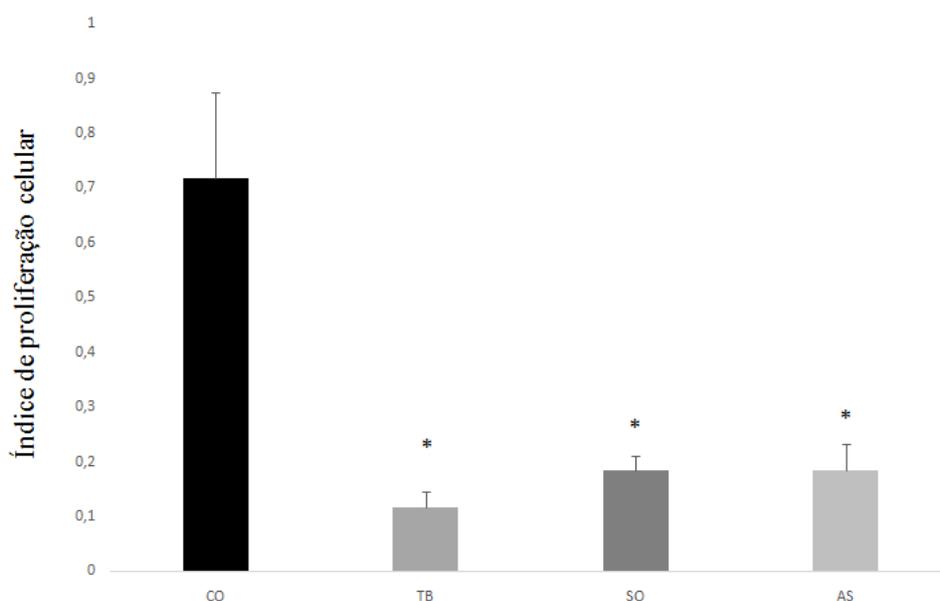
Os tratamentos com SO e AS reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de área positiva para CK8 em relação ao grupo CO. O grupo TB não apresentou diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) em relação ao CO (**Figura 22**).



**Figura 22:** Porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para CK8 em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### 4.10 Análise da Proliferação celular

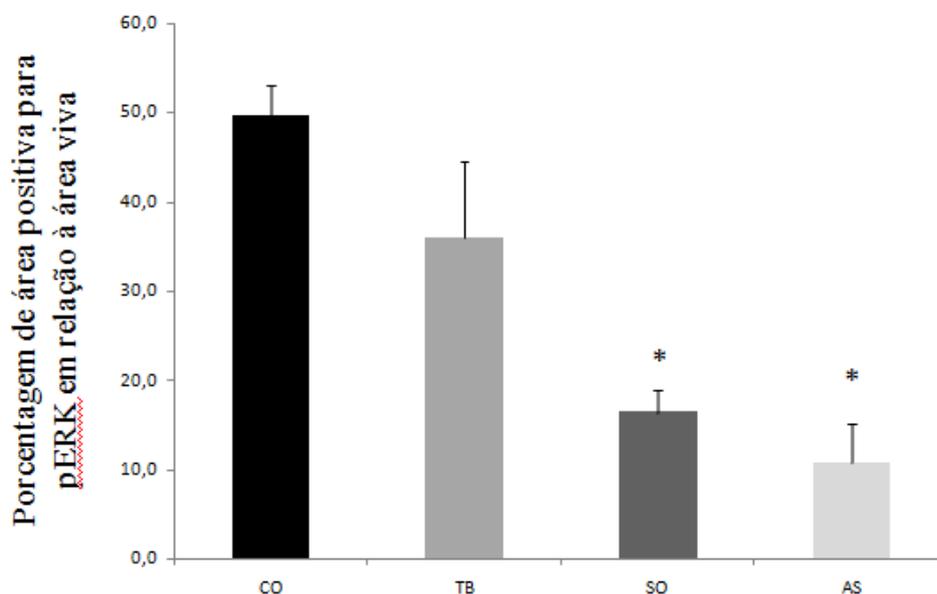
A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente corados) (FOLEY et al., 1993). Os grupos TB, SO e AS apresentaram ( $p < 0,05$ ) menor índice de proliferação celular em relação ao grupo CO, sendo que essa redução foi de 84% após tratamento com TB e de 74% após administração de SO e AS (**Figura 23**).



**Figura 23:** Índice de proliferação celular. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de proliferação celular ± EPM.\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### 4.11 Marcação imunoistoquímica para pERK

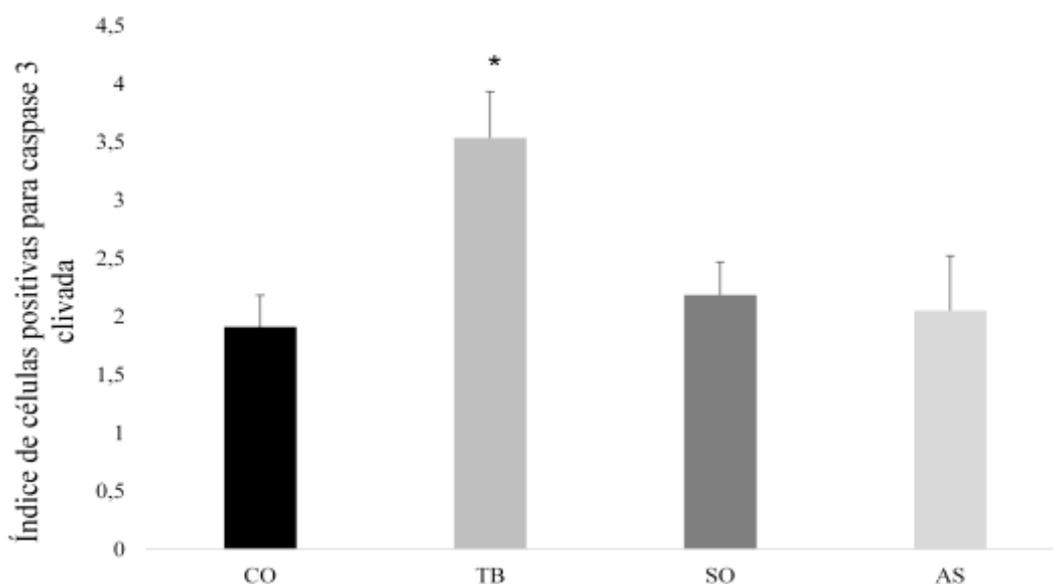
Em relação à área positiva para pERK, os tratamentos com SO e AS reduziram ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de área positiva em relação a área total viva quando comparados ao CO, sendo que o grupo SO apresentou redução de 67% e o grupo AS de 78%. A redução de pERK pelo grupo TB não foi estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) (**Figura 24**).



