## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em melanomas: estudos *in vivo* e *in vitro* 

**Carine Cristiane Drewes** 

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Sandra H. P. Farsky

São Paulo

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em melanomas: estudos *in vivo* e *in vitro* 

#### **Carine Cristiane Drewes**

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Sandra H. P. Farsky

São Paulo

2015

#### Ficha Catalográfica

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

Drewes, Carine Cristiane

D776e Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em melanomas: estudos in vivo e in vitro / Carine Cristiane Drewes. -- São Paulo, 2015.
174p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Toxicologia experimental 2. Nanopartículas I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.90028 CDD

#### **Carine Dristiane Drewes**

## Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em melanomas: estudos *in vivo* e *in vitro*

Com	iss	ão	Jul	gad	lora
~~:::		u-	~~:	444	

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

# Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky Orientador/Presidente

Prof. Dr	
1º. Examinador	
Prof. Dr	
2º. Examinador	
Prof. Dr	
3º. Examinador	
Prof. Dr	
4º. Examinador	

São Paulo, \_\_\_\_\_de 2015.

Aos meus pais Valdi e Olivedi e a minha irmã Lucieli que sempre me incentivaram a estudar e a correr atrás dos meus sonhos.

Obrigada pelo amor incondicional e por me apoiarem nas minhas decisões...

Amo vocês!

Ao Leo, meu eterno namorado, amigo e companheiro de todas as horas.... Obrigada pela paciência e incentivo ao longo destes e anos e por me apoiar em todos os momentos!

Amo você!

A minha querida orientadora Dra. Sandra Farsky, que me ensinou muito mais do que fazer pesquisa.... Muito obrigada pela oportunidade, pela sua dedicação e paciência!

#### **AGRADECIMENTOS**

Uma Tese não é desenvolvida de forma isolada..... muitas são as pessoas que fazem parte desta conquista! Agradeço a Deus por colocar no meu caminho cada uma delas!

Agradeço a minha orientadora Dra. Sandra Farsky por todo o conhecimento compartilhado comigo e por me incentivar a sempre empurrar os meus limites! Obrigada por abrir as portas do seu laboratório há seis anos atrás e me dar tantas oportunidades ao longo deste período! Com certeza aprendi muito contigo minha orientadora, amiga e, por vezes, mãezona!

Agradeço aos meus pais, Valdi e Olivedi, pela dedicação, exemplo, incentivo e por tudo o que sempre me proporcionaram. Apesar da distância sempre estaremos perto um do outro. Amo vocês!

Agradeço a minha irmã Lucieli pelo carinho e amor!

Agradeço ao Leo por ser um companheiro fantástico e por sempre estar ao meu lado!

Agradeço à família do Leo, que agora também é minha, pelo incentivo e compreensão de sempre!

Agradeço aos meus colegas, colaboradores e amigos do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, da FCF e do IQ da USP que ao longo destes anos tornaram a pós-graduação mais divertida e interessante!

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório e aos funcionários e professores do departamento.

Agradeço aos colaboradores pelas excelentes oportunidades de ampliação do conhecimento e discussões ao longo da realização deste trabalho! Em especial a Dra. Adriana Pohlmann, Dra. Sílvia Guterres e a Dra. Luana Fiel pelo fornecimento das formulações de LNCs e constante troca de conhecimento.

Agradeço à FAPESP (2010/19802-1), a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma ajudaram ou participaram no desenvolvimento deste trabalho.....MUITO OBRIGADA!!!!

"Ao expandirmos o campo do conhecimento apenas aumentamos o horizonte da ignorância"

#### RESUMO

DREWES, C.C. Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em melanomas: estudos in vivo e in vitro. 2015. 174f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O melanoma é uma neoplasia de pele invasivo, com maior taxa de morte, sem tratamento efetivo. Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) tem sido empregadas com sucesso como carreadores de fármacos hidrofóbicos. Como o eugenol é um composto hidrofóbico com atividades antiproliferativas e próapoptóticas em células cancerosas, visamos avaliar os efeitos dos tratamentos com acetileugenol (AC), LNC ou LNC contendo acetileugenol (LNC-AC) em modelo de melanoma in vivo em camundongos C57B6, e a citotoxicidade dos mesmos em células endoteliais (HUVEC) e de melanoma (SK-Mel-28) in vitro. Os resultados obtidos mostraram que: 1) tratamentos i.p. com as LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg, 3-10 dia de indução do tumor) induziram toxicidade sistêmica e, somente o tratamento com LNC inibiu o desenvolvimento do melanoma. O tratamento com LNC, mas não com a mistura de triglicerídeos de cadeia média, por via oral, inibiu o desenvolvimento tumoral, sem toxicidade. Adicionalmente, os tratamentos com AC, LNC ou LNC-AC não foram eficazes quando administrados em fase tardia de evolução tumoral (50 mg/kg, 7-17 dia de indução do tumor, via oral); 2) os tratamentos agudos com AC, LNC ou LNC-AC (20 mg/kg, 200 µL, e.v.) não alteraram o número de leucócitos circulantes, mas os tratamentos com LNC ou com LNC-AC reduziram o comportamento de rolling dos leucócitos em vênulas póscapilares do músculo cremaster e causaram hemólise, sendo que este último efeito também foi observado após tratamento *in vitro* em hemácias murinas; 3) Os estudos in vitro mostraram que as LNC e LNC-AC foram captadas pelas células HUVEC e SK-Mel-28 após 1 hora de incubação; que a incubação com LNC-AC induziu apoptose tardia e necrose com maior eficácia em SK-Mel-28 do que em HUVEC: que as incubações com LNC ou LNC-AC exerceram efeitos antiproliferativos, induzindo parada na fase G2/M do ciclo celular das duas linhagens de células avaliadas: que somente a incubação com AC ou LNC-AC inibiu a adesão ao Matrigel® com maior eficácia na linhagem SK-Mel-28 do que HUVEC; que somente a incubação com as LNC reduziram a expressão de VCAM-1 em HUVEC e que as incubações com LNC ou LNC-AC reduziram a expressão de β<sub>3</sub> integrina em SK-Mel-28; que nenhum dos tratamentos alterou a migração celular das HUVEC ou SK-Mel-28; que somente a incubação com LNC-AC reduziu os níveis de espécies reativas de oxigênio em HUVEC e SK-Mel-28; que a incubação com LNC ou LNC-AC aumentou a produção de óxido nítrico (NO) pelas duas linhagens de células avaliadas; que o tratamento com L-NAME reverteu os níveis de NO e a inibição sobre a proliferação celular induzida pela incubação com LNC ou LNC-AC e; que o tratamento de células de melanoma murino com LNC ou LNC-AC parece alterar a polarizar os neutrófilos para o fenótipo N1. Associados, os resultados obtidos mostram o tratamento oral com LNC inibe o crescimento do melanoma sem induzir efeitos tóxicos, e que este efeito benéfico pode ser dependente, pelo menos em parte, da nanoencapsulação dos triglicerídios de cadeia média e da supraestrutura da formulação, com toxicidade direta sobre as células de melanoma e possível modulação do microambiente tumoral.

**Palavras-chave:** Nanotoxicologia, Melanoma, Células Endoteliais, Neutrófilos, Nanocápsulas Poliméricas.

#### **ABSTRACT**

DREWES, C.C. Effects of lipid-core nanocapsules with acetyleugenol in melanomas: *in vivo* and *in vitro* studies. 2015. 174f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Melanoma is the most invasive skin cancer, with high rates of death without effective treatment. Polymeric lipid-core nanocapsules (LNC) has been successfully used as carriers of hydrophobic drugs. As eugenol is an hydrophobic compound with antiproliferative and pro-apoptotic activity in cancer cells, here we aimed to evaluate the effects of treatments with acetyleugenol (AC), LNC or LNC containing acetyleugenol (LNC-AC) in an in vivo melanoma model in C57BL6 mice and the cytotoxicity of the treatments in vitro, using endothelial (HUVEC) and melanoma (SK-Mel-28) cells. The results obtained showed that: 1) i.p. treatments with LNC or LNC-AC (50 mg/kg, 3-10 days of tumor injection) induced systemic toxicity and, only the treatment with LNC inhibited the melanoma development. Treatment with LNC, but not with mix of triglycerides of medium chain, by oral route, inhibited the tumor development, without toxicity. In addition, the treatments with AC, LNC or LNC-AC were not effective when administered in the late stage of tumor evolution (50 mg/kg, 10-20 days of tumor induction, oral route); 2) the acute treatments with AC, LNC or LNC-AC (20 mg/kg, 200 µL, intravenous route) did not altered the number of circulating leukocytes, but the treatments with LNC or LNC-AC reduced the rolling behavior of leukocytes in postcapillary venules of the cremaster muscle and induced hemolysis. The latter effect was also observed after in vitro treatment using murine erythrocytes; 3) In vitro studies showed that the LNC and LNC-AC suffered uptake by HUVEC and SK-Mel-28 cells after 1 hour of incubation; that the incubation with LNC-AC induced late apoptosis and necrosis more effectively in SK-Mel-28 than in HUVEC cells; that the incubation with LNC or LNC-AC presented antiproliferative effects, by inducing G2M arrest in cell cycle in both cells lines evaluated: that only the incubation with AC or LNC-AC inhibited the adhesion in Matrigel® with more efficaccy in SK-Mel-28 than in HUVEC cells; that only incubtion with LNC reduced the VCAM-1 expression in HUVEC and the incubation with LNC or LNC-AC reduced the \( \beta\_3 \) integrin expression in SK-Mel-28 cells; that any treatment affected the HUVEC or SK-Mel-28 migration; that only the incubation with LNC-AC reduced the levels of reactive species of oxygen in HUVEC and SK-Mel-28 cells; that the incubation with LNC or LNC-AC increased the nitric oxide (NO) production by both cell lines used; that the treatment with L-NAME reversed the NO levels and the inhibition on cell proliferation induced by incubation with LNC or LNC-AC and; that the in vitro treatment of murine with LNC or LNC-AC altered the neutrophil polarization to N1 phenotype. Together, results obtained show that the oral treatment with LNC inhibit the melanoma growth without any toxic effect, and that the beneficial effect could be dependent, at least in part, of nanoencapsulation of medium chain triglycerides and the supraestrucuture of the formulation, with direct toxicity on melanoma cells and possible modulation of tumor microenvironment.

**Keywords:** Nanotoxicology, Melanoma, Endothelial Cells, Neutrophils, Polymeric Nanocapsules.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Tipos de nanopartículas biodegradáveis4
Figura 2 Representação das possíveis formas de associação das substâncias ativas às LNC6
Figura 3 Constituintes celulares das camadas da pele e etapas da progressão do melanoma humano10
Figura 4 Participação dos neutrófilos TAN na inibição ou progressão tumoral
Figura 5 Acúmulo passivo de fármacos no microambiente tumoral devido a maior permeabilidade vascular e ao efeito de retenção
Figura 6 Estrutura química do eugenol (A) e do acetileugenol (B)21
<b>Figura 7</b> Esquema representativo dos três protocolos experimentais utilizados para a avaliação do crescimento tumoral após os diferentes tratamentos
Figura 8 Imagens representativas do procedimento da exposição do músculo cremaster e posicionamento do animal sob o microscópio
Figura 9 Esquema representativo das diluições seriadas realizadas com as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico e nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugeno em água
Figura 10 Imagem representativa das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico acetileugenol e nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol utilizadas no desenvolvimento deste trabalho
<b>Figura 11</b> Imagem representativa das LNC e das LNC-AC obtidas por microscopia hiperespectral no equipamento CytoViva <sup>®</sup> 48
<b>Figura 12</b> Distribuição de tamanho de partícula obtido por difração de laser para as LNC e as LNC-AC. Os resultados foram expressos como média ± DP de três lotes diferentes 49
Figura 13 Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via intraperitoneal durante sete dias na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma
Figura 14 Variação do peso acumulado, consumo de ração e imagens representativas da cavidade peritoneal de camundongos tratados com os diferentes tratamentos pela via intraperitoneal
Figura 15 Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via ora durante sete dias nas etapas iniciais de desenvolvimento do melanoma
Figura 16 Variação do peso acumulado e consumo de ração de camundongos tratados com os diferentes tratamentos pela via oral
Figura 17 Volume tumoral de animais que receberam os tratamentos com LNC e TCM pela

Figura 18 Concentração de mediadores químicos no momogenato tumoral após 7 dias de tratamento pela via oral
Figura 19 Imagens representativas de cortes histológicos da massa tumoral de animais que foram tratados durante 7 dias pela via oral
<b>Figura 20</b> Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via oral durante dez dias na etapa avançada de desenvolvimento do melanoma71
<b>Figura 21</b> Efeitos do AC, LNC e LNC-AC sobre o comportamento <i>rolling</i> (A) e adesão (B) de leucócitos da microcirculação murina
Figura 22 Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na hemólise <i>in vitro</i>
Figura 23 Imagens representativas obtidas no microsópio hiperespectral de células endoteliais (A) e de melanoma (B) após tratamento com R10, LNC ou LNC-AC por 1 hora.82
<b>Figura 24</b> Efeitos do LNC, AC ou LNC-AC na viabilidade celular realizada por azul de tripan em células endoteliais (A) e de melanoma (B) após 48 horas de incubação
<b>Figura 25</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais após 24 horas de incubação
<b>Figura 26</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais após 48 horas de incubação
<b>Figura 27</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células de melanoma após 24 horas de incubação
<b>Figura 28</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células de melanoma após 48 horas de incubação
<b>Figura 29</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na sobrevivência clonogênica de células endoteliais e de melanoma
<b>Figura 30</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no número de células presentes nas colônias de células endoteliais e de melanoma
<b>Figura 31</b> Imagens representativas de colônias formadas por células endoteliais após o tratamento com LNC, AC ou LNC-AC
<b>Figura 32</b> Imagens representativas de colônias formadas por células de melanoma após o tratamento com LNC, AC ou LNC-AC
<b>Figura 33</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na proliferação de células endoteliais após 24 ou 48 horas de incubação
<b>Figura 34</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na proliferação de células de melanoma após 24 ou 48 horas de incubação
<b>Figura 35</b> Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no ciclo celular de células endoteliais após 24 ou 48 horas de incubação
Figura 36 Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no ciclo celular de células de melanoma após 24 ou 48 horas de incubação

<b>Figura 56</b> Concentrações de MMP-9 no sobreadante de co-cultura de neutrófilos B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos	
Figura 57 Concentrações de Argininase-1 no sobreadante de co-cultura de neu células B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos	
Figura 58 Concentrações de VEGF no sobreadante de co-cultura de neutrófilos B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição qualitativa e quantitativa das formulações das nanocápsulas
Tabela 2 Parâmetros hematológicos dos camundongos ao final de 7 dias de tratamento pela         via oral68
Tabela 3 Parâmetros hepáticos e renais dos camundongos ao final de 7 dias de tratamento           pela via oral.         70
Tabela 4 Celularidade sanguínea de animais tratados pela via endovenosa com LNC, AC ou         LNC-AC (20 mg/kg) após duas horas de tratamento
Tabela 5 Parâmetros bioquímicos da urina de animais tratados com Salina, DMSO, FA,         LNC, AC ou LNC-AC (20 mg/kg) pela via endovenosa77
Tabela 6 Avaliação da liberação do AC após as diluições seriadas    80
Tabela 7 pH do meio de cultura após a diluição das diferentes formulações81

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Acetileugenol

ANOVA - Análise de Variância

BSA – Albumina sérica bovina

CFSE – Diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COX-2 - Ciclooxigenase 2

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPR – Efeito de aumento de retenção e permeabilidade

FA – Fase aquosa

FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting

FAO – Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

HE- Hematoxilina e eosina

HUVEC - Células endoteliais de veia umbilical humana

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

INCA - Instituto nacional de câncer

ISO – International Organization for Standardization

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LPS - Lipopolisacarídeo

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MEK/ERK – Proteína ativada por mitógeno/Quinase regulada por sinal extracelular

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-I)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

LNC – Nanocápsulas de núcleo lipídico

LNC-AC - Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NIOSH - National Institute of Occupational Safety & Health

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

PBS - Tampão fosfato salino

PCL – Poli (épsilon-caprolactona)

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen

PE - Ficoeritrina

PI – lodeto de propídeo

PSGL-1 - P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

R10 - Meio de cultura RPMI 1640 adicionado de 10 % de SFB

RMN – Ressonância magnética nuclear

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB - Soro fetal bovino

SK-Mel-28 - Células de melanoma humano

STAT 3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TAN – Tumor Associate Neutrophils

TCM - Triacilglicerol de cadeia média

TNF – Fator de necrose tumoral

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VCAM-1 – Molécula de adesão de células vasculares 1

## **SUMÁRIO**

1	Intr	odução	1
	1.1	Nanotecnologia, nanotoxicologia e nanocápsulas de núcleo lipídico	1
	1.2	Desenvolvimento de melanomas e a participação dos neutrófilos neste processo	6
	1.3	O tratamento de melanomas e as nanopartículas carreadoras de fármacos	14
	1.4	Eugenol	19
2	Obj	jetivos	22
3	Mat	terial e Métodos	23
	3.1	Obtenção e caracterização das formulações	23
	3.2	Tratamentos	25
	3.3	Cultura de células	26
	3.4	Ensaios in vivo.	27
	3.4.	.1 Animais	27
	3.4.	.2 Indução de melanoma em camundongos e avaliação do crescimento tumoral.	27
	3.4.	.3 Análise Histológica	29
	3.4.	.4 Avaliação dos mediadores químicos no homogenato tumoral	30
	3.4.	.5 Avaliação da toxicidade dos tratamentos in vivo	31
	3.4.	.6 Microscopia Intravital no músculo cremastérico	32
	3.4.	.7 Celularidade sanguínea após tratamento agudo	33
	3.4.	.8 Análise qualitativa da urina	33
	3.4.	.9 Hemólise in vitro	34
	3.5	Experimentos realizados in vitro	35
	3.5. do a	.1 Avaliação da estabilidade da suspensão de nanocápsulas quanto à liberaçã acetileugenol	
	3.5.	.2 pH do meio de cultura	36
3.5.3 Interação das nanocápsulas e nanocápsulas de acetileugenol com a endoteliais e de melanoma in vitro			
	3.5.	.4 Viabilidade celular	37
	3.5.	.5 Proliferação celular	38
	3.5.	.6 Análise do ciclo celular	40
	3.5.	.7 Aderência celular	40
	3.5.	.8 Expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e de melanoma	41
	3.5.	.9 Migração Celular	41
	3.5.	.10 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	42
	3.5.	.11 Determinação da concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> -) por quimiluminescencia	42

		3.5.1	12	Expressão Proteica das Enzimas Óxido Nítrico Sintases por Western Blot	43
		3.5.1	13	Co-cultura de células de melanoma murino (B16F10) e neutrófilos	44
	3	.6	Aná	lise estatística	45
4		Resi	ulta	dos e Discussão	46
	4	.1	SEÇ	ÇÃO 1 - Caracterização das formulações	46
	4	.2	SEÇ	ÇÃO 2 – Eficácia terapêutica e toxicidade <i>in vivo</i>	50
		4.2.1 intra		Eficácia terapêutica e toxicidade após administração dos tratamentos pela via toneal na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma	
		4.2.2 oral		Eficácia terapêutica e toxicidade após administração dos tratamentos pela via etapa inicial de desenvolvimento do melanoma	
		4.2.3	3	Quantificação dos mediadores químicos no homogenato tumoral	62
		4.2.4	1	Análise histológica da massa tumoral	65
		4.2.5	5	Análise da celularidade sanguínea e parâmetros sanguíneos	66
		4.2.6	3	Avaliação das funções renal e hepática	69
		4.2.7 avar		Eficácia terapêutica dos tratamentos após administração pela via oral na etapa a de desenvolvimento do melanoma	
	4	.3	SEÇ	ÇÃO 3 – Toxicidade Aguda	72
		4.3.1	1	Microscopia Intravital	72
		4.3.2	2	Análise Qualitativa da Urina	76
		4.3.3	3	Hemólise in vitro	77
	4	.4	SEÇ	ÇÃO 4 – Efeitos dos tratamentos em células endoteliais e de melanoma <i>in vitro</i>	79
		4.4.1	1	Diluições seriadas das suspensões de LNC-AC não alteram a liberação do AC .	79
		4.4.2	2	Os tratamentos não alteram o pH do meio de cultura	80
		4.4.3 incul		LNC e LNC-AC são internalizadas por células endoteliais e de melanoma após ão <i>in vitro</i>	
		4.4.4	1	Efeito dos tratamentos sobre a viabilidade celular	84
		4.4.5	5	Efeito do tratamento com AC e LNC-AC sobre a proliferação celular	92
		4.4.6	6	Efeito do tratamento com AC e LNC-AC sobre o ciclo celular1	02
		4.4.7 Matr		Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a aderência celular em	
		4.4.8 de a		Efeito do tratamento com LNC, AC e LNC-AC sobre a expressão de moléculas ão em células endoteliais e de melanoma1	
		4.4.9 endo		Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a migração de células ais e de melanoma1	
		4.4.1 reati		Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a geração de espécies de oxigênio por células endoteliais e de melanoma	
		4.4.1 óxido		Efeito do tratamento com LNC, AC, LNC-AC ou L-NAME sobre a produção de rico por células endoteliais e de melanoma1	

7	ANEXO	ns	168
6	Referêr	ncias Bibliográficas	.147
5	Conclu	sões	.147
	4.5.5 células	Concentração de mediadores químicos no sobrenadante da co-cultura de B16F10 e neutrófilos	
	4.5.4	Bursh oxidativo de neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10	.137
	4.5.3 com cél	Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos incubados em co-cultur lulas B16F10	
	4.5.2	Viabilidade de células de melanoma e de neutrófilos incubados em co-cultura	.131
	4.5.1	Caracterização da população de neutrófilos	.130
		ÇÃO 5 – Efeito dos tratamentos em células de melanoma murino na modulaçã de neutrófilos	
		Efeito dos tratamentos incubados na presença de L-NAME sobre a proliferaçã las endoteliais e de melanoma	
		Efeito do tratamento com LNC, AC e LNC-AC sobre a expressão proteica da ítrico sintases em células endoteliais e de melanoma	

#### 1 Introdução

#### 1.1 Nanotecnologia, nanotoxicologia e nanocápsulas de núcleo lipídico

A nanotecnologia pode ser definida como a "compreensão e controle da matéria e dos processos na nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de novas propriedades e fenômenos são dependentes do tamanho e permitem novas aplicações, como a produção de novas estruturas, materiais e dispositivos" (ISO, 2015; NIOSH, 2015), apesar de ainda não haver um consenso a respeito da definição deste termo.

A escala nanométrica, que vai de aproximadamente 0,2 nm até cerca de 100 nm, pode ser facilmente compreendida pela comparação das escalas de proporções, onde um nanometro é a bilionésima parte do metro (10<sup>-9</sup> m). A nanobiotecnologia refere-se à fusão de duas abordagens tecnológicas, a biotecnologia e a nanotecnologia, e pode ser definida como o "estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para a atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico" (DUCAN, 2011).

Os estudos em nanotecnologia, bem como o depósito de patentes, têm crescido significantemente em todo o mundo e a expectativa é que, nos próximos 10 ou 15 anos, a nanotecnologia movimente um mercado de US\$ 1 trilhão, cabendo ao Brasil, 1% desse faturamento (ALVES, 2005). Em 2008, os Estados Unidos investiram cerca de 1,55 bilhão de dólares no campo da nanotecnologia. Entretanto, esse país não é o único a reconhecer o enorme potencial de tal área. Embora seja difícil estimar com precisão, acredita-se que em 2008 os governos da União Europeia (UE) e do Japão investiram aproximadamente 1,7 bilhões e 950 milhões, respectivamente, na pesquisa e no desenvolvimento nanotecnológico (NANO.GOV, 2012).

A nanotecnologia está contribuindo para melhora, ou até mesmo para revolução, de muitos setores tecnológicos e industriais, como o energético, o ambiental, o médico, o alimentício, o de transportes, o de equipamentos de segurança e o farmacêutico (NANO.GOV, 2012). Dentre as diferentes faces da nanotecnologia, a área farmacêutica assume destaque inquestionável, devido ao impacto que a tecnologia em nanoescala imprime positivamente à terapêutica. Neste sentido, a nanotecnologia é utilizada no desenvolvimento de testes para diagnóstico e prevenção de doenças, além de

estratégias terapêuticas para as mesmas. Dentre as estratégias terapêuticas, a modificação dos sistemas de liberação de fármacos tem sido uma área de investigação intensa, visando à obtenção de nanopartículas para medicamentos mais seguros e eficazes (COUVREUR et al., 2002; COUVREUR & VAUTHIER, 2006). A utilização de sistemas nanoparticulados apresenta diversas vantagens sobre as formulações comumente utilizadas, como a possível modificação de distribuição, a melhora na biodisponibilidade de substâncias de interesse terapêutico, a possibilidade de vetorização de fármacos a alvos específicos, aumentando a sua especificidade e, assim, diminuindo a dose necessária para o efeito terapêutico, além de possibilitar a proteção de moléculas a fatores extrínsecos ou intrínsecos ligados à cinética no organismo, proporcionando administrações por vias não invasivas (THASSU, 2007; CATTANI et al., 2008; VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009, FRANK et al., 2015).

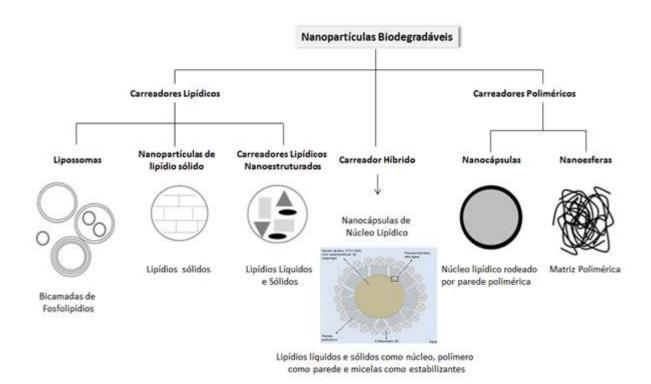
Em contrapartida, junto com a crescente produção e utilização de dispositivos nanoestruturados, surge a preocupação com a toxicidade destes dispositivos. A importância da nanotoxicologia, nova área de conhecimento que têm cerca 10 anos de estudos, pode ser mensurada por diversos parâmetros, como a alocação de recursos para pesquisa e pelo número crescente de publicações voltadas ao assunto (HAYNES, 2010). Apesar do grande número de publicações recentes, estas ainda são fragmentárias quanto à abordagem dos estudos, na grande maioria realizados em modelos *in vitro*, além da carência de estudos *in vivo* sobre a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade de novos nanomateriais (BALBUS *et al.*, 2007; FISCHER *et al.*, 2007, SHARIFI *et al.*, 2012).

A realização de estudos toxicológicos com nanomateriais *in vivo* é de difícil execução e interpretação, uma vez que ocorrem variações nas características físico-químicas como aglomeração, agregação, formação de corona, e química de superfície. Adicionalmente, cada nanomaterial pode possuir características intrínsecas, dificultando a extrapolação dos resultados obtidos a outras classes de nanomateriais (FISCHER *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2009; GIL *et al.*, 2010, SHARIFI *et al.*, 2012). No que tange às características físico-químicas, o tamanho, a área superficial, as características químicas e morfológicas de superfície das nanopartículas influenciam diretamente nos efeitos tóxicos induzidos pelas mesmas. Assim, quanto menor a partícula, maior a área superficial, maior a resistência mecânica e a atividade catalítica, e assim, maior poderá ser sua toxicidade. Estas características facilitam sua difusão e

transporte na atmosfera, em águas e em solos; a concentração de compostos tóxicos na superfície das nanopartículas, com posterior transporte no meio ambiente ou acúmulo ao longo da cadeia alimentar; a adsorção de biomoléculas, com consequentemente interferência em processos biológicos *in vivo*; a maior resistência à degradação e na catálise de reações químicas (FISCHER *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2010). Em relação aos aspectos toxicológicos, têm sido descrito que nanoestruturas interagem e/ou se ligam a componentes biológicos, como proteínas de membrana e intracelulares, enzimas e tecidos (FISCHER *et al.*, 2007; FARAJI & WIPF, 2009). Desta forma, a abordagem dos parâmetros de toxicocinética (absorção, biodistribuição, biotransformação e depuração) e a toxicodinâmica (estresse oxidativo, resposta imunológica, dano do DNA, entre outros) podem ser alterados. Neste contexto, na área farmacêutica, um ponto de grande relevância é localização e/ou degradação das nanopartículas após a liberação do fármaco, bem como a elucidação do destino do fármaco encapsulado ou não (FISCHER *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2010).

Nanopartículas biodegradáveis são sistemas carreadores de drogas que tem distribuição de tamanho menor do que 1 µm, e que tem sido amplamente investigadas por controlarem a liberação de fármacos, aumentarem a sua biodisponibilidade e direcionarem a mesma para o local desejado (POHLMANN *et al.*, 2013; MÜLLER *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2015). Classicamente, a composição destas nanopartículas pode ser dividida em carreadores lipídicos (lipossomas, nanopartículas de lipídio sólido e carreadores lipídicos nanoestruturados) e carreadores poliméricos (nanocápsulas e nanoesferas), porém, recentemente, foi descrito, pelo grupo das professoras Adriana Pohlmann e Silvia Guterres, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, um híbrido de nanopartícula biodegradável, chamada de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) (Figura 1).

**Figura 1** Tipos de nanopartículas biodegradáveis. Adaptado de PISSINATE *et al.*, 2013.



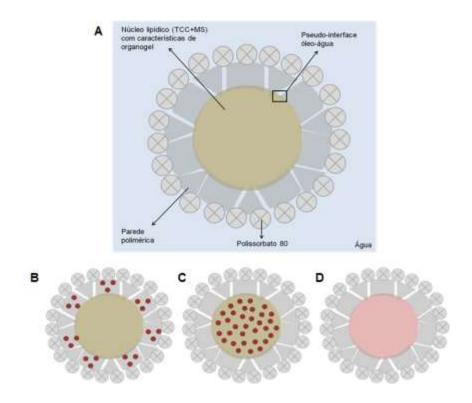
Apesar das LNC terem surgido em meados do ano 2000, diferenças na organização supramolecular das partículas formadas foram encontradas somente quando o componente monoestearato de sorbitano (MS) foi adicionado às formulações. O MS é um lipídio sólido que foi introduzido na composição de formulações de LNCs formadas por polímero, por componente lipídico líquido (óleo, representado pelos triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC)) e por tensoativo hidrofílico (MÜLLER et al., 2001). Estudos atuais têm descrito que este novo componente está molecularmente disperso no lipídio líquido contido no interior das LNCs (CRUZ et al., 2006; JÄGER et al., 2007; POHLMANN et al., 2008).

JÄGER e colaboradores (2007) demonstraram que a parede polimérica interage com ambas as fases, oleosa e aquosa, indicando que existe uma pseudo-interface óleo-água na superfície das partículas. As LNCs apresentam maior viscosidade do núcleo oleoso, podendo controlar a velocidade de liberação de uma substância encapsulada na partícula (JÄGER *et al.*, 2009), a rigidez particular (FIEL *et al.*, 2011) e a capacidade de penetração em tecido biológico, como o tecido cutâneo (DE BRUM,

FIEL et al., 2013). A dispersão de MS em TCC possui propriedades de organogel, sendo as características de rede do organogel alteradas pela interação com as substâncias ativas encapsuladas (POLETTO et al., 2013). Desta forma, atualmente a estrutura supramolecular proposta para as LNCs consiste de um núcleo lipídico, com características de organogel, e uma parede polimérica, a qual está situada na pseudointerface óleo-água (Figura 2A). OLIVEIRA e colaboradores (2013) relataram que, em formulações de LNC, a substância ativa, de acordo com suas características físicoquímicas, poderá localizar-se na fase dispersante, adsorvida na parede polimérica, particionada entre a fase dispersante e o nanocarreador ou, ainda, confinada no interior lipofílico da partícula, podendo estas informações serem determinadas de acordo com o valor de log D (OLIVEIRA et al., 2013). A Figura 2 mostra possíveis formas de associação das substâncias ativas às LNCs, de modo geral, não excluindo misturas. Inicialmente o acetileugenol, substância ativa alvo de estudo deste trabalho, cujo aspecto físico é óleo, foi descrito ser um componente do núcleo das nanocápsulas (Figura 2D). Mas, estudos recentes realizados pelo grupo de pesquisa das professoras Adriana Pohlmann e Silvia Guterres revelaram que esta não é a única opção de localização desta substância ativa e estes resultados serão discutidos ao longo deste trabalho.

Em conjunto, a problemática relacionada à avaliação da eficácia terapêutica de nanopartículas carreadoras de fármacos, dentre eles as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo antineoplásicos, é fundamental, uma vez que esta deve ser um balanço da ação terapêutica e do potencial tóxico. Estudos neste sentido são essenciais para a real aplicação destas nanoestruturas no setor farmacêutico.

**Figura 2** Representação das possíveis formas de associação das substâncias ativas às LNC.



Modelo de estrutura supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas por polissorbato 80 dispersas em água e localização das substâncias ativas quando veiculadas a estas (A), substância ativa adsorvida à parede polimérica (B), substância ativa retida no núcleo oleoso da partícula (C) e substância ativa compondo o núcleo da partícula (D). Adaptado de FIEL, 2013.

#### 1.2 Desenvolvimento de melanomas e a participação dos neutrófilos neste processo

A pele representa o maior órgão do corpo humano e está organizada histologicamente em epiderme e derme, sendo que, abaixo desta última, existe ainda a hipoderme, que é constituída basicamente de tecido adiposo (KANITAKIS, 2002). A epiderme representa a camada mais externa e é constituída principalmente por queratinócitos organizados em subcamadas ou estratos (POTTER, 1966); por melanócitos que produzem a melanina, responsável pela cor da pele e pela proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta dos tipos A e B; por células de Menkel, que desempenham função sensorial; e por células de Langerhans, responsáveis pelo controle imunológico (PHILLIPS, 1998, RÉGNIER *et al.,* 1993; BUTNARU & KANITAKIS, 2002; KANITAKIS, 2002).

Entre a epiderme e a derme está localizada a membrana ou lâmina basal que sustenta a camada epidérmica. Este sistema de conexões fibrilares controla o tráfego de moléculas bioativas em ambos os sentidos e é constituído, principalmente, por colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos e fatores de crescimento (HORCH *et al.*, 2005, IOZZO, 2005; AJANI *et al.*, 2007).

A derme, localizada abaixo da lâmina basal, fornece energia e nutrição para a epiderme e sustenta a pele devido às fibras de colágeno. A derme é constituída por colágeno, principalmente do tipo I, fibronectina, fibras de elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibroblastos, que sintetizam e depositam componentes da matriz extracelular e modulam a proliferação e migração de células vizinhas, além de células do sistema imune, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, terminações nervosas, vasos linfáticos e sanguíneos (BALASUBRAMANI *et al.,* 2001; WONG *et al.,* 2007).

O aumento da expectativa de vida observado na população mundial tem provocado elevação na incidência de doenças crônico-degenerativas e neoplasias. O câncer, também chamado de neoplasia ou tumor maligno, é um termo genérico utilizado para um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum a característica da perda do controle normal da proliferação e crescimento celular (malignidade), levando a produção de células não diferenciadas, ao crescimento desregulado e a invasão em tecidos locais e distantes (metástases). A Organização Mundial da Saúde estima que, no ano de 2030, ocorrerão 27 milhões de casos de incidência de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Por outro lado, os tumores benignos significam simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, sendo que raramente constituem um risco à vida (INCA, 2015; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014; WHO, 2014).

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil, correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, os melanomas, neoplasias malignas de melanócitos, representam apenas 4% deste total (INCA, 2015). A cada ano, globalmente, ocorrem cerca de 2,5 milhões de casos de câncer de pele do tipo não-melanoma, e cerca de 132.000 casos de melanoma. Segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, em 2014 estavam previstos 2.960 novos casos de melanoma em homens e 2.030 novos casos em mulheres (INCA, 2015). Para este

mesmo ano, estavam previstos cerca de 76.100 novos casos só nos Estados Unidos (National Cancer Institute, 2015). Em muitos países o melanoma é considerado um problema de saúde pública, sendo responsável por 75-80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (NCBI, 2013).

O melanoma cutâneo é um câncer de detecção simples, pelo fato da sua localização ser de fácil visualização. Quando o melanoma é detectado em estágios iniciais da sua progressão, ele apresenta um bom prognóstico. Contudo, uma vez que o melanoma progride, gerando metástases, ele se torna um tumor de difícil tratamento (FIDLER, 2003). Assim, apesar da incidência ser baixa, sua letalidade é elevada, pois a sobrevida, superior a 5 anos de pacientes com metástases em linfonodos, varia de 13 a 69% dos casos, dependendo do número de linfonodos afetados. Se houver metástases para outros órgãos, o tempo mediano de sobrevivência é estimado em aproximadamente 8 meses (± 2 meses) e, somente 10 % dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos após o diagnóstico (CHUDNOVSKY *et al.*, 2005; GARBE *et al.*, 2011, National Cancer Institute, 2015; Cancer Research UK, 2015).

Dentre os fatores de risco podem ser citados a exposição ao sol, as características de pigmentação da pele, a presença de múltiplos nevus, o histórico familiar e pessoal de desenvolvimento de melanoma, a imunossupressão, e a exposição ambiental a substâncias potencialmente carcinogênicas (National Cancer Institute, 2015).

Após a divisão celular os melanócitos separam-se, retraem seus dendritos e migram ao longo da membrana basal estabelecendo contato novamente com os queratinócitos, formando outra unidade de melanina epidérmica. Cada melanócito, por meio de expansões de seu citoplasma, pode interagir com até 36 queratinócitos. Por meio dessas expansões que os melanossomos, organela especializada que sintetiza o pigmento melanina, são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos das camadas suprabasais, no processo de pigmentação da epiderme (HAASS & HERLYN, 2005; LI & HERLYN, 2000). Após o estabelecimento da adesão, os queratinócitos controlam o crescimento e a expressão de receptores da superfície dos melanócitos. A maioria dos melanomas surge dentro da epiderme (melanoma *in situ*) e, então, invadem a membrana basal. As células tumorais podem escapar do controle dos queratinócitos por alguns mecanismos, a saber: 1) diminuição da expressão de receptores importantes para a comunicação com queratinócitos, como E-caderina, P-

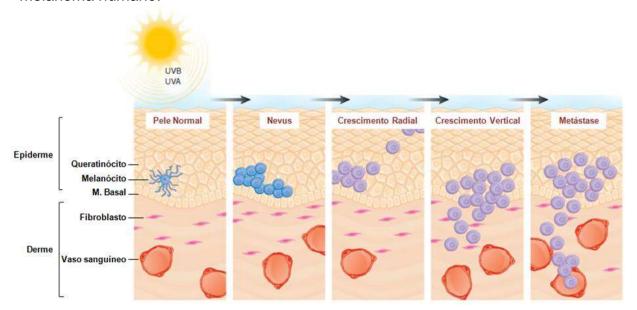
caderina desmogleína e conexinas, realizada por fatores de crescimento como fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas, e endotelina-1, produzidos por fibroblastos e queratinócitos; 2) regulação de receptores e moléculas de sinalização importantes para interações de células de melanoma-melanoma e fibroblasto-melanoma, tais como N-caderina, Mel-CAM e proteína-1 de zônula de oclusão; 3) desregulação de morfógenos, como os receptores Notch e seus ligantes; 4) perda de ancoragem à membrana basal, devido a expressão alterada de moléculas de adesão célula-matriz; e 5) produção exacerbada de metaloproteinases (HAASS & HERLYN, 2005).

A classificação dos estágios de desenvolvimento dos melanomas pode ser realizada de acordo com dois modelos histológicos diferentes, sendo que os mesmos se complementam. O primeiro é baseado na espessura vertical da lesão em milímetros (Classificação de Breslow) e, o segundo no nível de invasão anatômica (Classificação de Clark) (National Cancer Institute, 2015, Cancer Research UK, 2015).

A progressão dos melanomas segundo modelo proposto inicialmente por CLARK e colaboradores (1969) pode ser dividida em 5 níveis (Figura 3). Na primeira etapa do desenvolvimento dos melanomas ocorre a geração de nevos localizados somente na epiderme, que são formados por melanócitos que proliferam de desorganizada, formando uma lesão hiperplásica, também chamada de lesão névica ou nevo maduro. Esta lesão, que não progride devido a senescência celular, é comumente considerada um marcador de exposição a agentes com potencial carcinogênico, como, a luz ultravioleta (MOOI & PEEPER, 2006). Nível 1: uma vez vencida a barreira proliferativa, este nevo se torna displásico e pode progredir para um estágio de espalhamento superficial, chamado de melanoma de crescimento radial (in situ). Neste estágio, as células neoplásicas estão confinadas à epiderme e possuem baixo potencial invasivo. Nível 2: melanoma invasivo onde as células de crescimento radial podem adquirir a capacidade de romper a membrana basal e invadir a derme papilar, mas não atingir a interface papilar dérmica-reticular. Nível 3: melanoma invasivo, onde as células preenchem e expandem a derme papilar, mas não penetram na derme reticular. Nível 4: melanoma invasivo, onde as células invadem a derme reticular, mas não chegam ao tecido subcutâneo. Este é também chamado de melanoma de crescimento vertical, por levar a formação de nódulos visíveis e palpáveis (FIDLER, 2003). Nível 5: melanoma invasivo onde as células invadem a derme reticular

no tecido subcutâneo, além de possuírem capacidade de proliferação e sobrevivência em microambientes distantes do seu local de origem (CLARK *et al.*, 1984; CLARK, 1991; FIDLER, 2003, National Cancer Institute, 2015).

**Figura 3** Constituintes celulares das camadas da pele e etapas da progressão do melanoma humano.



A pele é dividida histologicamente em duas principais camadas: a epiderme, que é composta por queratinócitos e melanócitos, que estão próximos a membrana basal e a derme, que é composta principalmente por fibroblastos. A proliferação aberrante de melanócitos induzidas por radiação UV, por exemplo, resulta na formação de nevus benignos ou displásicos. Posteriormente, ocorre a fase de crescimento radial onde o melanoma apresenta a habilidade de crescimento dentro da epiderme, seguido pela invasão da derme na fase de crescimento vertical, culminando em metástase. Adaptado de ZAIDI et al., 2008.

