



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Laís Vaz da Costa

**Efeitos das Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas ao
Docetaxel no Metabolismo e na Proliferação Celular na
Linhagem de Adenocarcinoma Gástrico.**

Brasília – DF
2023

Laís Vaz da Costa

**Efeitos das Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas
ao Docetaxel no Metabolismo e na Proliferação Celular
na Linhagem de Adenocarcinoma Gástrico**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular, do Departamento de Biologia
Celular, do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília - UnB.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília – DF
2023

Laís Vaz da Costa

**Efeitos das Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas
ao Docetaxel no Metabolismo e na Proliferação Celular
na Linhagem de Adenocarcinoma Gástrico**

Data da Aprovação:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Sônia Nair Bão – Presidente
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dra. Andrea Barreto Motoyama
Universidade de Brasília – UNB

Dra. Márcia Cristina da Rocha
Instituto Butantan

Profa. Laise Rodrigues de Almeida (suplente)
Universidade de Brasília – UNB

Dedicatória

Aos meus pais, por todo apoio, amor dedicado incondicionalmente, por acreditarem nos meus sonhos e por todas as oportunidades que me ofereceram, que me propicia alçar novos voos sempre que for necessário. Minhas conquistas são e serão sempre compartilhadas com vocês, que me formaram de modo que eu possa chegar aonde desejo de maneira segura e amparada.

À minha amada avó (*in memoriam*), minha maior entusiasta, onde estiver, espero que esteja celebrando junto comigo.

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade de aprender e viver tantas experiências, pela força, por manter a minha fé acesa, pelo direcionamento e que em tantos momentos desesperadores, carregou-me no colo, não permitindo que eu me afastasse de meu propósito.

Aos meus pais e familiares agradeço por todas as oportunidades que me deram, reconheço os esforços e o tempo que se dedicaram a mim. Pude realizar meus sonhos porque tive o apoio de vocês. Se cheguei tão longe deve-se a uma base zelosa no início de tudo. Posso não dizer sempre, mas eu reconheço todo esforço que fizeram por mim e sou grata por tudo. Não seria quem sou, sem vocês!

Aos meus amigos, por me auxiliarem a repensar minhas atitudes e convicções de mundo, por me puxarem para a realidade quando necessário e por nunca me deixarem esquecer de quem eu sou. Obrigada a todos pela amizade e pela disponibilidade, que nem sempre, durante esse período, eu lhes concedi da forma como mereciam.

À minha orientadora Profa. Sônia Bão, pela permissão de trabalhar em seu laboratório, para que eu pudesse aprimorar em nível de doutoramento, grau tão difícil de alcançar em nosso país, obrigada pela oportunidade de ser sua orientanda.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Microanálise: Ariane, Bárbara, Brígida, Dayse, Diogo, Eloísio, Fabíola, Guilherme, Ingrid, Karen, Karine, Márcia, Marina Mesquita e Marina Radicchi. Em especial, Giovana e Melissa, obrigada por serem responsáveis pelos momentos coloridos dos meus dias nublados e por dividirem comigo tanto carinho por todos os anos em que estivemos juntas pesquisando, refletindo, compartilhando e principalmente nos divertindo. Gostaria de ter oferecido a vocês, uma versão minha menos preocupada, mais leve. Mas saibam que estarão sempre no meu coração!

À professora Kelly e seu aluno Igor, pela parceria nos estudos de citocinas/ELISA. À colega Caterynne, pela ajuda da aquisição das imagens no Microscópio Confocal. À técnica Karen, do departamento de nanotecnologia, pela disposição e acompanhamento dos procedimentos realizados nesse setor.

Agradeço também aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite, colaborando para a melhoria deste trabalho.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, pela estrutura para realização deste estudo e oportunidade.

Às agências de fomento CNPq, FAPDF, FINEP e FINATEC pelo financiamento que viabiliza a realização deste trabalho. À CAPES pela bolsa de estudos durante o doutorado.

Gostaria de aproveitar, para agradecer a existência das Universidades Públicas do nosso país. O espaço acadêmico é um local de envolvimento teórico, técnico e pessoal e de que nada adianta produzir conhecimento se ele não está a serviço da sociedade. Nesse momento estou concluindo o topo da cadeia de estudos formais, trajetória essa que se iniciou na minha Iniciação Científica durante os meus anos de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, passando pela minha pós-graduação no Instituto Federal do Triângulo Mineiro e pelo meu mestrado realizado na Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer também a todos os meus tutores e colegas que passaram por mim durante esses anos e contribuíram massivamente para a construção do meu saber científico e para formação do meu caráter pessoal. Uma carreira científica não é construída da noite para dia, são anos de formação, vários tijolinhos dia após dia. Por sorte, eu me tornei um mosaico, que se evidencia no meu perfil generalista em Ciências.

As próximas páginas desse trabalho representam não somente a conclusão de uma tese (embora eu me sinta orgulhosa por todo conhecimento gerado e discutido), mas contempla todo o processo de construção, que foi tão quanto ou mais importante do que o estado da arte final. Na apresentação de uma tese deveria ter um espaço reservado, especialmente, para que pudéssemos explicar todas as nossas experiências de crescimento pessoal, que são imensuráveis, indo muito além de dados, estatísticas, regras acadêmicas ou a obtenção das letras DRA. antes do nome.

A autoria dessa tese foi o projeto, até então, mais desafiador que eu tive em minha vida, onde todos os meus limites foram postos à prova. Apesar de, em vários momentos durante essa trajetória, eu me senti incapaz, tive dúvidas sobre as minhas escolhas, sobre a minha capacidade, sensações constantes de não merecimento. As minhas expectativas pessoais foram superadas, fico feliz e orgulhosa por ter obtido êxito durante essa caminhada e poder apresentar a vocês um trabalho dessa magnitude e qualidade.

Quando escrevi meu projeto para a seleção de doutorado, nunca tinha visto um microscópio eletrônico, confocal, citômetro de fluxo ou realizado uma cultura de células. Tudo foi muito novo e desafiador. Na minha prova de seleção, a prof. Ana Amélia, me disse: “quando damos continuidade a um projeto, é mais confortável; quando mudamos, nos desafiamos, aprendemos muito mais “; esse pensamento me motivou durante todo o meu doutorado, mas confesso que achei que o caminho não seria tão desafiador.

Implicitamente, esse trabalho fala também, sobre o meu poder de resiliência, minha força em superar as adversidades, o tamanho da fé, minha persistência, minha vontade de fazer as coisas da maneira correta, minha capacidade de evoluir e aprender com os meus erros, de lutas silenciosas e solitárias, do aprimoramento das minhas habilidades técnicas, científicas, profissionais e pessoais, de horas e horas, páginas e páginas, e madrugadas a fio de estudos regados por cafés, crises de ansiedade e insônias. E em todo esse processo eu fui honesta comigo mesma, coloquei minha personalidade, minha identidade, meu ritmo de aprendizagem e a minha dedicação em cada experimento realizado e em cada linha escrita.

Espero que a leitura de vocês seja agradável!!

Epígrafe

“Ninguém compreenderá seus sacrifícios e renúncias para a manutenção de uma vida modesta e honrada. Persevere no dever bem cumprido.”

Autor: Marco Prisco/Divaldo Franco

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Autor: Carl Jung

“Que o pecado de me achar melhor por ter acesso ao conhecimento científico não me atinja, que eu respeite os saberes populares e que eu entenda que inteligência é mais que isso que a universidade ensina. Que eu seja protegida da soberba da vida acadêmica.”

Autor: desconhecido

“A verdadeira liderança não se trata de estar no topo ou comandar, mas sim de inspirar e capacitar os outros a alcançarem o seu potencial máximo. É sobre escutar, aprender e crescer juntos, construindo uma equipe unida e colaborativa.”

Autor: Barbara Calderani

Resumo

VAZ-COSTA, L. Efeitos das Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas ao Docetaxel no Metabolismo e na Proliferação Celular na Linhagem de Adenocarcinoma Gástrico.

O câncer gástrico é um problema de saúde global, estando entre os 10 tipos de cânceres mais incidentes em todo o mundo. Apesar dos recentes avanços na terapia do câncer, ao longo dos anos houve pouca mudança nas taxas de cura e sobrevida em pacientes que sofrem de câncer gástrico. O Docetaxel (DTX), um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de adenocarcinomas, possui mecanismo de ação na inibição da mitose e divisão celular, podendo causar hipersensibilidade, nefrotoxicidade, retenção de líquido e neutropenia. Contudo, a sua encapsulação em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) poderá reduzir esses problemas, melhorando a sua eficácia e realizando o transporte diretamente do fármaco. NLS-DTX apresentou maior citotoxicidade contra células cancerígenas (AGS), demonstrando um valor de IC50 menor que a concentração de DTX livre, após 24 h de tratamento, evidenciando a eficiência das nanopartículas. Através da análise morfológica, observou-se que as células assumiram uma forma arredondada e diminuíram as projeções citoplasmáticas após o tratamento. NLS-DTX e DTX induziram danos aos microtúbulos, proteínas de ligação e fragmentação do núcleo, além de prejudicar a adesão, proliferação e migração celular. Também apresentou alterações nos testes envolvendo organelas celulares (mitocôndria e lisossomos) e metabolismo celular. A NLS não apresentou toxicidade significativa na linhagem tumoral AGS em nenhum dos ensaios, comportando-se de forma semelhante ao controle não tratado. Portanto, com os resultados deste trabalho, foi possível concluir que a associação de DTX com NLS foi eficiente, apresentando ação citotóxica em células de adenocarcinoma gástrico, e favorecendo o uso desta formulação na administração de fármacos.

Palavras-chave: Câncer de estômago, Efeito Antitumoral, Nanotecnologia, Metabolismo

Abstract

VAZ-COSTA, L. Effects of Solid Lipid Nanoparticles associated with Docetaxel on Metabolism and Cell Proliferation in Gastric Adenocarcinoma Line.

Gastric cancer is a global health problem, being among the 10 most common types of cancer worldwide. Despite recent advances in cancer therapy, over the years there has been little change in cure and survival rates in patients suffering from gastric cancer. Docetaxel (DTX), one of the most used drugs for the treatment of adenocarcinomas, has a mechanism of action of inhibiting mitosis and cell division, which can cause hypersensitivity, nephrotoxicity, fluid retention and neutropenia. However, its encapsulation in solid lipid nanoparticles (SLN) could reduce these problems, improving its effectiveness and transporting the drug directly. SLN -DTX showed greater cytotoxicity against cancer cells (AGS), demonstrating an IC₅₀ value lower than the concentration of free DTX, after 24 h of treatment, demonstrating the efficiency of the nanoparticles. Through morphological analysis, it was observed that the cells assumed a rounded shape and reduced cytoplasmic projections after treatment. SLN -DTX and DTX induced damage to microtubules, binding proteins and nucleus fragmentation, in addition to impairing cell adhesion, proliferation and migration. It also showed changes in tests involving cellular organelles (mitochondria and lysosomes) and cellular metabolism. SLN did not present significant toxicity in the AGS tumor lineage in any of the assays, behaving similarly to the untreated control. Therefore, with the results of this work, it was possible to conclude that the association of DTX with SLN was efficient, presenting cytotoxic action on gastric adenocarcinoma cells, and favoring the use of this formulation in drug administration.

Keywords: Stomach cancer, Antitumor effect, Nanotechnology, Metabolism

Lista de Figuras

Figura 1: Características fenotípicas adquiridas por uma célula durante os processos de transformação e progressão tumoral.....	17
Figura 2: Etapas durante a evolução clonal do câncer: iniciação, progressão e metástase.....	18
Figura 3 – Origens e influência da heterogeneidade do tumor.....	18
Figura 4 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
Figura 5 – Divisões anatômicas do estômago.....	22
Figura 6 – Lâminas da mucosa gástrica.....	23
Figura 7- Vista em corte da túnica mucosa do estômago mostrando as glândulas e os tipos de células.....	23
Figura 8: Principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de estômago.....	24
Figura 9: Classificação Macroscópica de adenocarcinoma gástrico, segundo Borrmann.....	25
Figura 10: Classificação histológica do adenocarcinoma gástrico.....	26
Figura 11: Estádios do câncer de estômago: classificação de acordo com a malignidade do tumor.....	30
Figura 12. Mecanismo de ação do Docetaxel no tratamento do câncer.....	32
Figura 13: Desenho experimental.....	38
Figura 14: Mecanismos de regulação de tamanho das populações celulares..	39
Figura 15: Relação entre função celular, morte celular e alterações morfológicas na lesão celular.....	41
Figura 16: Ilustração esquemática da Nanopartícula Lipídica Sólida associada ao Docetaxel (NLS-DTX)	43
Figura 17 – Viabilidade de AGS após tratamento com NLS-DTX, DTX e NLS..	51
Figura 18 – Viabilidade de Fibroblasto após tratamento com NLS-DTX, DTX e NLS.....	52

Lista de Figuras

Figura 19 – Efeito do tratamento com NLS-DTX na inibição de formação de colônia das células AGS.....	55
Figura 20 – Efeito do tratamento com NLS-DTX na inibição de formação de colônia das células AGS.....	56
Figura 21 – Alterações morfológicas das células AGS em Contraste de Fase após 24 h de tratamento.....	58
Figura 22 – Micrografia da linhagem AGS por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	60
Figura 23: Ensaio de imunofluorescência de células AGS mostrando os efeitos causados após os tratamentos na organização dos microtúbulos.....	62
Figura 24 – Ensaio de imunofluorescência de células AGS mostrando os efeitos causados após os tratamentos na organização da β -Catenina.....	64
Figura 25: Ensaio de Migração Celular em Células AGS por 24h.....	67
Figura 26: Ensaio de Migração Celular em Células AGS por 48h.....	69
Figura 27: Proliferação Celular de AGS por CFSE em 24 h.....	71
Figura 28: Proliferação Celular de AGS por CFSE em 48 h.....	72
Figura 29: Perfil de proliferação de células de Adenocarcinoma Gástrico em RTCA.....	73
Figura 30. Imagens Ultraestruturais de Células AGS tratadas com NLS-DTX por 6h.....	81
Figura 31 – Imagens Ultraestruturais de Células AGS tratadas com NLS-DTX por 24 horas.....	82
Figura 32: Intensidade relativa de fluorescência das células AGS após internalização da NLS-AIPc.....	82

Lista de Figuras

Figura 33: Internalização de NLS-AIPc por células AGS expostas a diferentes inibidores de endocitose por 3 horas.....	84
Figura 34: Produção de espécies reativas de oxigênio por células AGS após os tratamentos por 6h.....	98
Figura 35 – Produção de espécies reativas de oxigênio por células AGS após os tratamentos por 24h.....	99
Figura 36 – Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial por 6h.....	101
Figura 37: Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial por 24h.....	102
Figura 38: Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial por 48h.....	102
Figura 39: Avaliação da Massa Mitocondrial por 24h.....	104
Figura 40: Avaliação da Massa Mitocondrial por 48h.....	105
Figura 41: Fluorescência da Massa Mitocondrial em células AGS por MitoTracker Green após os tratamentos.....	106
Figura 42: Fluorescência de autofagia com marcação de Laranja de Acridina.....	108
Figura 43: Marcação de autofagia com Laranja de Acridina por 24h Canal FL1.....	109
Figura 44: Marcação de autofagia com Laranja de Acridina por 24h Canal FL3.....	109
Figura 45. Marcação de autofagia com Laranja de Acridina por 48h Canal FL1.....	110