**Figura 24:** Porcentagem de área positiva para pERK em relação à área viva. 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 da porcentagem de área positiva para pERK em relação à área viva  $\pm$  EPM \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### 4.12 Marcação imunoistoquímica para Caspase 3 clivada

Os animais tratados com TB apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) índice de células positivas para caspase 3 clivada em relação aos animais do grupo CO. Os grupos SO e AS não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) em relação ao grupo CO (Figura 25).

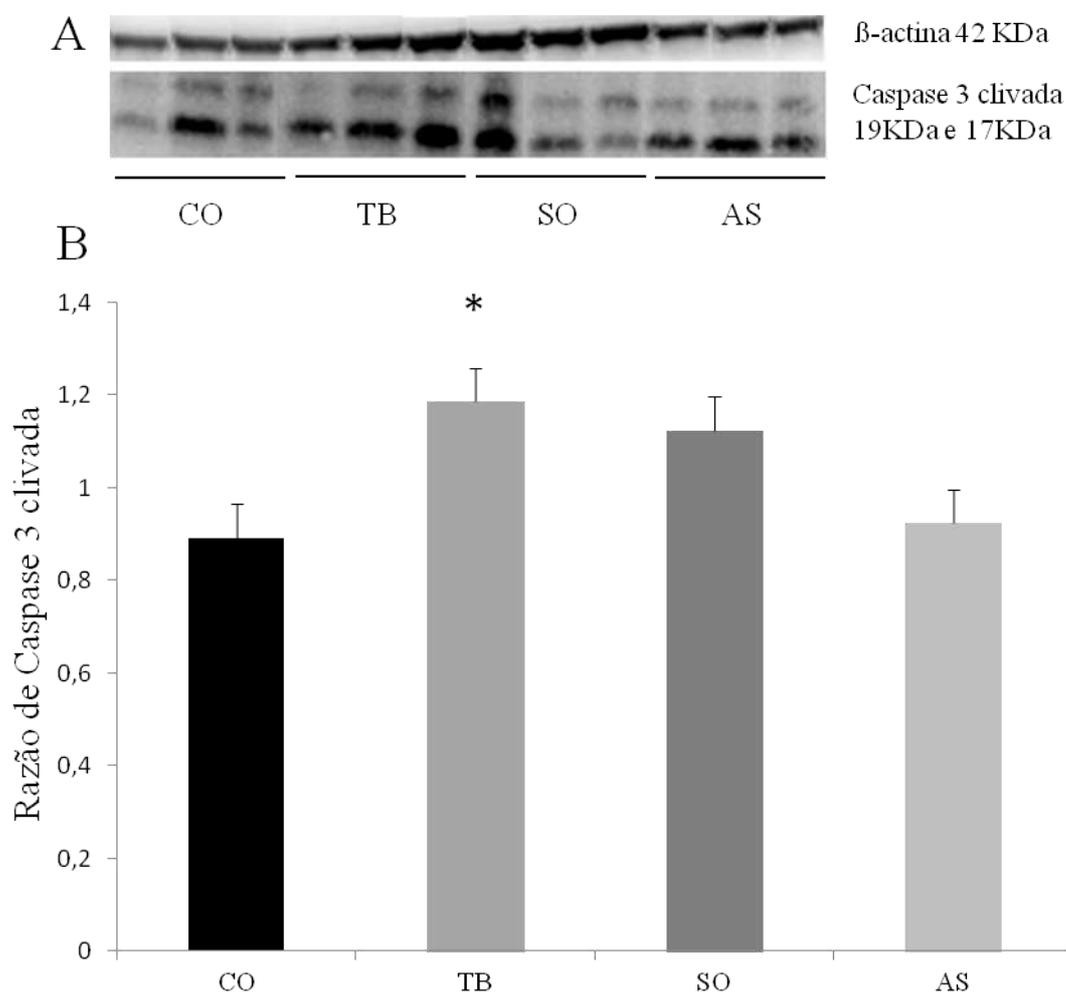


**Figura 25:** Índice de células positivas para caspase 3 clivada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de células positivas para caspase 3 clivada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ), segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

#### 4.13 Western blot para Caspase 3 clivada

Além da caspase 3 clivada ser avaliada pela técnica de imunoistoquímica, também foi avaliada por Western Blot. Nesse estudo, o grupo TB apresentou maior ( $p < 0,05$ ) concentração de caspase 3 clivada quando comparado com o grupo CO. Já os grupos SO e a AS não apresentaram diferenças ( $p \geq 0,05$ ) em relação ao grupo CO (Figura 26). As

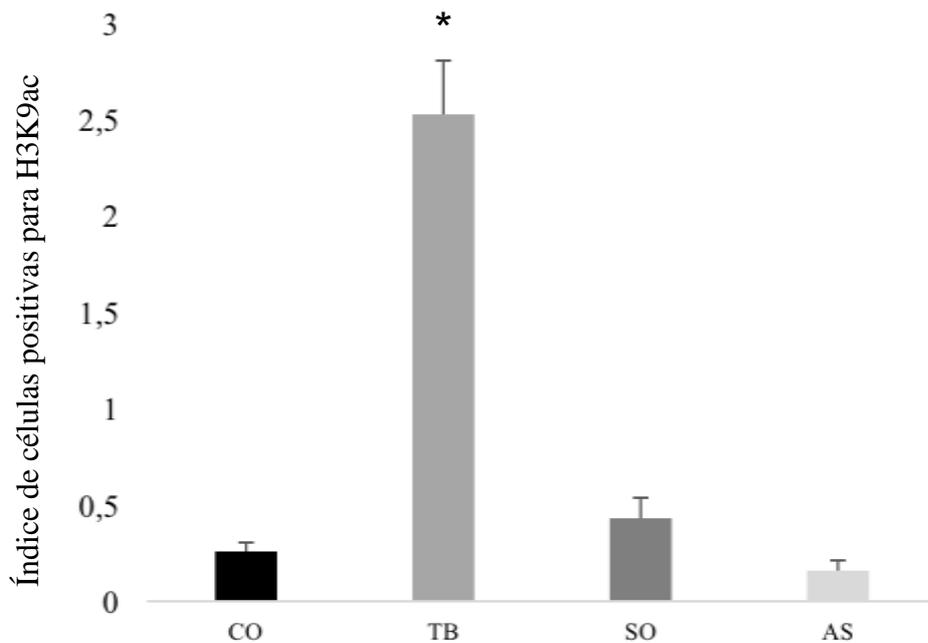
covariáveis p.c., idade, lote e latência não interferiram estatisticamente com o efeito dos tratamentos, assim, não foram necessários ajustes.