Já a classificação dos estágios de desenvolvimento descrito por BRESLOW (1970), baseada na espessura vertical da lesão, é mais reprodutível e possui maior precisão quanto ao comportamento do melanoma maligno em lesões mais expressas do que 1,5 mm. Sua classificação foi utilizada pelo Comitê Comum Americano em Câncer (AJCC) para definir a classificação dos estágios de desenvolvimento do melanoma pelo *Tumor Node Metastasis* (TNM) em 5 estágios (baseado na espessura do melanoma e a possibilidade de existência de qualquer propagação em nódulos linfáticos ou em outras partes do corpo). De forma simplificada, as etapas são: 0. Melanoma *in situ* na epiderme sem metástases locais ou distantes. 1. Melanoma com espessura ≤ 1 mm com ou sem ulceração ou mitose e sem metástases locais ou

distantes; 2. Melanoma com espessura entre 1,01 e 4,00 mm ou > 4,00 mm, com ou sem ulceração e sem metástases locais ou distantes; 3. Melanoma com espessura entre 1,01 e 4,00 mm ou > 4,00 mm com ou sem ulceração e com metástases somente em nódulos linfáticos locais ou sentinelas, sem evidências de metástase distantes; 4. Melanoma com diferentes espessuras com ou sem ulceração, com metástases em nódulos linfáticos locais ou sentinelas e com metástase em diferes órgãos como ossos, cérebro, pulmão, fígado e intestino (ESGE *et al.*, 2010, National Cancer Institute, 2015).

Além de células cancerosas, os tumores apresentam outra dimensão de complexidade, pois o microambiente tumoral possui um repertório de células recrutadas, aparentemente normais; de fatores de crescimento; rede vascular; expressão de enzimas, proteínas e fatores quimiotáticos, que tornam o "microambiente tumoral" único. Assim, o sucesso das terapias anti-melanoma estão associados ao estágio de desenvolvimento tumoral, mas também, dentre outros fatores, à composição do microambiente tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Nos últimos anos têm sido demostrado, por evidências epidemiológicas ou experimentais, que a inflamação crônica é um das características mais consistentes do microambiente tumoral. A inflamação pode contribuir para a aquisição de características únicas de cada tumor, onde estas podem ser alteradas pela presença do infiltrado de células inflamatórias; moléculas bioativas como fatores de crescimento, que sustentam a sinalização da proliferação celular; fatores de sobrevivência, que limitam a morte celular; fatores pró-angiogênicos, como enzimas que modificam a matriz extracelular facilitando a angiogênese, invasão e metástases; e sinais indutores que ativam a transição epitelial para a mesenquimal (DENARDO *et al.*, 2010; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; QIAN & POLLARD, 2010; KARNOUB & WEINBERG, 2007, GALDIERO *et al.*, 2012).

Neste contexto, os mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas; células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas, entre outras); fatores de transcrição (fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT 3), podem ser empregados como alvo de tratamento a fim de diminuir a incidência e a metastização tumoral (ALLAVENA et al., 2008; SCHETTER et al., 2009; MANTOVANI et al., 2008).

As células inflamatórias são componentes essenciais do microambiente tumoral e desempenham um papel importante na progressão tumoral (HANAHAN & WEINBERG,

2011; MANTOVANI *et al.*, 2008). Dentre as células inflamatórias, os neutrófilos tem recebido destaque pois são plásticas, ou seja, podem mudar o fenótipo dependendo do micro ambiente, e ainda, por serem secretoras modificam o microambiente tumoral e o crescimento de tumores (MANTOVANI *et al.*, 2011, GALDIEIRO *et al.*, 2012, FRIEDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU *et al.*, 2013).

Os neutrófilos são células sanguíneas da série branca que são geradas a partir de células tronco hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea, e seus estágios morfológicos de maturação incluem diferentes fases. Os neutrófilos segmentados, última etapa de maturação, representam a população predominante (cerca de 50-70%) de leucócitos circulantes em humanos. Estas células presentes no sangue periférico e tecidos possuem um núcleo multi-lobulado e três classes diferentes de grânulos em seu citoplasma. Cada classe de grânulos, azurófilos, secundários e de gelatinase, possuem componentes diferentes no seu interior que, em conjunto, são responsáveis pelas funções destas células. Os neutrófilos participam de forma direta na ativação e regulação da imunidade inata, atuando como células fagocíticas, liberadoras de enzimas láticas e produtoras de espécies reativas de oxigênio, e adaptativa do organismo, atuando como células apresentadoras de antígenos, como indutoras da proliferação e polarização de células T, e como células resolutivas do processo inflamatório (MANTOVANI et al., 2011; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Nos últimos anos tem sido publicada uma série de trabalhos que enfatiza, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a importância dos neutrófilos na biologia do câncer. Os neutrófilos são recrutados para o tumor em diversos estágios de iniciação e progressão tumoral. Consequentemente, eles desempenham um intenso *cross-talk* com as células tumorais, células do estroma e o microambiente (GALDIEIRO *et al.*, 2012, FRIEDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU *et al.*, 2013, KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). De maneira similar a polarização de macrófagos associados ao tumor (M1 e M2) no microambiente tumoral, tem sido proposto que os neutrófilos associados ao tumor (TANs) adquirem fenótipos de polarização em N1 e N2. A predominância de neutrófilos com fenótipo N1 no microambiente tumoral desencadeia um perfil de inibição de crescimento tumoral, enquanto que a predominância de neutrófilos com fenótipo N2 desencadeia um perfil de progressão do crescimento tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2011, GALDIEIRO *et al.*, 2012, FRIEDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU *et al.*, 2013).

As diferenças entre estes perfis de neutrófilos e resposta final de desenvolvimento tumoral são acompanhados por algumas características, como concentrações de fator de transformação do crescimento-β (TGF-β), agninase, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), fator de crescimento de endotélio (VEGF), metaloproteinase de matriz extravascular-9 (MMP-9), espécies reativas de oxigênio, dentre outros. Este perfil irá regular etapas importantes como a imunossupressão ou imunoestimulação, perfil pró ou anti-angiogênico, e liberação de mediadores pró ou anti-inflamatórios que irão direcionar a sobrevivência, proliferação, migração e invasão das células tumorais (Figura 4) (MANTOVANI *et al.*, 2011, GALDIEIRO *et al.*, 2012, FRIDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU *et al.*, 2013).

Adicionalmente, estudos clínicos recentes apontam a presença de neutrófilos como um importante parâmetro de prognóstico independente, que influencia no resultado da doença (DONSKOV, 2013). Um intenso infiltrado destas células no microambiente tumoral pode ser associado a um pior prognóstico e menor sobrevivência do paciente em diversos tipos de câncer, incluindo câncer renal, carcinoma hepatocelular, carcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, glioma, adenocarcinoma gástrico, câncer coloretal e melanoma (FOSSATI et al., 2009; JENSEN et al., 2009; KUANG et al., 2011; LI et al., 2011; TRELLAKIS et al., 2011; ILIE et al., 2012; JENSEN et al., 2012; RAO et al., 2012; ZHAO et al., 2012; DONSKOV, 2013, LADÁNVI, 2013). Em 2005 foi publicado o primeiro trabalho na literatura relacionando a presença de neutrófilos como um fator de pior prognóstico em pacientes com melanoma metastático (SCHIMIDT et al., 2005). Apesar disto, a literatura é escassa, neste momento, quanto à real modulação exercida pelas células de melanoma nos neutrófilos ou a modulação que os neutrófilos exercem nas células de melanoma.

Do exposto, fica evidente a importância das células imunes, entre os quais os neutrófilos, na progressão ou inibição tumoral, sendo que a elucidação da exata participação dos mesmos no tumor poderá torná-los alvos terapêuticos para tumores malignos, como os melanomas.

Penótipo NI

Células Tumorais

Células Tumorais

Células Tumorai

Células T

Cost

Células T

Cost

Células T

Cost

Cos

Figura 4 Participação dos neutrófilos TAN na inibição ou progressão tumoral.

Fonte: Adaptado de Mantovani et al., 2011.

#### 1.3 O tratamento de melanomas e as nanopartículas carreadoras de fármacos

Atualmente, dentre as opções de tratamento para o melanoma estão a realização de intervenção cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia, e a imunoterapia (National Cancer Institute, 2015), sendo que melhor tratamento para o paciente com o melanoma é realizado de acordo com a classificação do estágio de desenvolvimento do melanoma, e na maioria dos casos é utilizado um modo de terapia combinada (National Cancer Institute, 2015, Cancer Research UK, 2015).

O prognóstico do paciente é afetado pelas características primárias e metastáticas dos tumores. Dentre os principais fatores de prognóstico estão a espessura e/ou o nível de invasão do melanoma, o índice mitótico (mitoses por milímetro), a ulceração ou hemorragia do sítio primário, o número de linfonodos afetados e a presença de metástase sistêmica. Outros fatores, como a presença de infiltrado de células como linfócitos ainda estão sendo estudados (National Cancer Institute, 2015).

A intervenção cirúrgica pode acontecer não só no local da lesão inicial, mas também para a retirada de nódulos linfáticos e outros órgãos que foram atingidos pelas metástases. Os quimioterápicos mais utilizados, que podem ser utilizados de forma combinada com a terapia biológica, são a Dacarbazina e a Temozolida, que muitas

vezes são utilizadas em combinação com Carmustina, Vinblastina, Cisplatina ou com o Tamoxifeno. A radioterapia para o tratamento de melanomas é pouco utilizada e tem o objetivo de controlar os sintomas da doença e diminuir as chances de recidivas, principalmente após o processo cirúrgico. A imunoterapia consiste em fármacos inibidores de *chekpoints* como o anticorpo monoclonal anti-proteína 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4; Ipilimumab) ou anti-VEGF (Bevacizumab), em administração de interleucina-2 e interferon α-2b recombinantes, além da utilização de inibidores de transdução de sinal, como os inibidores de BRAF (Verurafenib, Dabrafenib) e de MEK (Trametinib). Ainda, dentre as opções de terapias biológicas, mas somente como *trial* clínico, está a terapia baseada em vacinas (GOYDOS *et al.*, 2005; GARBE *et al.*, 2011; Cancer Research UK, 2015, National Cancer Treatment, 2015).

O índice de resposta dos pacientes a estes tratamentos é muito baixo, não ultrapassando a faixa dos 30% a fração de pacientes com resposta objetivas. Os melanomas figuram assim, entre os cânceres humanos mais resistentes aos diferentes tratamentos. Os mecanismos de resistência mais conhecidos dos melanomas aos tratamentos são a expressão elevada de transportadores do tipo ATP-binding cassatte (ABC), sendo representada principalmente pela glicoproteína-P, que bombeiam os fármacos para o meio extracelular (DEICHMANN et al., 2005); a internalização dos fármacos pelos melanossomas, que podem captar, degradar e externalizar os fármacos junto com a melanina (CHEN et al., 2006); a evasão à morte por apoptose, permitindo que as células escapem da senescência pela super expressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> e Mcl-1; e a proliferação descontrolada, uma vez que adquirem mutações nas proteínas importantes para a proliferação e sobrevivência celular, como a BRAF e as vias de MAPK e MEK/ERK (BOLLAG et al., 2010; SMALLEY, 2010).

Deste modo, devido à rápida progressão tumoral, a alta resistência da doença à terapia e aos efeitos adversos dos tratamentos disponíveis, ainda é necessário a busca de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos melanomas (BENJAMIN *et al.,* 2007; FECHER *et al.,* 2008). Neste sentido, recentemente têm sido descrito na literatura que os sistemas nanoestruturados para o tratamento de melanoma podem ser uma estratégia viável. Apenas poucas formulações nanoestruturadas foram aprovadas pelo FDA já estão disponíveis na clínica para o tratamento ou como "*Trails*", como por exemplo, o Doxil<sup>®</sup> (lipossomas peguilados contendo doxorrubicina), o Abraxane<sup>®</sup>

(nanopartículas de albumina humana contendo Nab-paclitaxel), o Daunoxome® (lipossomas contendo daunorrubicina), o Ontak<sup>®</sup> (nanopartículas contendo denileucina diflitox), o Nanoxel<sup>®</sup> (nanopartículas contendo paclitaxel) e o Aurimune<sup>®</sup> (TNF ligado à nanopartículas de ouro e tiol peguilado, fase II). As demais opções de nanoestruturas contendo diferentes antineoplásicos já conhecidos para o tratamento do melanoma são utilizadas somente experimentalmente, como os lipossomas, dendrímeros, polimersomas, nanopartículas de carbono, nanogéis e, além disso, nanopartículas magnéticas para aumentar a temperatura no local desejado, nanopartículas metálicas ligadas a fotosensibilizadores para a realização de terapia fotodinâmica (BEI et al., 2010; CHEN et al., 2013; BOMBELLI et al., 2014; LI et al., 2015; NORTHFELT et al., 1996; OLSEN et al., 2001; NYMAN et al., 2005, PARVEEN et al., 2012; BAWA, 2013).

A utilização de sistemas nanoestruturados para o tratamento de melanoma, tanto experimentalmente quanto na clínica, apresenta algumas vantagens de acordo com cada nanopartícula. Os lipossomas apresentam alta biocompatibilidade e biodegradabilidade e altas taxas de captação celular; os dendrímeros apresentam alta estabilidade, solubilidade e eficácia de encapsulamento de drogas e, além disso, apresentam uniformidade de tamanho; os polimerssomas apresentam alta biodegradabilidade e permitem liberação controlada; as nanopartículas de carbono apresentam alta compatibilidade e fotoestabilidade, além disso, tamanho reduzido; as nanopartículas de albumina humana apresentam alta solubilidade, estabilidade e baixa toxicidade. Por outro lado, as nanopartículas decritas acima também apresentam algumas desvantagens como baixa eficácia de encapsulamento de drogas e alto custo (lipossomas); baixa biodegradação (dendrímeros e nanopartículas de carbono); falta de boa uniformidade de tamanho (polimerssomas). E estas desvantagens dos sistemas nanoestruturados podem culminar na síndrome das mãos e dos pés (rash cutâneo, edema, rubor e dor), efeitos secundários com a liberação dos tratamentos, toxicidade em células saudáveis devido à carga positiva, acúmulo em rins e retículo endotelial, inflamação e produção de espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2013).

Como já salientado, as nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetros inferiores a 1 µm e que têm sido utilizadas como uma estratégia atrativa para melhorar a eficiência da realização de *target* tumoral e reduzir os efeitos tóxicos de diferentes tratamentos. Neste sentido, tem sido descrito que as LNCs com estrutura e características físico-químicas semelhantes ás utilizadas

neste trabalho contendo indometacina, reveratrol ou curcumina aumentaram a eficácia no tratamento do glioblastoma *in vivo* e no tratamento da doença de Alzheimer (BERNARDI *et al.*, 2009; FIGUEIRÓ *et al.*, 2013; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015). Além disso, LNCs contendo extrato de *blueberry* melhoram a resposta em modelos de nocicepção em camundongos (RAMIREZ *et al.*, 2010).

A utilização de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou ativos cosméticos é uma alternativa para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas, bem como o transporte através delas e facilitar a sua absorção ou penetração cutânea (COUVREUR & VANTHIER, 2006). Comparando com outros carreadores coloidais, as nanocápsulas poliméricas apresentam maior estabilidade quando estão em contato com fluidos biológicos (RONEY et al., 2005). Além disso, elas podem ser administradas por via endovenosa sem causar embolia (COUVREUR et al., 2002). Mas, os sistemas carreadores, para serem efetivos, devem seguir alguns requisitos, como: o carreador deve ser capaz de encapsular a substância ativa; o sistema nanotecnológico resultante deve ser capaz de levar as moléculas de fármaco ao alvo específico pretendido; as moléculas do fármaco devem ser liberadas no tecido ou órgão alvo, e o carreador, depois de liberar o fármaco, deve ser eliminado após dissolução ou degradação no meio biológico. Além disso, os sistemas carreadores devem ser minuciosamente planejados em relação às suas características físico-químicas, como hidrofobicidade, potencial de superfície e perfil de biodegradação (GUTERRES et al., 2007, POHLMANN et al., 2013; FRANK et al., 2015).

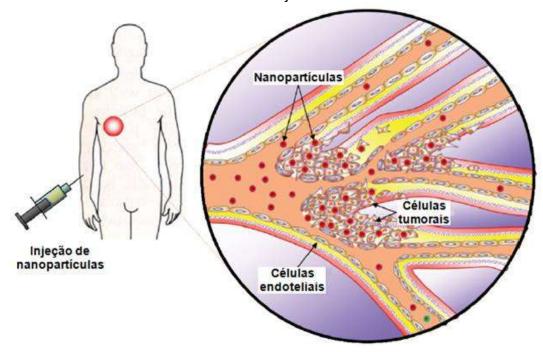
A entrega de drogas, presentes em sistemas nanoestruturados, a sítios específicos têm se mostrado promissora em termos de farmacocinética. Inicialmente, sugeria-se que a única forma viável para aumentar a seletividade ao tumor era usar um alvo celular, assim, muitos pesquisadores procuraram desenvolver anticorpos ou peptídeos específicos para os tumores (DUNCAN, 2003; KHANDARE & MINKO, 2006; KOUCHAKZADEH *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015). No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que fármacos conjugados com polímeros ou nanopartículas têm sua circulação sanguínea prolongada, e que estas se acumulam passivamente nos tumores, mesmo na ausência de ligantes de alvos específicos (DUNCAN, 2003), sugerindo a existência de um mecanismo de retenção passiva.

Os vasos sanguíneos tumorais geralmente são caracterizados por anomalias, tais como alta taxa de proliferação de células endoteliais, aumento da tortuosidade, deficiência de pericitos e a deformação na membrana basal. Este defeito na estrutura vascular, que provavelmente é resultante da rápida vascularização necessária para fornecer oxigênio e nutrientes para os tumores de crescimento rápido, aliada à diminuição na drenagem linfática, torna os vasos permeáveis a macromoléculas. Devido à diminuição da drenagem linfática, as macromoléculas não são removidas de forma eficiente, e, assim, são mantidas na região tumoral. Este fenômeno de alvo (target) passivo, primeiro identificado pelo grupo de MAEDA e colaboradores (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA 2001), foi chamado de "efeito de aumento de retenção e permeabilidade (EPR)". Após a sua primeira identificação, apesar de sofrer algumas críticas, estudos têm demonstrado que o efeito EPR resulta em acúmulo passivo de macromoléculas e de partículas nanométricas (polímeros conjugados, micelas poliméricas, dendrímeros e lipossomas) em tecidos de tumores sólidos, aumentando o índice terapêutico e diminuindo os efeitos tóxicos nas regiões próximas (MATTHEOLABAKIS et al., 2012). A Figura 5 ilustra o conceito do tumor como alvo passivo por efeitos de EPR.

O tamanho ótimo das nanopartículas que se acumulam em um tumor devido ao efeito EPR ainda não é precisamente conhecido. Estudos utilizando lipossomas e nanopartículas têm demonstrado que os poros em vasos tumorais podem chegar a 1,2 µm (YOKOYAMA *et al.*, 1991; YUAN *et al.*, 1995), indicando que nanopartículas carregadas de fármacos podem se acumular no microambiente tumoral e em células tumorais. Desta forma, a administração de formulações de lipossomas contendo doxorrubicina apresenta farmacocinética favorável devido ao efeito de *target* tumoral mediado por EPR, quando comparado com a doxorrubicina não encapsulada (MOGHIMI *et al.*, 2005). Adicionalmente, partículas poliméricas contendo doxorrubicina foram encontradas a circulação sanguínea por mais de três dias após o tratamento, e gradualmente acumularam em tumores através do efeito EPR (PARK *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006). Em teoria, o efeito EPR pode ser utilizado também para entregar genes e proteínas em tumores primários ou em metástases, sugerindo que uma ampla variedade de medicamentos que utilizam a tecnologia nanométrica podem ser utilizados para tornar o tumor alvo de drogas antineoplásicas.

Assim, aliando as vantagens da utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo antineoplásicos ao efeito da maior permeação e do efeito de retenção, atualmente é de grande interesse, para a comunidade científica, avaliar o emprego de antineoplásicos presentes em formulações nanoestruturadas no tratamento do câncer.

**Figura 5** Acúmulo passivo de fármacos no microambiente tumoral devido a maior permeabilidade vascular e ao efeito de retenção.



As nanopartículas poliméricas se acumulam preferencialmente em tumores sólidos, devido, pelo menos em parte, às fenestras do sistema de vasos presentes no microambiente tumoral e da ineficácia do sistema de drenagem linfática. Adaptado de PARK et al., 2008.

## 1.4 Eugenol

Os fitoquímicos fenólicos compreendem uma ampla classe encontrada em diversas plantas. Esta classe é extensivamente pesquisada por cientistas devido ao seu potencial de promoção da saúde e o eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol), um destes fitoquímicos, é um composto fenólico natural biologicamente ativo que pode ser encontrado em concentrações significativas em diferentes espécies de plantas, como por exemplo, a *Syzgium aromaticum* (cravo), a *Pimenta racemosa* (louro) e a

Cinnamomum verum (canela) (GOSH et al., 2005; PISANO et al., 2007). O óleo essencial extraído de cravos contém cerca de 72-90% de eugenol (JAGANATHAN & SUPRIYANTO, 2012). O Eugenol é um líquido oleoso de cor amarelo claro que é muito solúvel em solventes orgânicos e pouco solúvel em água.

De acordo com a literatura, o eugenol tem sido utilizado em diferentes áreas de forma segura, pois não apresenta efeitos cancerígenos ou mutagênicos (FDA, U.S. Food and Drug Administration), sendo que a FAO (Food and Agriculture Organization) e a WHO (World Health Organization) aceitam a ingestão diária de 2,5 mg/kg de eugenol por peso corpóreo de humanos (FDA, 2014; FAO, 2014; WHO, 2014).

Tal composto pode atuar como agente flavorizante, antisséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antioxidante, antigenotóxico e como principal ingrediente do "cimento" para preenchimento de cavidades dentárias (ABRAHAM *et al.*, 2001; KALEMBA *et al.*, 2003; BURT, 2004; GAYOSO *et al.*, 2005; GHOSH *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2007; PISANO *et al.*, 2007; SHOKEEN *et al.*, 2008; HIDALGO *et al.*, 2009). Os efeitos do eugenol são dependentes da sua concentração pois, tem sido demonstrado que, em baixas concentrações ele atua como agente antioxidante e anti-inflamatório, enquanto que em altas concentrações pode atuar como um pró-oxidante, causando aumento na geração de dano tecidual induzido por radicais livres (CHOGO & CRANK., 1981; ASHA *et al.*, 2001).

Recentemente tem sido reportado que o eugenol possui atividade anti-tumoral em várias linhagens celulares e em modelos animais. Adicionalmente, os mecanismos moleculares da apoptose induzida pelo eugenol em melanomas, tumores de pele, câncer de mama, leucemias, hepatoma, osteosarcomas, e mastócitos têm sido documentados (YOO et al., 2005; SLAMENOVÁ et al., 2009; ABDEL BAR et al., 2010; JAGANATHAN & SUPRIYANTO, 2012).

Além da indução de apoptose em diferentes tipos celulares, tem sido descrito que o eugenol inibe a biossíntese de prostaglandinas e bloqueia a atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), além de causar supressão no crescimento de melanomas por inibir a atividade transcricional do fator de transcrição E2F1 (GHOSH *et al.*, 2005; PISANO *et al.*, 2007; CARRASCO *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Adicionalmente, em um modelo de carcinogênese gástrica em ratos foi demonstrado que o eugenol induz apoptose das células cancerosas, por um mecanismo de desequilíbrio das proteínas pró e anti-apoptóticas e, ao mesmo tempo, por inibir a invasão e a angiogênese, por

mecanismo dependente da alteração do equilíbrio entre os estimuladores e inibidores do processo (MANIKANDAN *et al.*, 2010).

Um estudo demonstrou que o acetileugenol (AC) apresenta atividade similar à do eugenol em células de câncer de próstata insensíveis a andrógeno e em células de carcinoma escamoso oral (CARRASCO *et al.*, 2008). Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais o eugenol e o AC exercem seu efeito antitumoral ainda são pouco conhecidos e peculiares para cada tipo de tumor.

Para o desenvolvimento desta tese foi necessário realizar uma acetilação do eugenol (Figura 6), a fim de manter a estabilidade das formulações nanoencapsuladas contendo o princípio ativo, LNC-AC, conforme discutido ao longo do trabalho. As informações da literatura quanto à eficácia terapêutica do AC ou das nanocápsulas lipídicas contendo AC ainda são escassas tornando-se assim alvos interessantes para estudo.

Figura 6 Estrutura química do eugenol (A) e do acetileugenol (B).

## 2 Objetivos

Os objetivos desta tese foram avaliar a eficácia terapêutica do acetileugenol (AC), das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol (LNC-AC) em um modelo de melanoma *in vivo* e avaliar os mecanismos tóxicos destes tratamentos utilizando ensaios *in vitro* com diferentes linhagens de células. Além disso, foi objetivo avaliar se os tratamentos em células de melanoma poderiam modificar a ativação de neutrófilos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1) Avaliar os efeitos terapêuticos das LNC, AC e LNC-AC em diferentes estágios de desenvolvimento de melanoma *in vivo*;
- 2) Avaliar os efeitos tóxicos das LNC, AC e LNC-AC durante e ao término dos protocolos de desenvolvimento de melanoma *in vivo*;
- 3) Avaliar os efeitos tóxicos das LNC, AC e LNC-AC *in vivo* após tratamento agudo;
- 4) Avaliar os efeitos das LNC, AC e LNC-AC em células endoteliais e de melanoma humano *in vitro*;
- 5) Avaliar se o tratamento das células de melanoma murino com LNC, AC e LNC-AC poderia modificar a ativação de neutrófilos *in vitro*.

## 3 Material e Métodos

## 3.1 Obtenção e caracterização das formulações

O acetileugenol, as nanocápsulas de núcleo lipídico e as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol foram fornecidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Adriana Raffin Pohlmann, do Instituto de Química e da Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres, da Faculdade de Farmácia, ambas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os métodos utilizados para a produção e resultados de caracterização das formulações utilizadas neste trabalho, e apresentados aqui, foram realizados e obtidos pela Dr<sup>a</sup>. Luana Almeida Fiel durante o desenvolvimento do seu Doutorado realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FIEL, 2013).

O acetileugenol utilizado neste trabalho foi obtido pela acetilação do eugenol (óleo de cravo-da-índia, 78 % de eugenol) por mecanismo de substituição nucleofílica em carbono acílico (CAREY & SUNDBERG, 2000) e purificado por extração com solução aquosa de NaOH 0,5 M. O produto obtido foi caracterizado por infravermelho e RMN-1H.

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) utilizadas neste trabalho foram preparadas conforme método já descrito, chamado deposição interfacial de polímero pré-formado (MÜLLER et al., 2001; JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). Resumidamente, foi preparada a fase orgânica dissolvendo-se o componente oleoso, o monoestearato de sorbitano e a blenda polimérica de poli (epsiloncaprolactona) (PCL) (PCL<sub>114</sub>:PCL<sub>14</sub>, 90:10, m/m), na acetona (Tabela 1). Esta foi mantida sob agitação e aquecimento a 40 °C. Em um frasco separado, o polissorbato 80 (tensoativo de caráter hidrofílico) foi disperso em água, permanecendo sob agitação, à temperatura ambiente. Após a completa dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi injetada na fase aquosa utilizando-se um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação moderada por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e concentração da suspensão. O núcleo das nanocápsulas contendo acetileugenol foi formado por mistura de trilglicerídeos de cadeia média (TCM) e acetileugenol na proporção de 75:25 (TCM:AC, v/v) e o núcleo das nanocápsulas sem o principio ativo foi formado apenas por triacilglicerol de cadeias médias.

Tabela 1 Composição qualitativa e quantitativa das formulações das nanocápsulas.

	Componentes	Quantidade
Fase Orgânica	Acetileugenol	0,042 g
	PCL (M 114000 g/mol) (PCL <sub>114</sub> )	0,090 g
	PCL (M 14000 g/mol) (PCL <sub>14</sub> )	0,010 g
	Triglicerídeos de cadeia média (ácidos	0,120 mL
	cáprico e caprílico) Monoestearato de sorbitano	0,040 g
	Acetona	27 mL
Fase	Água milliQ	53 mL
Aquosa	Polissorbato 80	0,080 g

Fonte: Adaptado de Luana Almeida Fiel, 2013.

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas fisico-quimicamente quanto à distribuição de diâmetro das partículas, diâmetro médio considerando o volume de uma esfera (D[4,3]) e superfície específica por difração de laser (Mastersizer® Mastersizer 2000 (Malvern, Reino Unido); quanto ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro médio das partículas por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer®nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, Reino Unido); quanto ao potencial zeta por mobilidade eletroforética (Zetasizer®nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, Reino Unido); quanto ao pH por potenciometria; quanto à integridade do polímero na presença do acetileugenol por avaliação do entumescimento do filme polimérico (massa de um filme de polímero imerso em mistura triacilglicerol:acetileugenol 1:1 foi verificada durante 60 dias) e quanto ao número de partículas presente nas formulações pelo método de rastreamento do movimento das partículas no equipamento Nanosight (modelo LM10, Amesbury, Reino Unido).

Adicionalmente, as suspensões de LNC-AC foram analisadas quanto ao teor (mg de fármaco/mL de formulação) e eficiência de encapsulação (E.E. %) após dissolução e ultrafiltração-centrifugação, respectivamente. O teor de acetileugenol foi determinado no comprimento de onda em que o AC apresentou maior absorção em análise por varredura espectroscópica em UV-Vis ( $\lambda_{máx}^{AC}$ = 275 nm). A metodologia previamente descrita para análise de eugenol por CLAE (LI *et al.*, 2004) foi adaptada para as análises de acetileugenol. Nesta adaptação utilizou-se equipamento S200 Perkin-Elmer

(USA), coluna RP-18 LiChrospher<sup>®</sup> 100 (Merck, Germany), fase móvel metanol:água (85:15, v/v), pH 5,0 e fluxo 0,7 mL/min.

Cabe ressaltar que estes ensaios e caracterizações foram realizados pela Dra. Luana Almeida Fiel da UFRGS, que é colaboradora deste trabalho, e constituem parte de sua tese de Doutorado. Por esta razão, estes resultados são descritos resumidamente, somente para demonstração da produção, purificação e caracterização das nanocápsulas de núcleo lipídico em estudo.

### 3.2 Tratamentos

Para o desenvolvimento dos ensaios *in vivo*, foram empregados os seguintes grupos experimentais: salina (controle), DMSO (veículo do acetileugenol), nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC, sem o acetileugenol), acetileugenol (AC, solução de acetileugenol), nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol (LNC-AC, nanocápsulas contendo acetileugenol no núcleo) ou triglicerídeos de cadeia média dos ácidos cáprico e caprílico (TCM). Para os experimentos realizados *in vivo* foram utilizadas diferentes períodos de tempo de tratamento, que serão descritos a seguir. Os animais receberam os tratamentos nas doses de 20 mg/Kg (via endovenosa) ou 50 mg/Kg (via intraperitoneal e via oral) da solução de AC ou de LNC-AC, ou volumes equivalentes dos seus respectivos controles, de acordo com cada protocolo experimental.

Para o desenvolvimento dos ensaios *in vitro* foram empregados os seguintes grupos experimentais: R10 (controle), DMSO (veículo do acetileugenol), nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC, sem o acetileugenol), acetileugenol (AC, solução de acetileugenol) ou nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol (LNC-AC, nanocápsulas contendo acetileugenol no núcleo).

Os diferentes compostos foram diluídos no meio de cultura RPMI, adicionado de 10% de SFB (R10), nas concentrações de 1; 3; 10; 30; 60; 100 ou 300 µM, quando necessário. Os volumes de DMSO ou de LNC foram equivalentes aos seus respectivos tratamentos com AC ou com LNC-AC. Os tratamentos foram incubados com as culturas de células endoteliais, de melanoma murino ou melanoma humano por diferentes períodos de tempo.

### 3.3 Cultura de células

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as diferentes células: 1) linhagem de melanoma metastático murino B16F10, 2) linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-28, 3) linhagem não tumoral de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), e 4) Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6.

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizadas células de melanoma murino B16F10 (H2b), que correspondem a uma variante de melanoma B16 obtida de camundongos C57BL6. Esta linhagem de células é amplamente utilizada pela literatura como modelo experimental *in vivo* (DE LIMA *et al.*, 2013; STRELCZYK *et al.*, 2009).

Para a realização dos ensaios *in vitro* foi empregada a linhagem de células de melanoma humano SK-Mel-28, cuja principal mutação ocorre no gene B-RAF (V599E) (mutação ocasionada pela substituição da timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), que resulta na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599). Esta mutação ocorre em aproximadamente 50 % dos melanomas (GOYDOS *et al.,* 2005). Ainda, a linhagem não tumoral de células endoteliais humanas (HUVEC), foi empregada nos ensaios de toxicidade *in vitro*, pois a células endoteliais reveste os vasos da circulação e, desta forma, está em contato direto com agentes químicos distribuídos pelo organismo.

As linhagens de células foram cultivadas em estufa a 37°C, em garrafas de cultura contendo RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Vitrocell<sup>®</sup>) acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, Vitrocell<sup>®</sup>) (R10), em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células foram subcultivadas até atingirem aproximadamente 80% da densidade de saturação e, então, foram lavadas e incubadas com uma solução Tripsina/EDTA 250 mg% (Vitrocell<sup>®</sup>). Os estoques celulares foram mantidos em soro bovino fetal (SFB) contendo DMSO 10% (dimetilsulfóxido) a -196 °C, em reservatório com nitrogênio líquido e somente foram empregadas nos ensaios após o terceiro repique.

Os neutrófilos foram obtidos de camundongos C57BL6, machos, com 2-3 meses, que receberam uma injeção intraperitoneal de 3 mL de solução de glicogênio de ostra 1% (Type II– Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em solução tamponada de fosfatos (PBS: NaCl 125mM, KCl 5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM). Após 4 horas, os animais foram anestesiados com uma solução quetamina/xilazina (8:80 mg/kg),

exsangüinados pela secção da artéria carótida e veia jugular e a cavidade abdominal foi lavada com PBS para coleta das células com auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos, a 4º C, em 600 g. As células foram ressuspendidas em 1 mL de Hanks e contadas em câmara de Neubauer. (HEBEDA *et al.*, 2012).

#### 3.4 Ensaios in vivo

## 3.4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram empregados camundongos C57BL6 machos com peso entre 20-30g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos nas condições normais de biotério, ou seja, caixas de polipropileno, salas com controle de temperatura (22-25°C), controle de umidade (40 %), controle dos ciclos de luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro), com água e comida a vontade, até o início e durante os experimentos, quando necessário. Os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CEUA, N°309). Antes e, quando necessário, durante os experimentos os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de ketamina (77 mg/kg) /cloridrato de xilazina (7 mg/kg), respectivamente.

## 3.4.2 Indução de melanoma em camundongos e avaliação do crescimento tumoral

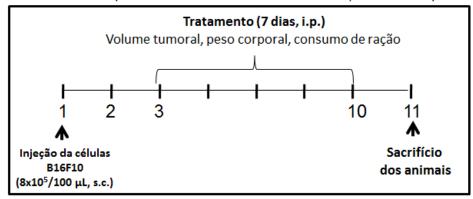
Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos e mantidos em condições normais de biotério. Para a realização da injeção das células tumorais da linhagem B16F10 os animais foram anestesiados e a região dorsal foi tricotomizada com o creme Veet<sup>®</sup>. Para avaliar os efeitos dos tratamentos nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral, foram realizados dois protocolos experimentais distintos: 1) avaliação nas primeiras etapas de desenvolvimento do melanoma - os animais receberam uma injeção subcutânea com 8x10<sup>5</sup> células B16F10 em 100 µL (meio de cultura com 10% de SFB) e a partir do 3º dia da administração das células tumorais os animais receberam o tratamento pela via intraperitoneal por 7 dias. 2) avaliação nas

primeiras etapas de desenvolvimento do melanoma - os animais receberam uma injeção subcutânea com 8x10<sup>5</sup> células B16F10 em 100 μL (meio de cultura com 10% de SFB) e a partir do 3º dia da administração das células tumorais os animais receberam o tratamento pela via oral por 7 dias. 3) Avaliação nos estágios avançados de desenvolvimento do melanoma - os animais receberam uma injeção subcutânea com 8x10<sup>5</sup> células B16F10 em 100 μL (meio de cultura com 10% de SFB) e a partir do 10º dia da administração das células tumorais os animais receberam o tratamento pela via oral, por 10 dias (adaptado de ONIKI *et al.*, 2006 e HUO *et al.*, 2010) O delineamento experimental *in vivo* está representado na Figura 7.

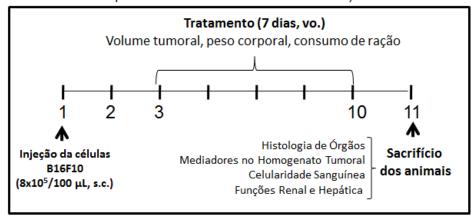
As dimensões do tumor foram determinadas diariamente, após os animais serem anestesiados com uma solução de cloridrato de ketamina (77mg/kg) / cloridrato de xilazina (7mg/kg), a partir do primeiro dia de tratamento com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo nº CD-6"CSX-B). O volume tumoral foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: "(valor do menor diâmetro)² x (valor do maior diâmetro) x 0,5"; de modo que os resultados foram expressos em milímetros cúbicos (DEGAKI *et al.*, 2009). A avaliação do crescimento tumoral foi realizada pela plotagem dos valores dos volume obtidos diariamente para cada grupo experimental do terceiro ao décimo dia de tratamento (mm³/dia).

**Figura 7** Esquema representativo dos três protocolos experimentais utilizados para a avaliação do crescimento tumoral após os diferentes tratamentos.

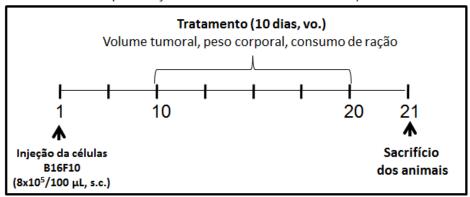
Protocolo 1 - Etapas iniciais de desenvolvimento tumoral, tratamento i.p.



Protocolo 2 - Etapas iniciais de desenvolvimento tumoral, tratamento v.o.



Protocolo 3 - Etapa avançada de desenvolvimento tumoral, tratameto v.o.



### 3.4.3 Análise Histológica

Para observar as alterações histopatológicas induzidas pelos diferentes tratamentos foram realizados cortes histológicos de diferentes tecidos dos animais utilizados no protocolo número 2 de desenvolvimento tumoral, descrito anteriormente (item 3.4.2). O tecido tumoral, estômago, intestinos, fígado, rins, baço, linfonodos,

pâncreas e pulmões foram coletados e transferidos para uma solução tampão fosfatosalino (PBS) contendo formaldeído (FA) a 10% (pH = 7,4), por 48 horas para fixação. Todas as amostras foram submetidas à desidratação e diafanização em álcool etílico e em diferentes concentrações de xilol. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina. Os blocos de parafina contendo as amostras coletadas foram cortados em micrótomo (cortes seriados com 5 micrômetros de espessura) e, em seguida, foi realizado a coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE) para uma observação geral das alterações histopatológicas.

Atualmente, a classificação das lesões proliferativas e não proliferativas (iniciativa INHAND) em camundongos está em discussão pelo Comitê de Padronização de Critérios Diagnósticos em Patologia Toxicológica (http://www.goreni.org/). Portanto, foi utilizada a classificação morfológica das lesões melanocíticas disponível para a espécie canina (SMITH *et al.*, 2002).

## 3.4.4 Avaliação dos mediadores químicos no homogenato tumoral

Para a avaliação das concentrações dos mediadores químicos no homogenato tumoral foram usados os animais do protocolo nº 2 de desenvolvimento tumoral, descrito anteriormente no item.3.4.2.

Ao término dos tratamentos, os animais foram sacrificados e parte da massa tumoral foi cuidadosamente removida e homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (T10 Ultra-Turrax IKA® - Brasil), de modo que para cada 1 g de tecido tumoral foram acrescentados 5 mL de solução tampão (composta por 10 mL de tampão Tris 50 mM pH 7,4 (Trizma – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 20 μL de PMSF 0,5 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10 μL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, esse homogenato foi centrifugado e no sobrenadante foi realizada a quantificação das proteínas pelo método de Bradford, com a finalidade de normatizar os valores obtidos para as concentrações dos mediadores químicos.

A concentração de nitrito (NO<sup>2</sup>-) foi determinada no sobrenadante do homogenato tumoral e no soro obtido dos animais por punção da veia cava abdominal. Em resumo, 50 μL das amostras (puras ou diluídas 1:3000 no caso do homogenato tumoral) foram adicionados à 50 μL do reagente de Griess (1% de sulfonilamida com 0,1% de α-naftil etilenodiamina). Após dez minutos de incubação em temperatura

ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de NO<sup>2-</sup> das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub>.

As concentrações dos outros mediadores como a prostaglandina  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>), TNF- $\alpha$ , interleucina 10 (IL-10) e o VEGF foram determinados no sobrenadante do homogenato tumoral dos animais com melanoma, sendo que os ensaios de ELISA foram conduzidos conforme as especificações dos fabricantes dos kits (PGE<sub>2</sub>: Cayman Chemical<sup>®</sup> - EUA; TNF- $\alpha$ : BD OptEIA<sup>®</sup> - EUA; IL-10: BD OptEIA<sup>®</sup> - EUA; VEGF: IBL<sup>®</sup> - Japão).

## 3.4.5 Avaliação da toxicidade dos tratamentos in vivo

Durante e/ou após a realização dos diferentes protocolos de tratamento de desenvolvimento tumoral foram analisados parâmetros, como ganho de peso e consumo de ração dos animais. Ainda, ao final do protocolo de tratamento nº 2, descrito no item 3.4.2, foram avaliados a celularidade sanguínea e funções renal e hepática dos animais.

Os animais e a ração contida em cada caixa foram pesados uma vez ao dia em uma balança semi-analítica, desde o primeiro dia de tratamento até o dia da eutanásia. Os resultados do peso dos animais foram apresentados como porcentagem (%) da variação do peso acumulativo, e os do consumo de ração como o consumo total de ração de cada grupo experimental.

As amostras sanguíneas foram obtidas a partir da punção da veia submandibular de camundongos previamente anestesiados. O sangue foi coletado em tubos tipo Eppendorf, contendo EDTA 10%, na proporção de 10 µL de anticoagulante para cada 1 mL de sangue. A partir do sangue obtido da punção da veia submandibular, foram realizados os hemogramas e a contagem diferencial de leucócitos circulantes. O hematócrito (Ht), a dosagem de hemoglobina (Hb), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas foram determinados pelo analisador automático de células sanguíneas ABC vet (ABX Diagnostics). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, corados com solução corante de May Grumwald-Giemsa

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), modificada (ROSENFELD, 1947). Os esfregaços foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100×).