Lista de Figuras

Figura 46: Marcação de autofagia com Laranja de Acridina por 48h Canal FL3.....	110
Figura 47: Avaliação da Permeabilidade de Membrana Lisossomal por 24h....	112
Figura 48: Avaliação da Permeabilidade de Membrana Lisossomal por 48h....	113
Figura 49: Morte Celular pelo tratamento com NLS-DTX em células AGS por 24h.....	116
Figura 50: Morte Celular pelo tratamento com NLS-DTX em células AGS por 48h.....	117
Figura 51: Avaliação do nível de Ca ²⁺ intracelular por 24h.....	120
Figura 52: Avaliação do nível de Ca ²⁺ intracelular por 48h.....	120
Figura 53: Dosagem de Óxido Nítrico em AGS.....	121
Figura 54: Modulação da secreção da citocina TNF- α	124
Figura 55: Modulação da secreção da citocina IL-6.....	125
Figura 56: Modulação da secreção da citocina IL-12.....	126
Figura 57: Modulação da secreção da citocina TGF- β	127
Figura 58: Análise da Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos em células AGS.	129
Figura 59: Esquema conclusivo sobre os resultados obtidos no trabalho.....	134

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação do câncer gástrico comparando a classificação de Lauren (1965) e a classificação proposta pela OMS (2010)	27
Tabela 2. Estadiamento do câncer gástrico conforme AJCC 8ª edição.....	28
Tabela 3 – Quadro com as combinações de medicamentos comumente utilizados e o momento em que poderá ser utilizado.....	31
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas do Docetaxel.....	33
Tabela 5 – Concentração inibitória de 50% das NLS-DTX e DTX nas linhagens AGS e Fibroblasto nos tempos de 24, 48 e 72 h.....	54

Lista de Abreviaturas

- AGS: linhagem celular de adenocarcinoma gástrico
- ANOVA: Análise de Variância
- ATCC: American Type Culture Collection
- BSA: *Bovine Serum Albumin* / *Albumina Sérica Bovina*
- CFSE: éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (do inglês: 5-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)
- CG: câncer gástrico
- CL: Corpúsculos Lipídicos
- DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
- DTX: Docetaxel
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
- FSC: Dispersão frontal (do inglês: forward scatter)
- IC50: *Inhibitory concentration of 50%* / Concentração Inibitória de 50%
- IL-6: Interleucina 6
- IL-12: Interleucina 12
- h: hora
- HNTMC: cultura primária de células não tumorais (fibroblastos)
- INCA: Instituto Nacional do Câncer
- MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium
- NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas
- NLS-DTX: Nanopartícula lipídica sólida associada com 1 mg/mL de docetaxel
- NLS-AIPc: Nanopartícula lipídica sólida associada ao cloreto de ftalocianina de alumínio
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- ON: Óxido Nítrico
- PBS: *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato-salino

PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial

PI: *Propidium Iodide* / Iodeto de Propídio

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS – *Reactive Oxygen Species* – espécies reativas de oxigênio

RTCA: *Real-Time Cell Analysis*

SSC: Dispersão lateral (*side scatter*)

SFB: Soro Fetal Bovino

TGF- β : Fator de Transformação de Crescimento Beta

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

Tween 80: Polissorbato 80

WHO: World Health Organization

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer e Aspectos Epidemiológicos	16
1.2 Câncer de Estômago	22
1.2.1 Anatomia do Estômago	22
1.2.2 Adenocarcinoma Gástrico	24
1.3 Tratamento.....	29
1.3.1 Tratamentos Convencionais.....	29
1.3.2 Docetaxel	31
1.3.3 Nanotecnologia	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO DESSE TRABALHO.....	37
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38

CAPÍTULO I – ADESÃO, PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E REPARO CELULAR

1. INTRODUÇÃO.....	39
2. OBJETIVO.....	42
2.1 Objetivo Geral.....	42
2.2 Objetivo Específico.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Cultura Celular.....	43
3.2 Processamento da formulação da Nanopartícula Lipídica Sólida.....	43
3.3 Ensaio da Viabilidade Celular.....	44
3.4 Ensaio de Formação de Colônia e Recuperação Celular.....	45

Sumário

3.5	Análise da morfologia das células AGS por Microscopia de Luz.....	46
3.6	Análise da morfologia das células AGS por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
3.7	Ensaio de Imunomarcação da β – Tubulina.....	47
3.8	Ensaio de Imunomarcação da β – Catenina.....	47
3.9	Ensaio de Wound Healing.....	48
3.10	Proliferação Celular por CFSE.....	48
3.11	Ensaio de adesão e proliferação celular por RTCA.....	49
3.12	Análises Estatísticas.....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Ensaio de Viabilidade Celular nas linhagens de AGS e Fibroblastos.....	50
4.2	Avaliação da capacidade de formação de colônias das células tratadas com as NLS-DTX.....	55
4.3	Morfologia das células AGS.....	57
4.4	Atividade de NLS-DTX sobre microtúbulos de células AGS.....	60
4.5	Expressão de β -Catenina.....	63
4.6	Ensaio de Wound Healing.....	65
4.7	Análise da Proliferação Celular por CFSE.....	70
4.8	Adesão e Proliferação Celular por “ <i>Real -Time Cell Analysis</i> ”	72
5.	CONCLUSÃO.....	74
CAPÍTULO II – INTERNALIZAÇÃO		
1.	INTRODUÇÃO.....	75

Sumário

2. OBJETIVO.....	78
2.1 Objetivo Geral.....	78
2.2 Objetivo Específico.....	78
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.1 Análise das células AGS por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	79
3.2 Ensaio de Internalização com NLS- AIPc.....	79
3.3 Vias de Internalização.....	80
3.4 Análise Estatística.....	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Análise das células AGS por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	81
4.2 Internalização com NLS- AIPc.....	83
4.3 Vias de Internalização.....	84
5. CONCLUSÃO.....	86
CAPÍTULO III – METABOLISMO	
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. OBJETIVO.....	90
2.1 Objetivo Geral.....	90
2.2 Objetivo Específico.....	90
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
3.1 Ensaio de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	91

Sumário

3.2	Ensaio do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	91
3.3	Determinação da densidade de mitocôndrias através da marcação com MitoTracker Green.....	92
3.4	Fluorescência da densidade de mitocôndrias através da marcação com MitoTracker Green.....	92
3.5	Autofagia por Laranja de Acridina.....	93
3.6	Fluorescência por Laranja de Acridina.....	93
3.7	Determinação da Permeabilidade da Membrana Lisossomal.....	93
3.8	Ensaio de tipo de Morte Celular induzida por NLS-DTX.....	94
3.9	Determinação do nível de Ca ²⁺ intracelular.....	95
3.10	Dosagem de Óxido Nítrico.....	95
3.11	Dosagem de Citocinas.....	96
3.12	Ensaio da Biogênese Corpúsculos Lipídicos.....	96
3.13	Análise Estatística.....	97
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
4.1	Ensaio de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS).....	98
4.2	Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	100
4.3	Análise da Massa Mitocondrial.....	103
4.4	Autofagia por Laranja de Acridina.....	107
4.5	Análise da Permeabilidade da Membrana Lisossomal.....	112
4.6	Tipo de morte celular causada pelos tratamentos.....	114
4.7	Determinação do nível de Ca ⁺ intracelular.....	118
4.8	Dosagem de Óxido Nítrico por Nitrito.....	120
4.9	Dosagem de Citocinas.....	123

Sumário

4.10 Análise da Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos.....	128
5. CONCLUSÃO.....	132
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	136
8. PERSPECTIVAS PROPOSTAS PARA A CONTINUIDADE DESSE TRABALHO.....	137
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e Aspectos Epidemiológicos

Uma célula é continuamente submetida a diversos tipos de tensões casuais, induzidas por fatores exógenos, tais como: agentes infecciosos, agentes químicos, radiação ionizante; ou fatores endógenos: como mutações herdadas ou geradas em decorrência do metabolismo, disfunções hormonais e condições imunológicas, com potencial para agir juntos ou em sequência, podendo causar danos ao DNA (BARNES et al, 2018; GLASER et al, 2018; WEEDEN et al, 2018; WANG et al, 2021; GROELLY et al, 2023). Além disso, existem erros decorrentes das polimerases de DNA, durante o processo de replicação (WATSON et al; 2015; GILLESPIE et al; 2023).

O câncer é uma doença, onde os padrões de instabilidade genética (cromossômica ou microssatélites) das células tumorais podem refletir a exposição e a pressão seletiva exercida resultando em alterações genéticas e/ou efeitos epigenéticos (SCHINEIDER et al, 2017; BOULAY et al, 2018; KAEDING & ZARET, 2018; FEINBERG & LEVCHENKO, 2023). Alterações genéticas podem ocorrer por mutação pontual, deleção, amplificação de genes, translocação cromossômica ou através de outros mecanismos (HALL & KUDCHADKAR, 2014; WATSON et al; 2015; BARNES et al, 2018; CHENG et al, 2022). Efeitos epigenéticos, como a metilação das bases de citosina no DNA ou modificações na estrutura da cromatina (por metilação, acetilação ou fosforilação) podem modificar a expressão de genes e são mecanismos importantes para silenciar os genes durante a diferenciação celular das células saudáveis (DEANS & MAGGER, 2015; PERRI et al, 2017; NEBBIOSO et al, 2018; GILLESPIE et al; 2023).

As células cancerosas apresentam características fenotípicas diferentes das células normais, foram descritos seis traços das células tumorais que estão presentes em quase todos os tipos de tumores (Figura 1), são eles: I) potencial replicativo ilimitado; II) evasão à apoptose; III) angiogênese; IV) auto-suficiência dos sinais de crescimento; V) insensibilidade aos sinais antiproliferativos e VI) invasão dos tecidos e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Posteriormente, foram adicionadas mais quatro características: VII) desregulação energética celular; VIII) evasão ao sistema imune; IX) mutação e instabilidade genética e X) indução de inflamação pelo tumor (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Recentemente, foi lançada uma revisão que incorpora mais características: XI) desbloqueio de plasticidade fenotípica, XII) reprogramação epigenética não mutacional, XIII) microbiomas polimórficos e XIV) células senescentes (Figura 1) (HANAHAN, 2022).

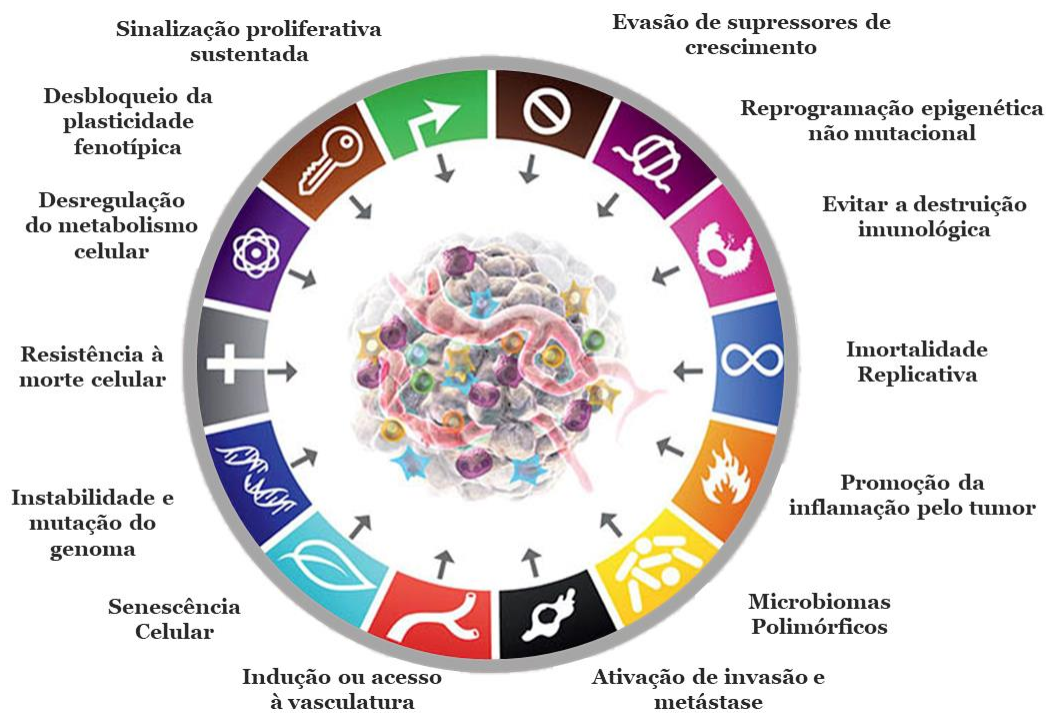


Figura 1: Características fenotípicas adquiridas por uma célula durante os processos de transformação e progressão tumoral (adaptado de HANAHAN, 2022).

Essa enfermidade emerge de um processo evolutivo darwiniano, onde as células tumorais com maior potencial adaptativo apresentam uma vantagem seletiva em relação às células menos aptas, muitas vezes levando a vários subclones concorrentes dentro de um único tumor primário (Figura 2) (NOWELL, 1976; HANAHAN & WEINBERG, 2000; GREAVES & MARLEY, 2012; CROSS et al, 2016). Esse processo evolutivo culmina na formação de metástases, que causam 90% das mortes relacionadas ao câncer (GREAVES & MARLEY, 2012; SUNG et al, 2021).

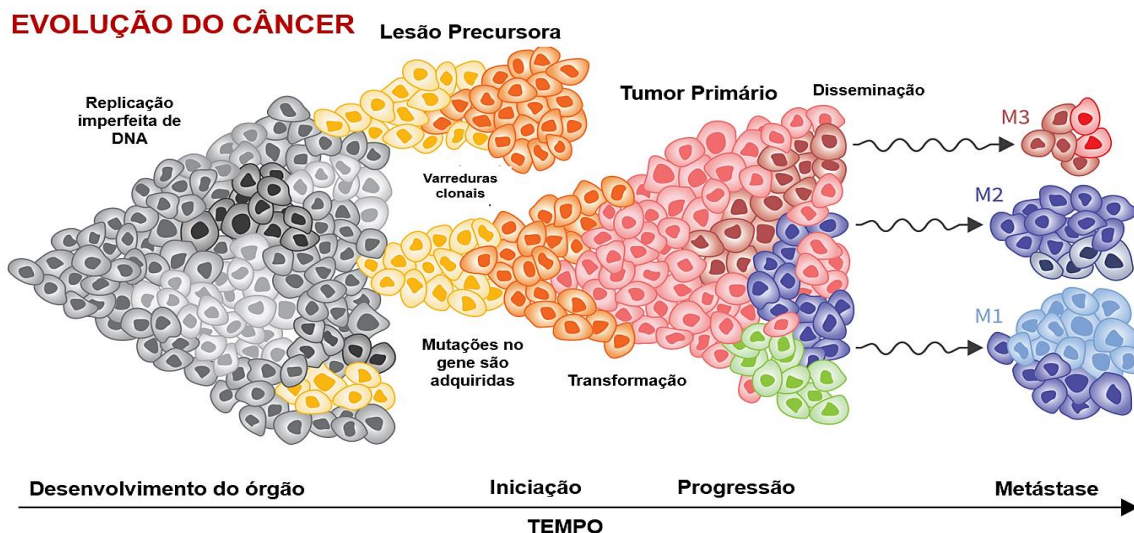


Figura 2: Etapas durante a evolução clonal do câncer: iniciação, progressão e metástase. M1: Métastase 1, M2: Métastase 2, M3: Métastase 3 (adaptado de <https://reiterlab.stanford.edu/>, 2020).

Durante o curso da doença, os cânceres geralmente tornam-se mais heterogêneos resultando em uma coleção diversificada de células que abrigam assinaturas moleculares e componentes fenotípicos distintos, com diferentes níveis de sensibilidade aos tratamentos (Figura 3) (DIETLEIN et al, 2014, KALLURI, 2016; SCHNEIDER et al, 2017; MEHRAJ et al 2022). Embora a heterogeneidade não seja evidenciada em amostragens tumorais limitadas, mostra ser um fator relevante para gerar resistência às drogas (JUNTTILA & SAUVAGE, 2013; AIPING et al. 2022; CRUCITTA et al. 2022).