**Figura 26:** Expressão em nível proteico de caspase 3 clivada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). **(A)** *Imunoblots*. As concentrações de caspase 3 clivada foram normalizados pela expressão da  $\beta$ -Actina. **(B)** Razão de caspase 3 clivada em relação a  $\beta$ -Actina. As barras representam a média da razão de caspase 3 clivada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ) avaliada por GLM.

#### 4.13 Marcação imunoistoquímica para H3K9 acetilada

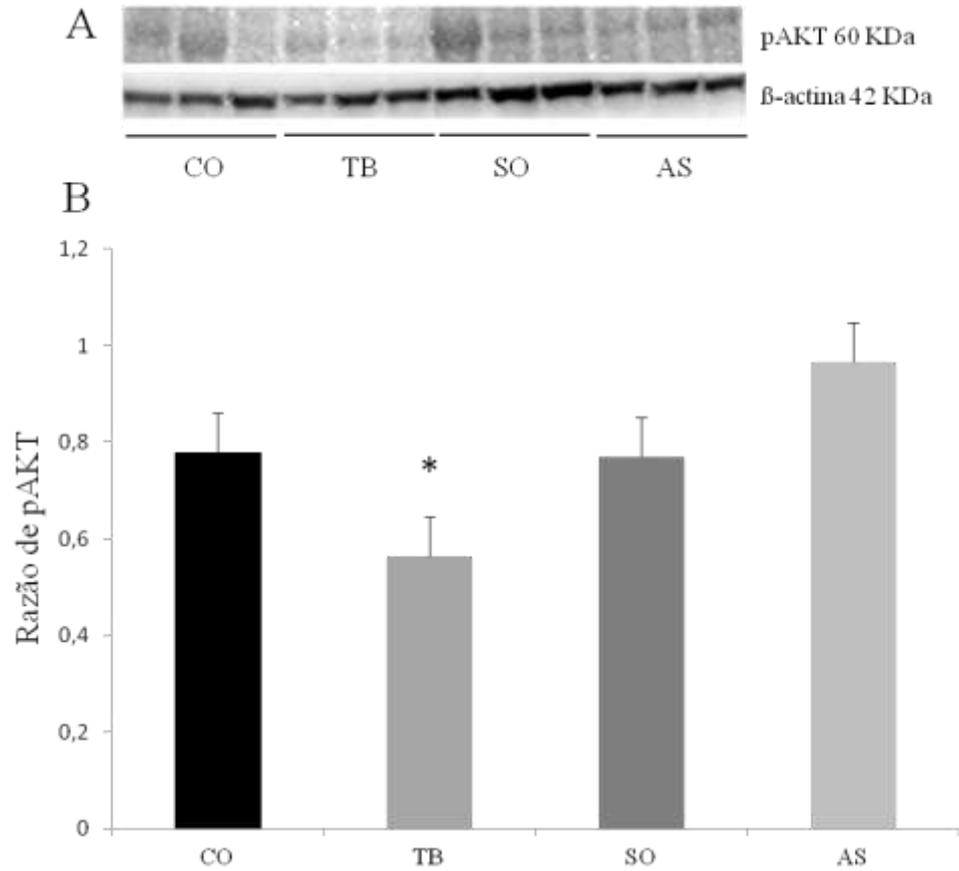
Os animais tratados com TB apresentaram maior índice de células positivas para H3K9 acetilada ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CO. Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) dos grupos SO e AS quando comparados ao grupo CO (**Figura 27**).



**Figura 27:** Índice de células positivas para H3K9 acetilada. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). As barras representam o índice de células positivas para H3K9 acetilada  $\pm$  EPM. \* Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ), segundo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn.

#### 4.14 Western Blot para pAKT

Os animais tratados com TB apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) expressão em nível proteico de pAKT Ser473 quando comparada com os animais do grupo CO. Nesse sentido, os grupos SO e a AS não apresentaram diferenças ( $p \geq 0,05$ ) em relação ao grupo CO (**Figura 28**).



**Figura 28:** Expressão em nível proteico de pAKTSer 473. CO = Grupo Controle (n=6), TB = Grupo Tributirina (n=6), SO = Grupo Sorafenibe (n=6), AS = Grupo Associação (n=6). **(A)** Imunoblots. As concentrações de pAKT (Ser 473) foram normalizados pela expressão da β-Actina. **(B)** Razão de pAKT em relação a β-Actina. As barras representam a média da razão de pAKT ± EPM. \*Diferença em relação ao CO ( $p < 0,05$ ) avaliada por GLM.

## 5. Discussão

Apesar do grande número de estudos referente ao tratamento do HCC, não existe uma terapia sistêmica efetiva para pacientes com essa doença em estágio avançado (ZANG, 2010). Além disso, o HCC é frequentemente acompanhado de uma disfunção hepática, o que dificulta a metabolização de fármacos (CIDON, 2017).

O tratamento farmacológico de primeira escolha para o HCC avançado é o SO, um quimioterápico inibidor de multiquinases (WILHELM *et al.*, 2008). No entanto, é considerado um tratamento paliativo, uma vez que é capaz de aumentar a sobrevida de pacientes em apenas 3 meses (LLOVET *et al.*, 2008; GAUTHIER e HO, 2013).