Os níveis de creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram analisados no soro coletado dos animais a partir da punção da veia cava abdominal, por método enzimático utilizando kits comerciais referentes ao aparelho analisador de testes bioquímicos e imunológicos Labmax 240 (Labtest® - Brasil).

## 3.4.6 Microscopia Intravital no músculo cremastérico

Para a avaliação dos parâmetros da microcirculação murina após os diferentes tratamentos foi utilizada a técnica de microscopia intravital. Esta técnica permite avaliar a dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos, pela observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não (GAVINS, 2012). Para tanto, os animais foram anestesiados, canulados pela veia femural e em seguida cada animal foi submetido aos procedimentos cirúrgicos necessários para a exposição do músculo cremaste. Cabe ressaltar que os animais permaneceram anestesiados durante todo o protocolo de microscopia intravital.

Os animais foram posicionados e fixados, em decúbito ventral, sobre uma placa de metal aquecida com uma região acrílica transparente. Uma vez exposto, o músculo cremáster foi então distendido por quatro pontos distintos, com auxílio de pequenos ganchos, formando uma área transparente, pela qual foi possível visualizar as estruturas microvasculares (Figura 8). Uma vênula pós-capilar com diâmetro entre 30 e 40 µm, facilmente observável ao microscópio na superfície transparente, foi então escolhida aleatoriamente para análise. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução tampão de Ringer-Locke gelatina (pH= 7,3 – 7,4; NaCl 154nM; KCl 5,6 mM; CaCl2.2H2O 2mM; NaHCO3 6mM; Glicose 5mM e Gelatina).

Após a escolha da vênula, foram administrados, por via endovenosa, durante 5 minutos, aproximadamente 200 μL de Salina, DMSO, FA, LNC, AC (20 mg/kg) ou LNC-AC (20 mg/kg). A vênula foi observada antes (tempo 0), 10, 30, 60 e 120 minutos após a administração dos compostos. Foram avaliados os parâmetros de número de leucócitos em comportamento de "rolling", número de leucócitos aderidos, formação de trombos e de áreas hemorrágicas. Os leucócitos em movimento na periferia do fluxo sanguíneo, em contato com o endotélio, foram considerados em comportamento

"rolling". Essas células foram observadas individualmente e contadas durante um período de 10 minutos a partir de sua passagem por um ponto fixo selecionado na vênula. Foram considerados leucócitos aderidos aqueles que permaneceram por mais de 30 segundos fixados à parede vascular (FARSKY *et. al.*, 1995; 2004). As imagens foram obtidas com aumentos finais de 400 x para a quantificação do número de leucócitos em comportamento de "rolling" e 1000 x para a quantificação do número de leucócitos aderidos.

As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Axioplan II, Carl-Zeiss) e as imagens foram capturadas por câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), e transmitidas simultaneamente a um computador onde, posteriormente, foram analisadas pelo software AxioVision 4.8.

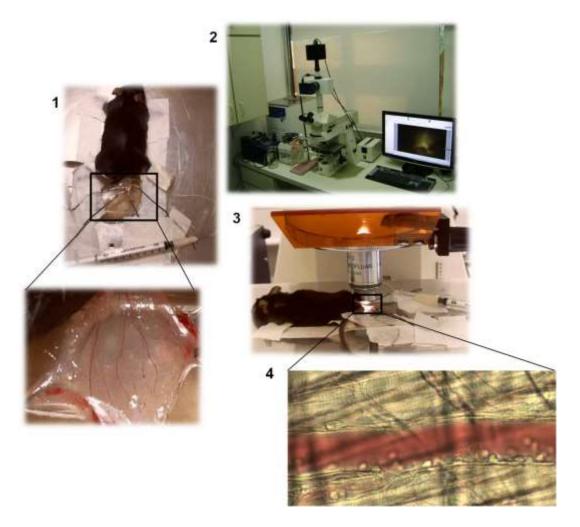
## 3.4.7 Celularidade sanguínea após tratamento agudo

Ao término do protocolo de microscopia intravital, ou seja, duas horas após a administração dos tratamentos, foram coletadas e analisadas amostras de sangue utilizando o mesmo protocolo descrito no item 3.4.5.

## 3.4.8 Análise qualitativa da urina

Ao término do protocolo de microscopia intravital, ou seja, duas horas após a administração dos compostos, amostras de urina dos animais foram coletadas. As amostras de urina foram coletadas realizando-se punção direta da bexiga dos animais e, posteriormente, as mesmas foram aplicadas a tiras reagentes (Urofita 10DL, Prodimol) para análises bioquímicas. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Sangue, Urobilinogênio, Bilirrubina, Proteínas, Nitrito, Cetonas, Glicose, pH, Densidade e Leucócitos.

**Figura 8** Imagens representativas do procedimento da exposição do músculo cremaster e posicionamento do animal sob o microscópio.



Os animais foram anestesiados, tricotomizados e o seu músculo cremaster foi exposto e estendido sob uma placa aquecida (1). Esta placa foi posicionada sobre o *charriot* do microscópio (2) onde a malha vascular foi transiluminada (3) e visualizada (4).

### 3.4.9 Hemólise in vitro

Para confirmar os resultados observados no ensaio de bioquímica da urina, o ensaio de hemólise *in vitro* foi adaptado de SHARMA & SHARMA (2001), onde os camundongos foram anestesiados e o sangue foi coletado da veia cava com citrato 0,13 M. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (2000 G, 15 minutos, temperatura ambiente) e o plasma e os leucócitos foram removidos. As hemácias foram lavadas com PBS (2x, temperatura ambiente) e centrifugadas (2000 G, 10 minutos, temperatura ambiente), sendo que o "pellet" de hemácias foi ressuspenso e

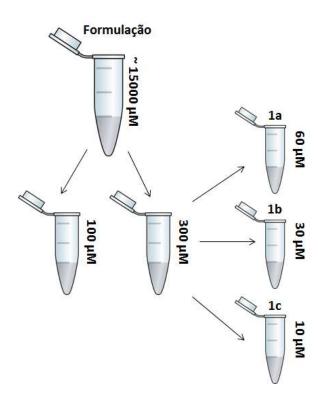
diluído a 10% em PBS. As hemácias diluídas foram incubadas com salina, LNC, AC, LNC-AC (20 ou 32 mg/Kg, ou seja, 1,6 ou 2,6 mM de acetileugenol, respectivamente) ou com os seus respectivos controles na proporção de 5:1 (v/v), durante 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (10000 g, 2 minutos, temperatura ambiente) e o sobrenadante foi avaliado por espectrofotometria no comprimento de onde de 540 nm. Para a indução de hemólise (controle positivo) foi utilizado uma solução de Triton-X 100 0,2% em PBS. O percentual da hemólise foi calculada com a fórmula: [Absorbância da amostra / Absorbância Triton-X 100] x 100.

## 3.5 Experimentos realizados in vitro

# 3.5.1 Avaliação da estabilidade da suspensão de nanocápsulas quanto à liberação do acetileugenol

A fim de avaliar a estabilidade das suspensões de LNC-AC após a realização de uma diluição seriada, a formulação foi diluída em água contendo 10 % de SFB. As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol e as suas diluições (Figura 9) foram analisadas quanto ao teor por CLAE (mg de fármaco/mL de formulação), conforme o item 3.1, e eficiência de encapsulação (E.E. %) após ultrafiltração-centrifugação (membranas de 10 kDa por 10 minutos a 5000 rpm).

**Figura 9** Esquema representativo das diluições seriadas realizadas com as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico e nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol em água.



## 3.5.2 pH do meio de cultura

A fim de avaliar se as suspensões de nanocápsulas alteravam o pH do meio de cultura, utilizado nos ensaios *in vitro*, foram realizadas diluições seriadas, semelhante às realizadas para a realização dos tratamentos com volume final de 5 mL a 25 °C. As diluições foram submetidas à avaliação da variação de pH utilizando um potenciômetro (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) calibrado com solução tampão a pH 4.0 e 7.0. Estes ensaios foram realizados utilizando 3 lotes diferentes de formulações, em triplicata.

## 3.5.3 Interação das nanocápsulas e nanocápsulas de acetileugenol com as células endoteliais e de melanoma in vitro

A interação das nanocápsulas e das nanocápsulas de acetileugenol com as células HUVEC e SK-Mel-28 foi avaliada pela observação direta das células, utilizando o microscópio com sistema de imagem hiperespectral CytoViva<sup>®</sup> (CytoViva Inc., Alabama, USA). A tecnologia da iluminação patenteada pela CytoViva<sup>®</sup>, integrada a um microscópio óptico padrão, propiciaram o desenvolvimento de um equipamento com

excelente relação sinal-ruído em imagem de campo-escuro, com resolução óptica de 74 nm. Desta forma, é possível uma rápida observação de nanomateriais e também de patógenos, devido ao espalhamento de luz intrínseco de materiais na escala micro e nanométrica. Além disso, caso estes estejam conjugados a fluoróforos, pode-se utilizar o CytoViva<sup>®</sup> no modo microscópio de fluorescência comum (CytoViva<sup>®</sup> Home, 2014).

Para tanto, as células foram plaqueadas (2x10<sup>5</sup> células/poço) em placas de Petri de poliestireno, com 22 cm² de diâmetro interno, contendo uma lamínula de vidro de aproximadamente 0,5 mm de espessura. Após a confirmação da aderência das células às lamínulas, pela visualização em microscópio invertido (Leica Microsystems) foram adicionados R10, LNC-Rod ou LNC-AC-Rod (30 μM). As células permaneceram em contato com os tratamentos por 24h e, em seguida, as mesmas foram cuidadosamente lavadas com PBS a 37°C (5x). Estas lamínulas foram posicionadas e fixadas sobre lâminas de microscópio livres de partículas de poeira para a obtenção das imagens das células pelo auxílio do microscópio CytoViva<sup>®</sup>. Visando a confirmação da presença de nanocápsulas no interior das células, variou-se o eixo Z, através da mudança do plano focal. As imagens foram processadas em um aumento final de 1500x. As análises conduzidas no microscópio CytoViva<sup>®</sup> foram realizadas em colaboração com a aluna de doutorado Mayara Klimuk Uchiyama, orientada pelo Professor Dr. Koiti Araki do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

#### 3.5.4 Viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade dos compostos aqui empregados foi avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan e em ensaios de citometria de fluxo. Este último foi empregado para a identificação do tipo de morte celular, tanto para as células endoteliais quanto para as células de melanoma.

## 3.5.4.1 Contagem de células pelo método de exclusão com Azul de Tripan

A viabilidade celular foi avaliada pela utilização de solução do corante Azul de Tripan (0,4% Azul de Tripan em PBS pH 7,4), onde as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram o seu interior a coloração azul. Assim, foram plaqueadas 1x10<sup>4</sup> células, em placas de 24 poços e, após 12 horas, as células foram tratadas com R10, LNC, AC, LNC-AC (1, 3, 10, 30, 60, 100, 300 ou 1000 μM) ou com os seus respectivos controles. Os tratamentos foram

realizados por 24 ou 48 horas e tanto as células aderidas quanto as células presentes no sobrenadante foram coletadas e centrifugadas. Uma alíquota das células foi adicionada ao corante Azul de Tripan e estas foram contadas em dois campos distintos da câmera de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

## 3.5.4.2 Marcação com Anexina-V e lodeto de Propídio (PI)

Para a identificação do tipo de morte celular induzida pelos compostos foi empregado a marcação com a proteína Anexina V e com iodeto de propídio (PI), para a mensuração da apoptose e necrose celular, respectivamente. As células foram plaqueadas e posteriormente tratadas com R10, LNC, AC, LNC-AC (10, 30, 60, 100 ou 300  $\mu$ M) ou com os seus respectivos controles, por 24 ou 48 horas. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos específicos para o ensaio de citometria de fluxo, e incubadas com a proteína Anexina-V (conjugada com o fluorocromo FITC), diluída com tampão de ligação para anexina (1:100), e com 10  $\mu$ L de PI, na concentração de 50  $\mu$ g/mL. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, solução tampão de ligação de anexina foi adicionada aos tubos e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACS Canto, Becton and Dickinson). Foi avaliada a % de células, de 10.000 eventos por amostra, que apresentavam fluorescência de FITC e do PI, monitorados nos canais FITC ( $\lambda_{exc.}$ = 490 nm;  $\lambda_{emi.}$ = 525 nm) e PerCP- Cy 5.5 ( $\lambda_{exc.}$ = 482 nm;  $\lambda_{emi.}$ = 695 nm), respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

## 3.5.5 Proliferação celular

## 3.5.5.1 Teste de sobrevivência clonogênica

O ensaio de sobrevivência clonogênica detecta todas as células que permaneceream com a capacidade para a produção de um grande número de descendentes após tratamentos, que podem causar a morte celular reprodutiva como um resultado de dano em cromossomos, apoptose, etc (FRANKEN *et al.*, 2006). Assim, 200 células, das diferentes linhagens, foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após o período de aderência, as células foram incubadas por seis dias com R10, LNC, AC,

LNC-AC (30, 60 ou 100  $\mu$ M) ou com os seus respectivos controles. O meio de cultura contendo os diferentes compostos foi substituído a cada 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído (4 % peso/volume, 5 mL, 4°C) por 20 minutos e, em seguida, foram lavadas com PBS (3x, 37°C). As células fixadas foram coradas com cristal violeta (0,01%, peso/volume, 5 mL, temperatura ambiente) por 10 minutos e, em seguida, as placas foram novamente submetidas a 3 lavagens consecutivas com PBS (37°C). As colônias de células foram contabilizadas com auxílio de uma lupa em um aumento final de 25x (Carl-Zeiss). A eficiência de clonagem (EC) foi calculada pela fórmula EC = n° de colônias / n° de células semeadas e a fração de colônias sobreviventes (FS) foi calculada de acordo com a fórmula: FS=n° de colônias contadas/ (EC\*n° células semeadas/100%).

## 3.5.5.2 Incorporação de CFSE

Os efeitos do acetileugenol e das nanocápsulas de acetileugenol sobre a proliferação celular foram avaliados pela marcação das diferentes linhagens de células com diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster (CFSE - Molecular Probe). Este fluoróforo penetra nas células por difusão passiva e seu grupo acetato é clivado pelas esterases intracelulares. Subsequentemente, o grupo succinimidil éster reage com aminas celulares formando conjugados que são retidos nas células durante o desenvolvimento e a meiose. A marcação é herdada pelas células filhas após a divisão ou fusão celular. Desta forma, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo da proliferação celular, permitindo assim acompanhar, de uma maneira eficaz, a taxa proliferativa das células (LYONS & PARISH, 1994; HODGKIN *et al.*, 1996).

As diferentes linhagens de células foram cultivadas e posteriormente 1x10<sup>6</sup> de células em suspensão foram lavadas com PBS acrescido de BSA (0,01%), centrifugadas e incubadas com CFSE (0,5 μL de uma solução 2 μΜ, Invitrogen<sup>®</sup>) por 10 minutos. Após a confirmação de incorporação do corante às células por citometria de fluxo, estas foram plaqueadas (4x10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 12 poços. Vinte e quatro horas após a incorporação do fluoróforo, o decaimento da intensidade de fluorescência foi novamente verificada por citometria de fluxo. Em seguida, foram realizados os tratamentos com R10, LNC, AC, LNC-AC (10, 30 ou 60 μΜ) ou com os seus respectivos controles, por 24 ou 48 horas.

Em um segundo protocolo experimental, para avaliar os efeitos do NO na proliferação celular, as células foram marcadas com o CFSE e incubadas previamente por 30 min com o N-ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10<sup>-3</sup> M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um inibidor inespecífico das oxido nítrico sintases (NOS). Após este período, foram realizados os tratamentos como descrito acima, mas na presença de L-NAME, por 24 ou 48 horas.

A intensidade de fluorescência do CFSE, de 10.000 eventos por amostra, foi monitorada por citometria de fluxo no canal do FITC ( $\lambda_{exc.}$ = 490 nm;  $\lambda_{emi.}$ = 525 nm; FACS Canto, Becton and Dickinson). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

#### 3.5.6 Análise do ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular, as células foram plaqueadas ( $3x10^4$  células/poço) em placas de 12 poços e após a aderência celular, as mesmas foram tratadas com R10, LNC, AC, LNC-AC (10, 30 ou  $60~\mu\text{M}$ ) por 24 ou 48 horas. Ao término dos tratamentos, o meio de cultura foi removido das placas e descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas (600g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo  $50~\mu\text{L}$  de uma solução contendo a enzima RNAse A (15~mg/mL) e  $150~\mu\text{L}$  do tampão hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05~% Triton–X 100, 0,1% de citrato de sódio,  $25~\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio). As amostras foram incubadas por 30~minutos, à temperatura ambiente, e as análises foram realizadas por citometria de fluxo (FACS Canto, Becton and Dickinson). Foi avaliada a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio ligado ao DNA de 10.000~eventos por amostra, monitorados no canal PerCP– Cy  $5.5~(\lambda_{\text{exc.}} = 488~\text{nm}; \lambda_{\text{emi.}} = 695~\text{nm})$ . Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

### 3.5.7 Aderência celular

As diferentes linhagens celulares foram cultivadas, contadas e adicionadas (5x10<sup>4</sup> células/poço) a uma placa de cultura de 96 poços. Concomitantemente, foram adicionados R10, LNC, AC, LNC-AC (10, 30 ou 60 μM) ou os seus respectivos controles. A aderência das células ao Matrigel® (BD Biosciences), na presença dos diferentes compostos, foi permitida por um período de 2 horas, a 37°C. Após este

período, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e as células foram lavadas com PBS (2×, a 37°C). Posteriormente, foi adicionado meio de cultura acrescido de 10 μL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-l)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL). As células foram incubadas com o MTT durante 2h a 37°C e, em seguida, o meio de cultura foi removido e os cristais de azul de formazan foram dissolvidos com 200 mL de DMSO (BRANDAL *et al.*, 2011). A absorbância foi quantificada usando um leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices) em 570 nm. Os resultados foram expressos como % em relação ao grupo controle. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental.

## 3.5.8 Expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e de melanoma

Para a quantificação das moléculas de adesão das células endoteliais e de melanoma, 4 x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas, e aguardou-se um período de 12 horas para a adesão celular. Após este período, as células foram tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (60 µM) por 2 horas.

Após o período de incubação com os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 20 minutos a 4°C, sob ausência de luz, com anticorpos específicos (Becton, Dickinson and Company): anti-PECAM-1-FITC (CD31), anti-VCAM-1-FITC (CD106), anti-ICAM-1-PE (CD54), anti- $\beta_3$  integrina-PE (CD61) ou anti- $\beta_1$  integrina-PE (CD29). Todos os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:100. Ao término da incubação, as células foram lavadas e fixadas pela adição de 100 μL de uma solução de *p*-formaldeído a 2%. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal FITC ( $\lambda_{exc.}$ = 488 nm;  $\lambda_{emi.}$ = 525 nm) e PE ( $\lambda_{exc.}$ = 562 nm;  $\lambda_{emi.}$ = 588 nm) utilizando citômetro de fluxo FACS Canto II (BD®- Becton, Dickinson and Company). Os resultados foram expressos como mediana de intensidade de fluorescência.

## 3.5.9 Migração Celular

A migração das células endoteliais e de melanoma foi avaliada utilizando o modelo de migração bidimensional de acordo com o modelo de cicatrização *in vitro* 

estabelecido por Burk (1973). Antes do plaqueamento, foram delimitadas linhas no fundo da placa, na altura do diâmetro dos poços, a fim de servir de guia para as fotos do experimento. Desta forma, as fotos foram sempre tiradas imediatamente acima da linha traçada. Para tanto,  $5x10^5$  células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços e após estas atingirem 90-100% de confluência, foi realizada uma lesão ("arranhão") na monocamada unicelular com o auxílio de uma ponteira estéril de micropipeta de 1 mL. As células foram lavadas 2x com PBS e em seguida, foram adicionados os tratamentos R10, LNC, AC, LNC-AC (30 µM) que permaneceram em contato com as células por 12 horas. Três campos microscópicos distintos de cada poço foram fotografados nos tempos 0 e 12 horas e o número de núcleos celulares que atravessaram a linha demarcada foi quantificado.

## 3.5.10 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) as células endoteliais e de melanoma foram plaqueadas ( $1x10^4$ /células por poço) em placas de 96 poços e após a sua aderência, as mesmas foram tratadas com R10, LNC, AC, LNC-AC (30, 60, 100 ou 300 µM) por 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas 2x com PBS e incubadas a 37°C por 30 min com o corante não fluorescente 2',7'-diclorfluoresceina-diacetato (DCFH-DA, 10 µM; diluído em PBS) que penetra no citoplasma das células onde é oxidado por ROS a uma diclorofluoresceína fluorescente (DCF) (ELBIM & LIZARD, 2009). Após este período, a fluorescência foi analisada em um leitor fluorescência em  $\lambda_{\rm exc.}$ = 488 nm and  $\lambda_{\rm emi.}$ = 530 nm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os resultados são apresentados como unidades arbitrárias de fluorescência de três experimentos em duplicata.

## 3.5.11 Determinação da concentração de nitrito (NO<sub>2</sub> ) por quimiluminescência

As células endoteliais e de melanoma foram plaqueadas (1x10<sup>4</sup> células/poço) e posteriormente incubadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60 μM) por 24 horas. A concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (indicador indireto da concentração de óxido nítrico) foi determinado em 5 μL do sobrenadante das culturas celulares pela técnica de quimioluminescência, óxido nítrico/ozônio na presença de um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N a 95 °C), utilizando um analisador de NO (Sievers<sup>®</sup> Nitric Oxide Analyser 280, GE Analytical Instruments, Boulder, EUA) de acorodo com as

instruções do fabricante (BAYLIS & VALLANCE, 1998). A concentração de NO<sub>2</sub> das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e os valores foram expressos como μM (adaptado de ALVES *et al.*, 2002).

Para avaliar os efeitos do inibidor inespecífico das NOS, as células foram prétratadas com L-NAME ( $10^{-3}$  M) por 30 minutos e posteriormente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC ( $30~\mu\text{M}$ ) na presença de L-NAME por 24 horas.

## 3.5.12 Expressão Proteica das Enzimas Óxido Nítrico Sintases por Western Blot

## - Extração proteica

As linhagens de células foram plaqueadas em placas de 100 nm de diâmetro e quando as células atingiam aproximadamente 50% de confluência, estas foram incubadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (60 μM). Após o período de tratamento, as culturas foram lavadas 2x com PBS gelado e, após, esta etapa, adicionou-se 70-100 μL de tampão de lise RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,4, SDS 0,05%, inibidor de protease (Protease inhibitor cocktail tables – Roche, Manheim, Germany) e inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Com o auxílio de um *cell scrapper*, as células foram coletadas, transferidas para um tubo cônico e incubadas por 20 min a 4C°. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 20 min, 4 °C e os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. As amostras foram normatizadas de acordo com a quantidade de proteína, utilizando o método de Bradford (1976), com o uso do Reagente de Bradford (Bio-Rad) e curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). Foram utilizados 60 μg de proteína total para cada canal.

## - Separação de proteínas utilizando eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana

Para a separação foi utilizado gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 60 μg de extrato proteico total em 20 μL de tampão de lise + 5 μL de tampão de amostra 5X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.7, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50 mM) aquecido a 95 °C por 5 min (condições desnaturantes) e 5 μL de marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) em cada gel. A corrida foi realizada a 100V / 2h durante a separação das proteínas no gel. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas

para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA), utilizando-se transferência úmida realizada 100V / 2 h a 4 C°.

- Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários

As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio constituída de 5 % de leite desnatado em pó em TBS-t acrescido de 0,2% de Tween 20 (Roche) (TBS-t), à temperatura ambiente, por 1 hora.

Após a etapa de bloqueio, as membranas fora incubadas *overnight* (16 a 20 horas) com os anticorpos:

- √ 1:500 de anticorpo monoclonal de humano específico para iNOS/NOS II humana - 130 kDa (610328 - BD Bioscience – Franklin Lakes, NJ, USA) na presença de TBS-t 0,2%.
- √ 1:500 de anticorpo monoclonal de humano específico para eNOS/NOS III humana - 140 kDa (610296 - BD Bioscience – Franklin Lakes, NJ, USA) na presença de TBS-t 0,2%.

Após 4 lavagens de 10 min com TBS-t 0,02%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho diluído 1:3000, ou anticorpo anti-camundongo diluído 1:5000 em TBS-t 0,0% durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.

Adicionalmente cada membrana foi incubada com 1:20000 de anticorpo monoclonal de humano específico para β-actina humana conjugada com a enzima HRP - 42 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na presença de TBS-t 0,2%, por 45 min.

Após as incubações com os anticorpos secundários ou com o anticorpo β-actina, as membranas foram lavadas 4 vezes de 10 min com TBS-t 0,02% e em seguidas reveladas por quimiluminescência, utilizando o kit ECL para detecção de proteínas (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) utilizando o equipamento ImageQuantTM 400<sup>®</sup> versão 1.0.0 (Amersham Biosciences, Pittsburg, PA, USA). Os resultados foram expressos em relação à intensidade de β-actina.

## 3.5.13 Co – cultura de células de melanoma murino (B16F10) e neutrófilos

Para avaliar se o tratamento prévio das células de melanoma poderia modular neutrófilos em co-cultura, as células de melanoma murino foram plaqueadas

 $(1x10^4/c$ élulas por poço) em placas de 24 poços e após a sua aderência, foram tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30 μM) por 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas 2x com PBS e foi adicionado 600 μL de R10. Após este procedimento, foi adicionado um transwell em cada poço (poro de 0,4 μm, BD Bioscience, EUA) contendo  $5x10^5$  neutrófilos em volume final de 200 μL (proporção final de 1 célula de melanoma para cada 50 neutrófilos, CHEN *et al.*, 2003).

Os neutrófilos foram obtidos de acordo com o item 3.3 e separados das demais células utilizando Ficoll (adaptado de MUNDER *et al.*, 2005). Resumidamente, as células foram colocadas sob o Ficoll e centrifugadas (700 x g por 30 min a 22 °C). O *pellet* contendo os polimorfos nucleares (PNM) e eritrócitos foi resuspendido em solução de Hanks (HBSS, Gilbco, Grand Island, EUA) e misturados em uma proporção de 1:1 em uma solução de dextran 3%. Após a sedimentação dos eritrócitos (cerca de 1h) o sobrenadante rico em PMN foi coletado e lisado com uma solução hipotônica (NaCl 0,2% por 30 segundos e NaCl 1,6% por 30 segundos) e posteriormente as células foram lavadas com solução de Hanks, analizadas quanto a viabilidade utilizando azul de tripan e caracterizados por citometria de fluxo.

As células permaneceram em co-cultura por 18 h e após este período as células B16F10 presentes no fundo do poço foram utilizados para realização de ensaios de viabilidade celular por FACS (protocolo descrito no item 3.5.4.2 do Material e Métodos). Os neutrófilos presentes na parte superior do *transwell* foram utilizados para a realização de ensaios de viabilidade celular por FACS e expressão de moléculas de adesão (protocolo descrito no item 3.5.8 do Material e Métodos). O sobrenadante da co-cultura foi utilizado para a quantificação de mediadores químicos por ELISA e por FACS (Kit CBA Inflammation, BD, EUA).

### 3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média ± e.p.m. e foram analisados estatisticamente pelo Teste "t" de student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário. O programa GraphPad Prisma® versão 4.00 (GraphPad Prism Software Inc, 1992-2003) foi utilizado para conduzir as análises estatísticas.

## 4 Resultados e Discussão

## 4.1 SEÇÃO 1 - Caracterização das formulações

Os resultados de produção e caracterização das formulações utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos pela Dra. Luana Fiel e fazem parte da sua tese de Doutorado desenvolvida na Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação da Dra. Adriana Raffin Pohlmann. A reação de acetilação do eugenol foi eficiente, com rendimento de reação de 84%, sendo que o produto purificado obtido foi caracterizado por infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 1). Os resultados confirmaram a obtenção do acetileugenol, solução límpida de cor amarelada (Figura 10).

As nanocápsulas utilizadas neste projeto foram obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (MÜLLER et al., 2001; JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). Após o preparo, as formulações de nanocápsulas apresentaram aspecto leitoso (Figura 10), pH em torno de 6,0 para as LNC e 4,5 para as LNC-AC. O potencial zeta ficou em torno de - 10,0 mV, tanto para as LNC quanto para as LNC-AC. Para a realização dos ensaios in vivo, o pH das formulações de LNC-AC foi ajustado dentro da faixa de 6-7. Cabe destacar que o polissorbato 80 utilizado na composição das LNC e LNC-AC é utilizado como um agente estabilizante da formulação, impedindo agregação das nanocápsulas. A fase aquosa (FA), utilizada em alguns ensaios como um controle, foi inserida como um grupo experimental após a observação de que as LNC (sem o princípio ativo) possuíam efeitos biológicos. Mas deve-se levar em consideração que o polissorbato 80 representa, de certa forma, somente a estrutura mais externa das LNC e das LNC-AC, enquanto que na FA ele está totalmente livre (FIEL et al., 2001 e 2013). O polissorbato 80 é conhecido por ser citotóxico para diferentes linhagens de células em concentrações abaixo de 0,1 µM (MÉNARD et al., 2011).

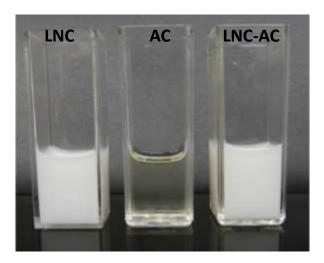
A avaliação da alteração da massa polimérica foi realizada para verificar a integridade do polímero em presença de AC. Observou-se que o perfil de entumescimento do polímero não foi alterado quando este foi colocado em contato com o AC, sendo que a massa polimérica foi mantida durante os 60 dias de observação. Diferentemente, a essência oleosa de cravo-da-índia induziu aumento seguido de

redução da massa polimérica (~ 60 %) (Anexo 2). Estes resultados indicam que a acetilação do eugenol foi capaz de reduzir a interação deste com o componente da parede polimérica, o polímero poli (épsilon-caprolactona), sugerindo que as nanopartículas preparadas com o derivado acetilado teriam mais chances de estarem estruturadas como um sistema vesicular, formado por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica (GUTERRES et al., 2000). Aliado a este fato, e os resultados obtidos por FIEL (2013) nos ensaios de eficiência de encapsulação e taxa de encapsulação, concluiu-se que a utilização do acetileugenol (AC) seria mais adequada do que do eugenol para o desenvolvimento deste trabalho.

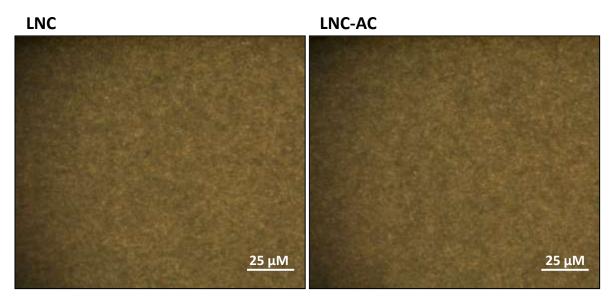
No entanto, como citado na introdução, estudos recentes realizados pelo grupo de pesquisa das professoras Adriana Pohlmann e Silvia Guterres revelaram que o AC possui um logD (logaritmo do coeficiente de distribuição) menor que 3, podendo interagir com o polímero das LNCs e, assim, dissolver sua parede polimérica com consequente alteração da supraestutura da formulação (FIEL, 2014, comunicação pessoal).

Adicionalmente, as imagens das formulações de LNC (Figura 11A) e de LNC-AC (Figura 11B), utilizando o microscópio de imagem hiperespectral CytoViva<sup>®</sup>, mostram a homogeinidade das nanocápsulas de núcleo lipídico, ou seja, estas formulações não sofreram agregação ou aglomeração decorridos 15 dias da sua manipulação.

**Figura 10** Imagem representativa das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico, acetileugenol e nanocápsulas de núcleo lipídico contendo acetileugenol utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.



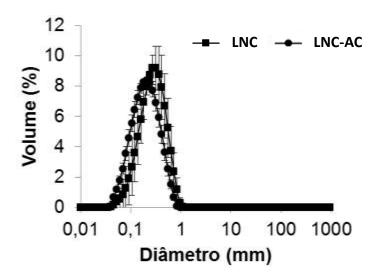
**Figura 11** Imagem representativa das LNC e das LNC-AC obtidas por microscopia hiperespectral no equipamento CytoViva<sup>®</sup>.



As LNC (A) e as LNC-AC (B) foram espalhadas em lâminas ultra limpa e observadas no microscópio em aumento final de 1500X. As fotos indicam a homogeneidade das diferentes formulações.

O perfil de distribuição de tamanho foi inicialmente determinado por difração a laser, sendo que os perfis de distribuição (Figura 12) foram monomodais e em escala nanométrica, tanto para as LNC quanto para as LNC-AC. Os valores de diâmetro médio de cada sistema (média de 3 lotes), expressos em volume da esfera equivalente  $(D_{[4,3]})$  foram 290 ± 51 nm (LNC) e 227 ± 41 nm (LNC-AC).

**Figura 12** Distribuição de tamanho de partícula obtido por difração de laser para as LNC e as LNC-AC. Os resultados foram expressos como média ± DP de três lotes diferentes.



Quando as LNC e as LNC-AC foram analisadas por espectroscopia de correlação de fótons, utilizada para avaliar a população nanométrica, as formulações de LNC e de LNC-AC apresentaram diâmetro médio de 208 ± 15 e 194 ± 20 nm, respectivamente. A largura do pico obtido foi menor do que 100 nm e os valores de PDI ficaram abaixo de 0,11 indicando estreita distribuição de tamanho. Os valores de diâmetro médio das LNC e das LNC-AC obtidas pelos dois métodos foram próximos, sendo que não houve diferença significativa deste parâmetro quando os mesmos foram comparados, ou quando o diâmetro médio das LNC e das LNC-AC foram comparados.

O AC foi analisado quanto ao teor e taxa de encapsulação por CLAE após dissolução e ultrafiltração-centrifugação, respectivamente. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, as curvas de calibração para quantificação do ativo foram validadas segundo os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intermediária,

repetibilidade, exatidão e limite de quantificação. A média da curva de calibração do AC em acetonitrila, na faixa de concentração de 1,0 a 30  $\mu$ g/mL, foi obtida com um r>0,99. A análise de variância dos dados indicou existência de correlação linear entre as variáveis selecionadas, sem desvios da linearidade. O método de quantificação foi preciso e exato e a análise de quantidade de fármaco contida nas amostras de LNC-AC foi de 3,23  $\pm$  0,03 mg/mL [teor (mg/mL de formulação)].

A eficiência de encapsulação do AC foi avaliada após análise do ultrafiltrado resultante da ultrafiltração-centrifugação do sistema. Essa análise mostrou que a quantidade de AC que permanece na FA (externa) é <1 %. Assim, considerando o teor de AC na formulação como 100 %, a eficiência de encapsulação do ativo foi >99 % para as LNC-AC.

As formulações de LNC e de LNC-AC obtidas contêm cerca de  $4,50 \pm 0,50 \times 10^{12}$  e  $3,65 \pm 0,36 \times 10^{12}$  partículas a cada mL de formulação, respectivamente. A superfície específica das partículas foi obtida com o auxílio do equipamento de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern). Assim, a superfície específica (média  $\pm$  DP, n=3) das LNC e das LNC-AC foi de  $34,3 \pm 1,25$  m²/g e  $38,1 \pm 1,25$  m²/g, respectivamente. A área superficial total das partículas foi calculada levando em consideração a superfície específica das partículas e a massa de todos componentes que compõem a fase dispersa das formulações. Assim, a área superficial total das partículas presentes em 1 mL de formulação é de LNC= $1,03 \pm 0,24$  m²/mL e de LNC-AC= $1,14 \pm 0,03$  m²/mL.

## 4.2 SEÇÃO 2 – Eficácia terapêutica e toxicidade in vivo

# 4.2.1 Eficácia terapêutica e toxicidade após administração dos tratamentos pela via intraperitoneal na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma

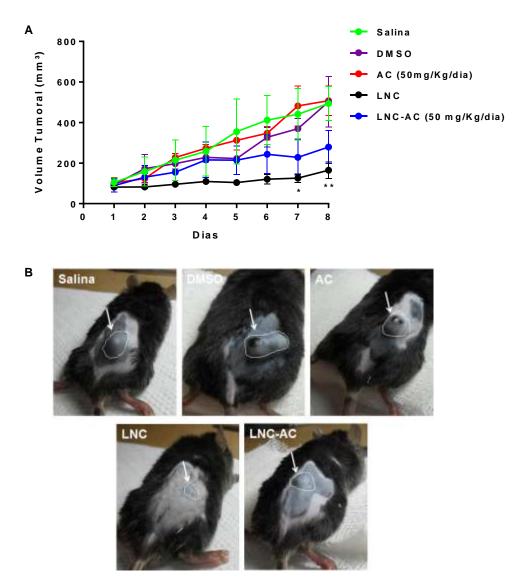
Os ensaios para avaliar a atividade anti-tumoral dos tratamentos foram iniciados com a dose diária de 20 mg/kg/dia, i.p., e os resultados obtidos mostram que nenhum dos tratamentos administrados foi capaz de reduzir a massa tumoral (dados não mostrados). Desta forma, os ensaios foram conduzidos com tratamentos na dose de 50 mg/Kg/dia, pela via i.p., do terceiro ao décimo dia a partir da injeção da suspensão de células de melanoma murino. Os resultados obtidos mostraram que o volume tumoral do grupo de animais tratados com LNC-AC apresentou uma tendência de redução do

volume tumoral em relação ao grupo tratado com salina. Adicionalmente, somente o volume tumoral do grupo de animais tratado com o LNC foi estatisticamente reduzido em relação ao grupo tratado com salina, nos 9° e 10° dia após a injeção das células tumorais (Figura 13).

É importante ressaltar que considerando somente o último dia de tratamento, os tratamentos com LNC-AC ou LNC, ocasionaram, respectivamente, redução no volume tumoral de 44,5% e 74,7%, quando comparados ao volume tumoral de animais tratados com salina. As reduções do volume tumoral ocasionadas pelos tratamentos com LNC ou LNC-AC puderam ser facilmente visualizadas macroscópicamente como demonstrado na Figura 13B.

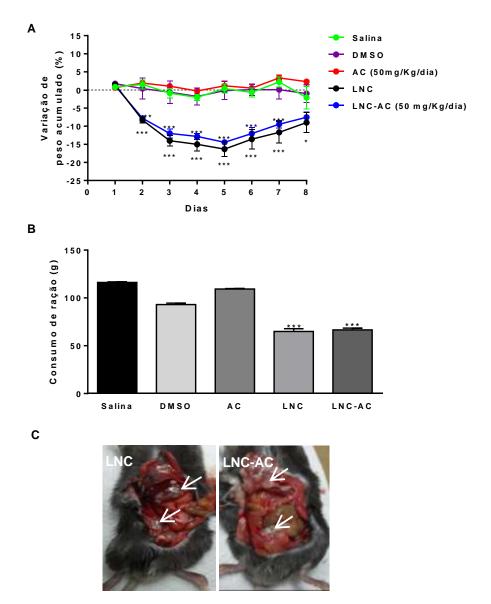
Apesar dos tratamentos com LNC ou LNC-AC (50 mg/Kg/dia), pela via i.p. terem causado redução no volume tumoral dos animais, estes mesmos grupos experimentais apresentaram toxicidade sistêmica, como redução no peso acumulado (Figura 14A) e no consumo de ração (Figura 14B), e toxicidade local, demonstrado pela presença de precipitado das LNC na cavidade abdominal (Figura 14 A), além de aderência dos órgãos desta região (Figura 14C).

**Figura 13** Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via intraperitoneal durante sete dias na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma.



Os animais receberam a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal  $(5x10^8 \text{ células B16F10/100 } \mu\text{L}$  meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, DMSO, AC (50 mg/kg/dia), LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg/dia) durante sete dias, pela via i.p., uma vez ao dia. (A) Volume tumoral dos diferentes grupos experimentais e (B) imagens representativas dos animais ao final dos tratamentos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de cinco animais por grupo. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs grupo tratado com salina.

**Figura 14** Variação do peso acumulado, consumo de ração e imagens representativas da cavidade peritoneal de camundongos tratados com os diferentes tratamentos pela via intraperitoneal.



Os animais receberam injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal (5x10<sup>8</sup> células B16F10/100 µL meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, DMSO, AC (50 mg/kg/dia), LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg/dia) durante sete dias, pela via i.p. (A) Variação do peso acumulado, (B) consumo de ração e (C) imagens representativas da cavidade peritoneal de camundongos tratados com LNC ou LNC-AC ao final dos tratamentos onde as setas indicam a formação de precitado esbranquiçado. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs grupo tratado com salina.

De modo semelhante, BULCÃO e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de nanocápsulas, com formulação semelhante às utilizadas neste trabalho, mas sem princípio ativo, por via i.p. em ratos Wistar, apresentou o mesmo perfil de toxicidade intraperitoneal, com perda de peso e diminuição no consumo de ração. Tal toxicidade foi observada tanto no tratamento agudo (dose única, 72,12x10<sup>12</sup> partículas de LNC/Kg; volume de 12 mL/kg), quanto no crônico (doses diárias por 28 dias; 18,03x10<sup>12</sup> partículas de LNC/Kg; volume de 3mL/kg). Vale a pena ressaltar que no trabalho aqui apresentado, foram empregadas 1,59x10<sup>12</sup> LNC/Kg no volume de 15 mL/kg durante 7 dias, ou seja, mesmo utilizando uma quantidade menor de partículas, observamos efeitos semelhantes aos observados por BULCÃO e colaboradores (2013). Adicionalmente, BARCELOS e colaboradores (2013, comunicação pessoal) também relataram o acúmulo de precipitado das LNC no peritônio, semelhante ao encontrado neste trabalho, quando tratavam camundongos por 10 dias, pela via i.p., com volumes de tratamentos de 200 à 500 μL de nanocápsulas poliméricas, com formulação semelhante à utilizada no presente estudo.