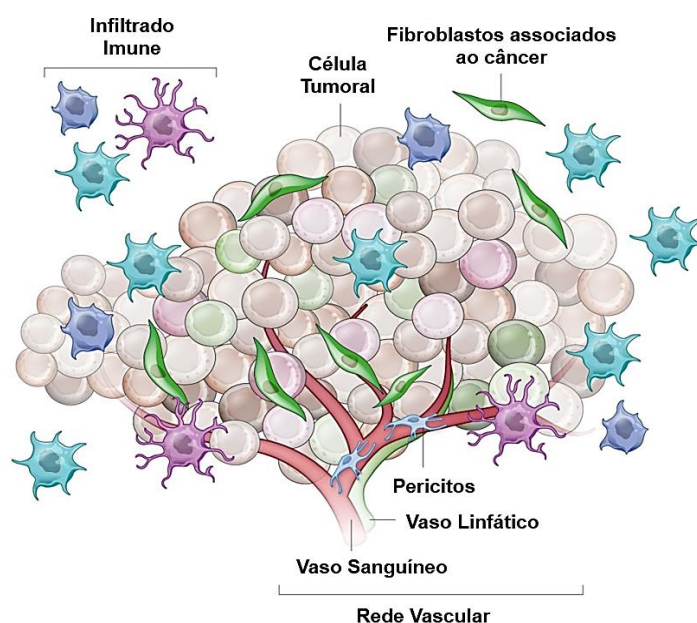


Figura 3 - Origens e influência da heterogeneidade do tumor. Formação de tumores envolve a co-evolução de células neoplásicas juntamente com matriz extracelular e células endoteliais vasculares, estromais e imunológicas (adaptado de JUNTTILA & SAUVAGE, 2013).

Diferentes tipos de cânceres correspondem aos mais variados tipos de células do corpo, apresentando lesões morfológicas e fenotípicas distintas, com diferentes morfologias celulares, expressão gênica, metabolismo, microambiente, proliferação e possibilidade de lesões metastáticas (JUNTTILA & SAUVAGE, 2013; SCHNEIDER et al, 2017). O ambiente tumoral serve como suporte estrutural, possibilitando o acesso a fatores de crescimento, suprimento vascular e interações de células imunes, que podem variar drasticamente, embora dentro da mesma lesão (SCHNEIDER et al, 2017; KELSEY & KENNETH, 2018).

Embora tenhamos obtido um avanço significativo nas últimas décadas, sobre a compreensão da biologia e genética do câncer, é difícil mensurar toda a complexidade celular da doença, suas características dinâmicas e evolutivas, envolvendo o processo de transformação celular; dado que as alterações acontecem em diversos níveis de organização celular, desde alterações na informação genética, de vias de sinalização ou sinais ambientais (VISVADER, 2011; WATSON et al; 2015, SHAEFER & SERRANO, 2016, MAZZIOTTA et al, 2022; ZABRANSKY et al, 2022).

Apesar da quantidade extraordinária de esforço e dinheiro investido na erradicação ou controle da doença através dos grandes avanços na medicina, com diagnósticos mais precoces e terapias mais eficientes; a incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando mundialmente, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (WEIR et al, 2015; BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2022).

A grande diversidade do câncer pode ser observada pela captura de variações na magnitude e no perfil da doença entre e dentro das regiões do mundo (BRAY *et al.*, 2018). Verifica-se uma transição dos principais tipos de câncer observados nos países em desenvolvimento, com um declínio dos tipos de câncer associados a infecções e o aumento daqueles associados à melhoria das condições socioeconômicas com a incorporação de hábitos e atitudes

associados à urbanização (sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros) (BRAY *et al.*, 2018).

Para o Brasil, a estimativa para o triênio 2023-2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer. Ao comparar-se com os números do triênio 2020-2022, quando eram esperados 625 mil novos casos por ano, observa-se que a expectativa é que tenhamos 79 mil casos acrescidos anualmente, ou seja, 237 mil novos casos a mais na somatória dos próximos três anos. O tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (Figura 4) (INCA, 2022).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA, 2022).

Apesar do significativo declínio da incidência do câncer de estômago, a sua mortalidade continua alta, sendo foco de importantes estudos, principalmente na área oncológica (GUIMARÃES & MUZI, 2012; MARTEL *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014). Dados estatísticos revelam o declínio desse tipo de câncer, especificamente nos Estados Unidos, Inglaterra e outros países mais desenvolvidos (FOCK, 2014; BRAY *et al.*, 2018). A alta mortalidade é registrada em sua maioria nos países em desenvolvimento, com taxas elevadas no leste

da Ásia, no leste Europeu e em partes da América do Sul e Central (CHIURILLO, 2014; BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2020). Demonstrando um importante caráter socioeconômico, atingindo em maior quantidade os grupos sociais mais baixos (RIBEIRO & NARDOCCI, 2013; FOCK, 2014; WIGGERS *et al.*, 2016; LORTET-TIEULENT *et al.*, 2020, VACCARELLA *et al.*, 2022).

De acordo com as estimativas do GLOBOCAN 2020, o câncer de estômago causou aproximadamente 800.000 mortes (representando 7,7% de todas as mortes por câncer) e ocupa a quarta principal causa de mortes por câncer em ambos os sexos combinados em todo o mundo (SUNG *et al.*, 2021; FERLAY *et al.*, 2021, ILIC & ILIC, 2022). Cerca de 1,1 milhão de novos casos de câncer de estômago foram diagnosticados em 2020 (representando 5,6% de todos os casos de câncer) (SUNG *et al.*, 2021; FERLAY *et al.*, 2021). Globalmente, a taxa de incidência de câncer de estômago em homens foi de 15,8 por 100.000 em 2020 e em mulheres 7,0 por 100.000 (SUNG *et al.*, 2021). As taxas de incidência são quase duas vezes maiores nos homens do que nas mulheres, apresentando variações geográficas significativas nas taxas de mortalidade (BRAY *et al.*, 2018, FERLAY *et al.*, 2021, ILIC & ILIC, 2022).

Porém, o maior número de casos ocorre no Japão, onde são encontrados 780 doentes por 100.000 habitantes (INCA, 2020). Esse fato é atribuído a dieta dos japoneses, que é caracteristicamente rica em alimentos salgados e pobre em frutas e legumes frescos, mas poderia haver também, a ocorrência de predisposições genéticas e fatores ambientais para o desenvolvimento de tumores gástricos nessa população (LIN *et al.*, 2014; SHIMAZU *et al.*, 2014; WCRF, 2016).

1.2 Câncer de Estômago

1.2.1 Anatomia do Estômago

O estômago é um órgão do tubo digestivo, caracterizando-se por ser um segmento dilatado, situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma, vindo logo após o esôfago e anteriormente ao duodeno (HALL & GUYTON, 2017). É dividido em cinco regiões: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro, e todas as regiões podendo ser acometidas pelo adenocarcinoma (Figura 5). As três primeiras partes do estômago (cárdia, fundo e corpo) são denominadas estômago proximal e as duas partes inferiores (antro e piloro) são denominadas estômago distal (HALL & GUYTON, 2017).

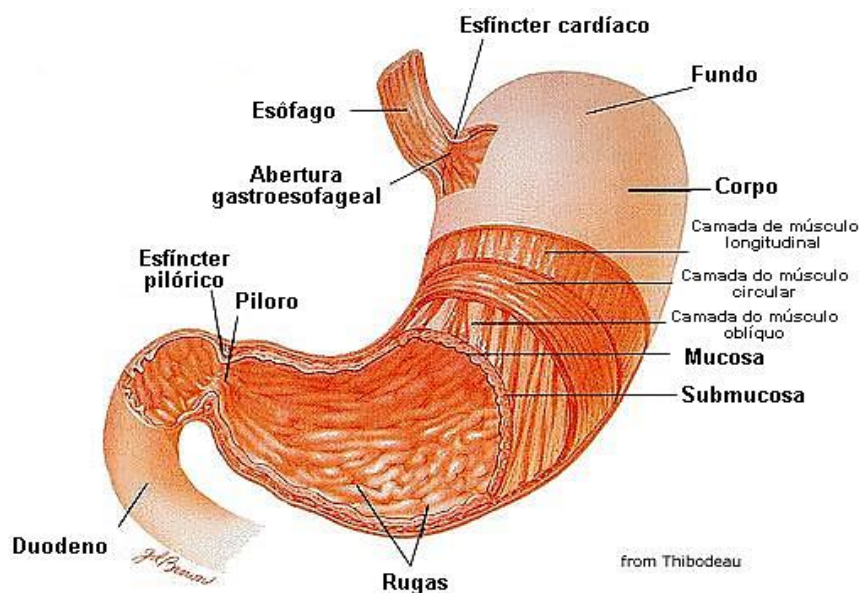


Figura 5 – Divisões anômicas do estômago. Uma parte da parede anterior foi seccionada e retirada para revelar as camadas musculares da parede gástrica (THIBODEAU & PATTON, 2002).

Esse órgão exerce as funções endócrinas e exócrinas, digerindo alimentos e secretando hormônios. É constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 6). A mucosa gástrica é um sistema celular dinâmico que demonstra uma alta taxa de proliferação celular e secreção

de enzimas digestivas, hormônios e citocinas (Figura 7) (TORTORA & DERRICKSON, 2016).

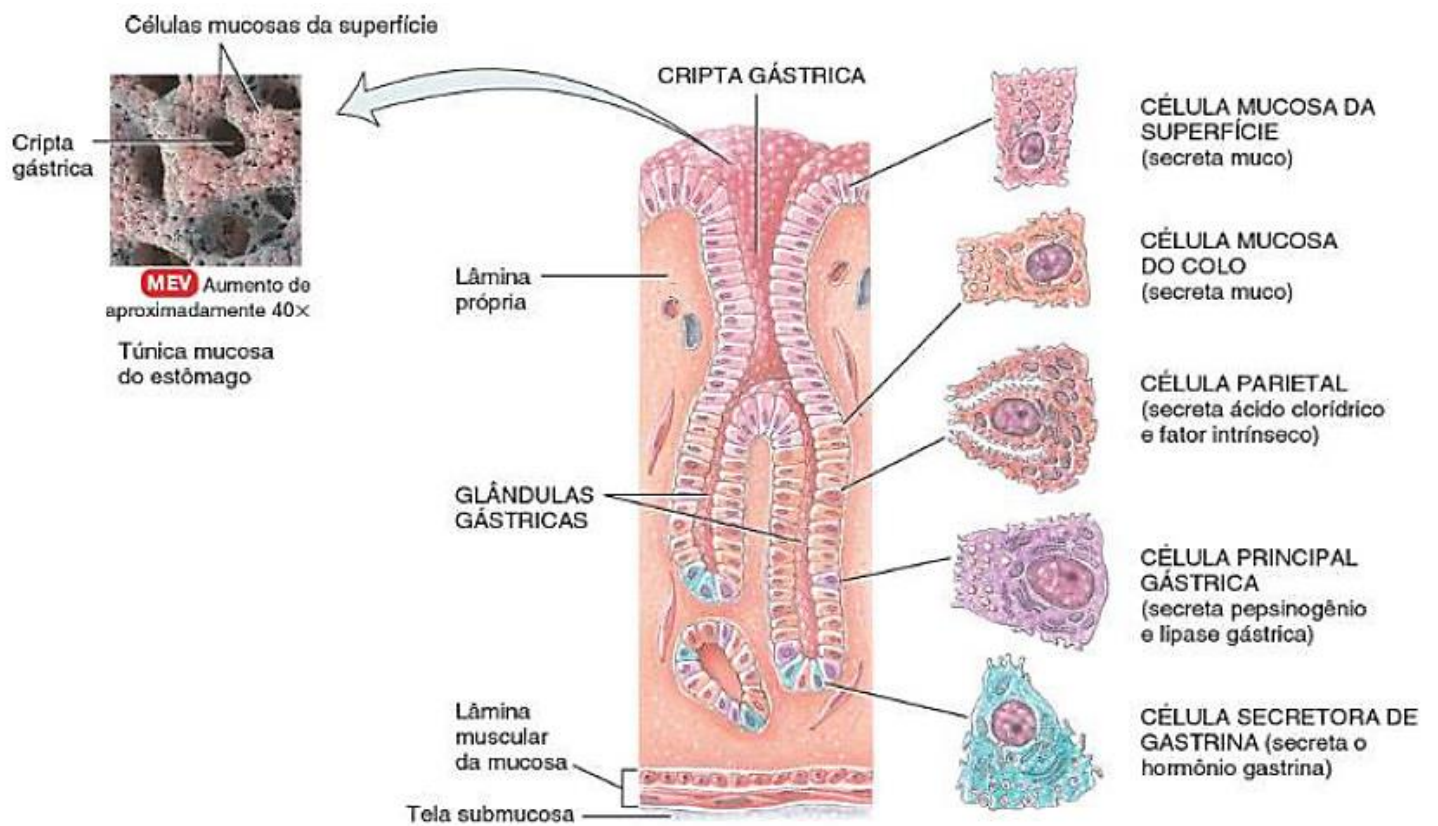


Figura 6 – Lâminas da mucosa gástrica (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020)

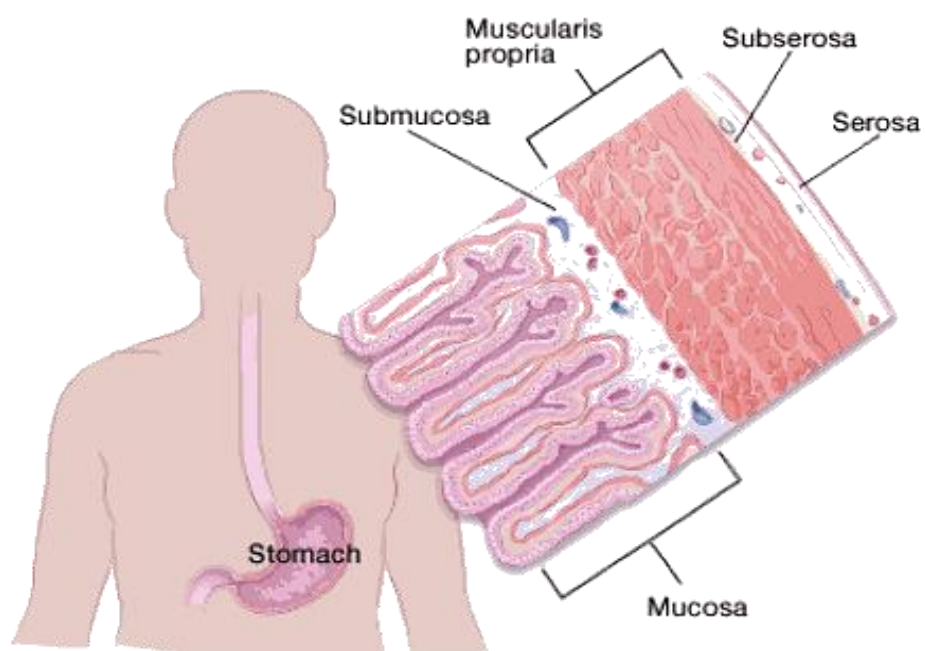


Figura 7- Vista em corte da túnica mucosa do estômago mostrando as glândulas e os tipos de células (TORTORA & DERRICKSON, 2016).