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, este último 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 e 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 JM-1 em ratos *Fischer-344*. Essas células foram isoladas de HCC primário de ratos *Fischer-344*, constituindo assim um implante singênico. Além disso, a sensibilidade das mesmas à ação quimioterápica do SO já foi comprovada em estudos anteriores (WEI *et al.*, 2010).

Os resultados macroscópicos desse experimento comprovam que tanto o tratamento com SO quanto com a AS foram capazes de retardar o crescimento da neoplasia e reduzir a massa neoplásica, apresentando efeito quimioterápico 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 e CHIEN, 2002; WILHELM, 2004).

Em neoplasias de fígado, constatou-se 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 no flanco de 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 (WEI *et al.*, 2010). Assim, os resultados de evolução e massa da neoplasia do presente experimento estão de acordo com a literatura onde se conclui que tratamento com SO é eficaz na redução do crescimento da neoplasia e, neste experimento, a associação de TB e SO apresentou atividade anticarcinogênica semelhante ao SO.

Também foi avaliada neste estudo a porcentagem de animais que atingiram o final do período de observação, uma vez que as neoplasias atingiam frequentemente o volume limite proposto pelo comitê de ética antes do fim do período do estudo. Assim, os animais foram eutanasiados no decorrer do experimento. Foi constatado que os tratamentos com TB e SO, quando administrados isoladamente, foram capazes de aumentar a sobrevida dos animais. Além disso, quando estes compostos foram administrados em associação, a taxa de animais que atingiram o final do período de observação do estudo foi de 100%, um aumento de 12,5 vezes em relação aos animais do grupo CO.

Estudos da associação do SO com outros tratamentos vêm sendo realizados a fim de aumentar a sobrevida do paciente. Quando associado à quimioembolização transarterial, foi observado um aumento de 80% (18 meses) na média de sobrevida dos pacientes em relação aos que foram tratados apenas com quimioembolização (HUANG *et al.*, 2017). O resultado da porcentagem de animais que atingiram o fim do período de observação, desse experimento, sugere que o tratamento com a associação de TB e SO poderia melhorar a sobrevida dos animais. Dessa forma, propõe-se que a ação da associação entre a TB e SO na sobrevida dos animais com HCC poderia ser um mecanismo a ser melhor explorado.

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi a necrose. 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 (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 não interferiram significativamente com a porcentagem de área necrótica da neoplasia. No entanto, os resultados de correlação entre a massa da neoplasia e a área necrótica demonstram uma correlação negativa, ou seja, quanto menor a área da neoplasia maior a extensão da necrose. Esse resultado foi independente do tratamento administrado. Assim, sugere-se que, neste modelo, a necrose possa ter contribuído para a redução das neoplasias.

Também foram avaliadas as concentrações teciduais dos tratamentos. 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 JM-1 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.

No entanto, os resultados da concentração tecidual de AB na neoplasia apresentam um padrão diferente do fígado. Os grupos TB e SO apresentam maiores concentrações teciduais de AB na neoplasia em relação ao grupo CO, porém os animais tratados com a

AS não apresentaram diferença quando comparados aos animais do grupo CO. Assim, é possível que o SO presente no grupo AS interfira na disponibilidade do AB para a neoplasia e que a atividade anticarcinogênica observada no grupo AS, seja apenas proporcionada pelo tratamento com SO. No entanto, são necessários mais estudos para melhor avaliar essa eventualidade.

Foi também determinada nesse estudo a concentração tecidual de SO na neoplasia e, como esperado, os animais tratados com SO e AS apresentaram maiores concentrações teciduais de SO na neoplasia em relação aos animais do grupo CO. No entanto, o grupo AS apresentou cinco vezes mais SO na neoplasia do que o grupo SO. Assim, sugere-se que o AB, produto da clivagem de TB no intestino, tenha um papel crucial no aumento das concentrações teciduais de SO na neoplasia, uma vez que, o AB poderia aumentar a permeabilidade intestinal (CANANI *et al.*, 2011) e a solubilidade do SO é maior em pH ácido (KEATING e SANTORO, 2009).

O AB é produto da fermentação de fibras alimentares por bactérias intestinais. Dessa forma, a redução de bactérias intestinais leva à redução na produção de AB. Foi comprovado que a coadministração de SO e Neomicina, antibiótico que causa alterações na microflora gastrointestinal, reduziu a exposição média de SO em 54% (JAIN *et al.*, 2011). Assim, especula-se que a redução da exposição média de SO quando coadministrado com Neomicina seja devido às baixas concentrações de AB no intestino, reduzindo assim a permeabilidade intestinal e/ou a solubilidade do SO.

Além disso, a TB pode ser utilizada como veículo para solubilização de fármacos (KANG *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou que a solubilidade de determinados fármacos tende a ser maior com triacilgliceróis de cadeia curta em comparação aos de cadeia média e longa (BUYUKOZTURK *et al.*, 2010). Quando associada ao Celecoxib, a solubilidade deste em emulsão de TB foi de aproximadamente 39,6, 8,5 e 9,7 vezes maior do que a do óleo de soja, o óleo de rícino e Labrafac® (emulsão lipídica utilizada como veículo para fármacos), respectivamente (KANG *et al.*, 2012).

Levando-se em conta a semelhança na solubilidade das moléculas de SO e Celecoxib, é provável que a coadministração de SO e TB aumente a solubilidade do SO. Nesse sentido, sugere-se no presente estudo que a TB possa ter aumentado a solubilidade do SO e/ou a permeabilidade intestinal, aumentando assim, a absorção e biodisponibilidade do SO. Além disso, sugere-se que a associação de TB e SO permita que as mesmas concentrações efetivas de SO alcancem à neoplasia com a administração de uma menor dosagem de SO.