Os efeitos tóxicos observados possivelmente não são decorrentes do polímero empregado na manipulação das nanocápsulas, pois, a poli (ε-caprolactona), um dentre os polímeros utilizados na produção de nanocápsulas, se destaca devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, pois é um polímero semi-cristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos (GUTERRES et al., 2007). A poli (ε-caprolactona) é um dos mais importantes polímeros biodegradáveis na medicina, sendo amplamente empregado em fios de suturas (LU & CHEN, 2004). Vários trabalhos têm mostrado a importância do emprego deste material polimérico no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos nanoparticulados, sendo empregado inclusive para uso intravenoso (LAMPRECHT et al., 2000a; 2000b; RAVI KUMAR, 2000; SINHA et al., 2004; LU & CHEN, 2004; FATTAL et al., 2007). Por estas observações, acreditamos que o acúmulo local de LNC no peritônio, pode estar relacionado ao 1) tempo prolongado de degradação do polímero empregado; 2) a absorção rápida somente da fração líquida onde as LNCs estão suspensas; e 3) a incapacidade dos macrófagos residentes da cavidade peritoneal fagocitarem a grande quantidade de LNCs, considerando que trabalhos recentes têm mostrado que esta células são capazes de fagocitar as LNCs in vitro (POLETTO et al., 2012; FIEL et al., 2014).

Associados, os resultados aqui obtidos mostraram a eficácia do emprego das LNCs para o tratamento do melanoma, no entanto, a administração dos tratamentos pela via i.p. causa toxicidade sistêmica e local, o que torna inviável a continuidade do estudo empregando esta posologia. Desta forma, passamos a investigar a eficácia dos tratamentos por via oral, que consiste na via mais preponderante para tratamentos farmacológicos.

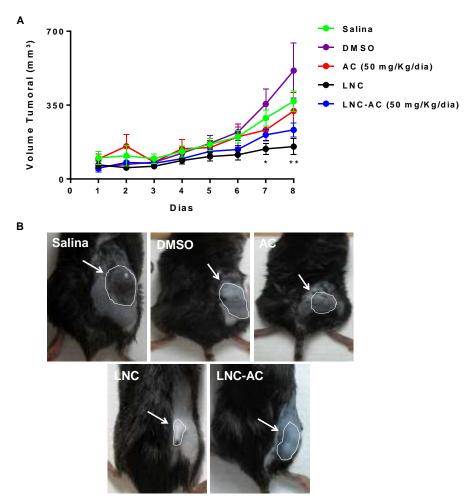
# 4.2.2 Eficácia terapêutica e toxicidade após administração dos tratamentos pela via oral na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma

Os resultados obtidos mostraram que a administração de LNC ou de LNC-AC (50 mg/Kg/dia), por via oral, reduziu o volume tumoral nos dois últimos dias de tratamento em relação ao grupo tratado com salina (66,2±8,4% e 50,7±8,6% (9° dia) e de 74,7±9,1% e 51,5±11,0% (10° dia)). No entanto, o volume tumoral do grupo de animais tratado com LNC-AC apresentou apenas tendência de redução do volume tumoral em relação aos grupo de animais tratados com salina ou com AC (Figura 15). Apenas o grupo de animais tratado com LNC apresentou redução do crescimento tumoral estatisticamente significante em relação ao grupo salina nos dois últimos dias de tratamento. Estes dados são muito instigantes, uma vez que confirmam a maior eficácia terapêutica das formulações nanoencapsuladas no tratamento do melanoma, mas ao mesmo tempo, sugerem um papel terapêutico próprio das LNC.

Apesar de tais reduções não terem sido estatisticamente significantes ao longo de todo o protocolo experimental, a diminuição no crescimento tumoral dos animais tratados com LNC ou LNC-AC pôde ser facilmente visualizada ao final dos tratamentos, conforme demonstrado na Figura 15B.

Como salientado na Introdução, o eugenol possui efeito anti-carcinogênico, no entanto, no protocolo experimental aqui empregado o efeito terapêutico do acetileugenol, nesta concentração, não foi observado.

**Figura 15** Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via oral durante sete dias nas etapas iniciais de desenvolvimento do melanoma.

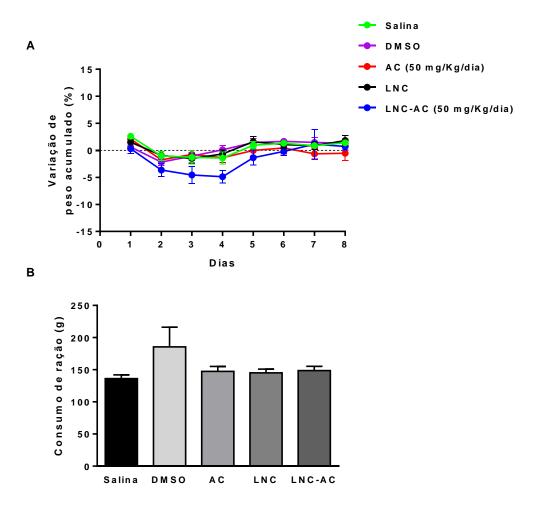


Os animais receberam a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal  $(5x10^8 \text{ células B16F10/100 } \mu\text{L}$  meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, DMSO, AC (50 mg/kg/dia), LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg/dia) durante sete dias, pela via oral. (A) Volume tumoral dos diferentes grupos experimentais e (B) imagens representativas dos animais ao final dos tratamentos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de dez animais por grupo. \*p<0,05 e \*\*p<0,01  $\nu$ s grupo tratado com salina.

Vale ressaltar que a absorção das LNCs pela via oral não alterou o peso acumulado e o consumo de ração dos animais (Figura 16 A e B), como ocorreu quando os animais foram tratados pela via i.p. (Figura 14). Adicionalmente, não foi observado acúmulo de LNCs ou alterações histopatológicas na mucosa gástrica ou intestinal destes animais. É possível que componentes da mucosa gástrica ou mesmo o

movimento peristáltico não favoreçam o acúmulo local das LNC, e em conjunto, os resultados sugerem que a via oral possa ser relevante para o emprego das LNCs.

**Figura 16** Variação do peso acumulado e consumo de ração de camundongos tratados com os diferentes tratamentos pela via oral.



Os animais receberam a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal (5x10<sup>8</sup> células B16F10/100 µL meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, DMSO, AC (50 mg/kg/dia), LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg/dia) durante sete dias, pela via oral. (A) Variação do peso acumulado e (B) consumo de ração dos animais. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. de dez animais por grupo.

O primeiro antineoplásico de base nanotecnológica a ser aprovado pelo FDA, para uso em humanos, foram os lipossomas peguilados de cloridrato de doxorrubicina (Doxil<sup>®</sup>), um antibiótico antraciclínico citotóxico, cuja patente expirou em 2009. No início

deste ano, o FDA aprovou a primeira versão genérica do Doxil® (BARENHOLZ, 2012; FDA, 2013). A doxorrubicina lipossomal peguilada é utilizada para o tratamento de pacientes com câncer de ovário, câncer de mama metastático e para o tratamento do sarcoma de Kaposi relacionado à síndrome da imunodeficiência adquirida. Estudos em animais mostraram que a cardiotoxicidade da doxorrubicina lipossomal peguilada é reduzida em comparação com a toxicidade das preparações convencionais de cloridrato de doxorrubicina. Apesar destas vantagens, ainda ocorrem toxicidade dérmica e reprodutiva, além deste tipo de formulação apresentar um alto custo de produção (ANVISA, 2015).

Os carreadores coloidais de fármacos, incluindo lipossomas, complexos lipídicos, nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas, são utilizados como veículos promissores para a administração de fármacos lipofílicos pela via intravenosa, oral, ocular e cutânea, possibilitando a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (ALVARES-RÓMAN *et al.*, 2001; BRIGGER *et al.*, 2002; COUVREUR *et al.*, 2002; FATTAL & VAUTHIER, 2002).

Apesar de haver diferentes carreadores que apresentam vantagens e desvantagens, como salientado na Introdução, a utilização de nanocápsulas poliméricas apresenta algumas facilidades em relação à utilização de lipossomas, pois permitem que maior quantidade de fármaco seja encapsulada e que haja maior controle do processo de liberação do mesmo (KONAN *et al.*, 2002). Adicionalmente, os polímeros utilizados para preparação das nanocápsulas para uso farmacêutico, os quais incluem a poli (epsilon-caprolactona) e a poli (D, L-lactona), são biodegradáveis e biocompatíveis, reduzindo a sua toxicidade (KUMARI *et al.*, 2010).

Neste sentido, o presente trabalho foi realizado com nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo acetileugenol. Mesmo porque, estudos prévios do grupo das professoras Guterres e Pohlmann mostraram a eficácia terapêutica das mesmas. Assim, BERNARDI e colaboradores (2008 e 2009) apresentaram resultados promissores com nanocápsulas de indometacina no tratamento de glioma, uma vez que a formulação encapsulada apresentou toxicidade seletiva para linhagens tumorais *in vitro* e, ao mesmo tempo, reduziu o crescimento tumoral em um modelo *in vivo* em ratos. Ainda, BERNARDI e colaboradores (2009) demonstraram que as nanocápsulas aumentam a eficácia anti-inflamatória da indometacina, diminuindo os efeitos indesejáveis deste fármaco no trato gastrointestinal (BERNARDI *et al.*, 2008 e 2009).

RODRIGUES e colaboradores (2015, submetido) mostraram que a nanoencasulamento de éster de indometacina evitou os efeitos adversos gástricos induzidos por este agente anti-inflamatório, que estas LNCs contendo éster de indometacina atravessaram a barreira hematoencefálica e inibiram o crescimento do glioma em um modelo experimental em camundongos. Outros pesquisadores, como SHENOY & AMIJI (2005), têm incorporado com sucesso fármacos como o tamoxifeno, amplamente empregado no combate ao câncer de mama, em nanocápsulas poliméricas, demonstrado, assim, a vetorização passiva do tamoxifeno para o tumor e comprovando as vantagens da formulação nanoencapsulada quando comparada com a habitualmente utilizada (SHENOY & AMIJI, 2005).

Embora ainda existam poucos estudos desta natureza em modelos de melanomas (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, utilizando as palavras-chave: "melanoma AND nanocapsules" obtêm-se apenas 38 trabalhos publicados), o mesmo padrão de melhora na resposta terapêutica tem sido observado (NECKEL-LOCH *et al.*, 2007; DAVID *et al.*, 2012).

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, vale a pena destacar que possivelmente as formulações nanoencapsuladas atingiram a região tumoral, uma vez que, além da inibição do crescimento tumoral, dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostram que foi possível detectar a fluorescência em vasos piais (vasos da microcirculação cerebral) de nanocápsulas ligadas à rodamina B (200 µL), após a administração das mesmas pela via oral ou pela via intravenosa. Estes resultados sugerem que as formulações foram absorvidas e atingiram a corrente sanguínea, ou seja, os parâmetros farmacocinéticos não interferiram na eficácia dos tratamentos quando administrados pela via oral (RODRIGUES *et al.*, 2015, submetido para publicação).

Aliado a estes aspectos, estudos recentes têm demonstrado que fármacos conjugados com polímeros e com nanopartículas apresentam um tempo prolongado na circulação sanguínea e acumulam, passivamente, nos tumores na ausência de ligantes de alvos específicos (DUNCAN, 2003), sugerindo a existência de um mecanismo de retenção passiva. Adicionalmente, estudos com lipossomas e nanopartículas tem demonstrado que o limite de tamanho dos poros em vasos tumorais está entre 200 nm e 1,2 μm (YOKOYAMA *et al.*, 1991; YUAN *et al.*, 1995), e a observação direta da vasculatura tumoral tem demonstrado que o limite de tamanho dos poros dos vasos

tumorais variam entre 200 nm a 2 µm (HOBBS et al., 1998; HASHIZUME et al., 2000), assim, não haveria impedimento reológico para as nanocápsulas utilizadas neste estudo não terem atingido as células tumorais.

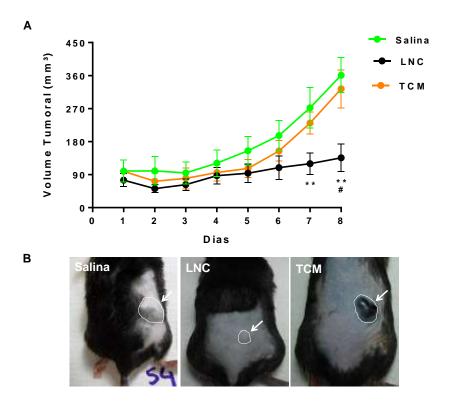
A literatura tem demonstrado que o tratamento com eugenol (125 mg/kg, i.p., duas vezes por semana) inibe em 40% o crescimento do melanoma, induzido com células B16F10, em camundongos. Adicionalmente, estes animais não apresentaram sinais de metástases ou invasão (GHOSH *et al.,* 2005). Contudo, os dados obtidos neste trabalho são inéditos, uma vez que aqui foi utilizado uma dose quase três vezes menor de fármaco do que utilizado por GHOSH e colaboradores (2005), e por não haver descrição dos efeitos do AC ou de nanocápsulas poliméricas contendo AC no crescimento de melanomas.

Os efeitos de inibição do crescimento tumoral induzido pelas LNC podem estar diretamente relacionados aos efeitos dos ácidos cáprico e caprílico, que compõe os triglicerídeos de cadeia média (TCM) do óleo presente no núcleo das nanocápsulas. Têm sido demonstrado que emulsões lipídicas podem reduzir efeitos do estresse oxidativo, da resposta imune e, até mesmo, de processos inflamatórios (HOSHIMOTO et al., 2002; LIMA et al., 2002; CALDER et al., 2010), fatores estes, que podem influenciar diretamente o crescimento tumoral. Neste sentido, foram realizados ensaios com o mesmo protocolo descrito acima, mas tratando os animais com salina, LNC (1,1x10<sup>12</sup>partículas/kg/dia) e TCM (180 µL/dia) não encapsulado em quantidades equivalentes. Podemos observar que somente o tratamento com LNC, mas não com os TCM não encapsulados, inibiu o crescimento tumoral ao final do protocolo experimental (Figura 17A e B) e não causaram alterações no peso acumulado ou consumo de ração destes animais (dados não mostrados). Assim, o efeito antitumoral das LNC pode estar relacionado ao fato dos TCM estarem encapsulados e chegarem em maior quantidade no microambiente tumoral.

Outro indicativo de que as LNC têm eficácia terapêutica maior do que as LNC-AC pode ser devido a alteração da supraestrutura da formulação de LNC-AC pelo AC. Nas LNC-AC a quantidade de TCM que compõe o núcleo lipídico é reduzido, sendo substituído pelo AC. Assim, a supraestrutura das LNC poderia estar exercendo efeito antitumoral, uma vez que quando o TCM é substituído pelo AC a formulação não apresenta efeito terapêutico (Figura 13 e Figura 15). Este fato por estar relacionado ao fato do AC presente nas LNC-AC interagir com a parede polimérica das nanocápsulas,

desestabilizando a supraestrutura da formulação, como salientado na Introdução. Neste sentido, FIEL e colaboradores (2013) mostraram que a substituição do TCM por diferentes concentrações de óleo mineral faz com que as LNCs apresentem atividade citotóxica *in vitro* na linhagem de células de glioblastoma de ratos C6 reduzida sugerindo o papel da supraestrutura das LNCs na sua atividade biológica (FIEL, 2013).

**Figura 17** Volume tumoral de animais que receberam os tratamentos com LNC e TCM pela via oral durante sete dias nas etapas iniciais de desenvolvimento do melanoma.



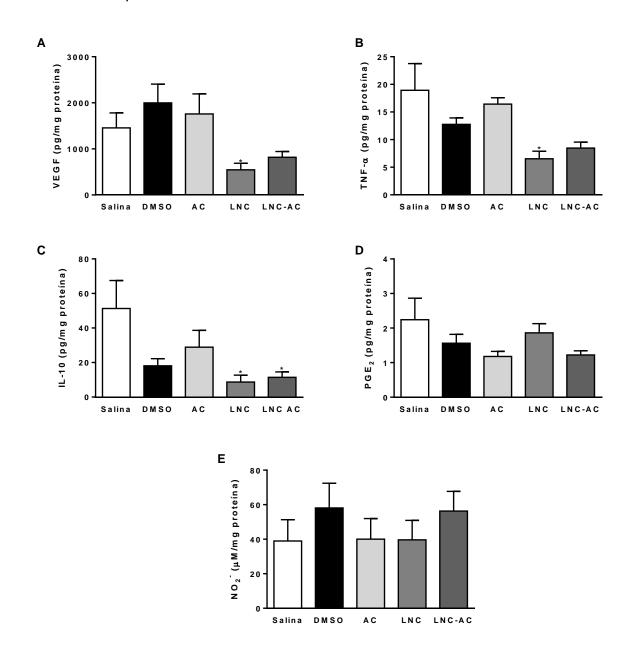
Os animais receberam a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal  $(5x10^8 \text{ células B16F10/100 } \mu\text{L}$  meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, LNC  $(1,1x10^{12}\text{partículas/kg/dia})$  ou TCM  $(180 \,\mu\text{L/dia})$  durante sete dias, pela via oral. (A) Volume tumoral dos diferentes grupos experimentais e (B) imagens representativas dos animais ao final dos tratamentos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de dez animais por grupo. \*\*p<0,01  $\nu$ s grupo tratado com salina e  $^{\#}$ p<0,05  $\nu$ s grupo tratado com TCM.

### 4.2.3 Quantificação dos mediadores químicos no homogenato tumoral

O microambiente tumoral possui uma diversidade de mediadores químicos, secretados pelas células tumorais, constitutivas dos tecidos e imunes que migram para o tumor, que influenciam o desenvolvimento do mesmo. Assim, com a finalidade de traçar o perfil de mediadores químicos presentes no homogenato tumoral ao final do protocolo experimental nº 2, descrito no ítem 3.4.2, os animais foram eutanasiados e a massa tumoral foi homogeneizada para a realização das análises.

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com LNC reduziu as concentrações de VEGF (Figura 18A), TNF-α (Figura 18B) e IL-10 (Figura 18C) no homogenato tumoral. Já o tratamento com LNC-AC (50 mg/kg/dia) reduziu somente a concentração de IL-10 (Figura 18A) no homogenato tumoral. O tratamento com AC (50 mg/kg/dia) ou com o seu veículo não alteraram as concentrações de nenhum dos mediadores químicos avaliados no homogenato tumoral. As concentrações de PGE2 (Figura 18D) ou óxido nítrico (Figura 18E) no homogenato tumoral não foram alteradas por nenhum dos tratamentos na concentração de 50 mg/kg/dia.

**Figura 18** Concentração de mediadores químicos no momogenato tumoral após 7 dias de tratamento pela via oral.



Os animais receberam a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal  $(5x10^8 \text{ células B16F10/100 } \mu\text{L}$  meio de cultura) e três dias após foram tratados com salina, LNC, AC ou LNC-AC (50 mg/Kg/dia) por sete dias. Ao término dos tratamentos, a massa tumoral foi coletada, homogeneizada e as concentrações de VEGF (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), PGE<sub>2</sub> (D) e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (E) foram analisadas. Os dados representam os valores de médias  $\pm$  e.p.m. de 4 ou 5 animais por grupo. \*p<0,05  $\nu$ s salina.

Os efeitos na redução tumoral observados podem ser provenientes da toxicidade das formulações nas células tumorais, da inibição da proliferação das células tumorais

e/ou da alteração na produção ou ação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, ou mesmo devido a uma possível atuação sobre as células do sistema imune (ALLAVENA *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2008). Neste sentido, a redução das concentrações de VEGF, TNF-α e IL-10 no homogenato tumoral induzido pelo tratamento com as LNC pode ser responsável, pelo menos em parte, pela inibição do crescimento tumoral.

O VEGF é o principal fator de crescimento responsável pela promoção da angiogênese tumoral, ou seja, pela formação de novos vasos no microambiente tumoral. A angiogênese tem ganhado destaque como um possível alvo na terapia contra o câncer (TORTORA et al., 2004) pois este desempenha papel chave na proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais que constituirão a nova rede microvascular. O VEGF atua pela ligação à receptores tirosina quinase específicos, de modo que o aumento das concentrações de VEGF e da expressão de seus receptores têm sido associados à progressão e pior prognóstico em diversos tumores malignos, como por exemplo, carcinomas de tireóide e melanomas (CAPP et al., 2009; SIMONETTI et. al., 2012).

Outro mediador inflamatório associado com pior prognóstico de diferentes tumores como glioma, cancer de mama e carcinoma renal (KOEV *et al.*, 2014; TRIPSIANIS *et al.*, 2014; MIKAMI *et al.*, 2015) é o TNF-α, que está associado à promoção do crescimento de células malignas e à maior frequência de processo de invasão e metástase. Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que o TNF-α aumenta a capacidade de invasão e migração de células de melanoma humano pela ativação de enzimas proteolíticas que atuam na degradação da membrana basal e da matriz extracelular (KATERINAKI *et al.*, 2003). Assim, a redução das concentrações do VEGF e TNF-α são importantes na inibição do desenvolvimento tumoral induzido pelo tratamento com as LNC.

Adicionalmente, a IL-10 apresenta ação imunomoduladora no microambiente tumoral, agindo como uma citocina antiinflamatória por diversos mecanismos de ação, dentre eles: inibição da síntese de citocinas/quimiocinas produzidas por macrófagos, como por exemplo, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α e IL-12; inibição da função de macrófagos e dos eventos metabólicos associados com sua ativação; inibição da proliferação de células T e da produção de citocinas do tipo Th1; inibição da liberação de mediadores dos mastócitos (histamina); inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias e

MHC classe II e estímulo à expressão de antígenos 4 citotóxicos à linfócitos T (CTLA-4) (OLIVEIRA et. al. 2011). Apesar destes efeitos, têm sido descrito que a IL-10 promove o crecimento de melanoma induzido por células B16F10 por inibir funções de macrófagos, e por induzir a proliferação de células tumorais além de induzir a angiogênese (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2002). Assim, a redução das concentrações de IL-10 poderia reduzir o crescimento do melanoma por aumentar as funções de macrógafos, por reduzir a proliferação das células tumorais ou por reduzir a angiogênese no microambiente tumoral. Mais estudos são necessários para elucidar a real participação destes mediadores químicos na inibição do crescimento do melanoma induzido pelo tratamento com as LNC.

Em conjunto, nossos resultados ressaltam que as LNC podem ter amplo espectro de ação do microambiente tumoral e, estudos subsequentes deste trabalho foram realizados para confirmar esta hipótese.

#### 4.2.4 Análise histológica da massa tumoral

Com a finalidade de analisar as possíveis alterações histológicas induzidas pelos tratamentos, quando administrados pela via oral, na massa tumoral ou em diferentes órgãos, os animais foram eutanasiados no oitavo dia após o início dos tratamentos e a massa tumoral e diferentes órgãos foram coletados. As análises histopatológicas foram realizadas em colaboração com o Professor Bruno Cogliati, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Os resultados histopatológicos dos tumores indicaram predomínio de figuras mitóticas nos tecidos de animais tratados com salina, DMSO ou com AC e predomínio de pontos de necrose nas amostras de animais tratados com LNC ou LNC-AC (50 mg/Kg/dia) (Figura 19). Estes resultados indicam um perfil proliferativo na massa tumoral de animais tratados com salina, DMSO ou AC e necrótico na massa tumoral de animais tratados com LNC ou LNC-AC, mostrando que os tratamentos causam a morte das células tumorais. A possibilidade da citotoxicidade direta das LNC sobre as células B16F10 foi posteriormente investigada neste estudo. No entanto, há de se considerar que ações das LNCs sobre o microambiente tumoral não podem ser descartadas.

Somente GHOSH e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento com eugenol (125 mg/kg, i.p., duas vezes por semana) induziu apoptose no tumor *in vivo* induzido por células B16F10. Assim, apesar de usarmos um modelo experimental

semelhante ao utilizado por GHOSH, não observamos o mesmo perfil de resposta, talvez por administrarmos uma dose 2,5 vezes menor de fármaco, apesar de administramos com uma frequência maior, ou por estarmos utilizando o acetileugenol e não o eugenol.

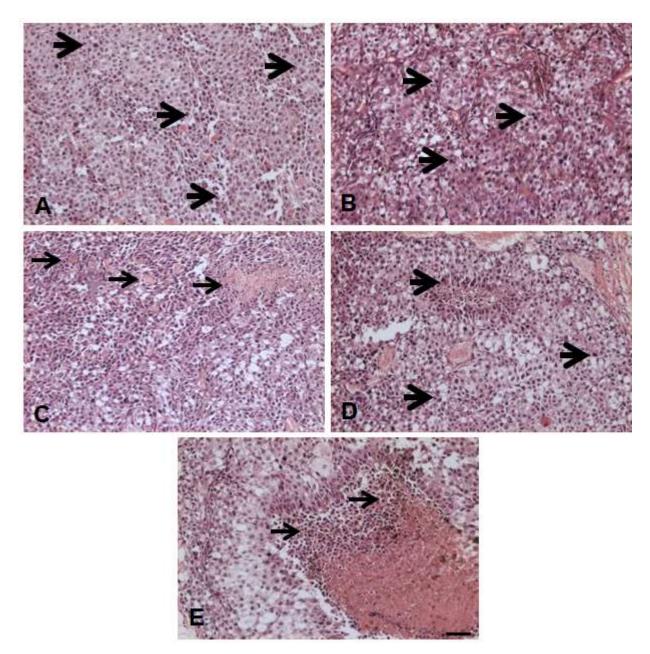
Associado ao efeito terapêutico, a administração pela via oral de LNC, AC ou LNC-AC (50 mg/Kg/dia) durante 7 dias, não causou alterações histopatológicas no estômago, intestinos, fígado, rins, baço, linfonodos, pâncreas, ou pulmões dos animais (dados não mostrados).

# 4.2.5 Análise da celularidade sanguínea e parâmetros sanguíneos

Com a finalidade de avaliar as possíveis alterações sistêmicas dos tratamentos, a celularidade e parâmetros bioquímicos do sangue foram avaliados em amostras obtidas por punção da veia submandibular. Foram quantificados o número total e diferencial de leucócitos, plaquetas e hemácias, bem como o valor da hemoglobina (Hb), o hematócrito (Ht), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), utilizando o analisador automático de células ABC vet (ABCX Diagnostics).

Os animais tratados com LNC, AC e LNC-AC (50 mg/kg/dia) apresentaram redução somente no número linfócitos em relação ao grupo tratado com salina (Tabela 2). Os demais parâmetros sanguíneos avaliados não foram alterados por nenhum dos tratamentos utilizados (Tabela 2).

**Figura 19** Imagens representativas de cortes histológicos da massa tumoral de animais que foram tratados durante 7 dias pela via oral.



Os animais receberam injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal (5x10<sup>8</sup> células B16F10/100 µL meio de cultura) e foram tratados pela via oral com salina (A), DMSO (B), LNC (C), AC (50 mg/Kg/dia, D) ou LNC-AC (50 mg/Kg/dia, E) por sete dias. Ao término dos tratamentos, a massa tumoral foi coletada, incluída em parafina, cortada, corada com hematoxilina e eosina (HE) e fotografadas em aumento final de 10 x. As setas maiores indicam regiões de proliferação celular, as setas menores indicam regiões de necrose e a barra indica dimensão de 50 µm.

**Tabela 2** Parâmetros hematológicos dos camundongos ao final de 7 dias de tratamento pela via oral.

a via Orai.					
	Salina	DMSO	AC	LNC	LNC-AC
Leucócitos	2,3±0,4	3,7±0,3	2,2±0,2	2,0±0,2	2,1±0,2
Linfócitos	2,5±0,2	3,1±0,3	1,7±0,2***	1,8±0,07**	1,7±0,1***
Neutrófilos	0,4±0,04	0,4±0,03	0,4±0,1	0,3±0,07	0,4±0,05
Monócitos	0,03±0,00	0,03±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
Plaquetas	1021±55,6	940±80	965,3±30	879,4±44,3	1164±38,2
Hemácias	8,7±1,0	8,4±0,3	9,1±0,2	9,1±1,0	9,7±0,2
Hemoglobina	13,7±0,2	13,3±0,5	14,7±0,4	13,4±1,5	14,7±0,4
Hematócrito	39,6±0,7	38,7±1,6	43,5±1,0	41,3±4,8	44,4±1,0
MCV	45,2±0,3	45,4±0,4	45,3±0,3	45,1±0,2	45,4±0,4
МСН	15,6±0,3	15,5±0,3	15±0,2	14,3±0,2	15,3±0,2
мснс	34,5±0,6	34,4±0,5	32,4±0,2	32,6±3,3	33,6±0,2

Notas: Leucócitos ( $10^6$ /mm³); Linfócitos ( $10^6$ /mm³); Neutrófilos ( $10^6$ /mm³); Monócitos ( $10^6$ /mm³); Plaquetas ( $10^6$ /mm³); Hemácias ( $10^6$ /mm³); Hemoglobina (g/dl); Hematócrito (%); MCV (fm³); MCH (pg); MCHC (g/dl). Os valores foram exressos como média ± e.p.m (n = 6). \*\*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 vs salina.

A diminuição no número de leucócitos totais por ser devido à linfocitopenia, apesar do número de leucócitos totais está dentro da faixa de normalidade para a espécie (PAIVA, 2013). Não há dados até este momento que possam inferir sobre os mecanismos envolvidos na linfocitopenia, mas é possível que tenha havido migração

destas células para a região tumoral, redução na sua produção, aumento no seu *clearance*, ou migração para os linfonodos. Mais estudos são necessários para elucidar os motivos reais desta redução no número de linfócitos induzido pelos tratamentos com LNC, AC e LNC-AC.

Nos ensaios de microscopia intravital, apresentados no ítem 4.3.2, após administração de um volume final de 200 µL de LNC ou LNC-AC pela via endovenosa (administrados durante um período de 5 ou 30 minutos) foi observado hemólise duas horas após as administrações. A hemólise foi detectada devido à presença de sangue, e não de hemácias, na urina dos animais (Tabela 5). Adicionalmente, o tratamento *in vitro* de hemácias murinas com LNC ou LNC-AC, na dose equivalente à 20 mg/Kg, também induziu hemólise destas células (ítem 4.3.3). Interessantemente, não observamos alterações no número ou função das hemácias após longo período de tratamento (7 dias) sugerindo que a hemólise pode ser momentâneo e reversível com o passar do tempo.

### 4.2.6 Avaliação das funções renal e hepática

Com a finalidade de avaliar as funções renal e hepática dos animais após a administração dos tratamentos pela via oral, sangue dos animais foi obtido por punção da veia cava no oitavo dia após o início dos tratamentos. O soro foi isolado e as concentrações de creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos não alteraram significantemente os níveis de creatinina e das enzimas aspartato aminotransferase e de alanina aminotransferase (Tabela 3).

**Tabela 3** Parâmetros hepáticos e renais dos camundongos ao final de 7 dias de tratamento pela via oral.

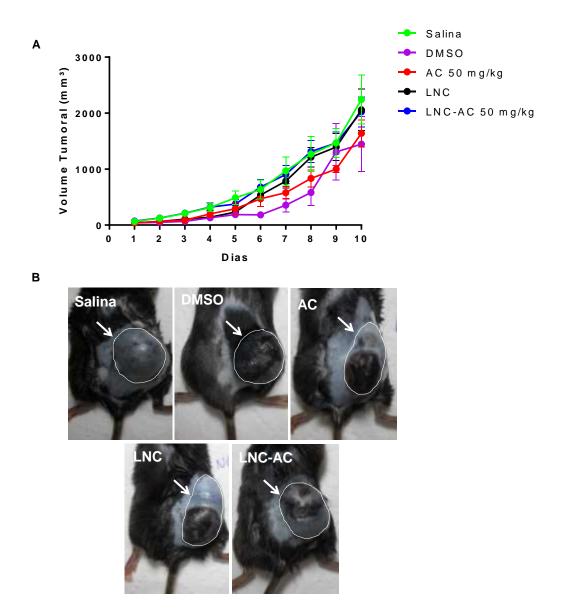
	•	Salina	DMSO	AC	LNC	LNC-AC
		<b>-</b>	2			
•	AST	159,9±37,0	182,7±50,1	163,1±45,2	109,4±16,2	162,4±33,2
	ALT	21,7±2,3	23±1,7	22,9±2,8	25,6±3,6	23,7±3,1
	Creatinina	0,15±0,02	0,17±0,02	0,16±0,02	0,18±0,03	0,12±0,02

Nota: AST (U/L); ALT (U/L); Creatinina (mg/dL). Os resultados expressam a média±e.p.m. m (n = 6).

# 4.2.7 Eficácia terapêutica dos tratamentos após administração pela via oral na etapa avançada de desenvolvimento do melanoma

Os resultados apresentados anteriormente mostraram a eficácia das LNCs na etapa inicial de desenvolvimento do melanoma. Sabe-se que, no modelo aqui empregado, o tumor está em fase avançada após 10 dias da injeção das células tumorais (ONIKI *et al.,* 2006). Assim, nos propusemos a investigar se os tratamentos poderiam reduzir o tumor avançado e os tratamentos foram conduzidos entre o 10º e 20º dias após a administração das células tumorais (protocolo nº 3, decrito no ítem 3.4.2). O volume tumoral do grupo de animais tratados com LNC ou LNC-AC foi igual ao volume tumoral do grupo de animais tratado com salina, DMSO ou AC (Figura 20A). A massa tumoral macroscópica dos animais pode ser visualizada na Figura 20B. Cabe ressaltar que não houve alteração nos parâmetros de variação de peso acumulado e de consumo de ração dos animais que receberam os diferentes tratamentos (dados não mostrados).

**Figura 20** Volume tumoral de animais que receberam os diferentes tratamentos pela via oral durante dez dias na etapa avançada de desenvolvimento do melanoma.



Os animais receberam injeção das células tumorais no tecido subcutâneo dorsal (5x10<sup>8</sup> células B16F10/100 µL meio de cultura) e após 10 dias foram tratados com salina, DMSO, AC (50 mg/kg/dia), LNC ou com LNC-AC (50 mg/kg/dia) durante 10 dias, pela via oral. (A) Volume tumoral dos diferentes grupos experimentais e (B) imagens representativas dos animais ao final dos tratamentos. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. de dez animais por grupo. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs grupo tratado com salina.

Atualmente o câncer é melhor compreendido como um microambiente, em que as interações entre os elementos celulares e moleculares que o compõe são

determinantes na progressão tumoral. Dentre os componentes do microambiente tumoral, a resposta imune com consequente formação de infiltrado inflamatório ocorre na maioria dos tumores e a composição deste infiltrado varia, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, de acordo com as alterações no microambiente tumoral, podendo modificar o fenótipo de cada tumor (HANAHAN & WEINBERG, 2011; SWARTZ et al., 2012). Assim, o microambiente tumoral difere, de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimento tumoral. Diante dos resultados obtidos nesta etapa de investigação, podemos sugerir que os tratamentos com as LNCs não induziram inibição do crescimento do melanoma, nesse estágio avançado de desenvolvimento, ou por haver diferenças de composição no microambiente tumoral, que podem ter alterado o fenótipo do mesmo, ou por haver diferença na reologia no microambiente tumoral quando comparamos os estágios iniciais e mais avançados de desenvolvimento tumoral. Estas alterações de reologia culminam em alteração da pressão intratumoral podendo limitar a chegada das LNCs no centro da massa tumoral (JAIN & STYLIANOPOULOS, 2010; Wang et al., 2011).

Cabe ressaltar que os resultados obtidos não estão relacionados com uma possível não absorção dos tratamentos uma vez que o protocolo de administração, pela via oral dos tratamentos foi o mesmo utilizado no segundo protocolo de tratamento (Figura 15). Adicionalmente, o tamanho dos poros nos vasos sanguíneos em situações de inflamação são maiores, facilitando o efeito de retenção passiva das nanocápsulas, e o limite de tamanho dos poros em vasos tumorais pode estar entre 200 nm e 2 μm (YOKOYAMA *et al.*, 1991; YUAN *et al.*, 1995; HOBBS *et al.*, 1998; HASHIZUME *et al.*, 2000). Assim, não haveria impedimento reológico para as nanocápsulas utilizadas neste estudo terem atingido as células tumorais (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

# 4.3 SEÇÃO 3 – Toxicidade Aguda

# 4.3.1 Microscopia Intravital

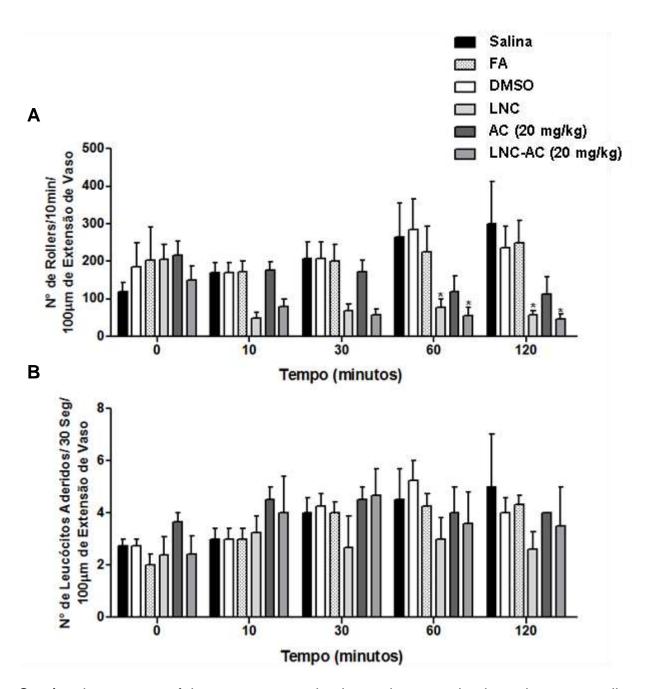
Nosso laboratório emprega a metodologia de microscopia intravital para o estudo de aspectos vasculares e celulares da microcirculação envolvidos na inflamação. No entanto, mais recentemente, acreditamos que esta seja uma metodologia importante para o estudo de toxicidade aguda. Neste método é possível avaliar as alterações na

rede microcirculatória *in vivo* e em tempo real (MENGER & LEHR, 1993; MENGER *et al.*, 2002; WEIGERT *et al.*, 2010). Assim, no intuito de contribuir para o emprego terapêutico das LNCs, realizamos o estudo das alterações da microcirculação após aplicação endovenosa das LNCs e os correspondentes controles.

Um dos parâmetros avaliados foi a interação leucócito-endotélio, no qual os leucócitos circulantes deslizam (comportamento *rolling*) e aderem sobre o endotélio de vasos pós-capilares (DAHLEN *et. al.*, 1981; UCHIYAMA *et al.*, 2014). Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com DMSO, com a FA ou com o AC (20 mg/kg) não foram capazes de alterar o número de leucócitos em comportamento *rolling* em relação ao grupo tratado com salina, em nenhum dos tempos avaliados. No entanto, os tratamentos com LNC ou LNC-AC (20 mg/kg) diminuíram o número de leucócitos em comportamento *rolling* em relação ao grupo tratado com salina 60 e 120 minutos após os tratamentos (Figura 21A). Adicionalmente, nenhum dos tratamentos empregados alterou a adesão de leucócitos em relação aos animais tratados com salina (Figura 21B). Adicionalmente, vale ressaltar que a administração pela via endovenosa dos diferentes tratamentos não induziu hemólise, formação de trombos ou de áreas hemorrágicas na microcirculação murina (dados não mostrados).

Estes dados, além de mostrar que os tratamentos não causaram toxicidade na rede microcirculatória, sugere que as LNCs podem atuar como anti-inflamatórias, inibindo as etapas iniciais da migração de leucócitos para o foco do tumor.

**Figura 21** Efeitos do AC, LNC e LNC-AC sobre o comportamento *rolling* (A) e adesão (B) de leucócitos da microcirculação murina.



O músculo cremaster foi exposto e os animais receberam pela via endovenosa salina, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (20 mg/kg). O comportamento de *rolling* e a adesão dos leucócitos às vênulas pós capilares foram avaliados antes ou 10, 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos. Os dados representam os valores de médias ± e.p.m. de 4 ou 5 animais por grupo.\*p<0,05 vs basal e vs salina.

Tem sido amplamente descrito na literatura que os mediadores e efetores celulares da inflamação são constituintes importantes do microambiente tumoral (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008; PORTA et al., 2009). Diferentes estudos têm realçado que um infiltrado leucocitário variando em tamanho, composição e distribuição está presente na maioria dos tumores e este está envolvido na carcinogênese, no crescimento do tumor, na invasão e na metástase (DIRKX et al., 2006; MANTOVANI et al., 2008, MAN et al., 2013). Adicionalmente, componentes moleculares, como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, óxido nítrico, fatores de transcrição (NF-κB), fatores indutores de hipóxia (HIF-1α) e transdutores de sinais e ativadores de transcrição 3 (STAT 3), ligam a inflamação ao desenvolvimento do câncer (KUNDU & SURH, 2008; MANTOVANI et al. 2008). Assim, a literatura tem sugerido que o controle do processo inflamatório, tanto a nível celular quanto a nível molecular, poderia inibir o crescimento tumoral (MANTOVANI et al., 2008; PORTA et al., 2009). Como os tratamentos com LNC ou com LNC-AC reduziram o comportamento rolling dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares, sugerindo que os tratamentos podem ter interagido/ligado com as glicoproteínas da família das selectinas, neste caso a P-selectina presentes nas células endoteliais e a Lselectina nos leucócitos, ou com os seus ligantes, na maioria carboidratos fucosilados, como PSGL-1 ou (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*) ou Sialyl Lewis-X. As PSGL-1 são amplamente expressas em leucócitos, sendo que anticorpos anti a região N-terminal de PSGL-1 de humano ou murino bloqueia a ligação desta com P e L-selectinas e abole o rolling de leucócitos in vivo (ZARBOCK et al., 2011). Assim, acreditamos que a interferência das nanocápsulas nestas interações possa contribuir para os efeitos antineoplásicos aqui observados, no entanto dados adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Ainda, a redução do comportamento de *rolling* de leucócitos induzida pelo tratamento com LNC ou LNC-AC (20 mg/kg) não foi dependente da redução do número absoluto de leucócitos ou número relativo de linfócitos, neutrófilos ou monócitos (Tabela 4), uma vez que estes parâmetros estavam dentro da faixa de normalidade para a espécie (PAIVA, 2013) e foram semelhantes entre todos os grupos experimentais.

**Tabela 4** Celularidade sanguínea de animais tratados pela via endovenosa com LNC, AC ou LNC-AC (20 mg/kg) após duas horas de tratamento.

·	Salina	DMSO	FA	AC	LNC	LNC-AC
Leucócitos	5,6±1,5	5,2±0,8	4,8±1,8	5,0±1,2	5,0±1,3	6,0±2,0
Linfócitos	60±4,0	68±4,5	70±5,2	63±4,0	60±4,6	67±4,0
Neutrófilos	38±5,1	30±5,8	26±6,8	35±3,5	37±5,7	36±5,2
Monócitos	1,5±0,9	1,6±0,7	0,6±0,9	1,2±0,6	1,4±1,0	0,9±0,6

Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para o estudo de microscopia intravital no músculo cremaster dos camundongos. Duas horas após os tratamentos o sangue foi coletado e os leucócitos totais contados em câmara de Neubauer. Os resultados são expressos como média ± e.p.m. de quatro a cinco animais por grupo. Nota: Leucócitos (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>); Linfócitos (%); Neutrófilos (%); Monócitos (%).