1.2.2 Adenocarcinoma Gástrico

O câncer do estômago é a mais frequente neoplasia que acomete o aparelho digestivo, podendo ser ocasionada, por vários fatores, quase sempre, resultantes de uma combinação das interações entre o meio com fatores genéticos (Figura 8) (CESAR et al., 2002, MAJEWSKI et al, 2022; ILIC & ILIC, 2022). Desenvolvem-se a partir de lesões sequências e progressivas na mucosa gástrica, durante um longo período (GULLO, et al, 2020). Cerca de 35% destes cânceres estão relacionados à dieta, bem como ao consumo de álcool, tabaco, exposição à luz solar, agentes químicos, infecções gástricas e condições hereditárias (MAGALHÃES, 2008; ZILBERSTEIN, 2013; PATEL et al, 2017, POOROLAJAL et al, 2020, MAJEWSKI et al, 2022; ILIC & ILIC, 2022)

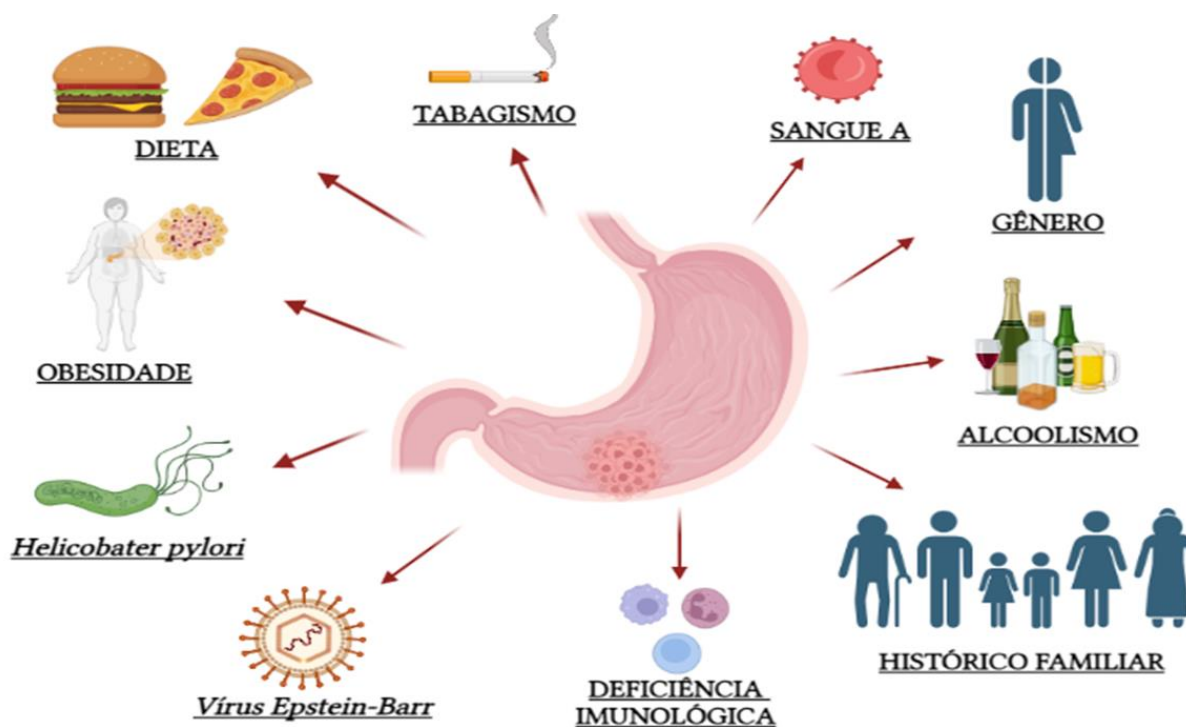


Figura 8: Principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de estômago (Criado pela autora)

Apresentam-se, predominantemente, na forma de três tipos histológicos: 1) Adenocarcinoma: originado das glândulas da camada da mucosa, responsável por 95% dos tumores diagnosticados; 2) Linfoma: que é originário do tecido linfóide e representa cerca de 3% dos casos; e 3) Leiomiossarcoma: iniciado em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos e representa 1 a 2% dos casos (SHI et al., 2014; INCA, 2020). O adenocarcinoma do estômago

localiza-se com mais frequência no antro e piloro (60%) e cárdia (25%). Dentre as possíveis classificações do adenocarcinoma gástrico, as mais utilizadas são de Borrmann (1926), de Laurén (1965), e da OMS (2010).

A classificação macroscópica mais utilizada para o adenocarcinoma gástrico invasivo é a de Borrmann, que subdivide as lesões em cinco categorias (TOWNSEND et al, 2015):

- a) **Borrmann 1** – Carcinoma Polipoide.
- b) **Borrmann 2** – Carcinoma Ulcerado com margens bem demarcadas e nenhuma infiltração.
- c) **Borrmann 3** – Carcinoma Ulcerado e Infiltrante com margens rasas e pouco definidas.
- d) **Borrmann 4** – Carcinoma Infiltrativo difuso.
- e) **Borrmann 5** – Câncer gástrico, cuja definição não se encaixa em nenhuma das descrições anteriores.

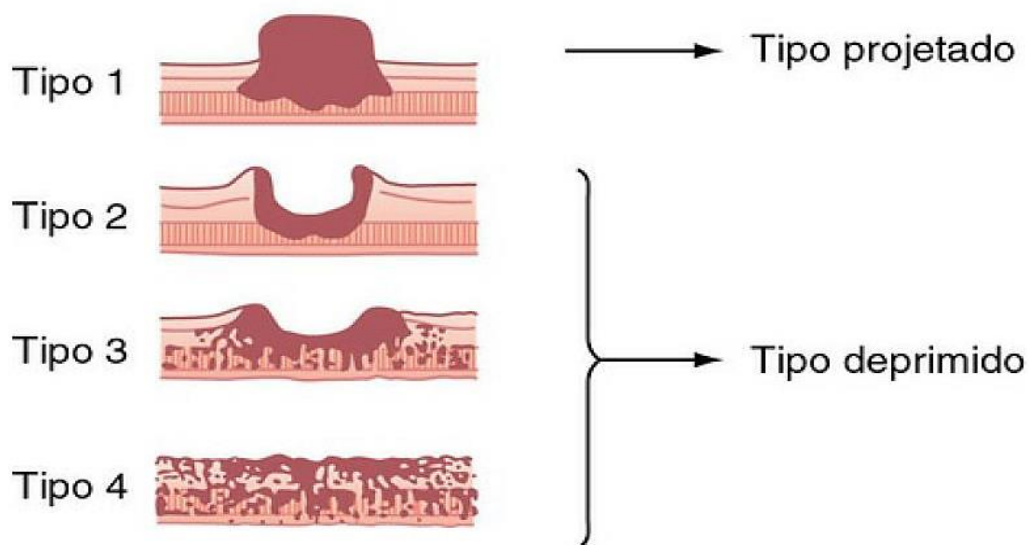


Figura 9: Classificação Macroscópica de adenocarcinoma gástrico, segundo Borrmann (TOWNSEND et al, 2015).

A classificação de Lauren, para diferenciar o adenocarcinoma, é a mais utilizada e separa em dois tipos distintos histologicamente: difuso e intestinal (LAUREN, 1965; NAGINI, 2012; QUI et al., 2013). O tipo difuso é formado por células que, de forma desorganizada, infiltram no estroma gástrico levando a um espessamento disseminado da parede do estômago, com formação glandular

escassa. Pode ser composto majoritariamente por células em anel de sinete, que se caracterizam pela presença de citoplasma abundante, o qual desloca o núcleo para a periferia e produz grande quantidade de mucina. O prognóstico dessa forma é pior, comparado ao tipo intestinal, e pode afetar indivíduos mais jovens e sem fatores de risco associados (Figura 10 a) (KUNZ et al., 2012; PIAZUELO & CORRÊA, 2013; GOLDMAN & AUSIELLO, 2016).

O Intestinal se caracteriza por células glandulares diferenciadas que infiltram no estroma gástrico. Elas podem apresentar diferentes graus de atipia celular, que é precedida por outras alterações celulares. Provavelmente a partir de uma gastrite atrófica, surge uma metaplasia e em seguida uma displasia, que configura a lesão pré-neoplásica. O tipo intestinal, por ser desencadeado a partir de um quadro de atrofia, está intimamente associado a fatores de risco como a gastrite, infecção por *Helicobacter pylori* e fatores alimentares (Figura 10 b) (PIAZUELO & CORREA, 2013; CARCAS, 2014; GOLDMAN & AUSIELLO, 2016).

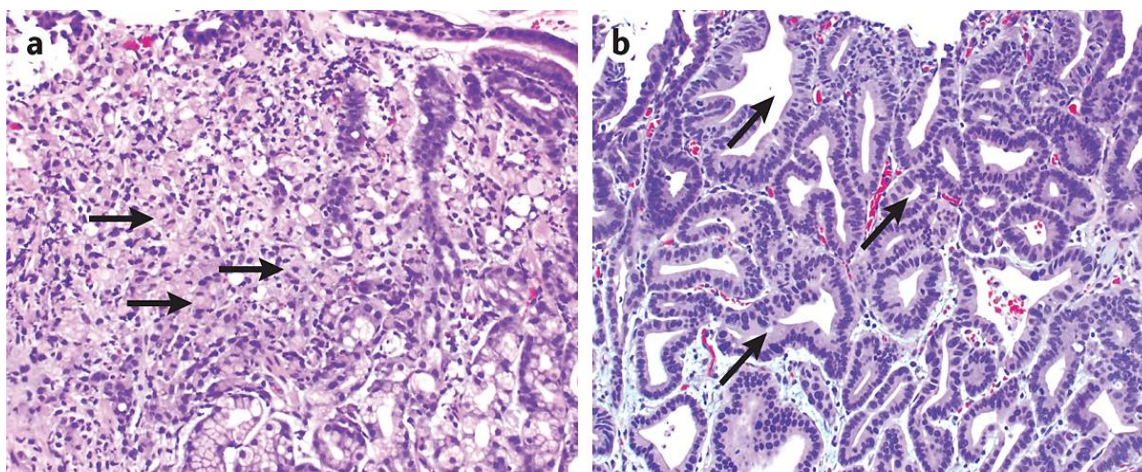


Figura 10 - Classificação histológica do adenocarcinoma gástrico. A) Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso, com muitas células cancerígenas isoladas de outras células. As setas apontam para células do anel de sinete, nas quais o núcleo é empurrado para a periferia do citoplasma. B) Adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. As setas estão apontando para a formação de glândulas pelas células tumorais (AJANI et al, 2017).

A OMS considera o padrão histológico encontrado e classifica os tumores gástricos de uma forma mais ampla de acordo com o padrão predominante, incluindo os adenocarcinomas e suas variantes, relatando outros tipos histológicos menos comuns (Tabela 1) (OMS, 2014).

Tabela 1: Classificação do câncer gástrico comparando a classificação de Lauren (1965) e a classificação proposta pela OMS (2010).

Classificação de Lauren (1965)	Classificação da Organização Mundial da Saúde (2010)
Tipo Intestinal	Adenocarcinoma Papilar Adenocarcinoma Tubular Adenocarcinoma Mucinoso
Tipo Difuso	Carcinoma com células em anel de sinete e outros carcinomas adesivos
Tipo Indeterminado	Carcinoma Misto Carcinoma adenoescamoso Carcinoma de células escamosas Adenocarcinoma hepatóide Carcinoma com estroma linfóide Coriocarcinoma Carcinossarcoma Carcinoma de células parietais Tumor rabdoide maligno Carcinoma mucocépidermoide Carcinoma de células de Paneth Carcinoma indiferenciado Carcinoma misto adenoneuroendócrino Tumor do seio endodérmico Carcinoma embrionário Tumor gástrico puro “yolk sac” Adenocarcinoma oncocítico

A American Joint Committee on Cancer (AJCC) utiliza o sistema TNM, que se baseia na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases a distância (M). Os parâmetros TNM expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. As combinações dos parâmetros se distribuem em estádios que variam de I a IV, que são subclassificados em A, B e C para expressar o nível de evolução da doença (Tabela 2) (BRASIL, 2018).

Tabela 2. Estadiamento do câncer gástrico conforme American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8ª edição

Resumo da classificação clínica TNM			
Tx	O tumor não pode ser avaliado.	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
T0	Sem evidência de tumor primário.	N0	Sem invasão linfática regional.
Tis	Tumor <i>in situ</i> /displasia de alto grau: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.	N1	1 a 2 linfonodos regionais acometidos.
T1	O tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa (T1a) ou submucosa (T1b).	N2	3 a 6 linfonodos regionais acometidos.
T2	O tumor invade a muscular própria.	N3	7 ou mais linfonodos regionais acometidos.
T3	O tumor invade a subserosa.	N3a	7 a 15 linfonodos regionais acometidos.
T4	O tumor perfura a serosa (T4a) ou invade estruturas adjacentes (T4b).	N3b	16 ou mais linfonodos regionais acometidos.
M0 Sem metástase à distância			
M1 Metástase à distância			
Grupamento por estádios patológicos			
EC 0	Tis	N0	M0
EC IA	T1	N0	M0
EC IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
EC IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
EC IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
EC IIIA	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
	T4b	N0	M0
EC IIIB	T4b	N1- N2	M0
	T4a	N3a	M0
	T3	N3a	M0
	T2	N3b	M0
	T1	N3b	M0
EC IIIC	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a	M0
	T4b	N3b	M0
	T3	N3b	M0
EC IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

T= Indica o tamanho do tumor primário e até onde se disseminou.

N= Descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos regionais próximos.

M= Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo, como fígado e pulmão.

TX (Tumor principal que não pode ser avaliado por falta de informação).

T0 (Sem evidência de tumor primário).

NX (linfonodos regionais, que não podem ser avaliados devido à falta de informação).

1.3 *Tratamentos*

1.3.1 *Tratamentos Convencionais*

Na maioria dos casos, o diagnóstico do câncer gástrico é realizado em estágios avançados, pois nos estágios iniciais, as lesões são normalmente assintomáticas, não havendo sintomas específicos para essa doença (MURARO, 2003; CORREA, 2013). O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento, no entanto é estimado que dez ou mais anos se passam entre a exposição à fatores externos e a detecção do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

São comumente utilizados dois exames para o diagnóstico: a endoscopia digestiva alta, o método mais eficiente, e o exame radiológico contrastado do estômago. A endoscopia permite a avaliação visual da lesão, a realização de biópsias e a avaliação citológica (HAMASHIMA & GOTO, 2017). Na radiografia contrastada do estômago, os raios-x delineiam o interior do esôfago e estômago e o médico procura por áreas anormais ou tumores.

As camadas são importantes para determinar o estadiamento da doença e prognóstico do paciente. Quando o tumor se desenvolve a partir da mucosa para as camadas mais profundas, o estadiamento torna-se mais avançado e o prognóstico mais difícil de tratamento. O estágio do cancro do estômago pode ser classificado da seguinte forma (Figura 11):

Estádio 0 - há presença de células de câncer na mucosa, também chamado de carcinoma *in situ*;

- a) **Estádio I** - o câncer invadiu até à submucosa e pode ter invadido 1 a 2 gânglios linfáticos;
- b) **Estádio II** – o câncer invadiu até à camada serosa e pode ter invadido até 7 ou mais gânglios linfáticos;
- c) **Estádio III** - o câncer invadiu órgãos vizinhos como o baço, o cólon, o fígado, o diafragma, o pâncreas, os rins, as glândulas suprarrenais ou o intestino delgado;

d) **Estádio IV** - o câncer espalhou-se para outros órgãos à distância.