Outro fator interessante da associação da TB com o SO que se pretende avaliar em futuras análises é a relação de AB e CYP3A4. A CYP3A4 é uma enzima do citocromo P450 presente em células intestinais e hepáticas. É considerada a principal enzima envolvida na metabolização do SO e formação do metabólito SO N-óxido, metabólito ativo com potencial ainda maior do que o fármaco original. Foi observado que a ação de HDACi do AB é capaz de ativar a transcrição de CYP3A4 em células intestinais *caco*. Assim, dados da literatura sugerem que além da associação de TB e SO poder aumentar a solubilidade do SO e/ou permeabilidade intestinal, existe a possibilidade de que esta associação aumente a metabolização desse fármaco, gerando um metabólito mais ativo do que o fármaco original (GHASSABIAN *et al.*, 2012).

A fim de melhor caracterizar as neoplasias de células JM-1, foram inicialmente realizadas análises imunoistoquímicas nas neoplasias dos animais do grupo CO. Os resultados demonstram expressão característica de neoplasias pouco diferenciadas, uma vez que não há a expressão de HepPar-1, marcador de diferenciação celular (SHIRAN, 2006) e pouca expressão de Arginase, também considerado um marcador de diferenciação celular, porém mais sensível que HepPar-1 em HCCs pouco diferenciados (YAN, 2010). Além disso, observou-se que as neoplasias foram positivas para CK7, CK8, CK18, e CK19, combinação de marcadores presentes em células progenitoras hepáticas (FELDSTEIN e GORES, 2004).

Além da caracterização das neoplasias do grupo CO, foi realizada análise imunoistoquímica quantitativa para as proteínas CK19, Arginase e CK8. 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 em células hepáticas progenitoras e colangiócitos. 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. 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 positivas ou 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 de células JM-1 apresentavam escore de 3+ 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). Além disso, 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 pacientes 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 induzem a diferenciação celular são de extrema importância para o prognóstico do paciente. No presente estudo, o tratamento com TB reduziu a expressão de CK19 em mais de 70% em relação ao grupo CO, enquanto que os tratamentos com SO e AS reduziram a expressão de CK19 em mais de 90%. Dessa forma, pode-se concluir a partir destes resultados que os tratamentos com TB e SO são capazes de reduzir a expressão de CK19 quando administrados isoladamente e em associação, talvez melhorando assim o prognóstico da doença.

Além da CK19, foi avaliada a proteína Arginase, sendo esta considerada um marcador de diferenciação celular (YAN *et al.*, 2010). Os grupos SO e AS apresentaram aumento nos níveis de Arginase. No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Esse dado, em conjunto com os resultados relativos à redução de CK19, sugere que os grupos SO e AS estejam aumentando a diferenciação celular nas neoplasias.

A indução da diferenciação celular é considerada um mecanismo importante para o controle do câncer (HEIDOR *et al.*, 2012). Agentes diferenciadores celulares são usados no tratamento de neoplasias malignas humanas há décadas (MARKS, RICHON, RIFKIND, 1996). O mecanismo fundamental dessa abordagem é fazer com que vias

genéticas de maturação e diferenciação voltem a ser ativas em células neoplásicas pouco diferenciadas, revertendo assim seu fenótipo maligno (GUAN *et al.*, 2000).

Demonstrou-se que o butirato de sódio é capaz de induzir a diferenciação celular em várias linhagens transformadas, como por exemplo: células K562 e HL60 de leucemia, células U138B de glioblastoma humano (ENGELHARD, DUNCAN, DAL CANTO, 1997; ENGELHARD *et al.*, 2001), células PANC1 de carcinoma pancreático (WITT *et al.*, 2001), células HT-29 de câncer colorretal (WITT *et al.*, 2001; GASCHOTT *et al.*, 2001), células SKG-IIIa de câncer cervical uterino de (NOZAWA *et al.*, 1983), células de câncer de próstata humano (MAIER *et al.*, 2000), células de câncer de mama (FOTOVATI *et al.*, 2011) e células PLC/PRF/5 de hepatoma (OGAWA *et al.*, 2004).

Assim como o AB, a TB também é um agente indutor de diferenciação celular (HEIDOR *et al.*, 2012). Em células HL60 de leucemia, a TB foi três vezes mais eficaz em induzir a diferenciação celular do que o AB (CHEN e BREITMAN, 1994). Além disso, a TB induziu a diferenciação fenotípica em células LS 174T de câncer de cólon (SCHRÖDER e MAURER, 2002) e PC-3 de próstata (MAIER *et al.*, 2000).

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 e WEISS, 2002). 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 e PACKEISEN, 2006) e carcinomas do trato urinário (SOUTHGATE e 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 e CADRIN, 2013), adesão celular (GALARNEAU *et al.*, 2007) e resistência a fármacos (FORTIER, ASSELIN e CADRIN, 2013; WANG *et al.*, 2008), sendo, portanto, associada a um mau prognóstico (FILLIES, WERKMEISTER e PACKEISEN, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não estão bem estabelecidos.

No presente estudo, o grupo CO apresentou média de 55% de área positiva para CK8 e os tratamentos com SO e AS foram capazes de reduzir significativamente os níveis de CK8 em 45%. Esses dados sugerem que a marcação de CK8 possa estar relacionada a um mau prognóstico do HCC, e os tratamentos com SO e AS poderiam reverter o prognóstico da doença.

Em se tratando de carcinogênese, 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 no HCC (SAITO *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1998).

Em estudos *in vivo*, embora sem diferença estatisticamente significativa, observou-se que a TB também reduziu o índice de proliferação celular em LPN quando administrada continuamente 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 demonstrado. Estudos *in vitro* evidenciaram a eficácia do tratamento com SO em reduzir a proliferação celular em células neoplásicas ATC de tireoide (SALVATORE *et al.*, 2006), células EOL-1F, MV4;11 e RS4-11 de leucemia (AUCLAIR *et al.*, 2007), células MDA-MB-231 de neoplasia de mama (WILHELM *et al.*, 2006), células LNCaP, PC3 e LNCaP-IL6C de neoplasia de próstata (WILHELM *et al.*, 2012), células UACC 903 de melanoma (SHARMA *et al.*, 2005), SK-MEL 2, SK-MEL 28 e A2058 (WILHELM *et al.*, 2008) e células HepG2 (WILHELM *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005) e PLC/PRF/5 de HCC (LIU *et al.*, 2005).