#### 4.3.2 Análise Qualitativa da Urina

As amostras de urina de animais que foram tratados com salina, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (20 mg/kg) apresentaram padrões de urobilinogênio, bilirrubina, nitrito, cetonas, glicose, pH, densidade e leucócitos semelhantes aos animais SHAM, ou seja, animais que não sofreram manipulação cirúrgica e que não receberam algum tratamento. Os animais tratados com FA, LNC, AC e LNC-AC apresentaram traços de proteínas na urina. Adicionalmente, foi detectado a presença de sangue na urina de animais tratados com FA, LNC ou LNC-AC (20 mg/kg, 200 µL, por 5 minutos, i.v.) (Tabela 5). Em adição, após a administração das LNC e das LNC-AC, na mesma dose e no mesmo volume, mas durante 30 minutos, também foi observado a presença de sangue na urina destes animais (dados não mostrados), confirmando que a velocidade de administração dos tratamentos não alterou o perfil de toxicidade. Assim, pode-se sugerir que as LNC e as LNC-AC podem induzir hemólise intravascular ou algum dano renal, apesar de não ter sido observado alterações histopatológicas nos rins. Apresar destes resultados, como já salientado, no protocolo de tratamento número 2, onde os animais receberam os tratamentos durante 7 dias pela via oral, não foram observados

alterações no número ou função das hemácias e, adicionalmente, após a administração dos tratamentos pela via endovenosa não foi observado hemorragia nas vênulas póscapilares do músculo cremaster.

**Tabela 5** Parâmetros bioquímicos da urina de animais tratados com Salina, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (20 mg/kg) pela via endovenosa.

Parâmetro	Sham	Salina	DMSO	FA	LNC	AC	LNC-AC
Sangue	Neg.	Neg.	Neg.	Ca 250±0	Ca 250±0	Neg.	Ca 250±0
Urobilinogênio	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Bilirrubina	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Proteínas	Neg.	Neg.	Neg.	Traços	Traços	Traços	Traços
Nitrito	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cetonas	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Glicose	500±0	506,7	500±0	500±0	300±117	425±75	350±92
рН	6±0,5	6±0	5,6±0,3	5,5±0	6±0	5,6±0,2	5,5±0,2
Densidade	1020±2,8	1025±0	1022±1,6	1025±0	1025±0	1023±1	1025±0
Leucócitos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Nota: Sangue (µL); Urobilinogênio (mg/dL); Proteínas (mg/dL); Glicose (mg/dL); Neg. (Negativo).

#### 4.3.3 Hemólise in vitro

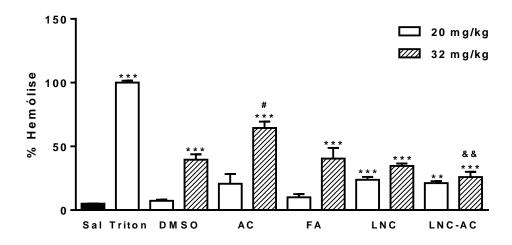
A fim de confirmar os efeitos dos tratamentos sobre os eritrócitos, o sangue de animais não tratados foi coletado e os eritrócitos isolados e incubados *in vitro* com os diferentes tratamentos.

O tratamento *in vitro* de eritrócitos murinos com Triton X 100 (0,2%, controle positivo) induziu 100% de hemólise destas células. O tratamento de eritrócitos *in vitro* com concentrações 1,6 mM de AC (equivalentes à dose de 20 mg/kg empregada no tratamento *in vivo*), de DMSO e de FA não induziram hemólise. Diferentemente, o tratamento com LNC, AC e LNC-AC com concentrações equivalentes à dose de 20

mg/kg (tratamento *in vivo*) induziram liberação de hemoglobina para o sobrenadante celular em relação ao observado no grupo incubado com salina (controle) (Figura 22).

Semelhantemente, o tratamento com DMSO, FA, LNC, AC e LNC-AC com concentrações (2,6 mM de AC) equivalentes à dose de 32 mg/kg (tratamento *in vivo*) provocaram liberação de hemoglobina para o sobrenadante celular em relação ao grupo incubado com salina (Figura 22).

Figura 22 Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na hemólise in vitro.



Suspensão de eritrócitos murino (10 %) foi incubada com salina, FA, LNC, AC ou LNC-AC (20 ou 32 mg/Kg) na proporção de 5:1, durante 1 hora a 37° C e, posteriormente, o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria (540 nm). Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da hemólise de hemácias obtidas de 3 animais diferentes. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs salina; \*p<0,01 vs DMSO e \*\*p<0,01 vs AC.

Apesar destes resultados indicativos de toxicidade, o tratamento com LNC e LNC-AC não alterou o número e nem as funções das hemácias após sete dias de tratamento, tanto pela via intraperitoneal (BEXIGA et al., 2013, comunicação pessoal) quanto pela via oral, sugerindo que estes efeitos, in vivo, possam não ser determinantes de toxicidade. Adicionalmente, os tratamentos não causaram nefrotoxicidade, uma vez que os níveis de creatinina não estavam alterados e os rins não apresentavam alterações histopatológicas, apesar da urina destes animais apresentar traços de proteínas (Tabela 3). Assim, o sangue encontrado na urina dos animais, apresar de não terem sido obsevados eritrócitos, pode ser decorrente da injúria da membrana dos eritrócitos causada ela grande área superficial específica das

nanocápsulas ou pode ser decorrente do polissorbato 80 presente na superfície das LNCs e na fase aquosa da formulação, uma vez que o tratamento com a fase aquosa também produziu o mesmo efeito.

Em 2012, BENDER e colaboradores descreveram que nanocápsulas de núcleo lipídico de poli(ε-caprolactona) estabilizadas com polissorbato 80 e revestidas com quitosana (potencial zeta positivo) ou não revestidas (potencial zeta negativo) apresentaram hemocompatibilidade, ou seja, 2% (v/v) das formulações não provocarem hemólise significante e não induziram agregação plaquetária, independente da natureza química da sua superfície. Já quando foi utilizado 10% (v/v) das formulações foram observados hemólise *in vitro* e agregação plaquetária, indicando que a área superficial específica dos colóides influenciam mais nos resultados do que a natureza química da interface partícula/água.

# 4.4 SEÇÃO 4 – Efeitos dos tratamentos em células endoteliais e de melanoma in vitro

Uma vez que, de forma surpreendente, o tratamento com as LNC exerceu efeito antitumoral por si só, e este foi mais eficaz do que o tratamento com AC ou com LNC-AC, a próxima etapa foi avaliar *in vitro* os mecanismos dos efeitos antitumorais observados *in vivo*.

### 4.4.1 Diluições seriadas das suspensões de LNC-AC não alteram a liberação do AC

Para a realização dos ensaios *in vitro*, uma vez que empregamos diluições seriadas das suspensões de LNC-AC, passou a ser relevante avaliar se haveria, nestas condições, liberação do princípio ativo para o meio de cultura. Assim, no sentido de avaliar a estabilidade da formulação de LNC-AC, a mesma foi submetida a diluições seriadas em água contendo 10% de SFB, à temperatura ambiente. A liberação do AC após cada diluição foi calculada pela relação percentual da concentração que permaneceu no carreador em relação à concentração total de AC (concentração total – concentração na fase aquosa). A Tabela 6 mostra a % de AC presente no exterior das LNC após as diluições a partir da formulação original (~15000 μM; 1,42%) para 300 μM (5,08%) ou para 100 μM (4,93%). As diluições realizadas a partir da concentração de 300 μM para 60 μM apresentaram 8,16% de AC no exterior das nanocápsulas.

Diferentemente, as % de AC que estavam presentes no exterior das nanocápsulas, nas diluições de 30 µM e 10 µM não puderem ser definidas, pois os valores obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação.

Estes resultados já eram esperados, uma vez que as LNCs apresentam um núcleo lipídico, o que dificulta a interação deste com a fase aquosa da formulação, com o meio de cultura utilizado nos ensaios e com a água utilizada neste ensaio de liberação do princípio ativo.

**Tabela 6** Avaliação da liberação do AC após as diluições seriadas.

Amostra	Concentração total (µM)	Concentração total (mg/mL)	Concentração na fase aquosa (mg/mL)	% Eficiência de encapsula mento	% de AC fora das NC
Formulação	15000	3214	45,8	98,58	1,42
Diluição 1	300	61,07	3,1	94,92	5,08
Diluição 2	100	20,36	1,0	95,07	4,93
Diluição 1a	60	12,21	1,0	91,84	8,16
Diluição 1b	30	6,10	_*	-	-
Diluição 1c	10	2,04	_*	-	-

<sup>\*</sup> Valor abaixo do limite de quantificação.

#### 4.4.2 Os tratamentos não alteram o pH do meio de cultura

Para avaliar os efeitos das formulações no pH do meio de cultura adicionado de 10 % de SFB, as LNC, AC e LNC-AC foram diluídas de maneira semelhante à forma realizada no momento do tratamento das células. Esta suspensão foi submetida às análises de pH.

Os resultados obtidos mostram que nenhuma das formulações, em nenhuma das concentrações utilizadas, foi capaz de alterar o pH do meio de cultura, que se manteve em torno de 7,6 na temperatura de 24 °C (Tabela 7).

24±0,5

24±0,4

•	R10	DMSO	LNC	AC	LNC-AC
pH	7,67±0,3	7,65±0,24	7,66±0,35	7,68±0,7	7,64±0,4

 $24 \pm 0.5$ 

**Tabela 7** pH do meio de cultura após a diluição das diferentes formulações.

 $24 \pm 0.3$ 

Temperatura

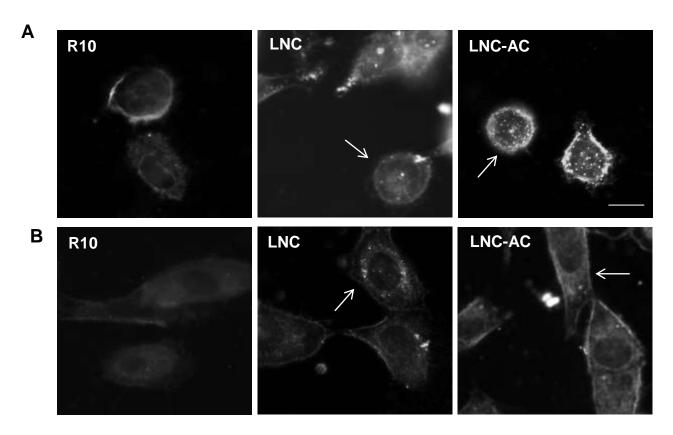
 $24 \pm 0.5$ 

Este ensaio foi realizado a fim de eliminar a possibilidade de alterações do pH do meio de cultura estarem mascarando ou alterando o comportamento das células utilizadas nos ensaios *in vitro*. Não foram observadas alterações de pH e este resultado já era esperado, pois, apesar do pH das formulações serem em torno de 4,5, o volume utilizado dos tratamentos foi cerca de apenas 2 µL de LNC ou LNC-AC para 1 mL de meio de cultura (equivalente a concentração de 300 µM de AC).

# 4.4.3 LNC e LNC-AC são internalizadas por células endoteliais e de melanoma após incubação in vitro

Uma pergunta corrente na literatura de nanocompostos é a habilidade e mecanismo pelo quais estes penetram as células. Assim, um dos primeiros resultados obtidos in vitro, utilizando o microscópio hiperespectral da CytoViva®, mostraram que as células tratadas com R10 apresentaram algumas poucas partículas bem características, tanto intra quanto extracelular. Os poucos pontos brilhantes (dado pelo espalhamento de luz) visualizados estavam em menor quantidade, com mobilidade reduzida e com tamanhos e formas ligeiramente diferentes comparados àquelas contendo nanocápsulas, tanto em células endoteliais quanto em células de melanoma da linhagem SK-Mel-28 (Figura 23). Diferentemente, o tratamento com as LNC ou com as LNC-AC produziu aumento na quantidade de pontos brilhantes em torno da superfície celular e no citoplasma (indicação com setas) de ambas as linhagens de células utilizadas neste estudo, indicando a interação destas nanocápsulas com as células. Adicionalmente, pôde-se observar que, tanto as LNC quanto as LNC-AC, que estavam presentes no meio extracelular e algumas localizadas no citoplasma apresentavam movimento Browniano, diferentemente daquelas próximas à superfície externa da membrana citoplasmática.

**Figura 23** Imagens representativas obtidas no microsópio hiperespectral de células endoteliais (A) e de melanoma (B) após tratamento com R10, LNC ou LNC-AC por 1 hora.



As células HUVEC e SK-Mel-28 foram plaqueadas em lamínulas, tratadas por 1 hora e lavadas. Posteriormente, as lamínulas foram posicionadas e fixadas sobre lâminas ultra limpas para a observação das células no campo escuro. As setas indicam a presença de LNC ou LNC-AC no citoplasma das células. O aumento final de todas as imagens é de 1500x e a barra indica dimensão de 25 µm.

Visando a confirmação da presença de nanocápsulas no interior das células variou-se a altura do eixo z. Este processo promove uma "varredura" da célula por meio de sua secção em planos que, posteriormente, justapostos reconstroem o volume integral da célula. Este recurso foi utilizado com o intuito de se comprovar a presença de nanocápsulas no interior das células, sendo que estas eram percebidas pelo surgimento e desaparecimento de um ponto brilhante, mediante a mudança do plano focal pela descida ou subida em z (dados não mostrados). A utilização deste equipamento para a visualização e localização de nanopartículas em células vivas é recente, sendo que este é o primeiro equipamento a ser utilizado no Brasil. Assim, o protocolo utilizado foi adaptado de duas publicações realizadas e publicadas pela

equipe técnica da CytoViva<sup>®</sup> e em poucos trabalhos já publicados na literatura (GRABINSKI *et al.*, 2011; EUSTAQUIO &, LEARY, 2012). O primeiro trabalho foi realizado por HASLING, onde este avaliou a internalização de bactérias Rickettsia em fibroblastos de camundongos após 24 horas de incubação (aumento final de 100 X), e o segundo trabalho mapeou nanopartículas de ouro internalizadas em células epiteliais vivas (CytoViva<sup>®</sup>, 2013).

A presença de nanocápsulas na superfície celular ocorreu, provavelmente, através da adsorção das primeiras sobre a segunda, o que indica a existência de certa afinidade das nanocápsulas com as células, que pode ser justificada entre as porções apolares das moléculas do polímero, que constituem a cápsula, e dos lipídeos da membrana plasmática. Por outro lado, ainda não foi possível confirmar o mecanismo de permeação destas nanocápsulas para o interior das células.

A permeação de nanopartículas pode ocorrer por difusão passiva, como foi observado por VRANIC e colaboradores (2013), devido a sua maleabilidade em se deformar, por ter caráter anfótero e ser relativamente pequena. A maleabilidade das nanocápsulas depende da composição do núcleo oleoso e do polímero utilizado, assim as nanocápsulas utilizadas neste trabalho são mais rígidas do que as nanocápsulas poliméricas convencionais, que não são constituídas por monoestearato de sorbitano (FIEL et al., 2011). Outra forma de captação de nanopartículas pelas células pode ocorrer por fagocitose ou endocitose, conforme observado por FRÖHLICH (2012) e revisado por PANARITI e colaboradores (2012). Assim, os resultados, obtidos até o momento, podem ser decorrentes da interação das LNC e das LNC-AC com a região externa da membrana celular, assim como da sua interação com estruturas citoplasmáticas.

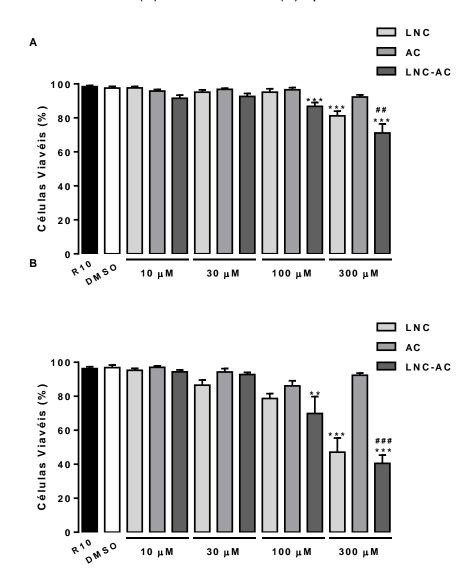
Em um trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Dra. Sandra Farsky utilizando LNC semelhantes às utilizadas neste trabalho foi observado que estas foram captadas, após tratamento *in vitro* durante 1 hora, por células GL261 (glioma murino) por mecanismo mediado por caveolina e por células BV2 (microglia murino) por mecanismo mediado por fagocitose e macropinocitose (PEREIRA, 2015, comunicação pessoal).

#### 4.4.4 Efeito dos tratamentos sobre a viabilidade celular

Uma das estratégias utilizadas na avaliação da efetividade de tratamentos antineoplásicos é a mensuração da viabilidade celular. A fim de identificarmos as concentrações do LNC, AC e das LNC-AC que seriam utilizadas *in vitro*, realizamos ensaios de viabilidade celular empregando, inicialmente, o método de exclusão por azul de tripan (para o *screening* inicial) e, posteriormente, ensaios de citometria de fluxo.

Podemos observar que no tratamento com FA (dados não mostrados) ou com o AC, nenhuma concentração avaliada alterou a viabilidade celular tanto de células endoteliais quanto de células de melanoma por até 48 horas de tratamento (Figura 24A e B). Já o tratamento com LNC reduziu a viabilidade celular somente na concentração de 300 μM, tanto para células endoteliais quanto para células de melanoma após 48 horas de incubação em comparação às células incubadas com R10 (Figura 24A e B). Por outro lado, o tratamento com LNC-AC reduziu a viabilidade celular, já na concentração de 100 μM, tanto para células endoteliais quanto para células de melanoma após 24 horas (dados não mostrados) ou 48 horas de incubação em comparação às células incubadas com R10 (Figura 24A e B). Portanto, o efeito citotóxico do tratamento com LNC-AC foi mais pronunciado nas células de melanoma do que nas células endoteliais.

**Figura 24** Efeitos do LNC, AC ou LNC-AC na viabilidade celular realizada por azul de tripan em células endoteliais (A) e de melanoma (B) após 48 horas de incubação.



Células da linhagem HUVEC (A) ou SK-Mel-28 (B)  $(1x10^5$  células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (10, 30, 100 ou 300  $\mu$ M) a 37°C 48 horas. As células foram coradas com azul de tripan e contadas utilizando microscópio óptico. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três ensaios realizados em duplicata. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001  $\nu$ s R10; \*##p<0,01 e \*\*\*p<0,001  $\nu$ s AC.

Nos ensaios de citometria de fluxo podemos observar que nenhum dos tratamentos, em todas as concentrações avaliadas, alterou a viabilidade, a apoptose, a apoptose tardia e a necrose das células endoteliais e de melanoma após 24 horas de incubação (Figura 25 e Figura 27, respectivamente).

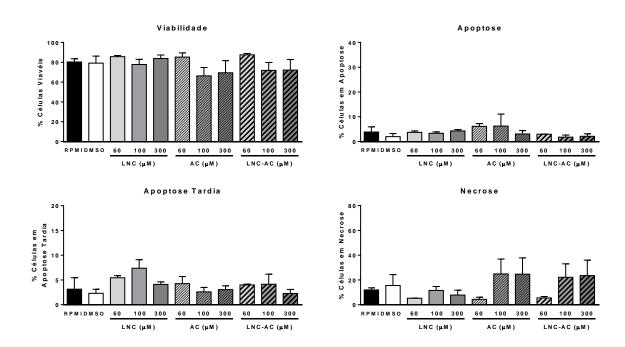
Os tratamentos com DMSO, FA, LNC, AC (60, 100 e 300 µM) ou LNC-AC (60 µM) não alteraram a viabilidade das células endoteliais após 48 horas de incubação. O tratamento com LNC-AC (100 e 300 µM) diminuiu a viabilidade celular e aumentou a percentagem das células endoteliais em necrose (Figura 26). Adicionalmente, neste mesmo período de incubação, o tratamento com AC (1000 µM) diminuiu a viabilidade celular e aumentou a percentagem das células endoteliais em apoptose tardia (dados não mostrados).

Os tratamentos com DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (60 µM) não alteraram a viabilidade celular, a apoptose, a apoptose tardia e a necrose das células de melanoma após 48 horas de incubação. O tratamento com LNC-AC (100 e 300 µM) diminuiu a viabilidade celular e aumentou a percentagem das células de melanoma em apoptose tardia e necrose (Figura 28) de maneira mais eficaz do que em células endoteliais.

Adicionalmente, o tratamento com AC (1000 µM), após 24 e 48 horas, diminuiu a viabilidade celular de maneira significativa, pois aumentou a percentagem de células de melanoma em apoptose (dados não mostrados).

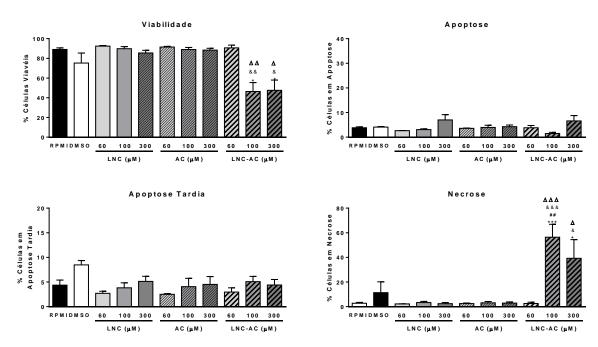
Concluindo, os dados de citotoxicidade aqui apresentados mostram que o tratamento *in vitro* com LNC-AC é mais efetivo em causar morte em células de melanoma do que em células endoteliais, e que este efeito é mais pronunciado do que o acarretado pelo tratamento com LNC ou AC.

**Figura 25** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais após 24 horas de incubação.



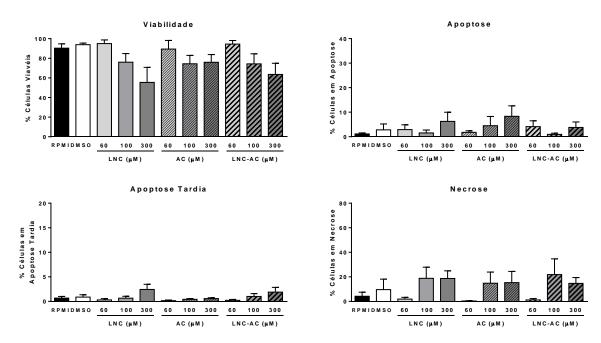
Células da linhagem HUVEC ( $1x10^5$  células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (60, 100 ou 300  $\mu$ M) a 37°C por 24 horas. As células foram incubadas com Anexina-V e PI e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três ensaios realizados em duplicata.

**Figura 26** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células endoteliais após 48 horas de incubação.



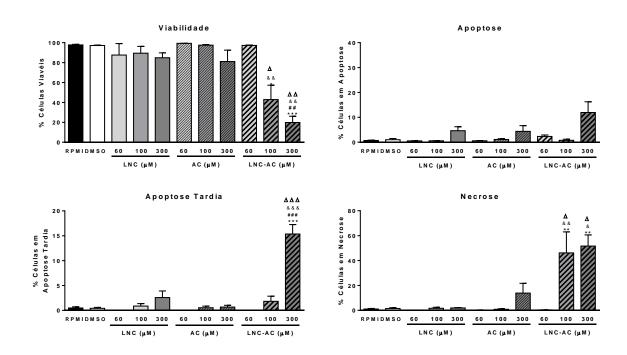
Células da linhagem HUVEC ( $1x10^5$  células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (60, 100 ou 300  $\mu$ M) a  $37^\circ$ C por 48 horas. As células foram incubadas com Anexina-V e PI e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três ensaios realizados em duplicata. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 vs R10; \*#p<0,01 vs FA; \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs AC.

**Figura 27** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células de melanoma após 24 horas de incubação.



Células da linhagem SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (60, 100 ou 300  $\mu$ M) a  $37^{\circ}$ C por 24 horas. As células foram incubadas com Anexina-V e PI e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três ensaios realizados em duplicata.

**Figura 28** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na viabilidade celular, apoptose, apoptose tardia e necrose de células de melanoma após 48 horas de incubação.



Células da linhagem SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (60, 100 ou 300  $\mu$ M) a  $37^{\circ}$ C por 48 horas. As células foram incubadas com Anexina-V e PI e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três ensaios realizados em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs R10; \*\*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs FA; \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs LNC; \*p<0,05, \*dp<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs AC.

O processo de morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos (KROEMER *et al.*, 2009), sendo que os mais estudados são a necrose, a apoptose, a autofagia e a piroptose (MELINO *et al.*, 2005, MAIURI *et al.*, 2007, LABBÉ & SALEH, 2011). Seus mecanismos estão bem estabelecidos para as linhagens de células avaliadas neste trabalho. Os processos de morte celular conhecidos como apoptose e necrose podem ser diferenciados a partir da observação de alterações morfológicas e bioquímicas das células (WILLINGHAM, 1999), as quais são dependentes da duração e da intensidade dos estímulos, da velocidade do processo de morte, bem como da extensão da depleção de adenosina trifosfato (ATP) (BUSSOLATI *et al.*, 1995; COTRAN *et al.*, 1999).

As células em apoptose apresentam condensação do seu citoplasma, seguida de alteração na forma e no tamanho da célula. Ocorre destacamento de alguns pontos de adesão na matriz, a condensação do DNA (picnótico) e fragmentação nuclear (cariorrexis) (VANENGELAND et al., 1997; WILLINGHAM, 1999; POON et al., 2010). Adicionalmente, ocorre a exteriorização da fosfatidilserina, antes que a integridade da membrana plasmática seja comprometida (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2010; MELINO et al., 2005). A exposição da fosfatidilserina serve como um gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos (ELMORE, 2007; POON et al., 2010), promovendo, assim, a eliminação destas células sem a ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático (ELMORE, 2007). Esta externalização é mensurada pela marcação celular com Anexina-V, que se liga a fosfolipídios, como a fosfatidilserina, de uma maneira reversível e cálcio-dependente (MELINO et al., 2005).

A morte celular por necrose é consequente de estímulos intensos e de curta duração (COTRAN et al., 1999). Este processo é caracterizado pelo aumento do volume intracelular, cariólise e lise da célula, ocorrendo sem o requerimento de consumo energético das células (SAIKUMAR et al., 1999). Em virtude do envolvimento de elevado número de grupos celulares e da perda precoce dos componentes citoplasmáticos para o espaço extracelular, a necrose geralmente resulta em resposta inflamatória intensa (VANENGELAND et al., 1997; WYLLIE, 1997; WILLINGHAM, 1999; KANNAN & JAIN, 2000; POON et al., 2010). A mensuração deste tipo de morte celular pode ser feita pela incubação com iodeto de propídio, um corante impermeável à membrana celular íntegra, que tem afinidade por estruturas intracelulares, como o DNA (ELMORE, 2007; WILLINGHAM et al., 1999). Entre a apoptose e a necrose, há uma fase no processo de morte celular denominada de apoptose tardia, que é caracterizada pela externalização da fosfatidilserina e rompimento da membrana plasmática. Assim, nesta fase, as células são marcadas tanto com o iodeto de propídio quanto com a Anexina-V (ELMORE, 2007).

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o tratamento com AC (1000 µM) induziu apoptose nas células endoteliais e de melanoma (dados não mostrados). Apesar de não haverem dados na literatura a este respeito sobre o AC, têm sido demonstrado que o tratamento com o eugenol induz apoptose dependente de caspase na linhagem de células de melanoma humano G361 (KIM *et* 

al., 2006) e dependente da inibição/ativação de proteínas como as Bcl2 (PISANO *et al.*, 2007). Adicionalmente, o tratamento com uma molécula similar ao eugenol, o 6,6'-dibromodehydrodieugenol (S7-S, 50 μM) induziu exposição de fosfatidilserina e ativação de caspases em células de melanoma humano CN-MelA, 24 horas após o tratamento (PISANO *et al.*, 2007). Na linhagem de células de câncer cervical (HeLa), o tratamento com eugenol apresentou toxicidade com IC<sub>50</sub> menor do que 1000 μM (LEE *et al.*, 2004).

Diferentemente, os tratamentos com LNC-AC nas concentrações de 100 e 300 µM já foram capazes de induzir diminuição da viabilidade celular por mecanismos mais avançados, como a apoptose tardia e necrose, demonstrando que, *in vitro*, a LNC-AC é mais potente que o eugenol.

Adicionalmente, acreditamos que as diferenças observadas nas concentrações ótimas para citotoxicidade do ativo, em relação às apresentadas pela literatura podem ser decorrentes da utilização do AC e não do eugenol. A acetilação da molécula pode causar alteração da atividade do eugenol e, assim, ser a responsável pela menor toxicidade observada. Outra possibilidade seria a sensibilidade das linhagens testadas, uma vez que não existem trabalhos descrevendo os efeitos do AC ou do eugenol na viabilidade de células HUVEC e SK-Mel-28.

#### 4.4.5 Efeito do tratamento com AC e LNC-AC sobre a proliferação celular

Os mecanismos dos antineoplásicos são distintos e um dos principais está relacionado a seus efeitos na proliferação das células tumorais. Assim, para avaliar os efeitos da LNC, AC e das LNC-AC sobre a sobrevivência clonogênica e a proliferação celular de células endoteliais e de melanoma, estas foram incubadas com diferentes concentrações dos tratamentos, durante diferentes períodos de tempo, de acordo com cada protocolo experimental.

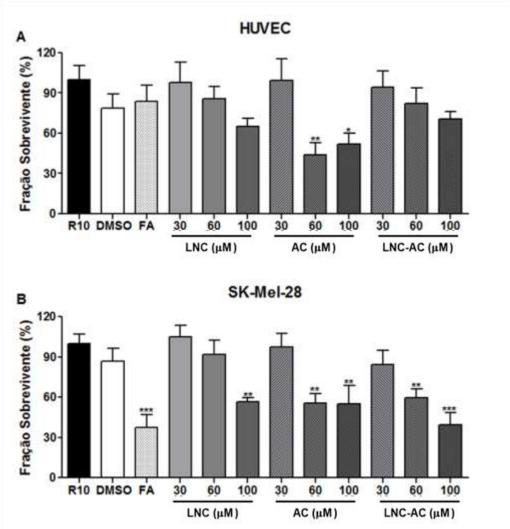
#### 4.4.5.1 Ensaio de sobrevivência clonogênica

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com AC causou redução na sobrevivência clonogênica, de maneira equivalente, nas duas linhagens de células estudadas. Interessantemente, as preparações de LNC e LNC-AC também causaram

reduções na fração sobrevivente de colônias de células de melanoma, mas estas foram equivalentes à causada pela FA, que caracteriza, de certa forma, a estrutura mais externa das LNC e das LNC-AC (Figura 29A e B). Desta forma, estes resultados nos permitem inferir a interferência da FA no efeito inibitório sobre a sobrevivência clonogênica das células tratadas com as nanocápsulas.

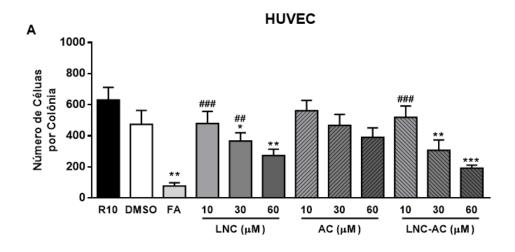
Adicionalmente, podemos observar que os tratamentos com FA, LNC (30 e 60  $\mu$ M) ou LNC-AC (30 e 60  $\mu$ M) reduziram o número de células presentes nas colônias formadas por células endoteliais e de melanoma após 6 dias de tratamento. Diferentemente, o tratamento com AC, nas concentrações avaliadas, não alterou a proliferação tanto das células endoteliais quanto das células de melanoma (Figura 30A e B). A Figura 31 e a Figura 32 mostram, respectivamente, imagens representativas das colônias formadas pelas células endoteliais e de melanoma ao final do período de tratamento.

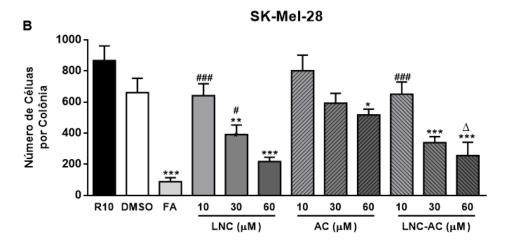
**Figura 29** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na sobrevivência clonogênica de células endoteliais e de melanoma.



Células das linhagens HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B) (200 células/poço) foram incubadas com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (30, 60 ou 100  $\mu$ M) a 37°C por 6 dias. As colônias foram coradas com cristal violeta e contabilizadas. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de n=4 em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001  $\nu$ s R10.

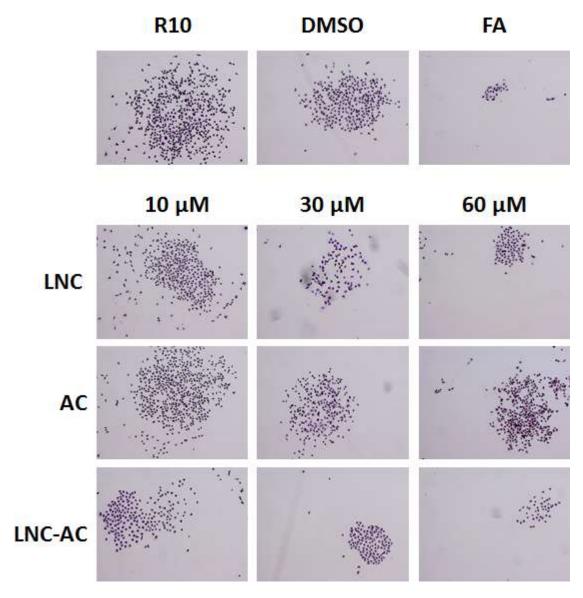
**Figura 30** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no número de células presentes nas colônias de células endoteliais e de melanoma.





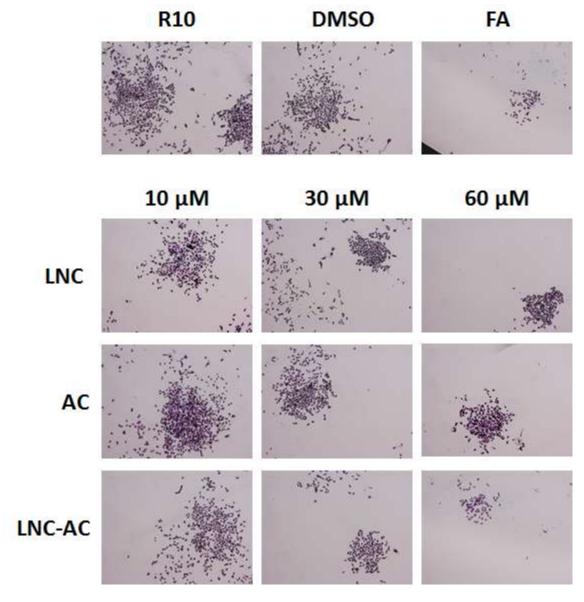
Células da linhagen HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B) (200 células/poço) foram incubadas com R10 (controle), DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C por 6 dias. Ao final dos tratamentos as colônias foram coradas com cristal violeta e as células presentes em cada colônia foram contabilizadas. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de 30% das colônias de cada poço. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001  $\nu$ s R10; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*#p<0,001 vs FA e  $^\Delta$ p<0,05  $\nu$ s AC.

**Figura 31** Imagens representativas de colônias formadas por células endoteliais após o tratamento com LNC, AC ou LNC-AC.



Células da linhagem HUVEC (200 células/poço) foram incubadas com R10 (Controle), DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30, ou 60  $\mu$ M) a 37°C por 6 dias. Ao final dos tratamentos, as colônias foram coradas e o número de células presentes em cada colônia foi contabilizado.

**Figura 32** Imagens representativas de colônias formadas por células de melanoma após o tratamento com LNC, AC ou LNC-AC.



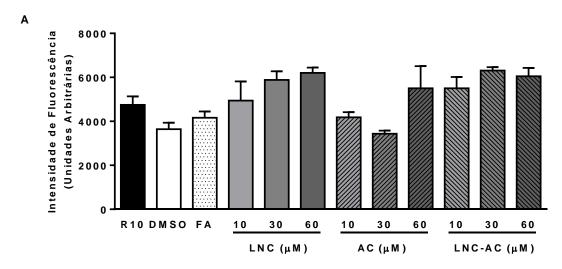
Células da linhagem SK-Mel-28 (200 células/poço) foram incubadas com R10 (Controle), DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C por 6 dias. Ao final dos tratamentos, as colônias foram coradas e o número de células presentes em cada colônia foi contabilizado.

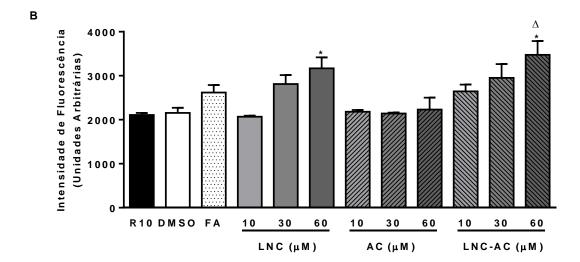
### 4.4.5.2 Ensaio de incorporação de CFSE

Nenhum tratamento, em todas as concentrações avaliadas, alterou a proliferação de células endoteliais após 24 horas de incubação e, somente o tratamento com LNC ou com LNC-AC, na maior concentração estudada, inibiu a proliferação das células endoteliais após 48 horas de tratamento (Figura 33A e B).

Nas células de melanoma, somente o tratamento com as LNC e as LNC-AC, na maior concentração avaliada, inibiu a proliferação celular em relação ao grupo controle, após 24 horas de tratamento (Figura 34A). Diferentemente, o tratamento com LNC (30 e 60 μM), AC (60 μM) ou com LNC-AC (30 e 60 μM) foi capaz de inibir a proliferação de células de melanoma quando tratadas por 48 horas (Figura 34B). Como descrito em ensaios anteriores, o efeito induzido pelas LNC ou LNC-AC foram equivalentes nas duas linhagens de células avaliadas.

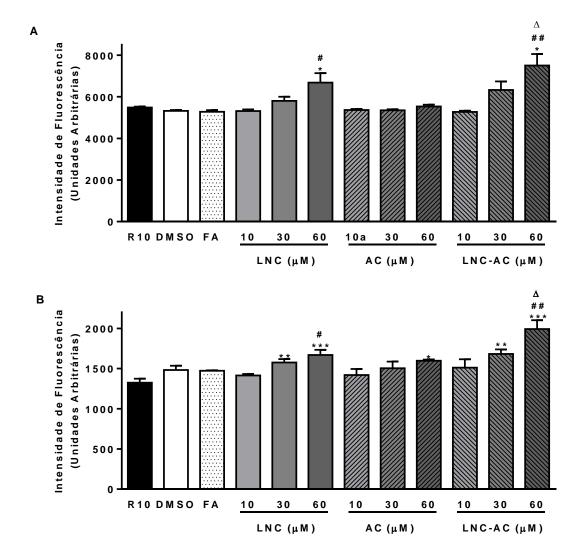
**Figura 33** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na proliferação de células endoteliais após 24 ou 48 horas de incubação.





Células da linhagem HUVEC ( $1x10^5$  células/poço) foram marcadas com CFSE, plaqueadas e após a sua aderência incubadas por 24 (A) ou 48 horas (B) com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou  $60~\mu$ M) a  $37^{\circ}$ C. Posteriormente as células foram avaliadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos realizados em duplicata. \*p<0,05 vs R10;  $^{\Delta}p$ <0,05 vs AC.

**Figura 34** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na proliferação de células de melanoma após 24 ou 48 horas de incubação.



Células da linhagem SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram marcadas com CFSE, plaqueadas e após a sua aderência incubadas por 24 (A) ou 48 horas (B) com R10 (Controle), DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C. Posteriormente as células foram avaliadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos realizados em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs R10;  $^{\#}$ p<0,05 e  $^{\#\#}$ p<0,01 vs FA;  $^{\Delta}$ p<0,05 vs AC.

A proliferação celular *in vitro* pode ser avaliada por técnicas distintas, sendo que uma das principais diferenças entre elas pode ser o período de tratamento das células.

Uma das técnicas que podem ser utilizadas para a avaliação da proliferação celular é a incorporação do diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster (CFSE -

Molecular Probe) e sua quantificação por citometria de fluxo. O fluoróforo (CFSE) penetra nas células por difusão passiva e seus grupos acetatos são clivados pelas esterases intracelulares, resultando em grupos fenol livres. Subsequentemente, o grupo succinimidil éster reage com aminas celulares formando conjugados que são retidos nas células durante o desenvolvimento e a divisão celular. A marcação é herdada pelas células filhas após a divisão ou fusão celular. Desta forma, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo da proliferação celular (QUAH & PARISH, 2010).

Outro ensaio utilizado para avaliar a proliferação celular é o ensaio de sobrevivência clonogênica. SUMANTRAN (2011) considera que este ensaio avalia os efeitos citostáticos de longa duração de um fármaco ou de um agente citotóxico, por quantificar a capacidade proliferativa de uma simples célula em formar um clone e, consequentemente, produzir uma colônia. Além disso, o autor considera a possibilidade do ensaio diferenciar os efeitos na viabilidade celular e de proliferação celular, pela inclusão do tamanho da colônia como um *endpoint* do ensaio. Apesar deste método ser considerado de excelência, pois avalia, ao mesmo tempo, morte celular e alterações no crescimento celular, apresenta limitações. Uma destas limitações está relacionada ao fato deste ensaio não levar em consideração o impacto da comunicação célula-célula no crescimento celular, devido às células serem plaqueadas em baixas densidades para formarem as colônias (MIRZAYANS *et al.*, 2007).

Desta forma, a avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo, após curtos períodos de tratamento, revelou que além das células de melanoma serem mais sensíveis aos tratamentos com LNC, AC e LNC-AC, estas já sofreram os efeitos antiproliferativos após 24 horas de tratamento (Figura 25 e 26). Estes dados foram confirmados pelo ensaio de sobrevivência clonogênica, que avalia os efeitos de longos períodos de tratamento, uma vez que o tratamento com LNC e LNC-AC diminuiu a formação de colônias das células de melanoma e de células endoteliais, apesar de não ter sido significativo nas últimas (Figura 24). Adicionalmente, o tratamento com o AC (60 e 100 µM) diminuiu a formação de colônias nas duas linhagens de células avaliadas. Desta forma, os tratamentos parecem ser mais efetivos na inibição da formação de colônias de células de melanoma. Para auxiliar na interpretação dos resultados relacionados à proliferação celular, foi quantificado o número de células presentes em cada colônia utilizando o software Image J.