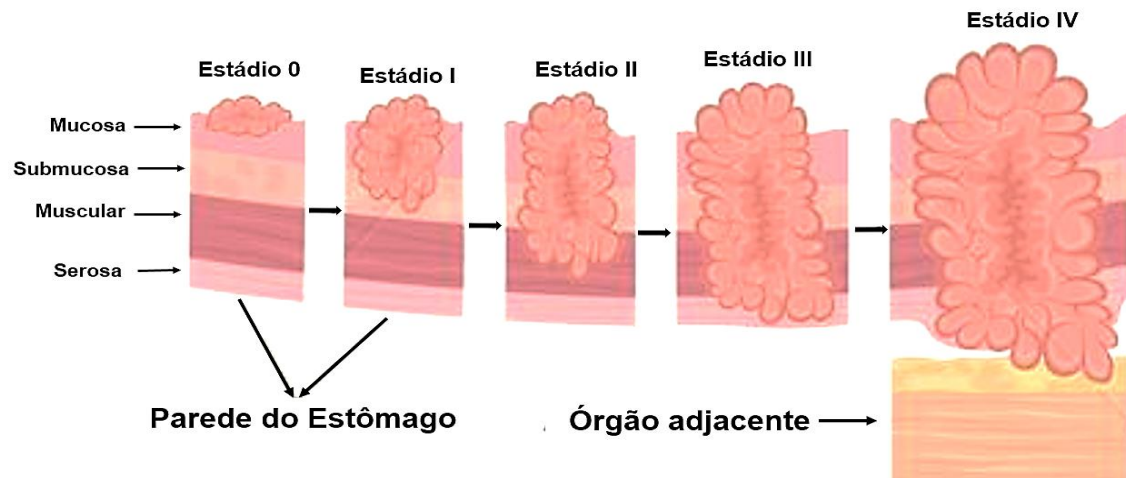


Figura 11: Estádios do câncer de estômago: classificação de acordo com a malignidade do tumor (Adaptado de <https://www.canstockphoto.com.br/>, 2020).

Tendo em conta o estadiamento, a equipe clínica avaliará o melhor tratamento a seguir caso a caso:

- a) **Estádios 0 e I** – a opção de tratamento é a cirurgia, através da realização de uma gastrectomia;
- b) **Estádios II e III** – a opção de tratamento incluem para além da gastrectomia, a quimioterapia; eventualmente poderá recorrer-se à radioterapia;
- c) **Estádio IV** - a opção de tratamento consiste na quimioterapia; eventualmente poderá recorrer-se a radioterapia.

O procedimento cirúrgico para o cancro do estômago é a gastrectomia, que consiste na remoção parcial ou total do estômago e dos gânglios linfáticos vizinhos. Para determinar a melhor abordagem cirúrgica, deve-se considerar a localização, tamanho, padrão e extensão da disseminação e tipo histológico do tumor (BEST et al, 2016; ETOH et al, 2017). A radioterapia e a quimioterapia são consideradas tratamentos secundários, que podem determinar a melhor resposta da cirurgia.

A quimioterapia pode ser pré-operatória (prévia ou dita neoadjuvante), perioperatória ou pós-operatória (adjuvante), associada ou não à radioterapia, dependendo do estágio da neoplasia e das condições do paciente (OHRI et al,

2013; WAGNER et al, 2017). Para o tratamento de câncer do estômago, são usualmente utilizados os seguintes medicamentos: 5-FU, Capecitabina, Carboplatina, Cisplatina, Docetaxel, Epirubicina, Irinotecano, Oxaliplatina e Paclitaxel (Tabela 3) (LORENZEN et al, 2020; PETRIOLI et al, 2020).

Tabela 3 – Quadro com as combinações de medicamentos comumente utilizados e o momento em que poderá ser utilizado. (Criado pela autora)

Medicamentos	Neoadjuvante	Adjuvante	Avançado	Combinado com Radioterapia
ECF (Epirubicina, Cisplatina e 5-FU)	+	+	+	
Docetaxel ou Paclitaxel + 5-FU ou Capecitabina	+			+
Cisplatina + 5-FU ou Capecitabina	+			+
Paclitaxel e Carboplatina	+			+
5-FU ou Capecitabina		+		+
DCF (Docetaxel, Cisplatina e 5-FU)			+	
Irinotecano + Cisplatina			+	
Irinotecano + 5-FU ou Capecitabina			+	
Oxaliplatina + 5-FU ou Capecitabina.			+	

1.3.2 *Docetaxel*

Docetaxel (DTX) é um dos quimioterápicos utilizados amplamente no tratamento de primeira linha nos carcinomas de mama, ovário, bexiga, próstata, gástrico e pulmão de células não pequenas (CORTES et al., 1995; MORSE et al., 2005; PARK et al., 2011; GAO et al., 2015, ZHANG et al. 2019, SHARMA et al., 2021, CHMIELEWSKI & LIMOLI, 2022, SUN et al, 2022). Consta na lista modelo de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde, como um dos principais quimioterápicos necessários para a manutenção da saúde pública (WHO, 2017).

Compõe o grupo farmacológico denominado “Taxanos”, que são derivados de uma substância natural encontrada na casca do teixo, a *Taxus*

baccata, uma árvore que produz substâncias tóxicas (taxinas) e também medicinais (taxol) (OJIMA et al, 2016, LANGE & CONNER, 2021, SHARMA et al., 2021). São quimioterápicos semi-sintéticos e possuem mecanismos de ação diferente da maioria dos agentes antineoplásicos, pois agem com o foco específico nos heterodímeros de tubulina, componente chave dos microtúbulos celulares, com o objetivo de quebrar o equilíbrio celular, resultando em apoptose (MONTERO et al., 2005; LORENZEN et al, 2020, CHMIELEWSKI & LIMOLI, 2022, SUN et al, 2022, PEREZ-MATAS et al, 2022).

Os taxanos, entretanto, se ligam a β -tubulina das células e promovem a polimerização dos microtúbulos, mesmo na ausência da GTP e das proteínas associadas (WANG et al, 2022) Uma vez ligados, os microtúbulos não podem mais ser despolimerizados e se tornam mais estáveis, interrompendo a mitose na fase G2M do ciclo celular (Figura 12). Como consequência do bloqueio do ciclo de divisão natural da célula, ocorre a inibição da proliferação celular (NEHMÉ et al., 2001; JORDAN et al., 2004; VIAL et al., 2008, CHMIELEWSKI & LIMOLI, 2022, SUN et al, 2022).

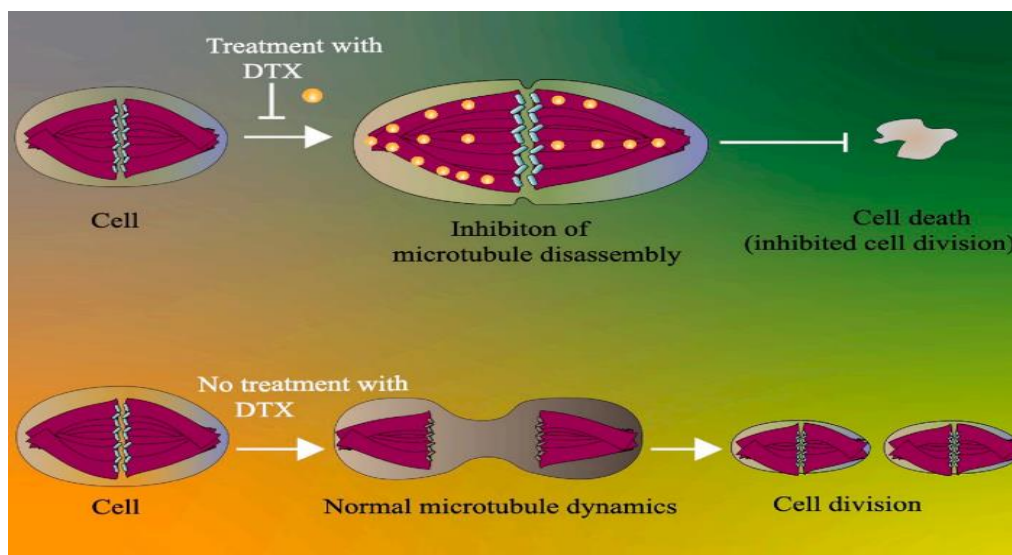


Figura 12. Mecanismo de ação do Docetaxel no tratamento do câncer. O DTX se liga às β -tubulinas e promove sua montagem em microtúbulos, inibindo simultaneamente a desmontagem que leva à estabilização dos microtúbulos e resulta na inibição das funções celulares mitóticas e interfásicas, causando parada do ciclo celular e, finalmente, levando à morte celular (IMRAN et al.; 2020).

O DTX apresenta-se com um perfil farmacocinético bem definido, composto por três compartimentos com meias-vidas de 4,5 min, 38,3 min e 12,2

h para as fases alfa, beta e gama, respectivamente. A dose aprovada de DTX está entre 75 e 100 mg/m², no entanto, a dose padrão pode variar dependendo do tipo de câncer e tratamento aplicável (IMRAN, M. et al.; 2020). É um composto lipofílico e sofre oxidação ao ser internalizado na célula, gerando então o metabólito ativo com ação farmacológica. Sua baixa solubilidade aquosa, coeficiente de partição e alto peso molecular, bem como outras propriedades físico-químicas, tornam sua veiculação uma limitação clínica (Tabela 4) (ZHAO et al., 2010; JAIN et al., 2016).

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas do Docetaxel

Peso Molecular	807,89 g/mol
Fórmula Molecular	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄
Ponto de Fusão	232 ° C
Solubilidade em água	0,274 mg/L
Absorções máximas no UV	230, 275, 283 nm
pKa	10,96
logP	2,59

Além disto, a formulação comercial contendo docetaxel (Taxotere) emprega o uso de polissorbato 80, um tensoativo não-iônico relacionado a reações de hipersensibilidade (DOU et al., 2014). O tratamento com taxanos sabidamente causa uma série de efeitos adversos relacionados com a dose utilizada, que vão desde reações alérgicas e toxicidade dermatológica até alterações hematológicas (MARTINS et al., 2010; ZHAO et al., 2012; KRASNOPOLSKY et al., 2017).

1.3.3 Nanotecnologia

Atualmente, a comunidade científica está focada na busca por novas moléculas, novos métodos ou rotas para controlar a farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade não específica, imunogenicidade, bioreconhecimento e eficácia de medicamentos. Estas estratégias são comumente chamadas de novos sistemas de distribuição de medicamentos

(NDDS) e baseiam-se em abordagens interdisciplinares que combinam ciência de polímeros, farmacêutica, química de bioconjugados e biologia molecular (PALIWAL et al, 2020).

Nanomateriais à base de lipídios são considerados os melhores veículos para sistemas de distribuição de medicamentos, devido às suas diversas propriedades, como natureza anfifílica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e multifuncionalidade (GHASEMIYEH & MOHAMMADI-SAMANI, 2018). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram introduzidas pela primeira vez em 1991, como um sistema alternativo de transporte de medicamentos e mudaram a dimensão da entrega de medicamentos, combinando todas as características vantajosas das nanopartículas poliméricas, lipossomas e microemulsões (ELDEM et al, 1991; YANG et al, 1999; PARDEIKE et al, 2009; XU et al, 2021).

As NLS são um sistema de entrega coloidal feito de lipídios sólidos e estabilizados com surfactante, se apresentando, sólidos tanto à temperatura fisiológica quanto à temperatura ambiente, com tamanhos de partícula variando de 50 a 500 nm (SOUTO & MULLER, 2008; MISHRA et al, 2018; XU et al, 2021). Devido as suas propriedades únicas, em comparação aos outros sistemas de transporte de medicamentos, as NLS emergiram como um sistema eficiente para o tratamento de diversos tipos de câncer como câncer de mama, colorretal, pulmão, próstata e cerebral (AKANDA et al, 2023). Além de suas atividades antitumorais, as NLS também são capazes de dificultar as interações adesivas entre células cancerígenas (DIANZANI et al, 2014). Também oferecem vantagem relacionadas aos aspectos biofarmacêuticos do tráfego de nanopartículas *in vivo* (PALIWAL et al, 2020; KORAKE et al, 2023).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanoformulações para entrega de DTX recebeu enorme interesse devido às vantagens de propriedades farmacocinéticas melhoradas, eficácias melhoradas e capacidade de reduzir efeitos colaterais. Com base em dados pré-clínicos anteriores, foi demonstrado que os NLS são superiores ao Taxotere em termos de administração de DTX (SUMERA et al, 2017, ROCHA et al, 2020; KORAKE et al, 2023).

Algumas das novas formulações de DTX exibiram alta eficácia antitumoral e entraram em diferentes fases de ensaios clínicos para completar a formulação (CHAURAWAL & RAZA, 2023). Entretanto, existem muitos desafios que não

foram superados, incluindo problemas de fabricação e segurança no controle de qualidade, até o momento não existem nanocarreadores DTX comerciais no mercado (CHAURAWAL & RAZA, 2023). A encapsulação do docetaxel em nanopartículas lipídicas sólidas poderá reduzir os efeitos colaterais, melhorar a sua eficácia e o tratamento do tumor (MARTINS et al., 2010; ZHAO et al., 2012, MCKEAGE, 2017). Mais atenção deve ser dada ao desenvolvimento de novas estratégias de direcionamento que possam reduzir os efeitos colaterais tóxicos e indesejados do DTX, para se estabelecer um tratamento para um tumor, sem comprometer os demais tecidos.

2. *JUSTIFICATIVA*

Vale ressaltar que o câncer gástrico vem ganhando cada vez mais visibilidade entre as causas de morte por câncer, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública mundial. Em sua fase inicial, por raramente provocar sintomas, torna-se difícil o diagnóstico precoce, diminuindo as chances de cura do paciente. Atualmente, a quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos utilizados, entretanto, seus efeitos negativos podem causar danos permanentes ao paciente. Dessa maneira, surge a necessidade de buscar novas terapias que sejam mais específicas as células do tumor e menos tóxicos ao organismo, sem danificar as células saudáveis. A nanotecnologia através da formulação de NLS, torna isso possível, através da utilização desses carreadores que podem ser adaptados a diversas vias de administração, favorecendo o transporte dos fármacos diretamente para as células cancerosas e sua liberação controlada no local alvo.

3. *OBJETIVO*

O objetivo principal desse trabalho consiste em avaliar o efeito do tratamento das Nanopartículas Lipídicas associadas ao Docetaxel (NLS-DTX) em células de Adenocarcinoma Gástrico Humano (AGS). A partir dos resultados dos testes de viabilidade celular e da determinação do IC₅₀, esse trabalho foi dividido em três vertentes: I- estudos de adesão, proliferação, migração e reparo celular, II - estudos de internalização e III - estudos do metabolismo celular.