Neste experimento o tratamento com TB reduziu o índice de proliferação celular em 84% e os tratamentos com SO e AS em 74%, comprovando o efeito antiproliferativo destes compostos *in vivo*. Sugere-se que a não potencialização da resposta do grupo AS em relação ao grupo SO se deva ao não aumento da concentração tecidual de AB na neoplasia.

A via MAPK é uma das vias que desempenha um papel crítico no desenvolvimento do HCC (LIU *et al.*, 2006) por estar relacionada a processos como proliferação celular, angiogênese, tumorigênese (WILHELM *et al.*, 2004) e a resistência a quimioterapias (ZHANG *et al.*, 2009). Assim, a inibição da cascata MAPK representa uma abordagem interessante no tratamento do HCC (LIU *et al.*, 2006). O SO é um inibidor de multiquinases, sendo que sua eficácia quimioterápica está intimamente relacionada à inibição da via MAPK (ZHANG *et al.*, 2009).

O HCC pode ser originado a partir de vários tipos de mutações. Portanto, são encontradas diferentes concentrações de pERK entre os diversos tipos de 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 portadores de HCC com elevadas concentrações de pERK apresentaram maior tempo de sobrevida em relação aos pacientes portadores de HCC com concentrações de pERK reduzidas. Esses dados sugerem que neoplasias com maiores níveis de pERK são mais sensíveis ou responsivas ao SO (ABOU-ALFA *et al.*, 2006). Assim, autores relatam que a expressão de pERK poderia ser um biomarcador preditivo de sensibilidade do HCC ao tratamento com SO (ZHANG *et al.*, 2009).

No presente estudo, todas as neoplasias do grupo CO foram positivas para pERK, sendo que a média da porcentagem de área positiva foi de 50%. Dessa forma, de acordo com a literatura, esse resultado sugere que essa neoplasia poderia ser sensível à ação quimioterápica do SO. Além disso, a linhagem celular JM-1 já foi utilizada em modelos de xenoenxerto e tratadas com SO em estudos anteriores e mostrou-se sensível à ação do fármaco (WEI *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram que o SO é capaz de inibir pERK em células UACC 903 (SALOMONI *et al.*, 2007), LOX (WILHELM *et al.*, 2004), WM-266-4, Colo829 e A375 de Melanoma (KARASARIDES *et al.*, 2004), células ATC de neoplasia de tireoide (SALVATORE *et al.*, 2006), células Bx PC de neoplasia de pâncreas (WILHELM *et al.*, 2004), células U937 de leucemia (RAHMANI *et al.*, 2005), células MDA-MB-231 de neoplasia de mama (WILHELM *et al.*, 2004), células HepG2 (ADNANE *et al.*, 2005) e PLC/PRF/5 de HCC (LIU *et al.*, 2005).

Em modelos *in vivo* de xenoenxerto, o SO foi capaz de reduzir a fosforilação de ERK em neoplasia de cólon originada de implante de células HT-29 (WILHELM *et al.*, 2004), neoplasias de melanoma originadas de implante de células UACC 903 e 1205 Lu (SHARMA *et al.*, 2005) e HCC originado de implante de células humanas PLC/PRF/5 (LIU *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com SO é capaz de reduzir a fosforilação de ERK em neoplasias hepáticas ortotópicas de células JM-1 (WEI *et al.*, 2010).

No entanto, o tratamento com SO não alterou a fosforilação de ERK em neoplasias renais originadas de implantes com células humanas 786-O ou Renca (CHANG *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2007) e neoplasias de cólon originadas de implantes de células Colo-205 (LLOVET *et al.*, 2008). Neste experimento, o tratamento com SO foi capaz de reduzir

a fosforilação de ERK em 67% e o tratamento com a AS em 78%. Assim, conclui-se que o tratamento com SO e com a AS é eficaz em inibir a via MAPK, via que tem importante ação na proliferação celular, angiogênese e inibição da apoptose. Assim, é provável que com a inibição da via MAPK haja conseqüente inibição desses processos.

Um dos parâmetros importantes a ser estudado para avaliação da eficácia da quimioterapia é a indução da apoptose. 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). Ela 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 programada (GRIVICICH; REGNER e ROCHA, 2007).

Foi demonstrado em estudos anteriores que o tratamento com AB em células de câncer de cólon induziu apoptose via ativação de caspase 3 (MANDAL, ADAM e KUMAR 1999). Além disso, foi descrito que a ação pró-apoptótica da TB também se dá via ativação de caspase 3 em células neoplásicas de cólon (CLARKE, FEINMAN e 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*.

Uma vez constatado que a indução da apoptose pelo AB e TB se dá por ativação de caspase 3, é provável que o resultado do não aumento de caspase 3 clivada observado no grupo AS seja devido ao não aumento das concentrações de AB na neoplasia nesse grupo. Apesar do tratamento com SO aumentar os níveis de caspase 3 clivada em 25% pela análise de *Western Blot* a diferença não foi estatisticamente significativa.

Em relação à acetilação da histona H3K9, o grupo TB apresentou maior índice de células positivas em comparação ao grupo CO. Esse resultado está de acordo com a literatura, onde estudo anterior do nosso grupo demonstrou, de forma inédita, que animais tratados com TB apresentam aumento no grau de acetilação da histona H3K9 e que esse evento poderia modular a expressão de diversos genes supressores de tumor (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009). Os animais tratados com SO e AS não apresentaram

diferenças em relação aos animais do grupo CO. O não aumento de acetilação da histona H3K9 no grupo AS, assim como o resultado de caspase 3 clivada, se deve, provavelmente, ao não aumento das concentrações teciduais de AB na neoplasia neste grupo.

Um fator limitante da utilização da quimioterapia e que deve ser considerado é a resistência induzida pelo fármaco a ser empregado. Células neoplásicas expostas ao tratamento com SO por longos períodos desenvolvem resistência à indução da apoptose. Essa resistência foi relacionada ao aumento de pAKT. Assim, células neoplásicas resistentes ao SO apresentaram níveis elevados de pAKT Ser 473 e concentrações reduzidas de fosfatase homóloga a tensina (PTEN) (CHEN *et al.*, 2011).