PISANO e colaboradores (2007) têm demonstrado que o eugenol, o isoeugenol e suas respectivas formas O-metiladas (metileugenol e metilisoeugenol) não inibem a proliferação de células de melanoma na concentração de 100 µM. Por outro lado, as formas diméricas do dihidrodieugenol (60 µM, por 72 horas) inibiram a proliferação de células de melanoma (cerca de 70-80%), enquanto que o 6,6'-dibromodeihidroeugenol inibiu 100% da proliferação das células das linhagens de melanoma WM, GR, PNP, GILIN e LAN-5 com valores de  $IC_{50}$  de 27, 23, 29, 19 e 16  $\mu$ M, respectivamente. Adicionalmente, GHOSH e colaboradores (2005) demonstraram que o eugenol (0,5 μM) inibiu 50% do crescimento das células de melanoma Sbcl2 e WM3211, após 24 horas de incubação e, diferentemente, as linhagens WM98 e WM1205Lu necessitaram do dobro de tempo de incubação para terem a mesma resposta. Este mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o isoeugenol não inibiu a proliferação de células de melanoma na concentração de 5 μM, mas o eugenol, na concentração de 0,5 μM, inibiu a formação de colônias de células endoteliais. Assim, fica claro que os efeitos do eugenol e de seus análogos na proliferação celular variam em cada linhagem de células avaliada, e que as linhagens de células de melanoma apresentam diferentes sensibilidades aos tratamentos. Não há na literatura descrição dos efeitos do AC ou dos ácidos cáprico e caprílico, que poderiam exercer efeitos antiproliferativos, na proliferação de células endoteliais ou de melanoma.

### 4.4.6 Efeito do tratamento com AC e LNC-AC sobre o ciclo celular

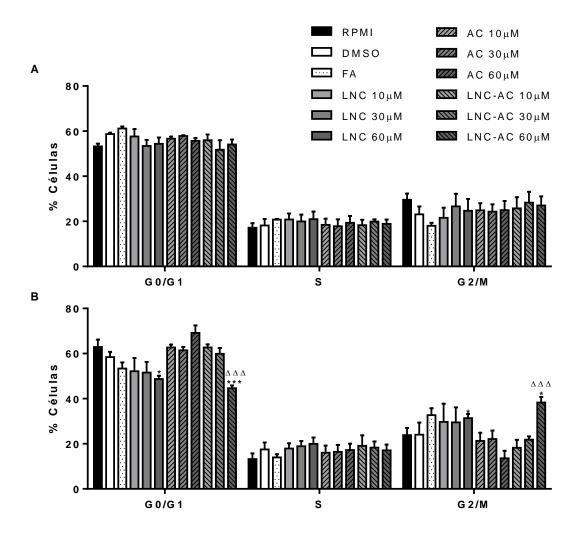
Uma ferramenta importante utilizada para compreender a interferência de diferentes tratamentos sobre a proliferação celular é avaliar a fase do ciclo comprometida. Assim, para avaliar os efeitos do AC e das LNC-AC sobre o ciclo celular das células endoteliais e de melanoma, estas foram incubadas com diferentes concentrações dos tratamentos por 24 ou 48 horas, posteriormente incubadas com PI e avaliadas por citometria de fluxo.

Foi observado que o tratamento com LNC ou LNC-AC (60  $\mu$ M), mas não com AC, diminuiu a porcentagem de células na fase G0/G1 e aumentou a porcentagem de células na fase G2/M em células endoteliais somente após 48 horas de tratamento, em relação ao grupo controle (Figura 35). De maneira semelhante, o tratamento com LNC (60  $\mu$ M) ou com LNC-AC (30 e 60  $\mu$ M) diminuiu a porcentagem de células na fase G0/G1 e aumentou a porcentagem de células na fase G2/M em células de melanoma,

após 24 ou 48 horas de tratamento, em relação ao grupo controle (Figura 36). Já o tratamento com o AC (60 μM) aumentou a porcentagem de células na fase G0/G1 e diminuiu a porcentagem de células na fase G2/M do ciclo de células de melanoma, após 24 ou 48 horas de tratamento, em relação ao grupo controle (Figura 36).

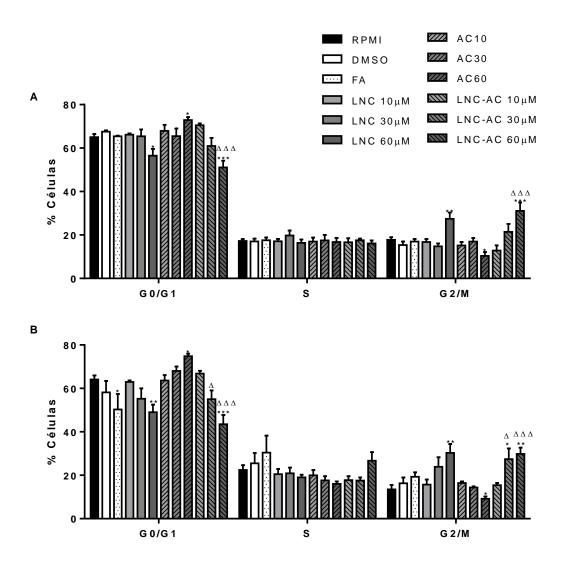
Assim, podemos concluir que os tratamentos com LNC ou LNC-AC são mais eficazes sobre as células de melanoma do que endotelial, uma vez que as paradas na fase G2/M do ciclo celular, observadas para os dois tipos celulares, ocorreram de forma mais intensa e precocemente na célula neoplásica. Ainda, o tratamento com AC somente induziu parada do ciclo celular nas células de melanoma. Interessantemente, como já detectado em alguns efeitos previamente mostrados, o efeito desencadeado pelo tratamento com LNC foi equivalente ao induzido pelo LNC-AC.

**Figura 35** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no ciclo celular de células endoteliais após 24 ou 48 horas de incubação.



Células da linhagem HUVEC ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a sua aderência incubadas por 24 (A) ou 48 horas (B) com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C. Após os tratamentos as células foram tripsinizadas e incubadas com uma solução contendo RNAse, Triton-X 100 e PI. As células coradas foram avaliadas por citometria de fluxo e os dados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata.\*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 vs R10;  $^{\Delta\Delta\Delta}$ p<0,001 vs AC.

**Figura 36** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC no ciclo celular de células de melanoma após 24 ou 48 horas de incubação.



Células da linhagem SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a sua aderência incubadas por 24 (A) ou 48 horas (B) com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C. Após os tratamentos as células foram tripsinizadas e incubadas com uma solução contendo RNAse, Triton-X 100 e PI. As células coradas foram avaliadas por citometria de fluxo e os dados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata.\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs R10;  $^\Delta$ p<0,05 e  $^{\Delta\Delta\Delta}$ p<0,001 vs AC.

GHOSH e colaboradores (2005) relataram que o tratamento de células de melanoma WM1205Lu com eugenol (0,5 µM) induziu diminuição da porcentagem de células na fase G1 e, consequentemente, aumento, de 40%, na fase S do ciclo celular,

após tratamento durante 20 ou 36 horas. Adicionalmente, este mesmo autor relatou que outras linhagens de células de melanoma, como a Sbcl2, a WM3211 e a WM98-1, apresentaram o mesmo perfil de resposta no ciclo celular após o tratamento com eugenol.

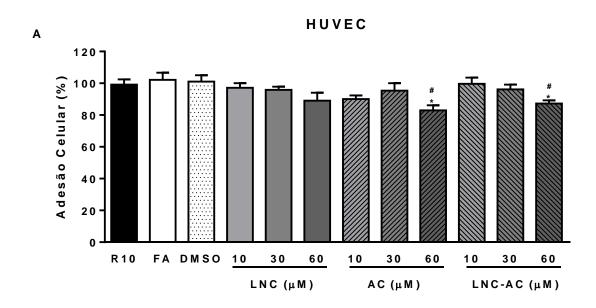
A progressão do ciclo celular é controlada pelos níveis das proteínas ciclinas e das quinases dependente de ciclinas (CDKs), que são proteínas serina/treonína quinases. As CDKs e as ciclinas formam heterodímeros, no qual as CDKs funcionam como um domínio catalítico, enquanto as ciclinas constituem a subunidade regulatória. Assim, diante dos resultados observados, pode-se inferir que pode estar ocorrendo uma alteração de expressão/função nas proteínas ciclina A ou nas quinases dependentes de ciclina 1 ou 2 (CDK1 ou CDK2), que controlam a saída da fase S e entrada na fase G2/M das células, no ciclo celular.

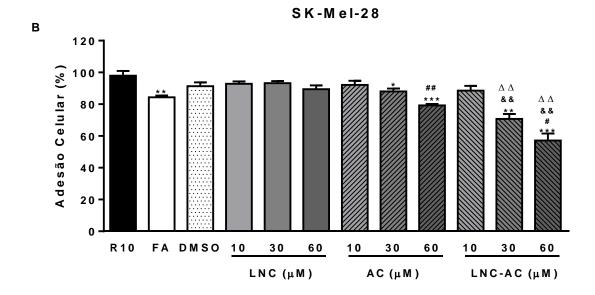
# 4.4.7 Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a aderência celular em Matrigel®

A aderência das células à matriz extracelular é necessária para o crescimento, migração e expressão de genes e metastatização de melanomas. Assim, para avaliar os efeitos das LNC, AC ou das LNC-AC sobre a aderência das células endoteliais e de melanoma, estas foram incubadas com os tratamentos e a adesão destas sobre o Matrigel<sup>®</sup> foi permitida.

Os tratamentos com DMSO ou com LNC não alteraram a aderência ao Matrigel<sup>®</sup> das duas linhagens de células avaliadas. Diferentemente, os tratamentos com AC e LNC-AC inibiram a aderência ao Matrigel<sup>®</sup> das células endoteliais (nas concentrações de 60 µM) e de melanoma (nas concentrações de 30 e 60 µM) em relação ao grupo tratado com R10 e aos grupos tratados com os seus respectivos controles (Figura 37A e B).

**Figura 37** Efeitos do LNC, AC e LNC-AC na aderência de células endoteliais e de melanoma ao Matrigel<sup>®</sup>.





Células das linhagens HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B)  $(5x10^4 \text{ células/poço})$  foram incubadas por 2 horas com R10, DMSO, FA, LNC, AC ou LNC-AC em diferentes concentrações (10, 30 ou 60  $\mu$ M) a 37°C sobre o Matrigel<sup>®</sup> previamente polimerizado. Posteriormente as células foram incubadas com MTT (5  $\mu$ g/mL) por 2 horas, lavadas e os cristais de formazan forma solubilizados. A solução foi lida em espectrofotômetro em 570 nm. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de três experimentos realizados em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs R10; \*p<0,05 e \*\*\*p<0,01 vs o seu respectivo controle (FA ou DMSO); \*&\*p<0,01 vs LNC e \*^{\Delta D}p<0,01 vs AC.

O Matrigel<sup>®</sup> mimetiza a membrana basal por ser composta por laminina (~60%), colágeno IV (~30%), ectactina (~8%) e proteoglicanos, ou seja, ligantes de moléculas de adesão expressas pelas células (KLEINMAN *et al.*, 1982; KLEINMAN *et al.*, 1986). A adesão das células endoteliais à matriz extravascular, no desenvolvimento da angiogênese, permite que as células se organizem de forma orientada, levando à formação de estruturas tubulares que são fundamentais para a formação dos vasos sanguíneos (FRANCAVILLA *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010). Já a aderência das células de melanoma à matéria extravascular facilita o processo de migração e invasão destas até os vasos sanguíneos, e adesão das mesmas em outros locais do organismo, caracterizando o processo de metástase (FIDLER, 2003).

Os resultados indicam a necessidade de menores concentrações de AC e de LNC-AC para inibir a aderência de células de melanoma à matriz, em relação às células endoteliais. Desta forma, sugere-se que os tratamentos podem inibir a expressão de moléculas de adesão, como integrinas ou as moléculas da superfamília das imunoglobulinas, importantes no contexto da ligação das células à matriz extracelular, ou impedir a ligação destas moléculas de adesão aos seu ligantes presentes na matriz. As terapias tendo como alvo as integrinas, nas mais variadas doenças, estão aumentando, sendo que cinco já foram aprovados para uso na clínica, e representaram vendas na casa de 1,5 bilhões de dólares somente em 2010 (GOODMAN & PICARD, 2012). Já foram identificados vários clusters de integrinas importantes na terapia do câncer, como as  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$ ,  $\alpha_1\beta_1$  e α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> integrinas (HELFRICH & SCHADENDORF, 2011; GOODMAN & PICARD, 2012). Na literatura existe apenas um trabalho relatando que o eugenol (100 µM) reduziu a adesão de células THP-1 (linhagem de células de leucemia monocítica humana) ao endotélio induzido pela LDL oxidada. Adicionalmente, o tratamento com eugenol (100 μM) reduziu a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina induzida pela LDL oxidada em células endoteliais (OU et al., 2006).

### 4.4.8 Efeito do tratamento com LNC, AC e LNC-AC sobre a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e de melanoma

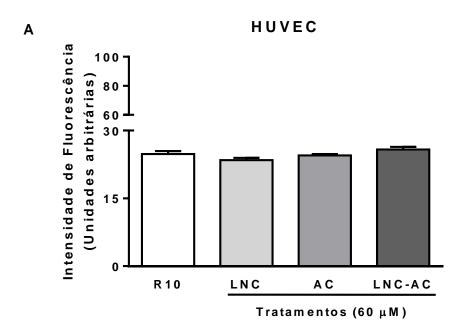
Para avaliar se os diferentes tratamentos estavam alterando a expressão de moléculas de adesão importantes para a adesão, desenvolvimento e progressão do

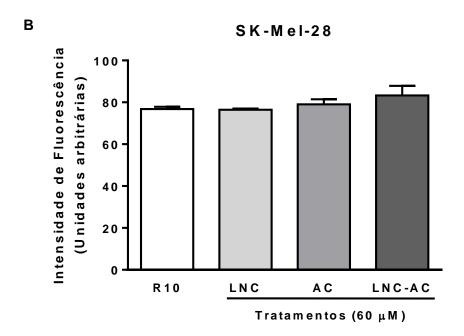
melanoma, bem como para a angiogênese, células endoteliais e de melanoma foram incubadas com os diferentes tratamentos por um período de duas horas.

Podemos observar que nenhum dos tratamentos alterou os níveis de expressão das moléculas de adesão PECAM-1 (Figura 38), ICAM-1(Figura 40) e  $\beta_1$  integrinas (Figura 42) nas duas linhagens de células avaliadas.

Somente o tratamento com as LNC (60  $\mu$ M) foi capaz de reduzir a expressão de VCAM-1 nas células endoteliais, mas não em células de melanoma (Figura 39) e que os tratamentos com LNC e LNC-AC (60  $\mu$ M) foram capazes de reduzir a expressão de  $\beta_3$  integrinas nas células de melanoma, mas não em células endoteliais (Figura 41).

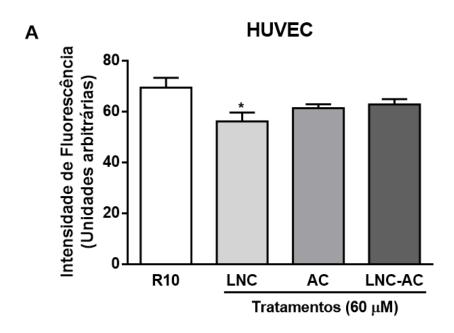
**Figura 38** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na expressão de PECAM-1 em células endoteliais e de melanoma.

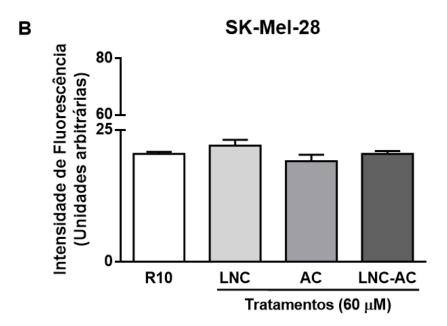




Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC ( $60 \mu M$ ) por duas horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo anti-PECAM-1 por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n= 3 em duplicata.

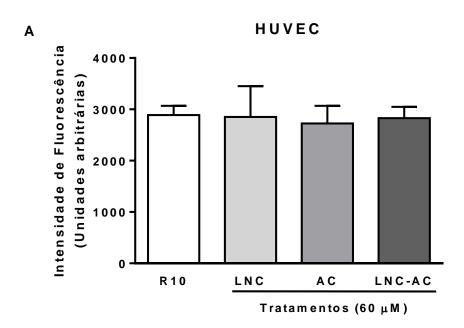
**Figura 39** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na expressão de VCAM-1 em células endoteliais e de melanoma.

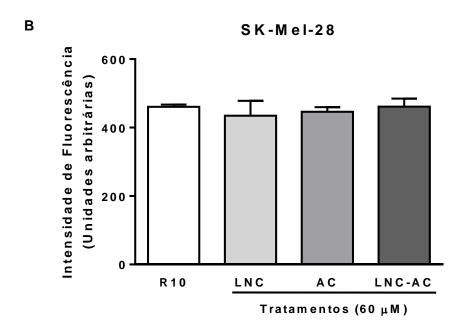




Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC ( $60 \mu M$ ) por duas horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo anti-VCAM-1 por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n= 3 em duplicata. \*P<0,05 vs R10.

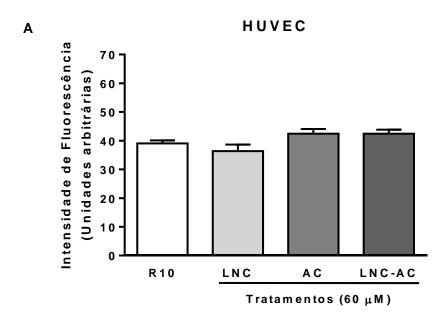
**Figura 40** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na expressão de ICAM-1 em células endoteliais e de melanoma.

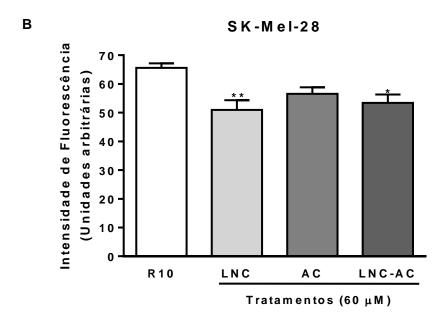




Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC ( $60 \mu M$ ) por duas horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo anti-ICAM-1 por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n= 3 em duplicata.

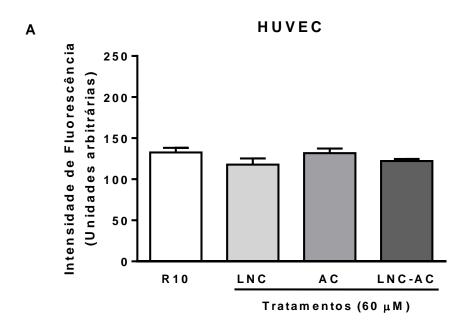
**Figura 41** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na expressão de  $\beta_3$  integrina em células endoteliais e de melanoma.

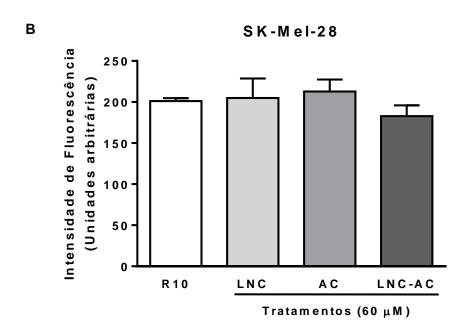




Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC ( $60~\mu M$ ) por duas horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo anti-  $\beta_3$  integrina por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n= 3 em duplicata. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs R10.

**Figura 42** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na expressão de  $\beta_1$  integrina em células endoteliais e de melanoma.





Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC ( $60~\mu M$ ) por duas horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo anti- $\beta_1$  integrina por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n= 3 em duplicata.

A expressão de moléculas de adesão se altera ao longo do desenvolvimento de melanomas. Neste sentido, várias evidências mostram que as  $\beta_3$  integrinas estão claramente relacionadas com a progressão tumoral e metástases em melanoma maligno (JOHNSON, 1999; MCGARY *et al.*, 2002). Enquanto a cadeia  $\alpha_v$  parece estar amplamente expressa, a expressão da cadeia  $\beta_3$  é o melhor marcador molecular correlacionado com a conversão do crescimento radial para o vertical em melanomas primários. Assim, altas expressões de  $\alpha_v\beta_3$  integrina têm sido associadas à progressão da doença metastática, demostrando a sua capacidade em ser um bom marcador para pior prognóstico. Ainda, a  $\beta_3$  integrina apresenta altas expressões em células endoteliais, sendo que o seu bloqueio inibe a angiogênese em diversos tipos tumorais, incluindo nos melanomas. Pacientes que receberam tratamento local com citocinas que reduzem a expressão desta molécula de adesão apresentaram redução no tamanho do melanoma (JOHNSON, 1999).

Nossos resultados demostram que o tratamento *in vitro* com LNC e LNC-AC, mas não com o AC, reduziu a expressão da  $\beta_3$  integrina, e não da  $\beta_1$  integrina, sugerindo que, pelo menos em parte, este pode ser um dos mecanismos relacionados com a redução da adesão das células de melanoma à matriz extravascular, e estar relacionado com a redução do volume tumoral induzido por estes tratamentos *in vivo*. Porém, no ensaio de adesão celular, provavelmente a redução da expressão das  $\beta_3$  integrinas não é o único mecanismo das LNCs uma vez que o tratamento com o AC não alterou a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais e de melanoma, mas reduziu a adesão destas células à matriz extravascular. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na redução da adesão das células endoteliais e de melanoma à matriz extravascular induzidos pelo AC e pelas LNC-AC e a real participação do efeito das LNCs na expressão das  $\beta_3$  integrina no desenvolvimento do melanoma *in vivo*.

Adicionalmente observamos que a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas parece não ser alterada pelos tratamentos utilizados neste estudo, pois somente a expressão de VCAM-1 das células endoteliais foram reduzidos pelo tratamento com LNC. A VCAM-1 se liga às integrinas VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) presentes nos leucócitos, no processo de transmigração celular entre as junções interendoteliais, até o foco inflamatório. Adicionalmente, cabe ressaltar que o tratamento com LNC ou LNC-AC, mas não com o AC, diminuiu o comportamento de

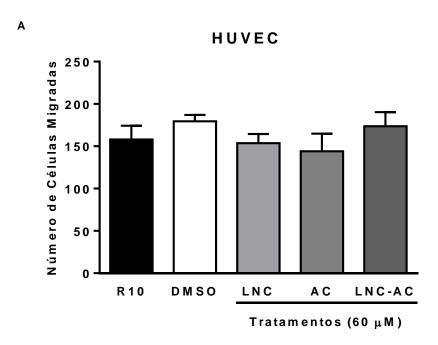
rolling e adesão de leucócitos de vênulas pós-capilares in vivo, etapas que antecedem a transmigração leucocitária. Assim, o tratamento com as LNCs poderia estar comprometendo o processo de recrutamento de leucócitos até o microambiente tumoral e, consequentemente, impedindo as suas ações pró-tumorais (BRANDAU et al., 2013; DUMITRU et al., 2013).

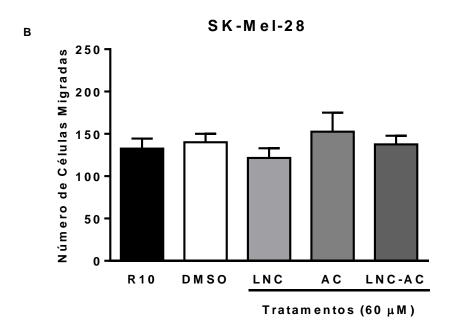
### 4.4.9 Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a migração de células endoteliais e de melanoma

Outro possível mecanismo de ação dos antineoplásicos está relacionado à inibição da capacidade migratória das células tumorais. Assim, para avaliar os efeitos das LNC, AC e LNC-AC as células das duas linhagens foram incubadas com os tratamentos e a sua capacidade de migração foi avaliada utilizando o modelo de lesão em monocamada.

Podemos observar que nenhum dos tratamentos, em todas as concentrações avaliadas, foi capaz de alterar a migração tanto de células endoteliais quanto de células de melanoma (Figura 43).

**Figura 43** Efeitos das LNC, AC e LNC-AC na migração de células endoteliais e de melanoma após 12 horas de tratamento.





Células da linhagem HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B)  $(1x10^5$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizada a lesão na monocamada de células. As imagens de cada campo foram capturadas antes e após 12 horas dos tratamentos com R10 (controle), DMSO, LNC, AC ou LNC-AC (60  $\mu$ M). Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de quatro campos distintos de cada poço, com n= 4 em duplicata.

A migração, tanto de células endoteliais, quanto de células de melanoma é fundamental para o desenvolvimento de processos importantes para o desenvolvimento tumoral, tais como a angiogênese e o desenvolvimento de metástases, respectivamente (MICHAELIS, 2014; WAN et al., 2013).

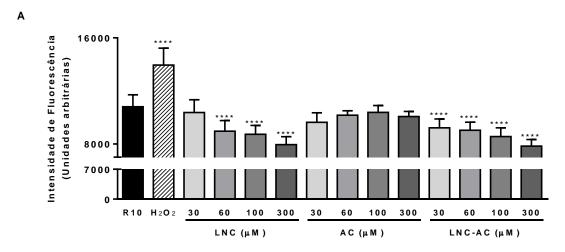
Podemos observar que nenhum dos tratamentos avaliados alterou a migração, tanto de células endoteliais, quanto de células de melanoma. Neste trabalho, foram utilizadas células que possuem alta taxa de migração, as células endoteliais em processos como na angiogênese e de melanoma metastático (SK-Mel-28), ou seja, que tem a habilidade me migrar, invadir os tecidos extravasculares e colonizar outros órgãos. Assim pode-se sugerir que, apesar das nanocápsulas de núcleo lipídico entrarem nas células utilizadas neste estudo, estas não afetam nenhumas das vias envolvidas na migração celular, como as adesões focais (FAK), filamentos de actina ou microtúbulos. Apesar do tratamento com LNC ou LNC-AC ter inibido a expressão das moléculas de adesçao  $\beta_3$  integrina, que possuem um papel importante na migração e formação de metástases de células tumorais.

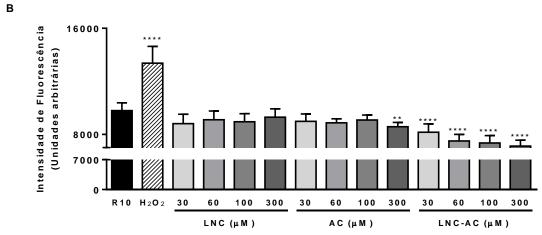
# 4.4.10 Efeito do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC sobre a geração de espécies reativas de oxigênio por células endoteliais e de melanoma

Para investigar um dos possíveis mecanismos de ação dos tratamentos, incubamos células endoteliais e de melanoma com os diferentes tratamentos e avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio por ensaios de fluorescência.

Podemos observar que o tratamento com as LNC e com as LNC-AC, mas não com AC, em todas as concentrações avaliadas, reduziram as concentrações de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais (Figura 44A). Já em células de melanoma, o tratamento com LNC não alterou as concentrações de espécies reativas de oxigênio e o tratamento com AC, somente na maior concentração avaliada (300 μM), ou o tratamento com LNC-AC, em todas as concentrações avaliadas, reduziram as concentrações de espécies reativas de oxigênio (Figura 44B). As células incubadas com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) representam o controle positivo do ensaio.

**Figura 44** Efeitos das LNC, AC ou LNC-AC na produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais e de melanoma.





Células da linhagem HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B)  $(1x10^4 \text{ células/poço})$  foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30, 60, 100 ou 300  $\mu$ M) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com o corante DCFH-DA (10  $\mu$ M) por 30 minutos e a intensidade de fluorescência foi avaliada em leitor de placas. As células incubadas com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) representam o controle positivo do ensaio. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=3 em duplicata. \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001  $\nu$ s R10.

As ROS são produzidas como produtos normais do metabolismo celular e compreendem uma família de espécies radicalares e não radicalares. As espécies radicalares são espécies com um elétron livre, sendo que alguns exemplos são o ânion radical superóxido  $(O_2^{\bullet-})$ , hidroxila  $(\bullet OH)$ , ânion radical carbonato  $(CO3^{\bullet-})$ , peroxila  $(RO_2^{\bullet})$ , e o radical  $(RO^{\bullet})$ . As espécies não radicalares podem ser representadas pelo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido hipocloroso (HOCI), hidroperóxido de ácido graxo (FaOOH), aldeídos reativos e oxigênio singlete (WITTGEN & KEMPEN, 2007).

O nível de ROS depende da taxa de geração e dos níveis e/ou atividade das enzimas responsáveis pelo seu *clearance*. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a dismutação do ânion radicalar superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio e a catalase catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. As enzimas do tipo peroxidase removem espécies reativas utilizando-as na oxidação de outros substratos, assim, a glutationa peroxidase oxida a glutationa reduzida (GSH), na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, sendo que enzima também pode atuar na redução de hidroperóxidos de ácidos graxos. Já a glutationa redutase mantém os níveis basais de GSH no organismo, onde a conversão de glutationa oxidada (GSSG) a GSH é catalisada por esta enzima. As peroxirredoxinas são tiol-proteínas com atividade antioxidante frente a variados substratos, tais como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroperóxidos orgânicos (WITTGEN & KEMPEN, 2007).

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com as LNCs, mas não com AC, apesar deste ser um agente antioxidante (CHEN et al., 2009; HIDALGO et al., 2009), reduzem os níveis de ROS das duas linhagens de células avaliadas. Ainda, resultados recentes obtidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Adriana Pohlmann revelaram que as LNCs diminuem a peroxidação lipídica in vitro, sugerindo um efeito antioxidante destas nanocápsulas (POHLMANN et al., 2015, comunição pessoal). Tem sido descrito que a produção de ROS no microambiente tumoral pode ser decorrente da produção por células tumorais, assim como por células do sistema imune presentes no microambiente tumoral como macrófagos e neutrófilos. Neste contexto, os neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO) em seus grânulos que converte as ROS, como o peróxido de hidrogênio, em ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso pode ativar direta ou indiretamente várias enzimas de degradação de matriz extracelular (MMP-2, MMP-7, MMP-8 e MMP-9) ou inativar inibidores teciduais de MMPs (TIMP-1) promovendo, assim, o crescimento tumoral (DUMITRU et al., 2013). De fato, tem sido demostrado que as ROS endógenas ou exógenas promovem a proliferação de células tumorais, pois inibidores de geração de ROS também inibem a proliferação de células tumorais (GUPTA et al., 2012).

Adicionalmente, tem sido descrito que as ROS podem ativar as vias de sinalização envolvidas na migração e invasão mediadas pelos membros das proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), família das quinases reguladas extracelular (ERK), c-jun quinases com terminação NH-2 (JNC) e p38 MAPK. As ROS também podem promover a migração por aumentar a fosforilação de adesões focais (FAK) (GUPTA *et al.*, 2012). Ainda, tem sido demostrado que em sistemas *in vivo* e *in vitro* as ROS induzem fatores de transcrição (NF-kB) e modulam a sinalização de moléculas envolvidas na angiogênese (MMPs e VEGF) e metástases. Neste contexto, a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por células de melanoma facilita a adesão de células tumorais ás células endoteliais mediada por ICAM-1 e altos níveis de ROS aumentam a migração transendotelial de células de melanoma e aumenta a regulação de AP-1, CXCR4, AKT e diminuição a regulação de PTEN (WITTGEN & KEMPEN, 2007; GUPTA *et al.*, 2012).

Assim, a diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio no microambiente tumoral pode contribuir para a diminuição do desenvolvimento tumoral induzida pelos tratamentos com LNC ou LNC-AC *in vivo*.

Adicionalmente, a literatura tem relacionado altas concentrações de ROS com indução de morte celular (ORRENIUS, 2007; DIXON & STOCKWELL, 2014), mas neste trabalho, os tratamentos com LNCs sugerem que este mecanismo parece não ser relevante, uma vez que a redução da viabilidade celular e a redução da proliferação celular ocorreram mesmo com redução das concentrações de ROS.

## 4.4.11 Efeito do tratamento com LNC, AC, LNC-AC ou L-NAME sobre a produção de óxido nítrico por células endoteliais e de melanoma

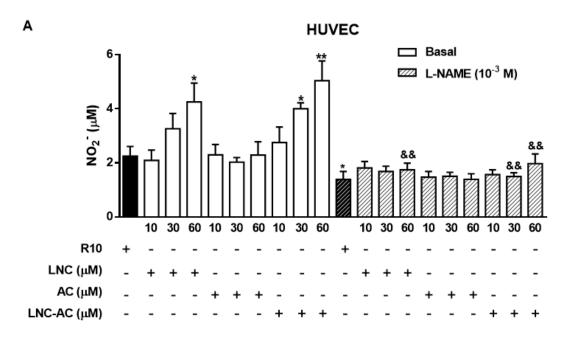
A toxicidade de nanomateriais tem sido avaliada analisando a geração de espécies reativas de nitrogênio por células incubadas com os mesmos (CANESI *et al.,* 2010; BUYUKHATIPOGLU & CLYNE, 2010). Assim, para avaliar os efeitos das LNC, AC e das LNC-AC sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais e de melanoma, estas foram incubadas com diferentes concentrações dos tratamentos e o NO foi avaliado no sobrenadante destas culturas celulares.

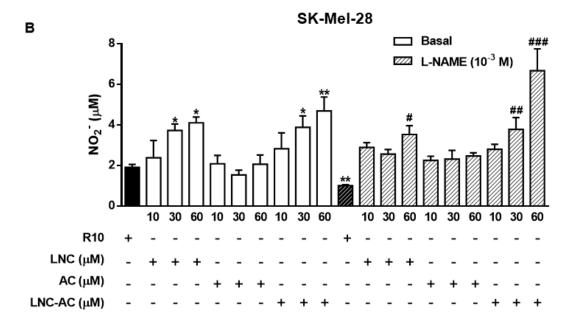
Em condições basais, o tratamento com DMSO ou com a FA não alterou a produção de NO em nenhuma das linhagens de células avaliadas (dados não mostrados) e o tratamento com AC não alterou a produção de NO pelas células

endoteliais ou pelas células de melanoma após 24 horas de tratamento (Figura 45 A e B). Diferentemente, o tratamento com as LNC (30 e 60 μM) e as LNC-AC (30 e 60 μM) aumentou a produção de NO pelas células endoteliais e de melanoma em relação ao grupo tratado com R10 após 24 horas de tratamento (Figura 45 A e B).

Ainda, em condições de pré-tratamento com o inibidor das óxido nítrico sintases (NOS) L-NAME (30 minutos, 10 μM, concentração padronizada previamente (Figura 46)) seguido pelo tratamento concomitante de L-NAME (10 μM) e os diferentes tratamentos por 24 horas, observamos que o tratamento com o L-NAME inibiu a produção de NO induzido pelas LNC e LNC-AC em células endoteliais e não alterou o perfil de resposta em células de melanoma (Figura 45).

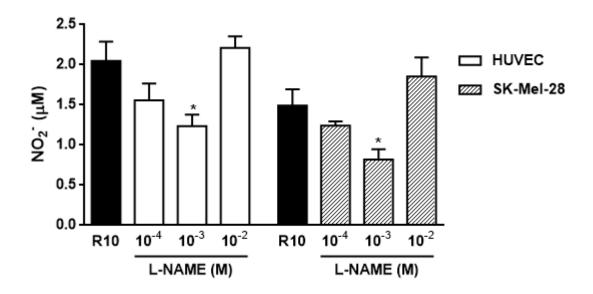
**Figura 45** Efeitos das LNC, AC ou LNC-AC na produção de NO em condições basais ou na presença de L-NAME em células endoteliais e de melanoma.





Células da linhagem HUVEC (A) e SK-Mel-28 (B)  $(1x10^4 \text{ células/poço})$  foram préincubadas com L-NAME  $(10^{-3} \text{ M})$  por 30 minutos ou não e posteriormente incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60  $\mu$ M) na presença de L-NAME ou não por 24 horas. Posteriormente o óxido nítrico foi quantificado no sobrenadante das culturas utilizando método de quimioluminescência. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de dois ensaios realizados em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs R10; \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*#p<0,001 vs L-NAME; \*&\*p<0,01 vs respectivo grupo basal.

**Figura 46** Efeitos do L-NAME na produção de óxido nítrico basal de células endoteliais e de melanoma.



Células da linhagem HUVEC e SK-Mel-28 ( $1x10^4$  células/poço) foram incubadas por 24 horas com R10 ou L-NAME ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  ou  $10^{-2}$  M) a 37°C. Posteriormente o NO foi quantificado no sobrenadante das culturas pelo método de de quimioluminescência. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de células de dois ensaios realizados em duplicata. \*p<0,05 vs R10.

O NO é um radical livre inorgânico de meia vida curta, que se difunde rapidamente dentro das células. Age como mediador biológico, similar aos neurotransmissores no sistema nervoso, regula o tônus vascular e é um importante agente envolvido na defesa do hospedeiro no sistema imune (AKTAN, 2004). O NO é resultante da oxidação da L-Arginina, que é convertida em L-citrulina e esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas distintas e bem caracterizadas desta enzima. Duas delas são constitutivamente expressas, a neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III) e a outra isoforma é induzida por estímulos inflamatórios, como produtos bacterianos ou citocinas (iNOS ou NOS II). Apesar das três isoformas catalisarem a mesma reação, diferem na regulação, amplitude e duração da produção de NO, além da distribuição celular e tecidual. As diferentes enzimas são expressas nas linhagens de células que foram utilizadas neste trabalho (FECKER *et al.*, 2002; CAMACHO *et al.*, 2012). Ainda, a produção de NO pode ser inibida por inibidores específicos de cada isoforma das NOS ou por inibidores

inespecíficos, como o  $N\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) que atua como um falso substrato para enzimas.

O NO pode atuar em diferentes etapas do crescimento tumoral, inibindo ou estimulando o seu crescimento. NO endógeno pode aumentar ou manter o fluxo sanguíneo no microambiente tumoral, via vasodilatação das arteríolas, o que facilita o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células tumorais (FUKUMURA *et al.*, 2006). Por outro lado, esta molécula pode diminuir a interação leucócito/endotélio nos vasos sanguíneos, diminuindo a resposta imune do hospedeiro frente ao tumor (FUKUMURA *et al.*, 2006). Assim, os efeitos observados na diminuição do *rolling* de leucócitos *in vivo*, podem estar relacionados com o aumento das concentrações de NO local.

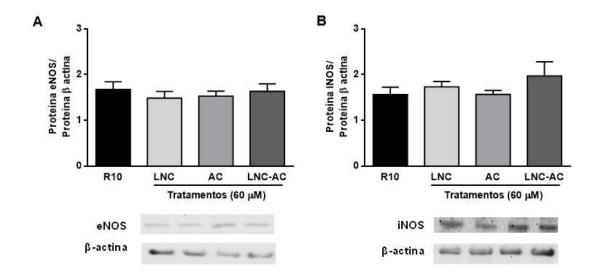
Ainda, em altas concentrações, o NO pode ser citotóxico (BURKE *et al.*, 2013) além de servir como um mensageiro que leva as células a um estado de locomoção, pois libera as forças tracionais dos complexos de adesão focal por afetar a expressão de FAK (EIGENTHALER *et al.*, 1993; GOLIGORSKY *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2000) ou por alterar a afinidade das integrinas que são expressas na superfície das células (YAO *et al.*, 1998). O aumento das concentrações de NO pode estar relacionado aos resultados de inibição do crescimento tumoral induzido pelas LNC e LNC-AC *in vivo*, mas parece não estar relacionado com a diminuição da viabilidade celular observada *in vitro*, uma vez que somente o tratamento com as LNC-AC induziu este efeito. De modo semelhante, a redução na adesão das células ao Matrigel<sup>®</sup> parece não estar relacionado com o aumento das concentrações de NO, uma vez que somente as LNC-AC induziram este efeito.

# 4.4.12 Efeito do tratamento com LNC, AC e LNC-AC sobre a expressão proteica das óxido nítrico sintases em células endoteliais e de melanoma

Uma vez que encontramos altas concentrações de NO presente no sobrenadante das culturas, tanto de células endoteliais como de melanoma tratadas com LNC ou com LNC-AC, investigamos se estes resultados estavam relacionados ao aumento da expressão proteica das enzimas responsáveis pela produção deste mediador.

Podemos observar que nenhum dos tratamentos, na concentração avaliada (60 μΜ), alterou os níveis de expressão da NOS endotelial ou induzível presentes em células endoteliais (Figura 47 A e B, respectivamente) e em células de melanoma (Figura 48 A e B, respectivamente).

**Figura 47** Efeito das LNC, AC ou LNC-AC na expressão proteica de eNOS (A) e iNOS (B) em células endoteliais.

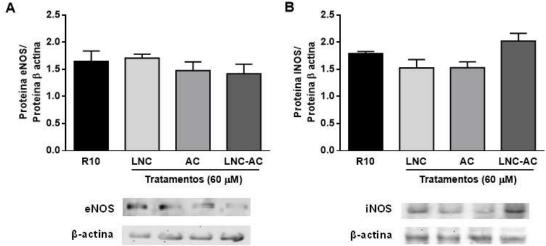


Células da linhagem HUVEC  $(1,5x10^6$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC  $(60 \,\mu\text{M})$  por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas e foi realizada a extração proteica, a eletroforese das proteínas e a incubação com os anticorpos adequados. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=4 em duplicata.

(B) em células de melanoma.

B
2.5
2.0

Figura 48 Efeito das LNC, AC ou LNC-AC na expressão proteica de eNOS (A) e iNOS



Células da linhagem SK-Mel-28  $(1,5x10^6$  células/poço) foram plaqueadas e após a aderência foi realizado o tratamento com R10, LNC, AC, LNC-AC  $(60 \mu M)$  por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas e foi realizada a extração proteica, a eletroforese das proteínas e a incubação com os anticorpos adequados. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=4 em duplicata.

Os níveis de NO podem ser regulados por mecanismos distintos, ou seja, devido ao aumento da expressão gênica ou proteica das enzimas que são responsáveis pela sua produção ou devido ao aumento da atividade das mesmas. Nossos resultados mostram claramente que os tratamentos não alteram a expressão proteica das enzinas eNOS ou iNOS, nas duas linhagens de células avaliadas, sugerindo que o aumento dos níveis de NO encontrados após os tratamentos com as LNC ou LNC-AC podem ser decorrentes da alteração da atividade enzimática das mesmas. Cabe ressaltar que não há relato na literatura dos efeitos de nanocápsulas de núcleo lipídico ou do AC na produção de NO por células endoteliais ou de melanoma.