4. *DESENHO EXPERIMENTAL*

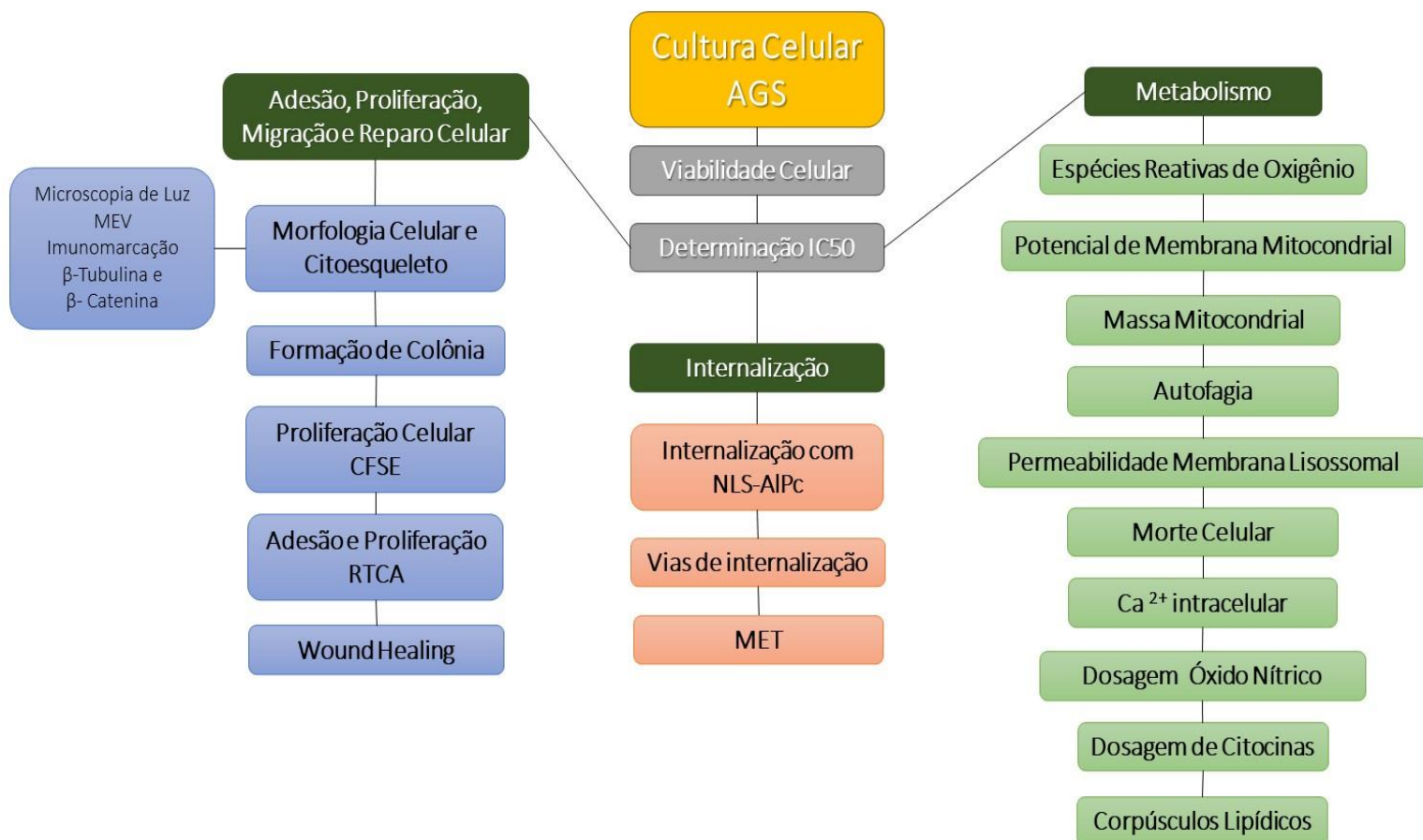


Figura 13: Desenho experimental

CAPÍTULO I – ADESÃO, PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO e REPARO CELULAR

1. INTRODUÇÃO

As células interagem de forma dinâmica com o ambiente, adequando a sua estrutura e função para responder às mudanças e a exposição a fatores extracelulares (HUANG et al, 2021; KOLIARAKI et al, 2022). Para manter o meio intracelular regulado, as células diferenciadas exercem uma série de funções que permite a manutenção das suas atividades normais e preservam a sua viabilidade, garantindo a homeostase dos tecidos (HARRIS & DENICOLA, 2020; LAFITA-NAVARRO & CONACCI-SORRELL, 2023).

Esse processo envolve um rigoroso controle de crescimento, diferenciação e morte celular programada, onde a passagem de cada fase do ciclo celular é regulada por diversas proteínas (DÍAZ-CORÁNGUEZ et al, 2019). Onde tais proteínas podem sofrer alterações que desestabilizam o andamento correto do ciclo celular, levando a uma proliferação celular descontrolada, dando início a formação de um processo neoplásico (Figura 14) (DÍAZ-CORÁNGUEZ et al, 2019; WALEN, 2020).

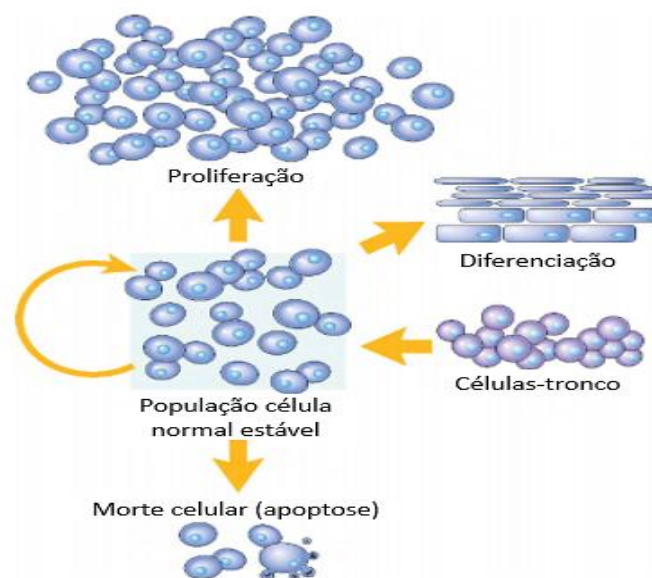


Figura 14: Mecanismos de regulação de tamanho das populações celulares. Patologia básica. Fonte: Robbins, 2013.

O citoesqueleto é uma rede complexa de proteínas intracelulares, que é responsável pela execução de diversas atividades essenciais para o funcionamento dos organismos vivos, determinando fatores como a capacidade para que uma célula mantenha um determinado formato, manutenção da polaridade, contração celular, separação de cromossomos durante a divisão celular, comanda toda a movimentação de organelas e vesículas citoplasmáticas dentro das células, como também a movimentação de toda a célula no ambiente (ALBERTS et al., 2017; HOHMANN & DEGHANI, 2019; MATTHEW et al, 2019).

Para que ocorra a manutenção e o crescimento celular há a necessidade tanto de um constante fornecimento de energia quanto a presença de elementos estruturais de base necessário para a síntese de macromoléculas (LACROIX et al, 2020; SAIZ et al, 2020; SCHILIRO & FIRESTEIN,2021). Apesar de muitos fatores que promovem o crescimento celular, serem proteínas que estimulam a proliferação e/ou sobrevivência da célula, devemos ressaltar que elas também podem desencadear processos como migração, diferenciação e a habilidade para a síntese (SAIZ et al, 2020; ISHIHARA & HAGA, 2022).

As células interagem e se comunicam entre si por meio de junções intercelulares que fornecem elos mecânicos e permitem que os receptores de superfície reconheçam seus ligantes em outras células (DÍAZ-CORÁNGUEZ et al, 2019). A proliferação celular é de grande importância para o desenvolvimento, manutenção do equilíbrio homeostático tecidual, manutenção do tamanho populacional e substituição de células mortas ou danificadas (BALASUBRAMANIAM et al, 2019; ANDRÉS-SÁNCHEZ et al, 2022). Os elementos-chave para que haja proliferação celular são a replicação precisa do DNA e a mitose (MATTHEWS et al, 2022).

O tamanho normal das populações celulares é determinado por um equilíbrio entre proliferação celular, morte celular por apoptose e diferenciação de novas células a partir de células-tronco (ZHOU et al, 2019; NOVIKOV et al, 2021). Quando ocorre um dano ou lesão no tecido, vários tipos de células proliferam na tentativa de reparar o tecido danificado (HARRELL et al 2021; NOVIKOV et al, 2021; YUE et al, 2023). A eficiência do reparo dos tecidos é determinada pela capacidade intrínseca de proliferação (Figura 15) (SOBRAL et al, 2022).

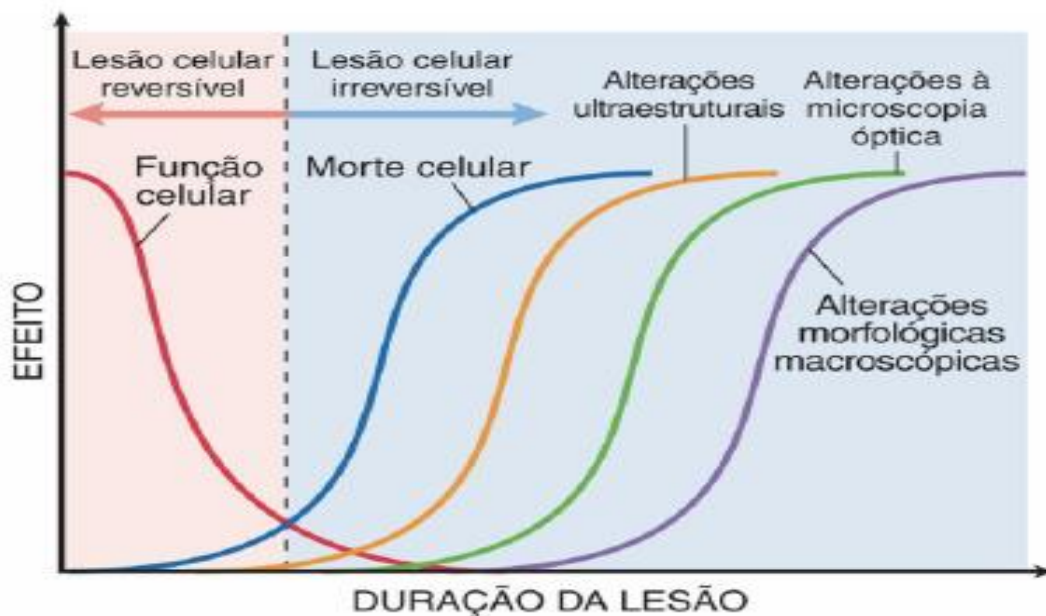


Figura 15: Relação entre função celular, morte celular e alterações morfológicas na lesão celular. Patologia básica. Fonte: Robbins, 2013.

Na maioria dos processos mutacionais, senão em todos, uma única lesão precursora não é suficiente para transformar uma célula saudável em uma célula cancerosa, surgindo a necessidade de mutações adicionais para haver a transição para o câncer (NOVIKOV et al, 2021; MATTHEWS et al, 2022). Sendo a carcinogênese, um processo complexo de múltiplas etapas decorrentes de várias modificações genéticas que em conjunto transformam o fenótipo e adquirem todas as características associadas (EASWARAN et al 2014; VEZZANI et al, 2022).

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento com as NLS-DTX na adesão celular, proliferação celular, migração e invasão das células de adenocarcinoma gástrico, bem como a dinâmica do citoesqueleto.

2.2 Específico

- Analisar o efeito citotóxico das NLS-DTX nas células AGS e fibroblastos;
- Descrever as alterações morfológicas, estruturais e no citoesqueleto das células AGS após o tratamento com NLS-DTX;
- Avaliar os efeitos das NLS-DTX sobre a capacidade de formar colônia, recuperação e proliferação nas células AGS após o tratamento;
- Avaliar os efeitos do tratamento das NLS-DTX sobre a adesão e proliferação celular na linhagem AGS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

A linhagem AGS foi obtida a partir do banco de células do Rio de Janeiro e cultivada em meio DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica e 10% de SFB. As células de cultivo primário de tecido conjuntivo composto prioritariamente de fibroblastos foram extraídas de polpa dentária no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília - UnB sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília (UnBDOC 104934/2008) e cultivada em meio DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica, 10% de SFB. Todas as células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO₂.

3.2 Processamento da formulação de Nanopartícula Lipídica Sólida

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (Figura 16) utilizadas foram formuladas em parceria com a Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB, cujo formulação foi previamente descrita por da Rocha et al. (2020) para NLS e NLS-DTX e Muehlmann et al. (2015) para NLS-AIPc. Foram utilizadas três formulações diferentes: (1) NLS-BRANCA (NLS) e (2) NLS associada com 1mg/mL de docetaxel (NLS-DTX) e (3) NLS associado com cloreto de alumínio-ftalocianina (30 mM) (NLS-AIPc).

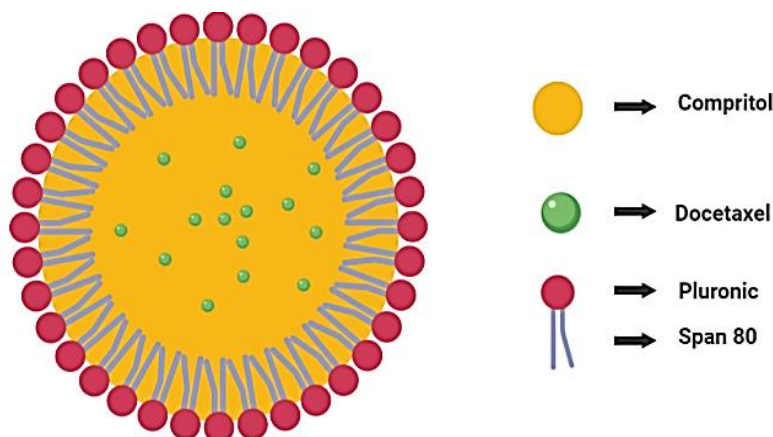


Figura 16: Ilustração esquemática da Nanopartícula Lipídica Sólida associada ao Docetaxel (NLS-DTX) (Criada pela autora).

Para analisar o padrão de internalização das NLS nas células AGS foi feita a associação da NLS com cloreto de alumínio-ftalocianina, uma substância que apresenta um alto coeficiente de emissão espectral na faixa de comprimentos de onda 650-850 nm, correspondendo ao intervalo da região do vermelho visível. O docetaxel por ser uma molécula não fluorescente, impede este tipo de análise. Portanto, essa formulação foi feita exclusivamente para este e para o experimento de avaliação das vias de internalização da NLS.

As NLS foram preparadas pelo método de homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha). As fases oleosas e aquosas foram pesadas separadamente e aquecidas a 80°C. A fase oleosa (compritol ATO 888, span 80 e pluronic F127) foi homogeneizada até completa dispersão do docetaxel e fusão dos lipídeos, mantendo a temperatura a 80°C. A fase aquosa (PBS) foi lentamente vertida sobre a fase oleosa sob agitação em Ultra-Turrax, mantendo a temperatura de 80°C por 10 minutos a 10.000 rpm, formando uma pré-emulsão óleo em água (Figura 12). Após formulada, as NLS foram armazenadas a temperatura ambiente.

O diâmetro hidrodinâmico das NLS-DTX foi obtido por dispersão dinâmica de luz (DLS). O DH médio foi de $128 \pm 2,2$ nm e o índice de polidispersão de $0,153 \pm 0,02$. O valor do potencial zeta variou entre -11 a -15 mV. O tamanho médio das partículas NLS-Branca é de 110 nm e das NLS-DTX é de 120 nm. Estando de acordo com as formulações anteriores e possuindo a mesma estabilidade, das NLS produzidas em estudos anteriores no nosso laboratório.

3.3 Ensaio da Viabilidade Celular

A viabilidade das células AGS e fibroblastos, tratadas com (1) NLS-BRANCA, (2) NLS-DTX e (3) DTX foram determinadas através do ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Foram semeadas 5×10^3 células das duas linhagens em placas de 96 poços. Após 24 h, foram tratadas com DTX e NLS-DTX nas concentrações seguintes: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, e 100 µg/mL de fármaco presente na formulação completa e com NLS no volume equivalente a cada concentração utilizada. Passadas 24, 48 ou 72 h, o tratamento foi retirado

e acrescentado 150 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e incubado por três horas. Após incubação, esta solução foi retirada e adicionado 200 μ L DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices). O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada tratamento e concentração utilizada, e ainda foram realizados três experimentos independentes. Os valores da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para as células AGS e Fibroblasto foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT. O cálculo foi feito utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc).

3.4 Ensaio de Formação de Colônia e Recuperação Celular

O ensaio de formação de colônia é um teste de sobrevivência celular onde é possível analisar a capacidade das células em se proliferarem e de formarem colônias após algum tipo de tratamento. Para esse teste, primeiro as células AGS, foram semeadas 5×10^3 por poço em placas de 24 poços e após sua adesão foram tratadas com 10 μ g/mL de docetaxel presente nas formulações NLS-DTX, e DTX e NLS no volume equivalente as NLS-DTX, por 24 h. Passado o tempo de tratamento, a solução foi retirada dos poços e as células sobreviventes foram lavadas duas vezes com PBS 1X e depois desaderidas com auxílio de tripsina-EDTA. Cada grupo experimental foi contado e conferida a viabilidade das células com o corante azul de tripan 0,4%, depois 3×10^2 foram semeadas em placas de 6 poços com meio DMEM comum. As células ficaram em cultivo por 12 dias, com o meio de cultivo sendo renovado, a cada dois dias.