Em um estudo anterior com HCC, observou-se que a redução dos níveis de PTEN e o aumento da ativação de AKT estão relacionados à progressão do câncer (ZHOU; HUANG; WANG, 2009). Nesse sentido, foi observado que as concentrações de PTEN estavam reduzidas enquanto que as concentrações de pAKT estavam aumentadas em focos pré-neoplásicos, adenomas e carcinomas (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Por outro lado, constatou-se que a inativação de AKT poderia resultar em apoptose (SILINS; HÖGBERG; STENIUS, 2006). Desta forma, observou-se que o tratamento com o butirato de sódio reduziu os níveis de pAKT e induziu a apoptose em células HeLa de câncer cervical (CHEN; GHAZAWI; BAKKAR, 2006). Dados ainda não publicados por nosso grupo demonstraram que a TB aumentou a expressão em nível proteico de PTEN em LPN hepáticas de ratos *Wistar*, sugerindo à inativação de AKT. Assim, os dados deste experimento estão de acordo com a literatura, onde a TB reduziu os níveis de pAKT, sugerindo que o tratamento com TB poderia, pela via do AKT, reduzir a proliferação celular e induzir a apoptose. Além de prevenir uma eventual resistência quimioterápica.

Além disso, o não aumento de pAKT no grupo SO em relação ao grupo CO sugere que a dosagem e o tempo de tratamento não foram suficientes para induzir resistência à quimioterapia. A não inibição de pAKT no grupo AS se deve, eventualmente, as concentrações reduzidas de AB na neoplasia, assim como ocorreu com os resultados de caspase 3 clivada e acetilação da histona H3K9, alvos da ação antineoplásica da TB. Assim, como as concentrações de AB estão aumentadas no fígado, a TB poderia reduzir uma eventual resistência do SO em modelos de neoplasias hepáticas ortotópicas. Além de, eventualmente, potencializar a eficácia antineoplásica do SO, uma vez que este estudo demonstrou que os compostos agem por mecanismos diferentes.

## 6. Conclusão

Os implantes de células JM-1 no flanco de ratos *Fischer-344* originaram neoplasias com características que lembram a organização hepatocítica de um HCC convencional. O tratamento com TB apresentou atividade antineoplásica, reduzindo a proliferação celular e induzindo apoptose. Os tratamentos com SO e AS apresentaram atividade semelhante em relação ao aumento da sobrevida dos animais, retardo no desenvolvimento e redução da massa das neoplasias, indução da diferenciação e redução da proliferação celular, melhorando o prognóstico da doença. Além disso, a coadministração de SO e TB (grupo AS) foi capaz de aumentar a biodisponibilidade do SO para a neoplasia.

## 7. Referências

ABOU-ALFA, G. K. et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 26, p.4293-300. 2006.

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

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. et al. Stem cell origins and animal models of hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 55, p. 1241-1250, 2010.

AUCLAIR, D. et al. Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia*; v. 21, p. 439–45. 2007.

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.

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. et al. 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.

BRUIX, J. et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *Journal of Hepatology*, v. 57, p. 821-829, 2012.

BUYUKOZTURK, F.; BENNEYAN, J. C.; CARRIER, R. L. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J. Control Release*, v. 142, p. 22–30. 2010.

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.

CHANG, Y. S. et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 59, p. 561–74, 2007.

CHEN, J. et al. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Molecular Cancer*, v. 5, n. 71, p. 1-11, 2006.

- CHEN, Y. L. et al. Sorafenib inhibits transforming growth factor b1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology*, v. 53, p. 1708–18, 2011.
- CHEN, Z. X.; BREITMAN, T. R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Research*, v. 54, n. 13, p. 3494-9, 1994.
- CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K. L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular Signalling*, v. 15, p. 463-469, 2003.
- CHU, P. G.; WEISS, L. M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, v. 40, p. 403–39.2002
- CIDON, E. U. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: past, present and future. *World Journal of Hepatology*, v. 9, n.18, p. 797-807. 2017.
- 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. *Clinical Chimica Acta*, v. 181, n. 3, p. 255-63, 1989.
- DE CONTI, A. et al. 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.
- DRUESNE, N. et al. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 7, p. 1227-36, 2004.
- 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. et al. The clinic pathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*, v. 49, p. 138-151.2006.
- 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.
- 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.
- FELDSTEIN, A. E.; GORES G. J. An apoptosis biomarker goes to the HCV clinic. *Hepatology*, v. 40, n. 5, p. 1044–1046.2004.
- FILLIES, T. et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*, v. 6, p. 10.2006.

FOLEY, J. et al. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environ Health Perspect*, v.101, p.199-206, 1993.

FORTIER, A. M.; ASSELIN, E.; CADRIN, M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288. p. 11555–71. 2013.

GALARNEAU, L. et al. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Experimental Cell Research*, v. 313, p. 179–94.2007.

GANSLMAYER, M. et al. A quadruple therapy synergistically blocks proliferation and promotes apoptosis of hepatomacells. *Oncology Report*, v.11 p. 943–950, 2004.

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

GHASSABIAN, S. et al.Role of human CYP3A4 in the biotransformation of sorafenib to its major oxidized metabolites. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, n. 2, p. 215-23. 2012.

GIRES, O. et al. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 343, p. 252–9.2006

GOVAERE, O. et al. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut*, v. 63, p. 674–685. 2014.

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

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.

GUNNINGHAM ,S. P. et al. Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *Cancer Res*, v. 61, p.3206–11, 2001.

HEERDT, B. G. et al. 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. et al. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Current Drug Targets*, v. 13, n. 14, p. 1720-9, 2012.

HEIDOR, R. et al.Thechemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. *Molecular Nutrition &Food Research*, v.60, n. 2, p. 420-9, 2016.