OU e colaboradores (2006) relataram que o tratamento com eugenol (100 μM) reverteu a diminuição da expressão de eNOS de HUVEC induzida pela LDL oxidada. Adicionalmente, LI e colaboradores (2006) relataram que o eugenol e o isoeugenol inibiram a produção de NO induzido por LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7. devido à redução da expressão da iNOS.

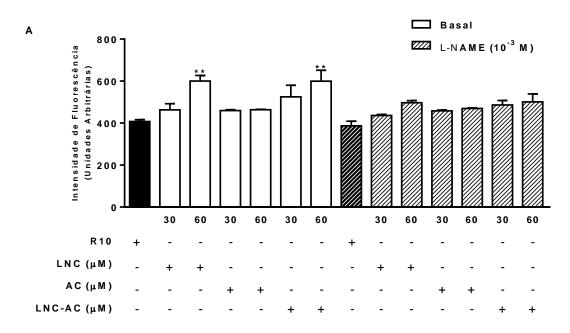
# 4.4.13 Efeito dos tratamentos incubados na presença de L-NAME sobre a proliferação de células endoteliais e de melanoma

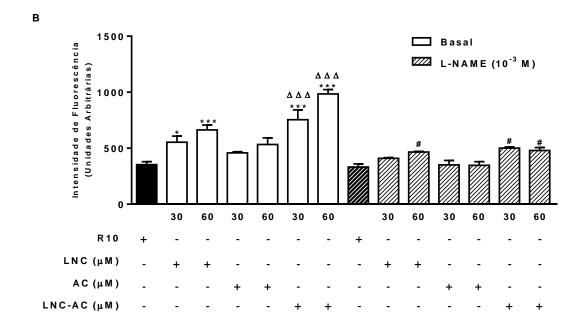
Para avaliar os efeitos dos tratamentos na presença de L-NAME, ou seja, na ausência de NO, as células endoteliais e de melanoma foram marcadas com CFSE, plaqueadas e após a adesão celular estas foram pré-incubadas com L-NAME (10 μM, 30 minutos) e, posteriormente, incubadas com os diferentes tratamentos na presença de L-NAME (10 μM) por 48 horas.

Podemos observar que, em condições basais, o tratamento com as LNC ou LNC-AC inibiu a proliferação celular, tanto de células endoteliais quanto de células de melanoma, pois observou-se maior intensidade de fluorescência presente nas células destes grupos experimentais (Figura 49A e B), sendo que este efeito foi revertido, na presença de L-NAME, somente nas células de melanoma (Figura 49A e B).

Tem sido descrito que pequenas concentrações de NO podem estar associadas com a inibição do crescimento de células de melanoma, enquanto altas concentrações de NO promovem o crescimento do melanoma (TANG & GRIMM, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2010; AMJADI et al., 2011; PRABHU & GURUVAYOORAPPAN, 2012). Por outro lado, doadores de NO aumentam a efetividade de terapias citostáticas e podem inibir a angiogênese, o crescimento tumoral e a proliferação de células de melanoma (MARAGOS et al., 1993; PIPILI-SYNETOS, et al., 1995; KONOVALOVA et al., 2003; PERROTTA et al., 2004; PERROTTA et al., 2007). Tem sido descrito que o NO proveniente dos doadores de NO pode ser gerado por diferentes mecanimos como liberação espontânea, reação química com ácidos, bases, metais ou tióis ou ainda por oxidação enzimática (HUERTA et al., 2008). Neste sentido, as LNC e LNC-AC podem estar atuando como doadores de NO e, consequentemente, inibindo o crescimento tumoral, mas ainda são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

**Figura 49** Efeitos das LNC, AC ou LNC-AC incubados na presença de L-NAME na proliferação de células endoteliais e de melanoma.





Células da linhagem HUVEC (A) e de SK-Mel-28 (B)  $(1x10^5 \text{ células/poço})$  foram marcadas com CFSE, plaqueadas e após a sua aderência foram pré-incubadas ou não por 30 minutos com L-NAME  $(10^{-3} \text{ M})$  e posteriormente incubadas com R10, DMSO, LNC, AC ou LNC-AC (10, 30 ou 60 µM) por 48 horas na presença ou não de L-NAME a  $37^{\circ}$ C. Após as incubaçãoes as células foram avaliadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos realizados em duplicata. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 vs R10 basal;  $^{\Delta\Delta\Delta}$ p<0,001 vs AC;  $^{\#}$ p<0,05 vs L-NAME.

4.5 SEÇÃO 5 – Efeito dos tratamentos em células de melanoma murino na modulação da ativação de neutrófilos

## 4.5.1 Caracterização da população de neutrófilos

Para avaliar se os tratamentos com as LNC poderiam afetar células do microambiente tumoral, realizamos ensaios de co-cultura de células B16F10 e neutrófilos, sendo que as células B16F10 foram pré-tratadas com LNC, AC ou LNC-AC (30 µM).

Os resultados obtidos mostraram que a população de neutrófilos isolada da cavidade peritoneal dos animais apresentou mais de 98% de viabilidade e mais de 88% de células marcadas com proteínas de membrana expressas por neutrófilos, o Ly6G e o CD11b (Figura 50A), sendo que estas células não apresentavam marcação com F4/40, um marcador de membrana expresso por macrófagos (Figura 50B).

O Ly6G é uma proteína de membrana expressa somente na população de neutrófilos, sendo por isso, utilizado para o reconhecimento e isolamento destas células (FRIDLENDER & ALBELDA, 2012). O CD11b é uma proteína de membrana expressa em leucócitos e o F4/40 é um marcador de membrana expresso por macrófagos (FRIDLENDER & ALBELDA, 2012).

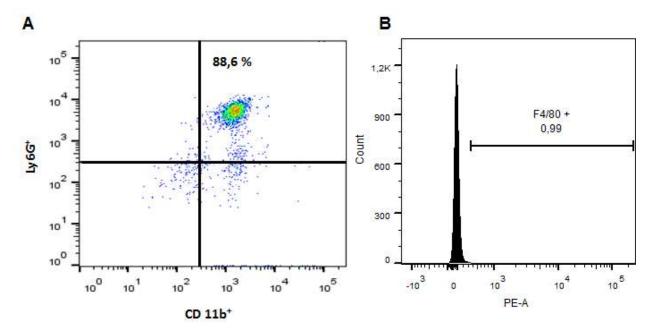


Figura 50 Caracterização da população de neutrófilos por citometria de fluxo.

Neutrófilos (1x10<sup>6</sup> células) obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e caracterizados por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos anti-Ly6G, anti-CD11b (A) e anti-F8/80 (B). As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra.

### 4.5.2 Viabilidade de células de melanoma e de neutrófilos incubados em co-cultura

Como já salientado anteriormente neste trabalho, a literatura tem mostrado que células do sistema imune, como os neutrófilos, presentes no micrambiente tumoral podem influenciar na viabilidade das células tumorais e, ainda, a viabilidade dos próprios neutrófilos pode ser alterada devido a sua polarização para diferentes fenótipos (MANTOVANI et al., 2011, GALDIEIRO et al., 2012, FRIDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU et al., 2013). Atualmente, tem se proposto a plasticidade dos neutrófilos, com mudanças de fenótipos para tipo N1 ou N2, dependendo do microambiente tumoral (MANTOVANI et al., 2011, GALDIEIRO et al., 2012, FRIDLENDER & ALBELDA, 2012; DUMITRU et al., 2013), e estes apresentam diferentes perfis de resposta no microambiente tumoral, como salientado na Introdução.

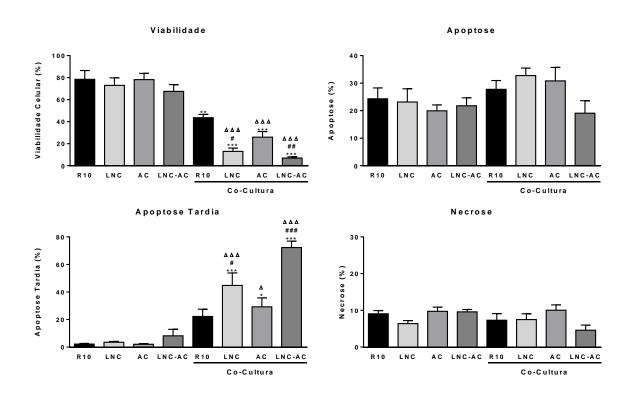
Neste sentido, avaliamos a viabilidade das células B16F10 (1x10<sup>4</sup>/células por poço) após 24 h de tratamento com LNC, AC ou LNC-AC (30 μM) e co-incubadas ou não com neutrófilos (5x10<sup>5</sup> células por *transwell*) por 18 horas. Podemos observar que

nenhum tratamento alterou a viabilidade de células de melanoma murino após 24 horas de tratamento e após 18 h de incubação com R10 (ausência da co-cultura com neutrófilos). Diferentemente, após as células de melanoma serem tratadas e co-incubadas com neutrófilos por 18 horas, podemos observar que, independente do tratamento, as células B16F10 tiveram redução significativa de viabilidade celular (Figura 51) e esta redução na viabilidade celular foi dependente de indução de apoptose tardia, e não de apoptose ou necrose, para os grupos tratados com LNC, AC ou LNC-AC (Figura 51).

Em relação à viabilidade de neutrófilos, podemos observar que houve redução na viabilidade dos mesmos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com R10 ou AC, mas não com LNC ou LNC-AC. A redução da viabilidade não pôde ser associada com a indução de apoptose, apoptose tardia ou necrose destas células. Assim, o tratamento das células B16F10 com LNC ou LNC-AC impediu a redução da viabilidade celular de neutrófilos co-incubados com estas células (Figura 52).

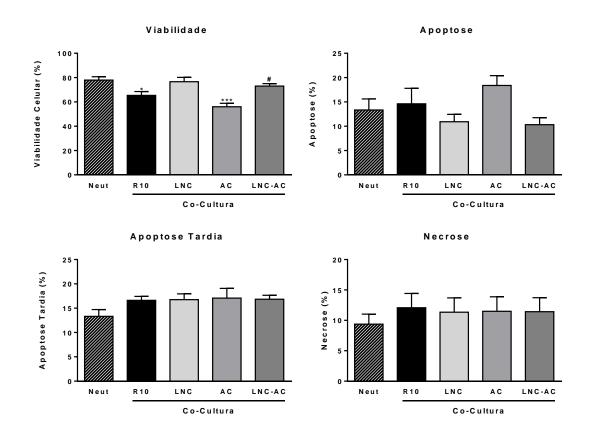
Estes resultados são inéditos e, em conjunto, mostram que os neutrófilos induzem a apoptose de células B16F10 e que nenhum dos tratamentos prévios da célula de melanoma impediu esta ação dos neutrófilos. Assim, os neutrófilos causam citotoxicidade das células de B16F10, podendo ser um modulador do melanoma.. Ainda, as células B16F10 induzem a morte de neutrófilos, a qual foi reduzida quando as células B16F10 são pré-tratadas com as LNCs ou LNC-AC. De fato, existe uma comunicação entre os neutrófilos e células de melanoma, na qual estas últimas exercem ações tóxicas para neutrófilos, as quais são inibidas pelas LNCs. É importante salientar que não há na literatura informações a respeito dos efeitos de nanocarreadores contendo ou não acetileugenol na modulação do fenótipo e da resposta de neutrófilos.

**Figura 51** Viabilidade de células B16F10 incubadas com os diferentes tratamentos e posteriormente incubadas ou não em co-cultura com neutrófilos.



Células B16F10 foram previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30  $\mu$ M) por 24 horas e posteriormente incubadas em co-cultura com neutrófilos por 18 horas. Após este período, as células B16F10 foram incubadas com anexina-V e PI para avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 vs B16F10 incubadas com R10; \*p<0,05, \*\*p<0,01  $e^{m}$ p<0,01  $e^{m}$ p<0,001  $e^{m}$ p

**Figura 52** Viabilidade de neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com os diferentes tratamentos.



Células B16F10 ( $1x10^4$ /células por poço) foram previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC ( $30 \mu M$ ) por 24 horas e posteriormnte incubadas em co-cultura com neutrófilos ( $5x10^5$  células por *transwell*) por 18 horas. Após este período os neutrófilos foram incubadas com anexina-V e PI para avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 *vs* B16F10 incubadas com R10; \*p<0,05 *vs* AC.

## 4.5.3 Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10

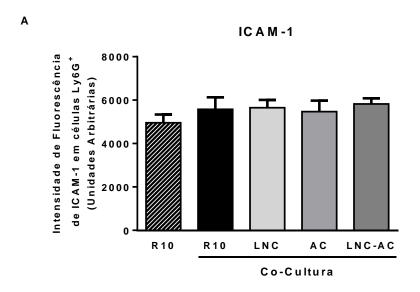
A expressão de moléculas de adesão em neutrófilos é fundamental para que estas células possam chegar até o foco da lesão e exercer as suas funções (FUTOSI *et al.*, 2013; SIONOV *et al.*, 2014). Neste sentido, a expressão de ICAM-1 e de Mac-1 em neutrófilos é importante para o recrutamento destas células para o microambiente tumoral (DIMITRU *et al.*, 2013; FUTOSI *et al.*, 2013; SIONOV *et al.*, 2014), assim, tratamentos que possam aumentar ou reduzir a expressão destas moléculas de adesão podem alterar o influxo de neutrófilos até a massa tumoral.

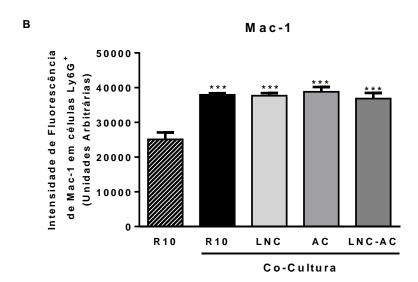
Podemos observar que não houve alteração na expressão de ICAM-1 em neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10, independente do tratamento prévio das células tumorais (Figura 53A). Corroborando estes resultados, anteriormente observamos que o tratamento com LNC, AC ou LNC-AC não alteraram a expressão de ICAM-1 tanto em células endoteliais quanto de melanoma humano (Figura 40).

Adicionalmente, podemos observar que houve aumento na expressão de Mac-1 em neutrófilos após o período de incubação em co-cultura com células B16F10, e este aumento foi independente do tratamento com LNC, AC ou LNC-AC (Figura 53B). A expressão de Mac-1 (CD11b/CD18) está envolvida em diferentes fases de adesão e migração transendotelial dos neutrófilos (FUTOSI *et al.*, 2013).

Assim, os resultados aqui obtidos mostram que as ações dos tratamentos com as LNCs não alteram as expressões das duas moléculas de adesão aqui estudadas em neutrófilos. Cabe salientar que não há na literatura informações sobre os efeitos de carreadores nanoestruturados contendo ou não acetileugenol na função de neutrófilos.

**Figura 53** Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com os diferentes tratamentos.





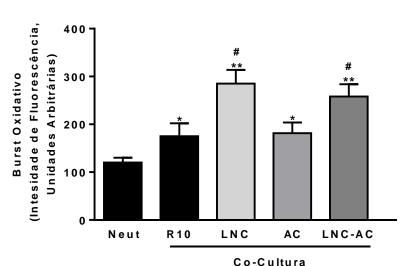
Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e incubados em co-cultura (5x10 $^5$  células por *transwell*) com células B16F10 (1x10 $^4$ /células por poço) previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30  $\mu$ M) por 24 horas. Após 18 horas de incubação em co-cultura os neutrófilos foram incubadas com anticorpos anti-ICAM-1 e anti-Mac-1 e a expressão das moléculas de adesão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*\*\*p<0,001 vs neutrófilos incubados com R10.

### 4.5.4 Burst oxidativo de neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10

O burst oxidativo produzido por neutrófilos é uma ferramenta importante destas células tanto para a eliminação de patógenos quanto no microambinete tumoral, para a eliminação das células tumorais (SIONOV *et al.*, 2014).

Neste sentido, podemos observar aumento do burst oxidativo de neutrófilos após a incubação destes em co-cultura com células B16F10 e este pode ser um mecanismo envolvido na citotoxicidade dos neutrófilos sobre as células de melanoma B16F10. Adicionalmente, podemos observar que neutrófilos incubados com células B16F10 prétratadas com LNC ou LNC-AC produziram um burst oxidativo maior do que células B16F10 pré-tratadas com R10 (Figura 54), sugerindo que os tratamentos com as LNCs afetam mecanismos das células B16F10 que podem controlar o burst oxidativo de neutrófilos.

Estes resultados corroboram os resultados de redução da viabilidade celular de células B16F10 pré-incubadas com LNC ou LNC-AC e posteriormente incubadas com neutrófilos. Assim, o ácido hipocloroso produzido pelos neutrófilos na ativação do burst oxidativo poderia ser o responsável pela redução da viabilidade das células tumorais.



**Figura 54** Burst oxidativo de neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com os diferentes tratamentos.

Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e incubados em co-cultura ( $5x10^5$  células por *transwell*) com células B16F10 ( $1x10^4$ /células por poço) previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC ( $30~\mu$ M) por 24 horas. Após 18 horas de incubação em co-cultura os neutrófilos foram marcados com DCFH-DA ( $10~\mu$ M) e as concentrações de espécias reativas de oxigênio foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 *vs* neutrófilos; \*p<0,01 vs neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com R10.

# 4.5.5 Concentração de mediadores químicos no sobrenadante da co-cultura de células B16F10 e neutrófilos

Como salientado anteriormente, os mediadores químicos são produzidos tanto pelas células tumorais quanto pelas células que estão presentes no microambiente tumoral (SIONOV *et al.*, 2014). Assim, investigamos os efeitos que os tratamentos exercem nas células B16F10 e a possível modulação destas na produção de citocinas na ausência ou na presença de co-cultura com neutrófilos.

Podemos observar que somente o tratamento com LNC ou LNC-AC reduziu as concentrações de TGF-β nos sobrenadantes tanto de células B16F10 na ausência ou na presença de co-cultura com neutrófilos em relação aos respectivos grupos tratados com R10 (Figura 55A). Assim, os resultados mostram que a Célula B16F10 secreta TGF-β e que este não é afetado pelos tratamentos, nem mesmo pelos neutrófilos. O

fator de crescimento transformante beta (TGF-β) no microambiente tumoral é o principal responsável pela infiltração de neutrófilos com fenótipos opostos. Na presença de TGF-β, os tumores possuem um infiltrado com neutrófilos que tem um fenótipo prótumorogênico (N2), adicionado de altas concentrações de Arginase-1 e fraca toxicidade contra as células tumorais. Em contraste, o bloqueio de TGF-β induz acúmulo de neutrófilos anti-tumorais, ou seja, com fenótipo N1, com ativação de células T CD8<sup>+</sup> e maior citotoxicidade contra células tumorais (FRIDLENDER & ALBELDA, *et al.*, 2012; DIMITRU *et al.*, 2013; SIONOV *et al.*, 2014). Assim, os tratamentos *in vivo* com LNC ou LNC-AC podem reduzir as concentrações de TGF-β na massa tumoral e assim ser responsável, pelo menos em parte, pela inibição do crescimento tumoral devido ao acúmulo de neutrófilos N1, mas, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Ainda, nenhum dos tratamentos alterou as concentrações de IL-4 e NO no sobrenadante, tanto de células B16F10 na ausência ou na presença de co-cultura com neutrófilos (Figura 55 B e E).

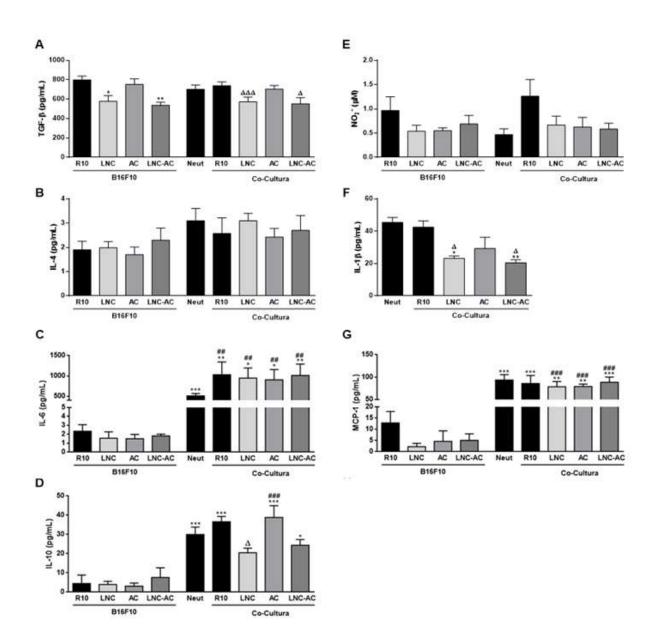
As concentrações de IL-1β não foram detectadas no sobrenadante de células B16F10 na ausência de co-cultura com neutrófilos. No entanto, na presença de co-cultura a citocina foi secretada para o sobrenadante, mostrando que os neutrófilos secretam IL-1β. Ademais, os tratamentos de células B16F10 com LNC ou LNC-AC reduziram as secreções desta citocina por neutrófilos (Figura 55F), mostrando, mais uma vez, que o tratamento das células cancerosas com as LNCs influencia a resposta de neutrófilos. Em um contexto inflamatório clássico, a IL-1β é uma citocina produzida por neutrófilos que estimula a resposta inflamatória, recrutando células do sistema imune e aumentando a apresentação de antígenos. Mas no contexto tumoral, onde muitos fatores imunosupressores são produzidos, esta citocina promove o desenvolvimento tumoral e recruta células imunossupressoras (IIKOVITCH & LOPEZ, 2008), tornando assim, os resultados obtidos no tratamento das células B16F10 com as LNC ou LNC-AC importantes para a redução tumoral observada *in vivo*.

Nenhum dos tratamentos alterou as concentrações de IL-6 e MCP-1 no sobrenadante de células B16F10 na ausência de co-cultura com neutrófilos (Figura 55 C e G). No entanto, na cultura de neutrófilos detectou-se maiores concentrações de IL-6 e MCP-1 e este aumento não foi alterado pela incubação em co-cultura com células B16F10 ou pelos diferentes tratamentos das células B16F10 (Figura 55C e G).

Claramente, estas duas citocinas são secretadas por neutrófilos e que as concentrações não são influenciadas pela presença de células cancerosas.

Da mesma forma que para as IL-6 e MCP-1, a IL-10 foi predominantemente encontrada no sobrenadante da co-cultura com neutrófilos, no entanto, a co-cultura de células B16F10 pré-tratadas com LNC inibiu a secreção da citocina IL-10 por neutrófilos (Figura 55D). Como salientado anteriormente, a IL-10 apresenta ação imunomoduladora no microambiente tumoral sendo que a redução das concentrações de IL-10 poderia reduzir o crescimento do melanoma por aumentar as funções de macrógafos, por reduzir a proliferação das células tumorais ou por reduzir a angiogênese no microambiente tumoral.

**Figura 55** Concentrações de mediadores químicos no sobrenadante de co-cultura de neutrófilos e células B16F10 tratadas com os diferentes tratamentos.

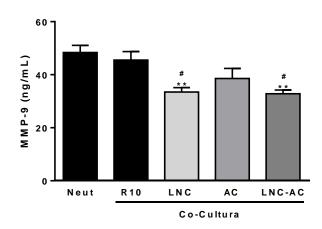


Células B16F10 (1x10 $^4$ /células por poço) foram previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30 µM) por 24 horas e posteriormente incubadas em co-cultura com neutrófilos (5x10 $^5$  células por *transwell*) por 18 horas. Após este período, o sobrenadante da co-cultura foi utilizado para a quantificação de TGF- $\beta$  (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), NO (E), IL-1 $\beta$  (F) e MCP-1 (G) por ELISA ou por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs B16F10 incubadas com R10; \*p<0,05, \*\*p<0,001 vs respectivo grupo B16F10;  $^\Delta$ p<0,05 e  $^{\Delta\Delta\Delta}$ p<0,001 vs B16F10 incubadas com R10 em co-cultura.

A metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), também chamada de gelatinase-B, é importante para o crescimento tumoral e é expressa por diferentes tipos de células que estão presentes no microambiente tumoral, incluindo todas as células hematopoiéticas, fibroblastos e pelas próprias células tumorais. Podemos observar que as concentrações de MMP-9 estavam reduzidas somente no sobrenadante da co-cultura de neutrófilos e células B16F10 pré-tratadas com LNC ou LNC-AC (Figura 56). Em neutrófilos, a MMP-9 é estocada em grânulos segundários e não está associada a uma proteína inibitória (TIMP-1), tornado-a mais propensa a ativação. A MMP-9 pode contribuir para o crescimento tumoral, pois pode inativar moléculas antiangiogênicas (FRIDLENDER & ALBELDA, 2012), além disso, a depleção de neutrófilos usando anticorpos anti-Gr1 leva a redução de crescimento tumoral e concomitantemente redução dos níveis de VEGF e lesões angiogênicas (KESSENBROCK *et al.*, 2010; GREGORY & HOUGHTON, 2011) sugerindo que os neutrófilos são produtores importantes de MMP-9 no microambiente tumoral.

Assim, o tratamento das células tumorais com as LNC ou LNC-AC pode estar reduzindo a produção e/ou liberação de MMP-9 pelos neutrófilos. Cabe ressaltar que a concentração de MMP-9 produzido somente pelas células B16F10 foi indetectável utilizando o ensaio de ELISA. Ainda, *in vivo* este efeito pode ser importante uma vez que a MMP-9 produzida tanto por neutrófilos quanto por células tumorais pode ser responsável pela liberação de fatores de crescimento, como o VEGF, que estão aprisionados na matriz extravascular. Assim, o efeito da inibição da produção e/ou liberação desta metaloproteinase pode estar relacionada com a diminuição do crescimento tumoral e da diminuição do processo da angiogênese.

**Figura 56** Concentrações de MMP-9 no sobrenadante de co-cultura de neutrófilos e células B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos.



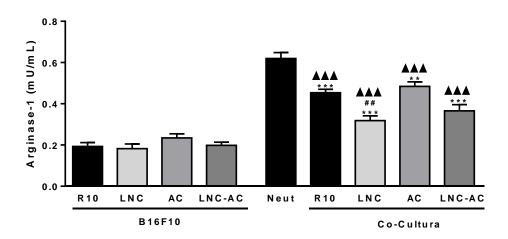
Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e incubados em co-cultura  $(5x10^5 \text{ células por } transwell)$  com células B16F10  $(1x10^4/\text{células por poço})$  previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC  $(30 \mu\text{M})$  por 24 horas. Após 18 horas de incubação as concentrações de MMP-9 foram avaliadas no sobrenadante da co-cultura por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*\*p<0,01 vs neutrófilos; \*p<0,01 vs neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com R10.

tumoral. Nο microambiente neutrófilos efeitos os podem exercer imunossupressores devido à degranulação e liberação de arginase-1, um inibidor das funções das células T. A arginase-1 é uma enzima citosólica expressa constitutivamente em diversas células e é responsável por catalisar a hidrólise de arginina para uréia e ornitina (SIONOV et al., 2014). Estudos in situ têm mostrado que neutrófilos presentes em infiltrados tumorais possuem reduzidas concentrações intracelulares de arginase-1, sugerindo que a arginase-1 presente nos grânulos já tenha sido liberada para o tecido tumoral (GREGORY & HOUGHTON, 2011).

Podemos observar que nenhum tratamento alterou as concentrações de Arginase-1 no sobrenadante das células B16F10 na ausência da co-cultura com neutrófilos. Diferentemente, as concentrações de Arginase-1 no sobrenadante das co-culturas aumentaram significantemente, bem como a concentração de arginase-1 no sobrenadante de neutrófilos (Figura 57). No entanto, os pré-tratamentos com LNC ou LNC-AC reduziram a concentração de arginase no sobrenadante das co-culturas

(Figura 57). Este resultado ressalta mais uma vez que ações das LNCs nas células B16F10 podem modular ações de neutrófilos que são relevantes para o desenvolvimento do melanoma. Desta forma, o tratamento *in vivo* com as LNC pode estar diminuindo as concentrações de arginase-1 proveniente de neutrófilos e assim, promovendo imunoestimulação, principalmente os efeitos relacionados células T CD8<sup>+</sup>, porém, mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

**Figura 57** Concentrações de Argininase-1 no sobreadante de co-cultura de neutrófilos e células B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos.



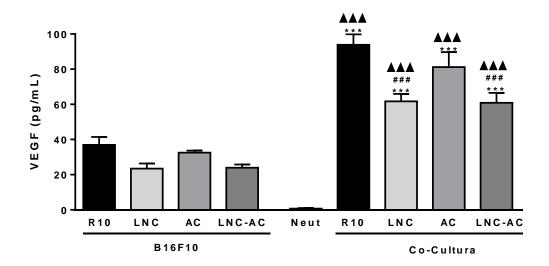
Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e incubados em co-cultura (5x10 $^5$  células por *transwell*) com células B16F10 (1x10 $^4$ /células por poço) previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30 µM) por 24 horas. Após 18 horas de incubação a concentração de Arginase-1 foi avaliada no sobrenadante da co-cultura por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata.\*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 vs neutrófilos; \*\*\*p<0,01 vs neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com R10; vs neutrófilos grupo de células B16F10.

Como já salientado anteriormente, o VEGF é o principal fator angiogênico presente no microambiente tumoral, sendo produzido por células tumorais, por neutrófilos, que estocam este fator de crescimento em grânulos, e ainda este pode estar aprisionado na matriz extravascular (TORTORA *et al.*, 2004; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Os resultados aqui obtidos mostram que as células B16F10 secretam VEGF, que não foi afetado pelos tratamentos com as LNCs ou AC. Ainda, a secreção de VEGF pelos neutrófilos foi insignificante, mas interessantemente, quando em co-cultura com neutrófilos, a secreção de VEGF aumentou marcantemente, visto pelo aumento da secreção do fator de crescimento no sobrenadante de neutrófilos co-incubados com células B16F10 tratadas com R10. Adicionalmente, o pré-tratamento das B16F10 com LNC ou LNC-Ac reduziram a secreção de VEGF no sobrenadante (Figura 58).

Em conjunto, os resultados aqui obtidos mostram que existe uma comunicação entre os neutrófilos e células B16F10 em diferentes parâmetros envolvidos na evolução do melanoma. Ainda, as ações das LNC ou LNC-AC sobre as células de melanoma podem modular as ações dos neutrófilos. Estes resultados não podem explicar os dados obtidos *in vivo* neste estudo, mas indicam que as LNCs podem também alterar o microambiente tumoral. Esta é uma perspectiva interessante do estudo da evolução tumoral e abre novas frentes de estudo com as LNCs.

**Figura 58** Concentrações de VEGF no sobreadante de co-cultura de neutrófilos e células B16F10 pré-tratadas com os diferentes tratamentos.



Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL6 foram isolados e incubados em co-cultura (5x10 $^5$  células por *transwell*) com células B16F10 (1x10 $^4$ /células por poço) previamente tratadas com R10, LNC, AC ou LNC-AC (30 µM) por 24 horas. Após 18 horas de incubação a concentração de Arginase-1 foi avaliada no sobrenadante da co-cultura por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. de n=5 em duplicata. \*\*\*p<0,001 *v*s neutrófilos; \*##p<0,001 *v*s neutrófilos incubados em co-cultura com células B16F10 tratadas com R10;  $^{\Delta\Delta\Delta}$ p<0,001 vs respectivo grupo de células B16F10.

Estes resultados sugerem, em conjunto, que o tratamento das células de melanoma murino com as LNC e LNC-AC parece exercer um papel importante na polarização de neutrófilos para o fenótipo N1, ou seja, de inibição do crescimento tumoral. Mais estudos são necessários, principalmente em modelos in vivo, para esclarecer a participação das formulações nanoestruturadas na polarização de neutrófilos no microambiente tumoral.

#### 5 Conclusões

Em conjunto, estes resultados mostram que a formulação de LNC possui melhor eficácia terapêutica do que o AC e o LNC-AC, pela via oral, na inibição do crescimento tumoral na fase inicial de desenvolvimento. Ainda, os tratamentos não possuem efeitos tóxicos importantes e após o tratamento agudo com LNC ou LNC-AC estas reduziram a interação inicial dos leucócitos circulantes com o endotélio microvascular. Com base nos estudos in vitro, mostra-se com clareza que as LNCs penetram as células endoteliais e de melanoma. Quanto aos mecanismos de ação das LNC e das LNC-AC em comparação com AC, embora alguns resultados sejam controversos, concluímos que há maior eficácia das LNC-AC em células tumorais, que estas são mais sensíveis aos diferentes tratamentos, e que este efeito pode ser decorrente de alterações na indução de morte por necrose e redução da adesão celular. Apesar das LNC-AC terem causado redução na proliferação celular, na sobrevivência clonogênica, no ciclo celular e no aumento da produção de NO, estes efeitos foram também observados com as LNC, sugerindo ações próprias das nanocápsulas aqui empregadas. Ainda, o tratamento de células de melanoma murino com LNC ou LNC-AC in vitro e a co-cultura destas com neutrófilos modifica ativação destes para um fenótipo N1 e que existe interações entre as células B16F10/neutrófilos que podem modular o melanoma. Assim, a redução do crescimento do melanoma in vivo induzida pelas LNC pode ser dependente, pelo menos em parte, da nanoencapsulação dos triglicerídios de cadeia média e da supraestrutura da formulação, com toxicidade direta sobre as células de melanoma e possível modulação do microambiente tumoral.

### 6 Referências Bibliográficas

ABDEL BAR, F. M.; KHANFAR, M. A.; ELNAGAR, A. Y.; BADRIA, F. A.; ZAGHLOUL, A. M.; AHMAD, K. F.; SYLVESTER, P. W.; EL SAYED, K. A. Design and pharmacophore modeling of biaryl methyl eugenol analogs as breast cancer invasion inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 18(2), p. 496-507, 2010.

ABRAHAM, S.K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 493–498, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. http://www.anvisa.gov.br. Acessado em abril de 2015. AJANI, G.; SATO, N.; MACK, J.A.; MAYTIN, E.V. Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a three-dimensional organotypicepidermal model. *Exp Cell Res.*, v. 313, n.14, p. 3005-15, 2007.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* v. 75, n. 6, p. 639-53, 2004.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 18, p. 3-10, 2008.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALVES, G.M.; BARAO, M.A.; ODO, L.N.; NASCIMENTO GOMES, G.; FRANCO, M.C.; NIGRO, D. L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. *Pediatr Nephrol.*, v. 17, p. 856–862, 2002.

ALVES, O. L. Em Estudos estratégicos Nanotecnologia; Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República: Brasília, 2004/2005, parte II; http://www.nae.gov.br/doc/estudos\_estrategicos/estudo\_nanotecnologia.pdf, acesso em Dezembro 2010.

American Joint Committee on Cancer (AJCC): Melanoma of the skin. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, p. 325-44, 2010.

AMJADI, F.; JAVANMARD, S.H.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; KHAZAEI, M.; NARIMANI, M. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *J Exp Clin Cancer Res.*, v. 21, p. 30:21, 2011.

ASHA, M.K.; PRASHANTH, D.; MURALI, B.; PADMAJA, R.; AMIT, A. Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum sanctum and eugenol. *Fitoterapia*, v. 72, p. 669–670, 2001.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. *Burns.*, v. 27, n. 5, p. 534-544, 2001.

BALBUS, J.M.; MAYNARD, A.D.; COLVIN, V.L.; CASTRANOVA, V., DASTON, G. P.; DENISON, R.A.; DREHER, K.L.; GOERING, P.L.; GOLDBERG, A.M.; KULINOWSKI, K.M.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; OBERDÖRSTER, G.; OMENN, G. S..; PINKERTON, K.E.; RAMOS, K.S.; REST, K.M.; SASS, J.B.; SILBERGELD, E. K.; WONG, B.A. Meeting Report: Hazard ssessment for Nanoparticles-Report from an Interdisciplinary Workshop. *Environmental Health Perspectives*, v. 115, n. 11, p.1654-1659, 2007.

BARENHOLZ, Y. Doxil®-The first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, v. 160, n. 2, p.117-134, 2012.

BAWA, R. FDA and Nanotech: Baby Steps Lead to Regulatory Uncertainty. In: Bagchi, D.; Bagchi, M.; Moriyama, H.; Shahidi, F. (Ed.) Bio-Nanotechnology: A Revolution in

- Food, Biomedical and Health Science, 1ª edição, John Wiley & Sons, Ltd, p. 720-732, 2013.
- BEI, D.; MENG, J.; YOUAN, B.B. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine* (Lond), v. 5, n. 9, p. 1385-99, 2010.
- BENDER, E.A.; ADORNE, M.D.; COLOMÉ, L.M.; ABDALLA, D.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Hemocompatibility of poly(ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int J Pharm.*, v. 426, n. 1-2, p. 271-9, 2012.
- BENJAMIN, C.L.; MELNIKOVA, V.O.; ANANTHASWAMY, H.N. Models and mechanisms in malignant melanoma. *Mol Carcinog.*, v. 46, n. 8, p. 671-678, 2007.
- BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, MI.; POHLMANN, AR.; GUTERRES, SS.; BATTASTINI, AM. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett.*, v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.
- BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JAGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 586, p. 24-34, 2008.
- BOLLAG, G.; HIRTH, P.; TSAI, J.; ZHANG, J.; IBRAHIM, P.N.; CHO, H.; SPEVAK, W.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; HABETS, G.; BURTON, E.A.; WONG, B.; TSANG, G.; WEST, B.L.; POWELL, B.; SHELLOOE, R.; MARIMUTHU, A.; NGUYEN, H.; ZHANG, K.Y.; ARTIS, D.R.; SCHLESSINGER, J.; SU, F.; HIGGINS, B.; IYER, R.; D'ANDREA, K.; KOEHLER, A.; STUMM, M.; LIN, P.S.; LEE, R.J.; GRIPPO, J.; PUZANOV, I.; KIM, K.B.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G.A.; SOSMAN, J.A.; CHAPMAN, P.B.; FLAHERTY, K.T.; XU, X.; NATHANSON, K.L.; NOLOP, K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, v. 467, n. 7315, p. 596-599, 2010.
- BOMBELLI, F.B.; WEBSTER, C.A.; MONCRIEFF, M.; SHERWOOD, V. The scope of nanoparticle therapies for future metastatic melanoma treatment. *Lancet Oncol.*, v. 15, n. 1, p. e22-32, 2014.
- BRAGA, P.S.; SASSO, M.D.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans. *Fitoterapia*, v. 78, p. 396–400, 2007.
- BRANDAL, S.; BLAKE, C.M.; SULLENGER, B.A.; FORTENBERRY, Y.M. Effects of plasminogen activator inhibitor-1-specific RNA aptamers on cell adhesion, motility, and tube formation. *Nucleic Acid Ther.*, v. 21, n. 6, p. 373-381, 2011.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 631–651, 2002.
- BULCÃO, R. P.; FREITAS, F. A.; VENTURINI, C. G.; DALLEGRAVE, E.; DURGANTE, J.; GOETHEL, G.; CERSKI, C. T. S.; ZIELINSKY, P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(epsilon-

- caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicological Sciences*, v. 132, n. 1, p. 162-176, 2013.
- BURKE, A.J.; SULLIVAN, F.J.; GILES, F.J.; GLYNN, S.A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 3, p. 503-512, 2013.
- BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *Int J Food Microbial*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSSOLATI, O.; BELLETTI, S.; UGGERI, J.; GATTI, R.; ORLANDINI, G.; DALL'ASTA, V.; GAZZOLA, G.C. Characterization of apoptotic phenomena induced by treatment with L-Asparginase in NIH3T3 cells. *Exp. Cell. Res.*, v. 220, p. 283-291, 1995.
- BUTNARU, C.A.; KANITAKIS, J. Structure of normal human skin. *Eur J Dermatol.*, v. 12, n. 6, p. II-IV, 2002.
- BUYUKHATIPOGLU, K.; CLYNE, A.M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research.*, v. 96A, n. 1, p. 186-195, 2010.
- CALDER, P. C.; JENSEN, G. L.; KOLETZKO, B. V.; SINGER, P.; WANTERN, G. J. A. Lipid emulsions in parenteral nutrition of Intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive Care Med.*, v. 36, p. 735-749, 2010.
- CAMACHO, M.; MARTINEZ-GONZALEZ, J.; RODRIGUEZ, C.; SIGUERO, L.; SERIOLA, C.; ROMERO, J.M.; VILA, L. Imidazolineoxyl N-oxide induces COX-2 in endothelial cells: role of free radicals. *Front Biosci.*, v. 4, p. 2654-2669, 2012.
- CANESI, L.; CIACCI, C.; VALLOTTO, D.; GALLO, G.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO2, SiO2) on Mytilus hemocytes. *Aquat Toxicol.*, v. 96, n. 2, p. 151-8, 2010.
- CAREY, F.A.; SUNDBERG, R.J. In: Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms (Part A) (Advanced Organic Chemistry / Part A: Structure and Mechanisms). 4th E.d. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 452, 2000.
- CARMONA-GUTIERREZ, D., EISENBERG, T., BÜTTNER, B.; MEISINGER, C., KROEMER, G., MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentation*, p. 1-11, 2010.
- CARRASCO, H.; ESPINOZA, L.; CARDILE, V.; GALLARDO, C.; CARDONA, W.; LOMBARDO, L.; CATALAN, K.; CUELLAR, M.; RUSSO, A. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (part I). *J Braz Chem Soc.*, v. 19, n. 3, n. 543-548, 2008.
- CATTANI, V.B.; POHLMANN, A.; DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules, *Inter. J. Pharm.*, v. 363, p. 214-216, 2008.
- CHEN, F.; SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, n. 1, p. 30-39, 2009.