As colônias então formadas foram processadas para a observação. O meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados cuidadosamente duas vezes com PBS. As colônias foram fixadas com metanol puro por duas vezes, 5 min cada banho. Para corar as células, foi utilizado cristal violeta 0,5% em água destilada e incubada por 5 min. O corante foi removido e os poços foram lavados com água corrente.

As imagens das colônias foram obtidas através do microscópio Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) com aumento de 10x e 20x e observadas no estereoscópio LEICA M205 C (Leica – Alemanha) com aumento de 5x, e as imagens foram obtidas usando uma câmera LEICA DFC295 (Leica – Alemanha) com o auxílio do software Leica Application Suite (Leica – Alemanha).

3.5 Análise da morfologia das células AGS por Microscopia de Luz

Para analisar a morfologia das células, foram plaqueadas 5×10^5 células da linhagem AGS em placas de 12 poços. Após aderidas, as células foram tratadas por 24 h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX ou apenas o meio de cultura (controle). As imagens foram obtidas com o auxílio do software Axio Vision no Microscópio de luz Axiovert (Zeiss, Alemanha) do Laboratório de Virologia da Universidade de Brasília – UnB.

3.6 Análise da morfologia das células AGS por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para visualizar as diferenças na morfologia da superfície celular as células AGS foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As células das linhagens AGS, 5×10^5 células por poço, foram semeadas sobre lamínulas 18x18mm colocadas no fundo da placa de 6 poços. Após adesão, as células foram tratadas por 24 h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX ou apenas o meio de cultura (controle). As células aderidas na lamínula foram processadas para análise em MEV. O meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PSB 1X, e depois fixadas com a solução Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2) *overnight* à 4°C. No dia seguinte, o fixador foi descartado e as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M. As células foram pós-fixadas por 30 min no vapor de tetróxido de ósmio 2%. Depois as células foram lavadas com água destilada, e desidratadas em série com acetona (30-100%). As células passaram por secagem ao ponto crítico (CPD 030, BALZERS, EUA) e depois

foram metalizadas (SCD 500, LEICA, Germany) para serem analisadas no MEV (JEOL, JSM-700 1-F, Japão).

3.7 Ensaio de Imunomarcção da β -Tubulina

Para visualizar os efeitos das NLS-DTX nos microtúbulos, foi realizada a imunomarcção das células com o anticorpo anti- β -tubulina. Foram semeadas 3×10^5 células AGS sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com NLS-DTX e DTX na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ de docetaxel e NLS volume equivalente ou receberam apenas meio de cultivo (controle) por 24 h. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura e meio com tratamento foram retirados e as células foram fixadas com paraformaldeído 3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Depois foi adicionado à solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS – pH 7,4) por 20 min e logo após, as células foram incubadas à 4°C *overnight* com o anticorpo primário anti- β -tubulina (1:500) produzido em camundongo. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG Alexa-488 (5 $\mu\text{g/mL}$) e incubado por 1 h. Após, as lamínulas foram incubadas por 7 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS SP5).

3.8 Ensaio de Imunomarcção de β - Catenina

Para visualizar os efeitos das NLS-DTX na β -catenina foi realizada a imunomarcção das células com o anticorpo anti- β -catenina. Foram semeadas 3×10^5 células AGS sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com NLS-DTX e DTX na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ de docetaxel e NLS no volume equivalente a NLS-DTX ou receberam apenas meio de cultivo (controle) por 24 h. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura e meio com tratamento foram retirados e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Depois foi adicionado à solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS –

pH 7,4) por 20 min e logo após, as células foram incubadas à 4°C *overnight* com o anticorpo primário anti- β -catenina (1:500) produzido em camundongo. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG Alexa-488 (5 μ g/mL) e incubado por 1 h. Após, as lamínulas foram incubadas por 7 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS SP5).

3.9 *Ensaio de Wound Healing*

As células AGS foram cultivadas em placas de 24 poços, em uma densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas por 24h na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, para a aderência. Após esse período foi realizado o “arranhão” com uma ponteira de 200 μ L no centro de cada poço. O meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com meio sem soro (200 μ l) para remover as células no sobrenadante. Então, foi realizado o tratamento com as NLS-DTX e DTX nas concentrações estabelecidas de 10 μ g/ml, por 24 h e 48h. A NLS foi colocada em volume equivalente. Os tratamentos foram submetidos a quatro condições: presença de SFB, presença de 1% de SFB + 1 μ M de colchicina ou 10% de SFB + 1 μ M de colchicina

3.10 *Proliferação Celular CFSE*

Foram plaqueadas 3×10^5 células AGS em placas de 12 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1X e expostas à 5 μ M de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X por 15 minutos a 37°C. Após incubação com o agente fluorescente, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e estimuladas durante 24 h e 48 h pelos tratamentos NLS-DTX e DTX na concentração de 10 μ g/ml. Durante toda a cultura as células foram mantidas no escuro. Após o tempo de tratamento, as células foram então coletadas, lavadas uma vez com PBS 1 X, centrifugadas e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCALLIBUR) em canal FL-1 em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10. O controle experimental foi obtido expondo células marcadas com CFSE à 5 μ M de colchicina por 24 horas.

3.11 Ensaio de Adesão e Proliferação Celular RTCA

As células foram tripsinizadas e plaqueadas em placa E-plate 16 (ACEA Biosciences Inc., EUA) em densidade de 5×10^3 células/poço e incubadas por 24 h em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ tendo o “cell index” medido a cada 30 minutos. Passado esse período, o experimento foi pausado, foi adicionado aos poços na concentração de 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX, meio de cultura e NLS foram adicionados ao volume correspondente, e novamente as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ tendo o “cell index” medido a cada 30 minutos por 120 horas.

3.12 Análise Estatística

Os resultados experimentais obtidos estão expressos em valores médios com desvios-padrão. As análises foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) pelo software Graphpad Prism®. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de Viabilidade Celular nas linhagens de AGS e Fibroblasto

A possível citotoxicidade causada pelas formulações de nanopartículas, foi o primeiro parâmetro a ser testado, servindo como referência para os demais ensaios. Para isso, foram testadas doses do fármaco no intervalo de 0.0001, µg/ml a 100 µg/ml, em diluição seriada na base 10, nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Ao analisar os resultados obtidos na linhagem AGS, foi possível observar que o tratamento com NLS-DTX apresentou citotoxicidade a partir da concentração 0.01µg/ml; enquanto o tratamento com DTX apresentou citotoxicidade a partir da concentração 10 µg/ml, ambos analisadas no tempo de 24 h. Já o tratamento com NLS no mesmo tempo, apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração de 100 µg/ml (Figura 17).

No tempo de 48 h, a citotoxicidade foi muito acentuada em todas as doses testadas no tratamento com NLS-DTX, regredindo a uma viabilidade abaixo de 50%. A partir desse momento, o perfil de mortalidade do DTX livre assemelhou-se ao tratamento com NLS-DTX. Para o NLS o perfil de mortalidade ocorreu apenas na concentração de 100 µg/ml.

Em 72 h, ocorreu aumento da citotoxicidade levando a redução de viabilidade, abaixo de 35% em todas as doses testadas, nos tratamentos com NLS-DTX e DTX. Obtendo, respectivamente, 93% e 84% de mortalidade na concentração de 100 µg/ml. Enquanto a NLS apresentou mortalidade apenas na concentração mais alta.

A NLS apresentou mortalidade apenas nas concentrações mais altas, onde nas concentrações intermediárias e menores, apresentou crescimento superior ao grupo controle sem tratamento. A viabilidade da NLS-DTX e do DTX apresentou diferenças significativas apenas no tempo de 24 h, sendo que nos

outros tempos a formulação com a nanopartícula apresentou perfil de toxicidade semelhante ao fármaco livre.

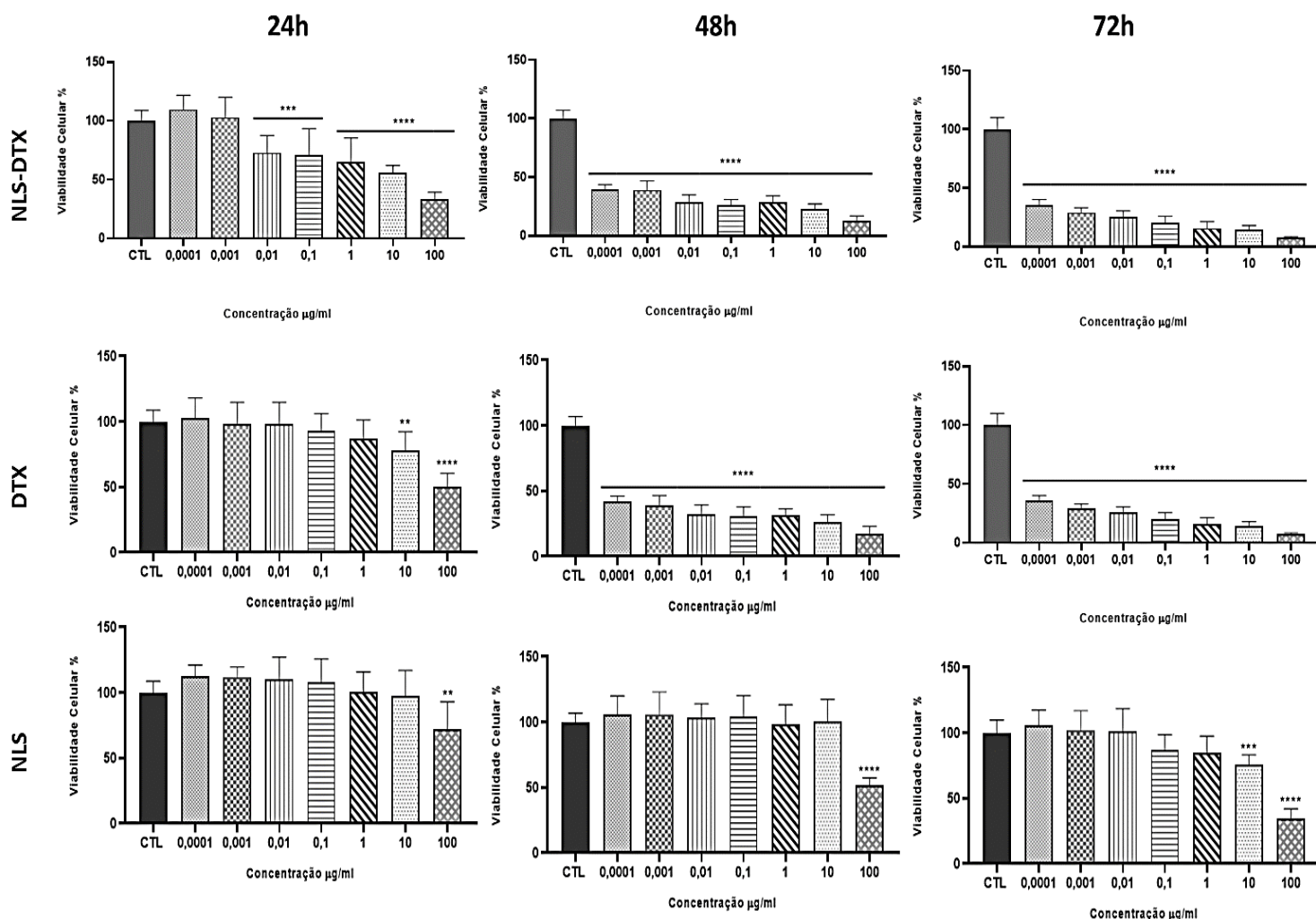


Figura 17 - Viabilidade de AGS após tratamento com NLS-DTX, DTX e NLS. As células AGS foram tratadas com NLS-DTX e DTX nas concentrações de 100 µg/ml, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a média ± SEM. **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. * comparados ao controle não tratado.

Estudos de encapsulação de fármacos são de suma importância uma vez que possuem o objetivo de potencializar e controlar a administração, absorção e seletividade. Surgem como uma alternativa aos tratamentos convencionais, que provocam a morte tanto de células tumorais e não tumorais. Baseado nisso, torna-se essencial testar a toxicidade das nanoformulações em linhagens de células não tumorais. Para esse fim, utilizamos uma linhagem de cultura celular primária de fibroblastos, com o mesmo padrão de tratamento descrito acima.

O tratamento com NLS-DTX apresentou citotoxicidade menor da formulação sobre a linhagem de fibroblasto, observando uma viabilidade superior a 86% no decorrer de todo o ensaio (Figura 18). O DTX livre também apresentou um padrão de citotoxicidade menor em relação a linhagem de fibroblasto. Os volumes de NLS utilizados, mostraram um padrão semelhante de citotoxicidade com a formulação NLS-DTX, mantendo a viabilidade superior a 56% durante todo o tratamento.

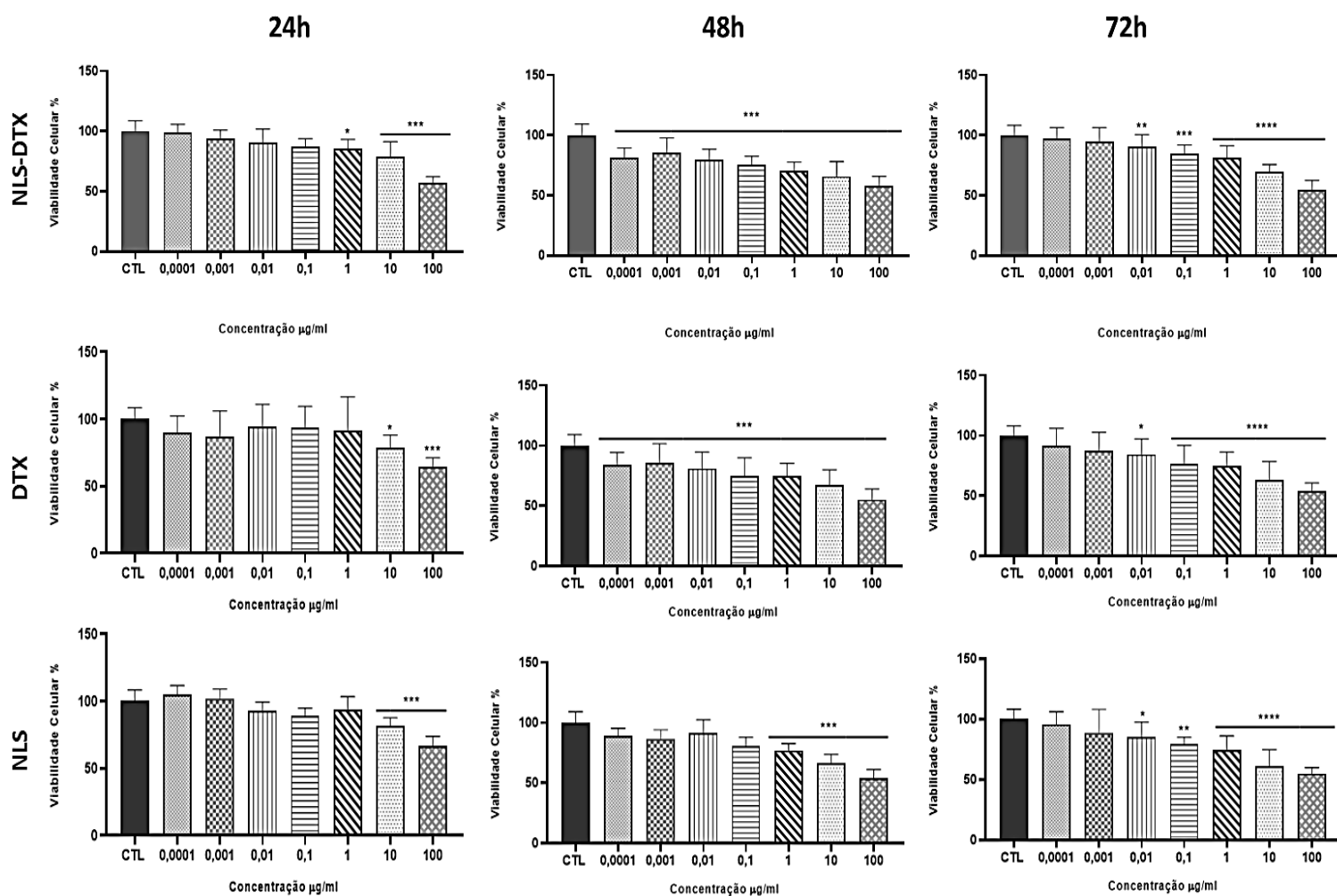


Figura 18 - Viabilidade de Fibroblasto após tratamento com NLS-DTX, DTX e NLS. As células de Fibroblasto foram tratadas com NLS-DTX e DTX nas concentrações de 100 µg/ml, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL por 24, 48 e 72h. Os dados representam a média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. * comparados ao controle não tratado.