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

- HUANG, Y. et al. Overall survival in response to sorafenib with transarterial chemoembolization for BCLC stage B hepatocellular carcinoma: propensity score analysis. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 55, n. 6, p. 498-508. 2017.
- JAIN L. et al. Population pharmacokinetic analysis of sorafenib in patients with solid tumours. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 72, n.2, p. 294–305. 2011.
- JOHNSON, P. J. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *International Hepato-Pancreato Biliary Association*, v. 7, p. 50–55, 2005.
- KANG, S. N. et al. Dual function of tributyrin emulsion: solubilization and enhancement of anticancer effect of celecoxib. *Int J Pharm*, v. 428, p. 76-81. 2012.
- KEATING, G. M.; SANTORO, A. Sorafenib. A Review of its Use in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Drugs*, v. 69, n. 2, p. 223-240. 2009.
- KNOSEL, T. et al. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cell Oncology*, v. 28, p. 167–75. 2006
- KOWALIK, M. A. et al. Cytokeratin-19 positivity is acquired along cancer progression and does not predict cell origin in rat hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, v. 6, n. 36, p. 38749-63. 2015
- KUEFER, R. et al. 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*, v. 1, n. 1, 2011.
- KUROIWA-TRZMIELINA, J. et al. 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.
- LACHENMAYER, A. et al. 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.
- 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, L. et al. 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.11851-8, 2006.
- LLOVET, J. M. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, v.359, p. 378–90, 2008.
- LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *Journal of Hepatology*, v. 48, p. 20-37, 2008.

- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, Apr 14;2:16018. doi: 10.1038/nrdp.2016.18.2016
- LYONS, J. F. et al. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine-Related Cancer*, v. 8, p. 219–25, 2001.
- 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.
- MAIER, S. et al. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, v. 88, n. 2, p. 245-51, 2000.
- MAKINO, T. et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *British Journal of Cancer*, v.101, p. 1298–306. 2009.
- 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.
- MARGOLIS, D. Depletion of Latent HIV Infection In Vivo: Moving Towards Eradication of HIV Infection. *The PRN Notebook*, v. 10, n. 4, 2005.
- MARSHALL, C. J. MAP kinase kinasekinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 4, p. 82–89, 1994.
- MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1653, p. 25-40, 2003.
- NAUGLER, W. E. et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, v. 317, n. 5834, p. 121–124, 2007.
- NOVICKI, D. L.; JIRTLE, R. L.; MICHALOPOULOS, G. Establishment of two rat hepatoma cell strains produced by a carcinogen initiation, phenobarbital promotion protocol. *In Vitro*, v. 19, p. 191-202, 1983.
- ODOUX, C. et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. *Cancer Research*, v. 68, n. 17, p. 6932-6941, 2008.
- OKADA, S. Chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology*. v. 45, n. 3, p. 1259-63. 1998.
- OMARY, M. B. et al. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, p. 1794–1805. 2009.
- 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.
- 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.

- PERRYMAN, S. V; SYLVESTER, K. G. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* . v. 10, n. 2, p. 292-308, 2006.
- PEYSSONNAUX, C.; EYCHENE, A. The Raf/MEK/ERK pathway: New concepts of activation. *Biology of the Cell*, v. 93, p. 53-62. 2001.
- POGRIBNY, I.; P.; RUSYN, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, v. 342, n. 2, p. 223-30, 2012.
- RIGGS, M. G. et al. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature*, v. 268, n. 5619, p. 462-4, 1977.
- ROUX, A. et al. Keratin 8/18 regulation of insulin receptor signaling and trafficking in hepatocytes through a concerted phosphoinositide-dependent Akt and Rab5 modulation. *FASEB J.*, v. 31, n. 8, p. 3555-3573. 2017.
- SALVATORE, G. et al. B-RAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 12, p. 1623–9. 2006.
- SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European Journal of Cancer*, v. 41, n. 16, p. 2381-402, 2005.
- 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.
- SCHRODER, C. P.; MAURER, H. R. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, v. 20, n. 1, p. 195-200, 2002.
- SCHWEIZER, J. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of Cell Biology*, v. 174, p. 169–174. 2006.
- SHARMA, A. et al. Mutant V599EB-Rafregulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Research*, v.65, p.2412–21. 2005.
- 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.
- 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 and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1552-61, 2006.
- SINGH, S. et al. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. *Nature Review Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 1, p. 45-54, 2014.

- SOUTHGATE, J.; HARNDEN, P.; TREJDOSIEWICZ, L. K. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histology and Histopathology*, v. 14, p. 657–64. 1999.
- SPIRA, D. et al. Comparison of different tumor response criteria in patients with hepatocellular carcinoma after systemic therapy with the multikinase inhibitor sorafenib. *Academic Radiology*, v.18. n.1, p.89-96. 2011.
- SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 537-543, 2002.
- 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.
- SU, J. et al. Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, n. 316, p. 62-70, 2006.
- TAKAHASHI, M. et al. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis*, v. 29, p. 2218-26, 2008.
- VAN SPRUNDEL, R.G. et al. Keratin 19 marks poor differentiation and a more aggressive behaviour in canine and human hepatocellular tumours. *Comparative Hepatology*, doi: 10.1186/1476-5926-9-4.2010.
- 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, J. C.; DICK, J. E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*, v. 15, n. 9, p. 494-501. 2005.
- WANG, Y. et al. Cytokeratin 8 silencing in human nasopharyngeal carcinoma cells leads to cisplatin sensitization. *Cancer Letters*, v. 265, p. 188–96.2008.
- WATKINS, S. M. et al. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. *Journal of Dairy Science*, v. 66, p. 559-567, 1999.
- WEI, G. et al. 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.
- WILHELM, S.; CHIEN, D. S. BAY 43-9006: preclinical data. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 2255–7, 2002.
- WILHELM,S. et al. The novel Raf inhibitor BAY 43-9006 blocks signaling and proliferation in BRAF mutant and wild type melanoma and colorectal tumor cell lines. *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, v. 44: Abstract 106609. 2003.
- 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.64, n.19, p.7099-109. 2004.

WILHELM, S. M. et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 7, n. 10, p. 3129-40. 2008.

WILSON, A. J. et al. 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.

WOELFLE, U. et al. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 10, p. 2670-4.2004.

YAN, B. C. et al: Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 34. p. 1147-1154, 2010.

ZHANG, T. et al. Sorafenib improves the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Anticancer Drugs*, v. 21, n.3, p. 326-32. 2010.

ZHANG, Y. et al. Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 67 n. 9, p.1093-9, 2012.

ZHOU, L. et al. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*, v. 20, n. 2, p. 255-61, 2009.

---

Laura Helena Gasparini Fernandes

---

Prof. Titular Fernando Salvador Moreno