- CHEN, J.; SHAO, R.; ZHANG, X.D.; CHEN, C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *Int J Nanomedicine*, v. 8, p. 2677-88, 2013.
- CHEN, K.G.; VALENCIA, J.C.; LAI, B.; ZHANG, G.; PATERSON, J.K.; ROUZAUD, F.; BERENS, W.; WINCOVITCH, S.M.; GARFIELD, S.H.; LEAPMAN, R.D.; HEARING, V.J.; GOTTESMAN MM. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 103, n. 26, p. 9903-9907, 2006.
- CHOGO, J.B.; CRANK, G. Chemical composition and biological activity of the tanzanian plant *Ocimum suave. J. Nat. Prod.*, v. 42, p. 308–311, 1981.
- CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P.A.; ADAMS, A.E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.*, v. 115, n. 4, p. 813–824, 2005.
- CLARK, W.H. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*, v. 64, n. 4, p. 631-644, 1991.
- CLARK, W.H.; ELDER, D.E.; GUERRY, T.H.; EPSTEIN, M.N.; GREENE, M.H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodularmelanoma. *Hum Pathol.*, v. 15, n. 12, p. 1147-1165, 1984.
- COTRAN, S.R., HUMAR, V., COLLINS, T. Pathologic Basis of Disease. 6.ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 1999.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res.*, v. 23, n. 7, p. 1417-50, 2006.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.
- CYTOVIVA® HOME. http://www.cytoviva.jp. Acessado em abril de 2014.
- DAHLEN, S.E.; BJORK, J.; HEDQUIST, P.; ARFORS, K.E.; HAMMARSTROM, S.; LINDGREN, J.A.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci*, v. 78, n. 6, p. 3887-91, 1981.
- DAVID; S., CARMOY, N.; RESNIER, P.; DENIS, C.; MISERY, L.; PITARD, B.; BENOIT, J.P.; PASSIRANI, C.; MONTIER, T. In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model. *Int. J. Pharm.*, v. 423; n.1, p. 108-115, 2012.
- DE LIMA, V.C.; DE CARVALHO, A.F.; MORATO-MARQUES, M.; HASHIMOTO, V.L.; SPILBORGHS, G.M.; MARQUES, S.M.; LANDMAN, G.; TORRES, C.; BRAGA, R. K.; BRENTANI, H.; REIS, L.F.; DIAS, A.A. TNF-alpha and melphalan modulate a specific group of early expressed genes in a murine melanoma model. *Cytokine*, v. 62, n. 2, p. 217-225, 2013.
- de OLIVEIRA, S.I.; ANDRADE, L.N.; ONUCHIC, A.C.; NONOGAKI, S.; FERNANDES, P.D.; PINHEIRO, M.C.; ROHDE, C.B.; CHAMMAS, R.; JANCAR, S. Platelet-activating

factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*, v. 10, p. 200, 2010.

DEGAKI, T.L.; DEMASI, M.A.A.; SOGAYAR, M.C. Overexpression of Nrp/b (nuclear restrict protein in brain) suppresses the malignant phenotype in the C6/ST1 glioma cell line. J. Steroid Biochem. *Mol. Biol.*, v. 117, p. 107–116, 2009.

DEICHMANN, M.; THOME, M.; EGNER, U.; HARTSCHUH, W.; KURZEN, H. The chemoresistance gene ABCG2 (MXR/BCRP1/ABCP1) is not expressed in melanomas but in single neuroendocrine carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol.*, v. 32, n. 7, p. 467-473, 2005.

DIRKX, A.E.M.; EGBRINK, M.G.A.; WAGSTAFF, J.; GRIFfiOEN, A.W. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, p. 1183-1196.

DIXON, S.J.; STOCKWELL, B.R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol.*, v. 10, n. 1, p. 9-17, 2014.

DUMITRU, C.; LANG, S.; BRANDAU, S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironmental: Mechanisms and consequences for tumor pregression. *Seminars in Cancer Biology*, v. 23, p. 141-48, 2013.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Natl Rev Drug Discov.*, v. 2p. 347–360, 2003.

DUNCAN, T.V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J Colloid Interface Sci.*, v. 1, p. 1-24, 2011.

EIGENTHALER, M.; ULLRICH, H.; GEIGER, J.; HORSTRUP, K.; HÖNIG-LIEDL, P.; WIEBECKE, D.; WALTER, U. Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem.*, v. 268, n. 18, p. 13526-13531, 1993.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v.35, p. 495-16, 2007.

EUSTAQUIO, T.; LEARY, J.F. Nanobarcoding: detecting nanoparticles in biological samples using in situ polymerase chain reaction. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p., 5625-5639, 2012.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FARSKY, S.H.P.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; PROTO, S.Z.; FERREIRA, J.R.; MELLO, S.B. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effects on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm Res.*, v. 53, n. 9, p. 442-52, 2004.

- FARSKY, S.H.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol.*, v. 57, n. 3, p. 379-86, 1995.
- FATTAL, E.; ANDRIEUX, K.; BARRATT, G.; COUVREUR, P.; LABARRE, D.; PONCHEL, G.; VAUTHIER, C. Recent Advances in Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles for Drug Delivery. In: DOMB, J; TABATA, Y.; RAVI KUMAR, M.N.V.; FABER, S. (Ed.) Nanoparticles for Pharmaceutical Applications, p. 213-232, 2007.
- FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Nanoparticles as drug delivery systems. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. (Ed.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York, pp. 1864–1882, 2002.
- FECHER, L.A.; AMARAVADI, R.; SCHUCHTER, L.M. Effectively targeting BRAF in melanoma: a formidable challenge. *Pigment Cell Melanoma Res.*, v. 21, n. 4, p. 410-411, 2008.
- FECKER, L.F.; EBERLE, J.; ORFANOS, C.E.; GEILEN, C.C. Inducible nitric oxide synthase is expressed in normal human melanocytes but not in melanoma cells in response to tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide. *J Invest Dermatol.*, v. 118, n. 6, p. 1019-1025, 2002.
- FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.
- FIEL, L.A. Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico com uso potencial no tratamento de tumores sólidos. Qualificação de tese de doutorado. Programa de Pósgraduação em Ciências Farmaêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 164 páginas, 2013.
- FIEL, L.A.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; NETZ, P.A.; POHLMANN, A.R. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: a quick quantitative comparison of the relative physical stability. Colloids and Surfaces: *A Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 431, p. 93-104, 2013.
- FIEL, L.A.; REBELO, L.M.; SANTIAGO, T.M.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; SOUSA, J.S.; POHLMANN, A.R. Diverse Deformation Properties of Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules. *Soft Matter* (Print), v. 7, p. 7240-7247, 2011.
- FIEL, L.A.; CONTRI, R.V.; BICA, J.F.; FIGUEIRÓ, F.; BATTASTINI, A.M.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with triglyceride conjugated to afluorescent dye as strategy to particle tracking in biological studies. *Nanoscale Res Lett.*, v. 9, n. 1, p. 233, 2014.
- FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; TERROSO, T.; ZANOTTO-FILHO, A.; JANDREY, E.H.; MOREIRA, J.C.; SALBEGO, C.G.; EDELWEISS, M.I.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BATTASTINI, A.M. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. *J Biomed Nanotechnol.*, v. 9, n. 3, p. 516-26, 2013.

FISCHER, H.C.; CHAN, W.C.W. Nanotoxicity:the growing need for *in vivo* study. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 565-571, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTATION. www.fda.gov. Acessado em Abril de 2013.

FOSSATI, G.; RICEVUTI, G.; EDWARDS, S.W.; WALKER, C.; DALTON, A.; ROSSI, M.L. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol.*, v. 98, n. 4, p. 349-54, 1999.

FRANCAVILLA, C., MADDALUNO, L., CAVALLARO, U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol.*, v. 19, n. 5, p. 298-309, 2009.

FRANK, L.A.; CONTRI, R.V.; BECK, R.C.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015.

FRANKEN, N.A.; RODERMOND, H.M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.*, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FRIDLENDER, Z.G.; ALBELDA, S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, v. 33, n. 5, p. 949-55, 2012.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 5577-5591, 2012.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, v. 6, n. 7, p. 521-34, 2006.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.*, v. 17, n. 3, p. 638-50, 2013.

GALDIERO, M.R.; GARLANDA, C.; JAILLON, S.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol.*, v. 228, n. 7, p. 1404-12, 2013.

GARBE, C; EIGENTLER, T.H.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A; KIRKWOOD, J.M. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. *Oncologist*, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.L.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; GARIGLIO, P.; BERUMEN, J. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, v. 105, p. 231-243, 2002.

GAVINS, F.N. Intravital microscopy: new insights into cellular interactions. *Curr Opin Pharmacol.*, v. 12, n. 5, p. 601-607, 2012.

GAYOSO, C.; LIMA, E.; OLIVEIRA, V.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to Eugenia cariophyllata 5 essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, v. 76, p. 247–249, 2005.

- GHOSH, R.; NADIMINTY, N.; FITZPATRICK, J. E.; ALWORTH, W. L.; SLAGA, T. J.; KUMAR, A. P. Eugenol Causes Melanoma Growth Suppression through Inhibition of E2F1 Transcriptional Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 7, p. 5812-5819, 2005.
- GIL, P. R.; OBERDORSTER, G.; ELDER, A.; PUNTES, V.; PARAK, W. J. Correlating Physico-Chemical with Toxicological Properties of Nanoparticles: The Present and the Future. *ACS Nano*, v. 4, n. 10, p. 5527-5531, 2010.
- GOLIGORSKY, M.S.; ABEDI, H.; NOIRI, E.; TAKHTAJAN, A.; LENSE, S.; ROMANOV, V.; ZACHARY, I. Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol.*, v. 276, p. 6, p. 1271-1281, 1999.
- GOODMAN, S.L.; PICARD, M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 33, n. 7, p. 405-412, 2012.
- GOYDOS, J.S.; MANN, B.; KIM, H.J.; GABRIEL, E.M.; ALSINA, J.; GERMINO, F.J.; SHIH, W.; GORSKI, D.H. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *J Am Coll Surg.*, v. 200, n. 3, p. 362-370, 2005.
- GRABINSKI, G.; SCHAEUBLIN, N.; WIJAYA, A.; D'COUTO, H.; BAXAMUSA, S.H.; HAMAD-SCHIFFERLI, K.; HUSSAIN, S.M. Effect of Gold Nanorod Surface Chemistry on Cellular Response. *ACS Nano*, v. 5, n. 4, p. 2870–2879, 2011.
- GREGORY, A.D.; HOUGHTON, A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, v. 71, n. 7, p. 2411-6, 2011.
- GUTERRES, S.S.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R. Preparação e Aplicações de Nanopartículas para a Liberação Controlada de Fármacos, In: Morales, M. Terapias Avançadas: Células Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia, Atheneu, 2007.
- GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; DE LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv.*, v. 7, n. 4, p. 195-199, 2000.
- HAASS, N.K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc.*, v. 10, n. 2, p. 153-163, 2005.
- HAN, E.H.; HWANG, Y.P.; JEONG, T.C.; LEE, S.S.; SHIN, J.G.; JEONG, H.G. Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: Bifunctional effects on CYP1 and NAD (P) H:quinone oxidoreductase. *FEBS Lett.*, v. 581, p. 749–756, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A.Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.
- HASHIZUME, H.; BALUK, P.; MORIKAWA, S.; MCLEAN, J.W.; THURSTON, G.; ROBERGE, S.; JAIN, R.K.; MCDONALD, D.M.Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.*, v. 156, p. 1363–1380, 2000.

- HAYNES, C.L. The emerging field of nanotoxicology. *Anal Bioanal Chem.*, v. 398, p. 587-588, 2010.
- HELFRICH, I.; SCHADENDORF, D. Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: One step forward for overcoming antiangiogenic drug resistance? *Molecular Oncology*, v. 5, p. 137-1 4 9, 2011.
- HIDALGO, M. E.; ROSA, C.; CARRASCO, H.; CARDONA W.; GALLARDO, C.; ESPINOZA L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quím. Nova.*, V. 32, n.6, 2009.
- HOBBS, S.K.; MONSKY, W.L.; YUAN, F.; ROBERTS, W.G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 4607–4612, 1998.
- HODGKIN, P.D.; LEE, J.H.; LYONS, A.B. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J Exp Med.*, v. 184, n. 1, p. 277-281, 1996.
- HORCH, R.E.; KOPP, J.; KNESER, U.; BEIER, J.; BACH, A.D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med.*, v. 9, n. 3, p. 592-608, 2005.
- HOSHIMOTO, A.; SUZUKI, Y.; KATSUNO, T.; NAKAJIMA,H.; SAITO, Y. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Br J Pharmacol.*, v. 136, n. 2, p. 280–286, 2002.
- HUERTA, S.; SAPNA CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). *International Journal of Oncology*, v. 33, n. 5, p. 909-27, 2008.
- HUO, L.; YAO, H.; WANG, X.; WONG, G.W.; KUNG, H.F.; LIN, M.C.Inhibition of melanoma growth by subcutaneous administration of hTERTC27 viral cocktail in C57BL/6 mice. *PLoS One*, v. 5, n. 9, p. e12705, 2010.
- ILIE, M.; HOFMAN, V.; ORTHOLAN, C.; BONNETAUD, C.; COËLLE, C.; MOUROUX, J.; HOFMAN, P. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, v. 118, n. 6, p. 1726-37, 2012.
- ILKOVITCH, D.; LOPEZ, D.M. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol.*, v. 17, n. 12, p. 977-85, 2008.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. www.inca.org.br. Acessado em Fevereiro de 2015.
- IOZZO, R.V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 6, n. 8, p. 646-56, 2005.
- ISO (International Organization for Standardization), ISO/TC 229 Nanotechnologies. http://www.iso.org/iso/iso\_technical\_committee?commid=381983. Acessado em Fevereiro de 2015.

- JAGANATHAN, S.K.; SUPRIYANTO, E. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, v. 17, n. 6, p. 6290-6304, 2012.
- JAGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, J.P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130–140, 2009.
- JAIN, R.K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.*, v. 7, n. 11, p. 653–664, 2010.
- JENSEN, H.K.; DONSKOV, F.; MARCUSSEN, N.; NORDSMARK, M.; LUNDBECK, F.; VON DER MAASE, H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.*, v. 27, n. 28, p. 4709-17, 2009.
- JENSEN, T.O.; SCHMIDT, H.; MØLLER, H.J.; DONSKOV, F.; HØYER, M.; SJOEGREN, P.; CHRISTENSEN, I.J.; STEINICHE, T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*, v. 118, n. 9, p. 2476-85, 2012.
- JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 18, n. 3, p. 345-57, 1999.
- JIANG, J.; OBERDOORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J Nanopart Res*, v. 11, p. 77-89, 2009.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.*, v. 12, n. 4, p. 390-399, 2002.
- KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, v. 7, n. 7, p. 153-163, 2000.
- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, v. 141, p. 52–67, 2010.
- KHANDARE, J.; MINKO, T. Polymer–drug conjugates: progress in polymeric drugs. *Prog Polym Sci.*, v. 31, p. 359–397, 2006.
- KIM, G.C.; CHOI, D.S.; LIM, J.S.; JEONG, H.C.; KIM, I.R.; LEE, M.H.; PARK, B.S. Caspases-dependent apoptosis in human melanoma cell by eugenol. *Korean J. Anat.*, v. 39, p. 245–253, 2006.
- KIM, J.H.; KIM, Y.S.; KIM, S.; PARK, J.H.; KIM, K.; CHOI, K.; CHUNG, H.; JEONG, S.Y.; PARK, R.W.; KIM, I.S.; KWON, I.C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel. *J Control Release*, v. 111, p. 228–234, 2006.
- KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; LIOTTA, L.A.; ROBEY, P.G.; TRYGGVASON, K.; MARTIN, G.R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin,

and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, p. 21, n. 24, p. 6188-6193, 1982.

KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSELL, J.R.; STAR, V.L.; CANNON, F.B.; LAURIE, G.W.; MARTIN, G.R. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, v. 25, n. 2, p. 312-318, 1986.

KOEV, I.G.; FEODOROVA, Y.N.; KAZAKOVA, M.H.; STAYKOV, D.G.; KITOV, B.D.; SARAFIAN, V.S. Glioblastoma multiforme classified as mesenchymal subtype. *Folia Med (Plovdiv)*, v. 56, n. 3, p. 215-9, 2014.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 13, n. 3, p. 159-75, 2013.

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.*, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KONOVALOVA, N.P.; GONCHAROVA, S.A.; VOLKOVA, L.M.; RAEVSKAIA, T.A.; EREMENKO, L.T.; KOROLEV, A.M. Nitric oxide donor increases the effectiveness of cytostatic therapy and inhibits the development of drug resistance. *Vopr Onkol., v.* 49, n. 1, p. 71-5, 2003.

KOUCHAKZADEH, H.; SAFAVI, M.S.; SHOJAOSADATI, S.A. Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. *Adv Protein Chem Struct Biol.*, v. 98, p. 121-43, 2015.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M.V., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death and Diferentation*, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUANG, D.M.; ZHAO, Q.; WU, Y.; PENG, C.; WANG, J.; XU, Z.; YIN, X.Y.; ZHENG, L. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, v. 54, n. 5, p. 948–955, 2011.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.*, v. 659, n. 1-2, p. 15-30, 2008.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection. *The Inflammasomes Progress in Inflammation Research*, p. 17-36, 2011.

LADÁNYI, A. Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in melanoma. *Magy Onkol.*,v. 57, n. 2, p. 85-95, 2013.

- LAMPRECHT, A.; RODERO TORRES, H.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.M. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. *J Control Release*, v. 69, n. 3, p. 445-454, 2000 (a).
- LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; HOMBREIRO PÉREZ, M.; LEHR, C.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int J Pharm.*, v. 196, n. 2, p. 177-82, 2000 (b).
- LEE, H. S.; KIM, S.Y.; LEE, C.H.; ALIN, Y.J. Cytotoxic and mutagenic effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 1176-1181, 2004.
- LI, J.; WANG, Y.; LIANG, R.; AN, X.; WANG, K.; SHEN, G.; TU, Y.; ZHU, J.; TAO, J. Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. *Nanomedicine*, v. 11, p. 769-794, 2014.
- LI, W.; TSUBOUCHI, R.; QIAO, S.; HANEDA, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Inhibitory action of eugenol compounds onthe production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomed Res.*, v. 27, n. 2, p. 69-74, 2006.
- LI, Y.W.; QIU, S.J.; FAN, J.; ZHOU, J.; GAO, Q.; XIAO, Y.S.; XU, Y.F. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J Hepatol.*, v. 54, n. 3, p. 497-505, 2011.
- LI, G.; HERLYN, M. Dynamicsof intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today*, v. 6, n. 4, p. 163-1639, 2000.
- LIMA, T.M.; KANUNFRE, C.C.; POMPEIA, C.; VERLENGIA, R.; CURI, R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicology in Vitro*, v. 16, p. 741–747, 2002.
- LIU, Y.; FANG, S.; ZHAI, J.; ZHAO, M. Construction of antibody-like nanoparticles for selective protein sequestration in living cells. *Nanoscale.*, v. 0, p. 0-0, 2015.
- LU, Y.; CHEN, S.C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, v. 56, n. 11, p. 1621-1633, 2004.
- LYONS, A.B.; PARISH, C.R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *J. Immunol. Methods*, v. 171, n. 1, p.131-137, 1994.
- MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*, v. 41, p. 189–207, 2001.
- MAIURI, M.C.; ZALCKVAR, E.; KIMCHI, A.; KROEMER, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 8, n. 9, p. 741-752, 2007.
- MAN, Y.G.; STOJADINOVIC, A.; MASON, J.; AVITAL, I.; BILCHIK, A.; BRUECHER, B.; PROTIC, M.; NISSAN, A.; IZADJOO, M.; ZHANG, X.; JEWETT, A. Tumor-infiltrating

immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J Cancer*, v. 4, n. 1, p. 84-95, 2013.

MANIKANDAN, P.; MURUGAN, R.S.; PRIYADARSINI, R.V.; VINOTHINI, G.; NAGINI, S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sciences*, v. 86, p. 936–941, 2010.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation, *Nature*, v. 454, p. 436-444, 2008.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M.A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.*, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.

MARAGOS, C.M.; WANG, J.M.; HRABIE, J.A.; OPPENHEIM, J.J.; KEEFER, L.K. Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the *in vitro* proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxiderelease. *Cancer Res.*, v. 53, n. 3, p. 564-8, 1993.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, v. 46, p. 6387–6392, 1986.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIGAS, B.; CONSTANTINIDES, P.P. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine*, v. 7, n. 10, p. 1577-1590, 2012.

MCGARY, E.C.; LEV, D.C.; BAR-ELI, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.*, v. 1, n. 5, p. 459-65, 2002.

MELINO, G., KNIGHT, R.A., NICOTERA, P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death and Differentation*, v. 12, p. 1457-62, 2005.

MÉNARD, N.; TSAPIS, N.; POIRIER, C.; ARNAULD, T.; MOINE, L.; LEFOULON, F.; PÉAN, J.M.; FATTAL, E. Physicochemical characterization and toxicity evaluation of steroid-based surfactants designed for solubilization of poorly soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, p. 595–601, 2011.

MENGER, M.D.; LASCHKE, M.W.; VOLLMAR, B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res, v.* 34, p. 83-91, 2002.

MENGER, M.D.; LEHR, H.A. Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from *in vitro* to *in vivo*. *Immunol Today*, v. 14, p. 519-22, 1993.

MICHAELIS, U.R. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci.*, v. 71, n. 21, p. 4131-48, 2014.

MIKAMI, S.; MIZUNO, R.; KOSAKA, T.; SAYA, H.; OYA, M.; OKADA, Y. Expression of TNF-α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, v. 136, n. 7, p. 1504-14, 2015.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; SCOTT, A.; TESSIER, A.; MURRAY, D. A sensitive assay for the evaluation of cytotoxicity and its pharmacologic modulation in human solid tumor-derived cell lines exposed to cancertherapeutic agents. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 10, p. 298s–311s, 2007.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*; v. 19, p. 311–330, 2005.

MONTEIRO, H.P.; GRUIA-GRAY, J.; PERANOVICH, T.M.; DE OLIVEIRA, L.C.; STERN, A. Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogen-activated protein kinases in murine fibroblasts. *Free Radic Biol Med.*, v. 28, n. 2, p. 174-82, 2000.

MOOI, W.J.; PEEPER, D.S. Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer. *N Engl J Med.*, v. 355, n. 10, p. 1037-46, 2006.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; SILVEIRA, N. P.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres: Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie* (Berlin), v. 56, n. 11, p. 864-867, 2001.

MUNDER, M.; MOLLINEDO, F.; CALAFAT, J.; CANCHADO, J.; GIL-LAMAIGNERE, C.; FUENTES, J.M.; LUCKNER, C.; DOSCHKO, G.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MÜLLER, F.; HO, A.D.; GOERNER, M.; MODOLELL, M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, v. 105, n. 6, p. 2549-56, 2005.

NANO.gov. National Nanotechnology Initiative. http://www.nano.gov/>. Acesso em Janeiro de 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer. Acessado em Fevereiro de 2015.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. www.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em Março de 2015.

NECKEL-LOCH, G.; NEMEN, D.; PUHL, A. C.; FERNANDES, D.; STIMAMIGLIO, M. A.; SILVA, M. A., HANGAI, M.; SILVA, M. C. S.; SENNA-LEMOS, E. Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p. 1359-1364, 2007.

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/. Acessado em Fevereiro de 2015.

NORTHFELT, D.W.; MARTIN, F.J.; WORKING, P.; VOLBERDING, P.A.; RUSSELL, J.; NEWMAN, M.; AMANTEA, M.A.; KAPLAN, L.D. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Pharmacol.*, v. 36, n. 1, p. 55-63, 1996.

NYMAN, D.W.; CAMPBELL, K.J.; HERSH, E.; LONG, K.; RICHARDSON, K.; TRIEU, V.; DESAI, N.; HAWKINS, M.J.; VON HOFF, D.D. Phase I and pharmacokinetics trial of

- ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J Clin Oncol.*, v. 23, n. 31, p. 7785-93, 2005.
- OLIVEIRA, C.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, S.F.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. An algorithm to determinate the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, v. 9, n. 4, p. 1141-1150, 2013.
- OLSEN, E.; DUVIC, M.; FRANKEL, A.; KIM, Y.; MARTIN, A.; VONDERHEID, E.; JEGASOTHY, B.; WOOD, G.; GORDON, M.; HEALD, P.; OSEROFF, A.; PINTER-BROWN, L.; BOWEN, G.; KUZEL, T.; FIVENSON, D.; FOSS, F.; GLODE, M.; MOLINA, A.; KNOBLER, E.; STEWART, S.; COOPER, K.; STEVENS, S.; CRAIG, F.; REUBEN, J.; BACHA, P.; NICHOLS, J. Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.*, v. 19, n. 2, p. 376-88, 2001.
- ONIKI, S.; NAGAI, H.; HORIKAWA, T.; FURUKAWA, J.; BELLADONNA, M.L.; YOSHIMOTO, T.; HARA, I.; NISHIGORI, C. Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenicmelanoma. *Cancer Res.*, v. 66, n. 12, p. 6395-404, 2006.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO): http://www.who.int/cancer/en/. Acessado em Março de 2015.
- ORRENIUS, S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev.*, v. 39, n. 2-3, p. 443-55, 2007.
- OU, H.C.; CHOU, F.P.; LIN, T.M.; YANG, C.H.; SHEU, W.H. Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, n. 44, p. 1485–1495, 2006.
- PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. Curso de manipulação de animais de laboratório. FIOCTRUZ, Salvados-BA, 2013.
- PAN, R.; DAI, Y.; GAO, X.; LU, D.; XIA, Y. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin 2 through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its 3 downstream signaling pathways. *Vascular Pharmacology*, v. 54, n. 1-2, p. 18-28, 2010.
- PANARITI; A.; MISEROCCHI; G.; RIVOLTA, I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*, v. 5, p. 87–100, 2012.
- PARK, J.H.; KWON, S.; LEE, M.; CHUNG, H.; KIM, J.H.; KIM, Y.S.; BONG SEO, S.; KWON, I.C.; YOUNG, J.S. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: in vivo biodistribution and antitumor activity. *Biomaterials*, v. 27, p. 119–126, 2006.
- PARK, J.H.; LEE, S.; KIM, J.H.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I.C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog. Polym. Sci.*, v. 33, n. 113–137, 2008.
- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, v. 8, p. 147–166, 2012.

- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.
- PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer theraphy. *Nature Nanotechnology*, p. 751-760, 2007.
- PERROTTA, C.; BIZZOZERO, L.; FALCONE, S. Nitric oxide boosts chemoimmunotherapy via inhibition of acid sphingomyelinase in a mouse model of melanoma. *Cancer Res*, v. 67, p. 7559-7564, 2007.
- PERROTTA, C.; FALCONE, S.; CAPOBIANCO, A.; CAMPOREALE, A.; SCIORATI, C.; DE PALMA, C.; PISCONTI, A.; ROVERE-QUERINI, P.; BELLONE, M.; MANFREDI, A.A.; CLEMENTI, E. Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma. *Cancer Res.*, v. 64, n. 11, p. 3767-71, 2004.
- PHILLIPS, T.J. New skin for old: developments in biological skin substitutes. *Arch Dermatol.*, v. 134, n. 3, p. 344-349, 1998.
- PIPILI-SYNETOS, E.; PAPAGEORGIOU, A.; SAKKOULA, E.; SOTIROPOULOU, G.; FOTSIS, T.; KARAKIULAKIS, G.; MARAGOUDAKIS, M.E. Inhibition of angiogenesis tumour growth and metastasis by NO-releasing vasodilators, isosorbidemononitrate and dinitrate. Br J Pharmacol., v. 116, n. 2, p. 1829-34, 1995.
- PISANO, M.; PAGNAN, G.; LOI, M.; MURA, M. E.; TILOCCA, M. G.; PALMIERI, G.; FABBRI, D.; DETTORI, M. A.; DELOGU, G.; PONZONI, M.; ROZZO, C. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. *Mol Cancer*, v. 6, n.8, p. 1-12, 2007.
- POLETTO, F.S.; FIEL, L.A.; LOPES, M.V.; SCHAAB, G.; GOMES, A.M. O.; GUTERRES, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A.R. Fluorescent-Labeled Poly(ε-caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. *J Col Sci Biotechnol.*, v. 1, n. 1, p. 89-98, 2012.
- POON, I.K.H., HULETT, M.D., PARISH, C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death and Differentation*, v. 17 p. 381-97, 2010.
- PORTA, C., LARGHI, P., RIMOLDI, M., TOTARO, M.G., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A., SICA, A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, v. 214, n. 9-10, p. 761-77, 2009.
- POTTER, B. The physiology of the skin. Annu Rev Physiol., v. 28, p. 159-176,1966.
- PRABHU, V.V.; GURUVAYOORAPPAN, C. Anti-inflammatory and anti-tumor activity of the marine mangrove Rhizophora apiculata. *J Immunotoxicol.*, v. 9, n. 4, p. 341-52, 2012.
- QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *J. Vis. Exp.*, v. 44, p. pi2259, 2010.
- RAMIREZ, M.R.; GUTERRES, L.; DICKEL, O.E.; DE CASTRO, M.R.; HENRIQUES, A.T.; DE SOUZA, M.M.; BARROS, D.M. Preliminary studies on the antinociceptive

- activity of Vaccinium ashei berry in experimental animal models. *J Med Food.*, v. 13, n. 2, p. 336-42, 2010.
- RAO, H.L.; CHEN, J.W.; LI, M.; XIAO, Y.B.; FU, J.; ZENG, Y.X.; CAI, M.Y.; XIE, D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*, v. 1, p. e30806, 2012.
- RAVI KUMAR, M.N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci.*, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.
- REGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J Pharm Sci.*, v. 82, n. 4, p. 404-407, 1993.
- RODRIGUES, S.F.; FIEL, L.A.; SHIMADA, A.L.; PEREIRA, N.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; FARSKY, S.H. Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administrations. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, submetido, 2015.
- RONEY, C.; KULKARNI, P.; ARORA, V.; ANTICH, P.; BONTE, F.; WU, A.; MALLIKARJUANA, N.N.; MANOHAR, S.; LIANG, H.; KULKARNI, A.R.; SUNG, H.; SAIRAM, M.; AMINABHAVI, T.M. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, v. 108, p. 193-214, 2005.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p.329-335, 1947.
- SAIKUMAR, P.; SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.*, v.107, n.5, p.489-506, 1999.
- SANTIN, J.R.; UCHÔA, F.D.; LIMA, M. do C.; RABELLO, M.M.; MACHADO, I.D.; HERNANDES, M.Z.; AMATO, A.A.; MILTON, F.A.; WEBB, P.; NEVES, F. de A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. *Eur J Pharm Sci.*, v. 48, n. 4-5, p. 689-697, 2013.
- SCHMIDT, H.; BASTHOLT, L.; GEERTSEN, P.; CHRISTENSEN, I.J.; LARSEN, S.; GEHL, J. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British Journal of Cancer*, v. 93, n. 3, p. 273–8, 2005.
- SHARIFI, S.; BEHZADI, S.; LAURENT, S.; FORREST, M.L.; STROEVE, P.; MAHMOUDI, M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev.*, v. 41, n. 6, p. 2323-43, 2012.
- SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol.*, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

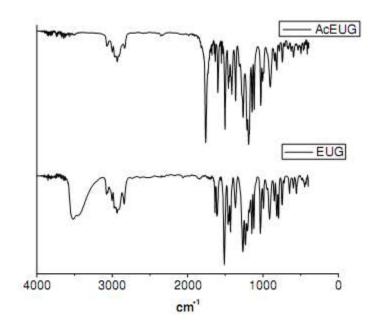
- SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.*, v. 293, p. 261-270, 2005.
- SHOKEEN, P.B.; BALA, M.; SINGH, M.; TANDON, V. In vitro activity of eugenol, an active component from Ocimum sanctum, against multiresistant and susceptible strains of Neisseria gonorrhoeae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 32, p. 174–179, 2008.
- SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm.*, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.
- SIONOV, R.V.; FRIDLENDER, Z.G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.*, v. 0, p. 0-0, 2014. SLAMENOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, E.; WSÓLOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.; NAVAROVÁ, J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research*, v. 677, p. 46–52, 2009.
- SMALLEY, K.S. PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Investig Drugs*, v. 11, n. 6, p. 699-706, 2010.
- SMITH, S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.*, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002.
- STRELCZYK; D.; EICHHORN, M.E.; LUEDEMANN, S.; BRIX, G.; DELLIAN, M.; BERGHAUS, A.; STRIETH, S. Static magnetic fields impair angiogenesis and growth of solid tumors *in vivo*. *Cancer Biology & Therapy*, v. 18, p. 1756-1762, 2009.
- SUMANTRAN, V.N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol.*, v. 731, p. 219-236, 2011.
- SWARTZ, M.A.; IIDA, N.; ROBERTS, E.W.; SANGALETTI, S.; WONG, M.H.; YULL, F.E.; COUSSENS, L.M.; DECLERCK, Y.A. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.*, v. 72, n. 10, p. 2473-80, 2012.
- TANG CH, GRIMM EA. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J Biol Chem.*, v. 279, n. 1, p. 288-98, 2004.
- THASSU, D., DELLERS, M., PATHAK, Y. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v, 166, 2007.
- TRELLAKIS, S.; BRUDEREK, K.; DUMITRU, C.A.; GHOLAMAN, H.; GU, X.; BANKFALVI, A.; SCHERAG, A.; HÜTTE, J.; DOMINAS, N.; LEHNERDT, G.F.; HOFFMANN, T.K.; LANG, S.; BRANDAU, S. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer.*, v.129, n. 9, p, 2183-93, 2011.
- TRIPSIANIS, G.; PAPADOPOULOU, E.; ANAGNOSTOPOULOS, K.; BOTAITIS, S.; KATOTOMICHELAKIS, M.; ROMANIDIS, K.; KONTOMANOLIS, E.; TENTES, I.;

- KORTSARIS, A. Coexpression of IL-6 and TNF-α: prognostic significance on breast cancer outcome. *Neoplasma*, v. 61, n. 2, p. 205-12, 2014.
- UCHIYAMA, M.K.; DEDA, D.K.; RODRIGUES, S.F.; DREWES, C.C.; BOLONHEIS, S.M.; KIYOHARA, P.K.; TOLEDO, S.P.; COLLI, W.; ARAKI, K.; FARSKY, S.H. *In vivo* and *in vitro* toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system. *Toxicol Sci.*, v. 142, n. 2, p. 497-507, 2014.
- VANENGELAND, M.; KUIJPERS, H.J,.; RAMAEKERS, F.C.; REUTELINGSPERGER, C.P.; SCHUTTE, B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, v. 235, p. 421-430, 1997.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 5, 2009.
- VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. Colloids and Surfaces A: Physicochem. *Eng. Aspects*, v. 375, p. 200- 208, 2011.
- VOGLER, E.A. A thermodynamic model of short-term cell adhesion in vitro. *Colloids and Surfaces*, n. 42, p. 233-254, 1989.
- VRANIC, S.; BOGGETTO, N.; CONTREMOULINS, V.; MORNET, S.; REINHARDT, N.; MARANO, F.; BAEZA-SQUIBAN, A.; BOLAND, S. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol.*, v. 10, p. 10-2, 2013.
- WAN, L.; PANTEL, K.; KANG, Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med.*, v. 19, n. 11, p. 1450-64, 2013.
- WANG, J.; LU, Z.; GAO, Y.; WIENTJES, M.G.; AU, J.L.S. Improving delivery and efficacy of nanomedicines in solid tumors: Role of tumor priming. *Nanomedicine (Lond)*, v. 6, n. 9, p. 10.2217/nnm.11.141, 2011.
- WEIGERT, R.; SRAMKOVA, M.; PARENTE, L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; MASEDUNSKAS, A. Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. *Histochem Cell Biol*, v. 133, p. 481-491, 2010.
- WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, v.47, n.9, p.1101-1109, 1999.
- WONG, T.; MCGRATH, J.A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol.*, v. 156, n. 6, p. 1149-1155, 2007.
- WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull*, v. 53, p. 451-465, 1997.
- YAO, J.; PRÖLS, F.; GAUER, S.; STERZEL, R.B. Exogenous nitric oxide inhibits mesangial cell adhesion to extracellular matrix components. *Kidney Int.*, v. 53, n. 3, p. 598-608, 1998.

- YOKOYAMA, M.; OKANO, T.; SAKURAI, Y.; EKIMOTO, H.; SHIBAZAKI, C.; KATAOKA, K. YUAN. *Cancer Res.*, v. 51, p. 3229–3236, 1991.
- YOO, C.B.; HAN, K.T.; CHO, K.S.; HA, J.; PARK, H.J.; NAM, J.H.; KIL, U.H.; LEE, K.T. Eugenol isolated from the essential oil of Eugenia caryophyllata induces a reactive oxygenspecies-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.*, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005.
- YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.*, v. 55, p. 3752–3756, 1995.
- ZAIDI, M.R.; DAY, C.P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol.*, v. 128, n. 10, p. 2381-2391, 2008.
- ZANOTTO-FILHO A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; DE OLIVEIRA, C.M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; FORCELINI, C.M.; BECK, R.C.; MOREIRA, J.C. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin inglioma treatment. *Eur J Pharm Biopharm.*,v. 83, n. 2, p. 156-67, 2013.
- ZARBOCK, A.; LEY, K.; MCEVER, R.P.; HIDALGO, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, v. 118, n. 26, p. 6743-6751, 2011.
- ZHAO, J.J.; PAN, K.; WANG, W.; CHEN, J.G.; WU, Y.H.; LV, L.; LI, J.J.; CHEN, Y.B.; WANG, D.D.; PAN, Q.Z.; LI, X.D.; XIA, J.C. The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One*, v. 7, n. 3, p. e33655, 2012.

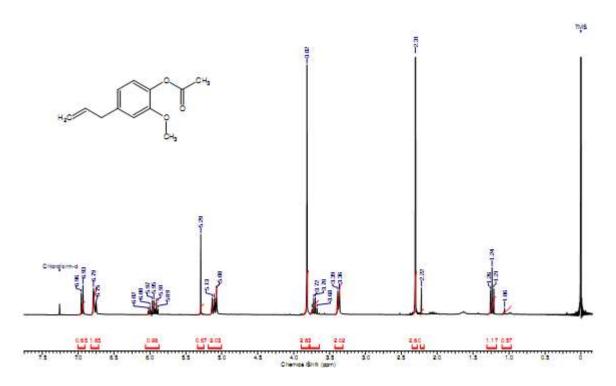
#### 7 ANEXOS

# ANEXO 1 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO ACETILEUGENOL E DA ESSÊNCIA OLEOSA DE CRAVO-DA-ÍNDIA



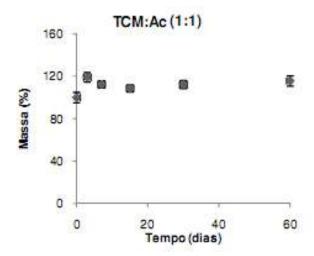
Espectro de infravermelho do acetileugenol e comparação com o do produto de partida [essência oleosa de cravo-da-índia, componente majoritário= Eugenol (EU)]. No espectro de infravermelho do produto de partida (essência oleosa de cravo-da-índia) visualiza-se banda alargada acima de 3000 cm-1, típica de hidroxila. Por outro lado, no espectro de infravermelho do AC, esta não se encontra presente. Ainda, banda referente ao estiramento da carbonila C=O pode ser claramente identificada, em 1700 cm-1, no primeiro espectro.

# **ANEXO 2 - ESPECTRO DE RMN DE 1H DO ACETILEUGENOL**



O espectro de RMN de 1H do produto final mostrou os seguintes deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm): 6,96 e 6,93 (d, 1H ArH posição 5), 6,79 e 6,75 (d, 1H ArH posição 4), 5,95 (m, 1H, H posição 7), 5,29 (s, 1H, H posição 3), 5,10 (m, 2H, H posição 8), 3,82 (s, 3H, H posição 2, OCH3), 3,36 (d, 2H, H posição 6), 2,31 (s, 3H, H posição 1, OC=OCH3). É possível observar o surgimento de sinal com  $\delta$ = 2.31 ppm, referente aos hidrogênios metílicos do éster, confirmando assim a formação do acetileugenol (acetato de 4-alil-2-metoxifenol).

# ANEXO 3 - MASSA DO FILME POLIMÉRICO QUE FOI MANTIDO EM CONTATO COM A MISTURA DE TRIACILGLICEROL E ACETILEUGENOL



Relação da massa do filme polimérico que foi mantido em contato com a mistura de triacilglicerol e acetileugenol durante 60 dias.

# ANEXO 4 - INSTRUÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO



#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Secretaria de Pós-Graduação

#### Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

- O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
- Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
- 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
  - 3. A sessão de defesa será aberta ao público.
- 4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.
- 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
- 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
- Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior Presidente da CPG/FCF/USP

# ANEXO 5 - PARACER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Estudo da eficácia terapêutica de nanocápsulas de eugenol: estudos in vivo e in vitro" (Protocolo CEUA/FCF/309), de responsabilidade da pesquisadora Carine Cristiane Drewes sob a orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/FCF/USP

No. Prof. Limit Product, 666 - 50000 13 A - Grante Universabile - CEF 0000-001 - See Paula - SP From: [11] 2001-2022 | Fax [11] 1001-2027 - 4-866 - CoodS-Quagaila

#### ANEXO 6 – FICHA DO ALUNO ATUALIZADA

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



# Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas **FICHA DO ALUNO**

9141 - 6723007/2 - Carine Cristiane Drewes

Email: cdrewes@usp.br Data de Nascimento: 10/09/1984

Cédula de Identidade: RG - 9085340471 - RS Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2008

Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências

Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Doutorado

Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Data de Matrícula: 14/04/2011 Início da Contagem de Prazo: 14/04/2011 Data Limite para o Depósito: 14/04/2015

Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 14/04/2011 até o presente. Email:

sfarsky@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/04/2011

Data de Aprovação no Exame de

Qualificação:

Aprovado em 18/06/2013

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da

Banca:

15/05/2015

16/03/2015

Data de Aprovação da Banca: Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa: Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 01/04/2015 13:44:25

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



## Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO

#### 9141 - 6723007/2 - Carine Cristiane Drewes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc	Situação
FBC5752-2/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	27/05/2011	01/07/2011	45	3	100	Α	N	Concluida
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0425 - Toxicologia Geral I, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/08/2011	03/12/2011	. 15	3	11	8		#
FBC5722-2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	100	A	N	Concluida
FBC5784-2/6	Tópicos Avançados em Toxicologia II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85	A	N	Concluida
FBC5705-4/1	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/10/2011	09/10/2011	30	2	100	A	N	Concluida
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	0			N	Matricula cancelada
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	4	90	A	N	Concluida
FBC5729-7/1	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	23/08/2012	19/09/2012	60	4	100	Α	N	Concluida
BMF5862-3/2	Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/06/2013	24/06/2013	90	6	100	A	N	Concluida

	Créditos mi	Créditos mínimos exigidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	1 30 70 70 70 70 70
Disciplinas:	10	20	28
Estágios:			
Total:	10	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

#### Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matricula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 01/04/2015 13:44:25

Fanus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



## Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO

#### 9141 - 6723007/2 - Carine Cristiane Drewes

Comissão julgadora da tese de doutorado:						
NUSP	Nome	Vinculo	Função			
1684580	Sandra Helena Poliselli Farsky	FCF - USP	Presidente			

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 01/04/2015 13:44:25