Através desses resultados de citotoxicidade, podemos inferir que na linhagem AGS a formulação NLS-DTX e o DTX livre apresentaram uma redução eficiente de viabilidade celular, enquanto o veículo NLS não mostrou grandes

reduções nesse quesito, podendo distinguir assim o efeito tóxico do fármaco Docetaxel sobre as células. Comparando a linhagem tumoral e não tumoral, podemos inferir que o tratamento foi muito mais nocivo na linhagem AGS do que em fibroblasto, mostrando um resultado satisfatório para o tratamento da linhagem tumoral.

Foram calculados os IC₅₀ de NLS-DTX e DTX nos três tempos estudados nas linhagens de AGS e Fibroblasto (Tabela 4), porém em alguns tempos não foi possível ter uma concentração determinada porque o IC₅₀ ficou fora do intervalo das concentrações testadas. Em 24 h na linhagem AGS, o IC₅₀ de NLS-DTX foi de 12,23 µg/mL (24 h) e para DTX não foi possível ter uma concentração determinada, pois o IC₅₀ estava fora da faixa das concentrações testadas, acima de 100 µg/ml. Não foi possível calcular o IC₅₀ de NLS -DTX e DTX em 48 h e 72 h, pois nesses momentos as doses testadas causaram uma redução abaixo de 50%, o que indica um IC₅₀ menor que 0,0001 µg/ml. NLS-DTX apresentou maior citotoxicidade contra células cancerígenas, demonstrando um valor de IC₅₀ menor que a concentração de DTX, após 24 h de tratamento. Assim, conclui-se que o NLS-DTX foi mais eficaz. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a citotoxicidade de nanopartículas à base de lipídios carregadas com drogas foi maior do que a de drogas livres (WANG et al. 2011; VAN EERDEN et al. 2020; JOSHI & BADGWELL 2021; HOLSÆTER et al. 2022). O mecanismo mais eficaz de citotoxicidade do NLS-DTX pode ser devido à sua rápida absorção e alta permeabilidade, o que permite o acúmulo de nanopartículas intracelulares (da ROCHA et al. 2020).

Segundo a American Type Culture Collection (ATCC), o “*doubling time*” da linhagem AGS é de 20 h. Mas existem divergências na literatura sobre o tempo de duplicação dessa linhagem: alguns autores sugerem em 22h (COWLEY et al, 2014), em 24 h (MATOZAKI et al, 1992) e em 24.16 +/- 0.07 h (NIAPOUR et al, 2022). O que possivelmente é a causa da drástica redução da viabilidade após o tempo de 24h, indicando uma melhor ação do fármaco docetaxel após esse período, devido ao seu modo de ação, que inibe o crescimento celular no momento da divisão celular.

Tabela 5 – Concentração inibitória de 50% das NLS-DTX e DTX na linhagem AGS e Fibroblasto nos tempos de 24, 48 e 72 h.

TEMPO	IC ₅₀			
	AGS		FIBROBLASTO	
	NLS-DTX	DTX	NLS-DTX	DTX
24 horas	12,23 µg/ml	> 100 µg/ml	> 100 µg/ml	> 100 µg/ml
48 horas	< 100 pg/ml	< 100 pg/ml	> 100 µg/ml	> 100 µg/ml
72 horas	< 100 pg/ml	< 100 pg/ml	> 100 µg/ml	> 100 µg/ml

Estudos realizados com a mesma formulação de NLS-DTX em linhagens de câncer de ovário A2780, onde os valores de IC₅₀ das NLS-DTX foi de 129,1 ng/ml (24h) e 9,58 ng/ml(48h) e do DTX foi de 350,3 ng/ml (24h) e <1ng/mL (48h), e de câncer de mama 4T1, onde os valores de IC₅₀ das NLS-DTX foi de 0,08 µg/mL (24h) e 0,01 µg/mL (48 h) e do DTX livre foi de 10 µg/mL (24 h) e 0,3 µg/mL (48 h), indicando que a citotoxicidade é tempo e dose dependente (ANDRADE, 2018; DA ROCHA *et al.*, 2020).

Podemos observar também, que a NLS-DTX mostrou maior citotoxicidade contra células cancerígenas (DA ROCHA *et al.*, 2020). Estando de acordo com resultados de estudos anteriores, que mostraram que a citotoxicidade das nanopartículas à base de lipídios é maior que a dos fármacos livres (XU *et al.*, 2009; SANNA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2016; QURESHI *et al.*, 2017). Através dos estudos citados, podemos inferir também que a composição da NLS é biocompatível, reduzindo a viabilidade celular somente na maior concentração, como também foi demonstrado no presente estudo com células da linhagem AGS.

4.2 Avaliação da capacidade de formação de colônias das células tratadas com as NLS-DTX

Através desse ensaio, foi possível observar que as células não tratadas e as tratadas com NLS, aderiram em todo o poço formando diversas colônias, de variados tamanhos, muitas vezes não sendo possível delimitar as colônias (Figura 19). O tratamento com NLS aumentou a quantidade de células comparadas com o controle, ocorrendo formação de colônias fortemente coradas. As células que receberam tratamento das NLS-DTX e do DTX quase não formaram colônias e tiveram a morfologia das células alteradas (Figura 20). Podemos constatar que o tratamento com NLS-DTX e o DTX não mantém a capacidade das células proliferarem e pode inibir a formação de colônia.

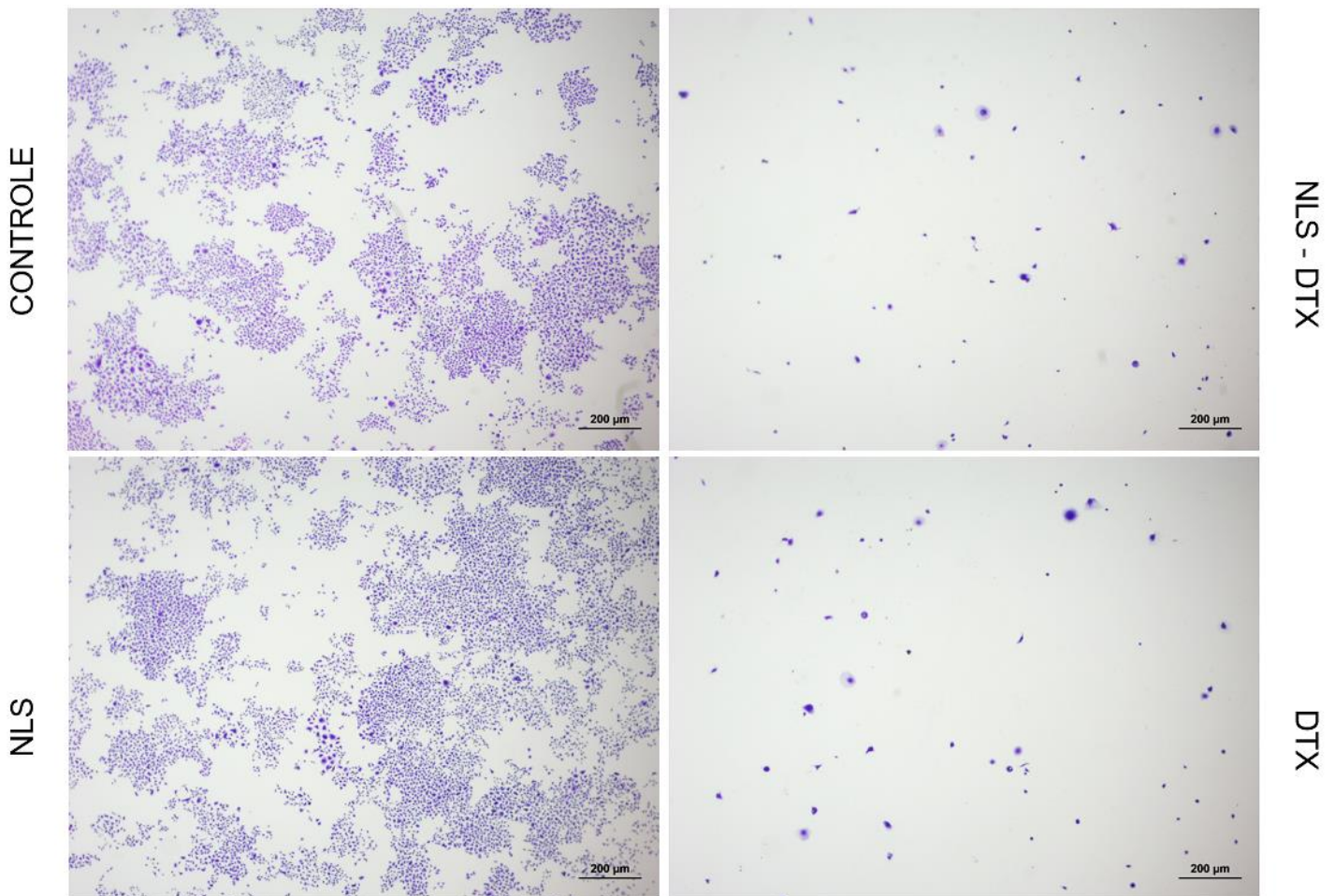


Figura 19: Efeito do tratamento com NLS-DTX na inibição de formação de colônias das células AGS. As células AGS foram tratadas com 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX por 24 h. Imagens foram obtidas em estereoscópio no aumento de 5 X.

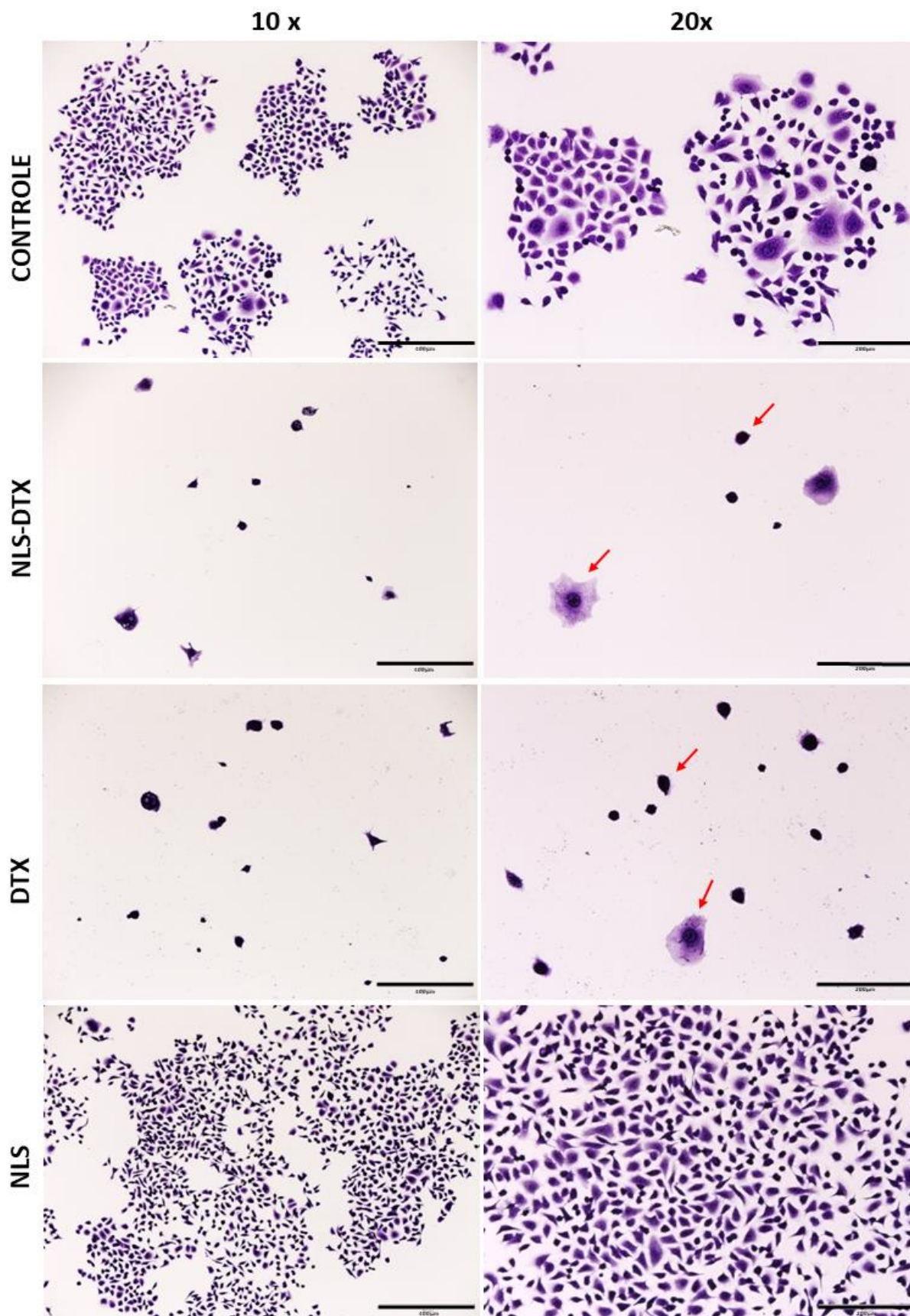


Figura 20: Efeito do tratamento com NLS-DTX na inibição de formação de colônias das células AGS. As células AGS foram tratadas com 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX por 24 h. Imagens foram obtidas no Microscópio EVOS, com aumento de 10x e 20x. As setas mostram células isoladas após o tratamento.

O ensaio de formação de colônias é um ensaio *in vitro* de sobrevivência de células com base na capacidade de células individuais crescerem em colônias. É um ensaio padrão para determinar a morte celular reprodutiva após tratamento com radiação ionizante ou agentes quimioterápicos (BRASELMANN et al., 2015). Durante a progressão de um tumor, diferentes subpopulações de células com capacidade de resistir a um determinado tratamento podem surgir e se expandir, e essa parcela de células pode ser proveniente tanto da expansão clonal de uma única subpopulação da massa tumoral, quanto de várias populações sub clonais diferentes (SPENCER et al, 2009; SHARMA et al, 2010; HOLOHAN et al, 2013).

Conceitualmente, uma colônia gerada *in vitro* a partir de célula única deveria ser composta por células-filhas geneticamente e fenotipicamente idênticas à célula de origem (SHARMA et al, 2010). No entanto, diversos outros processos influenciam o fenótipo de resistência, levando a fenótipos heterogêneos mesmo em células com genótipos idênticos. Assim, para o mesmo tratamento, diferentes células podem responder de forma heterogênea (SPENCER et al, 2009).

4.3 *Morfologia das células AGS*

Durante o acompanhamento do desenvolvimento da cultura celular de AGS, através de observação diária em microscópio invertido, observou-se que essa linhagem cresce de maneira desorganizada com aglomerações, divisões heterogêneas e com ciclo celular flutuando em torno de 22 h. Na análise das células AGS por contraste de fase foi possível observar que o tratamento realizado com 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX apresentou diferenças morfológicas, quando comparadas com o grupo sem tratamento (Figura 21).

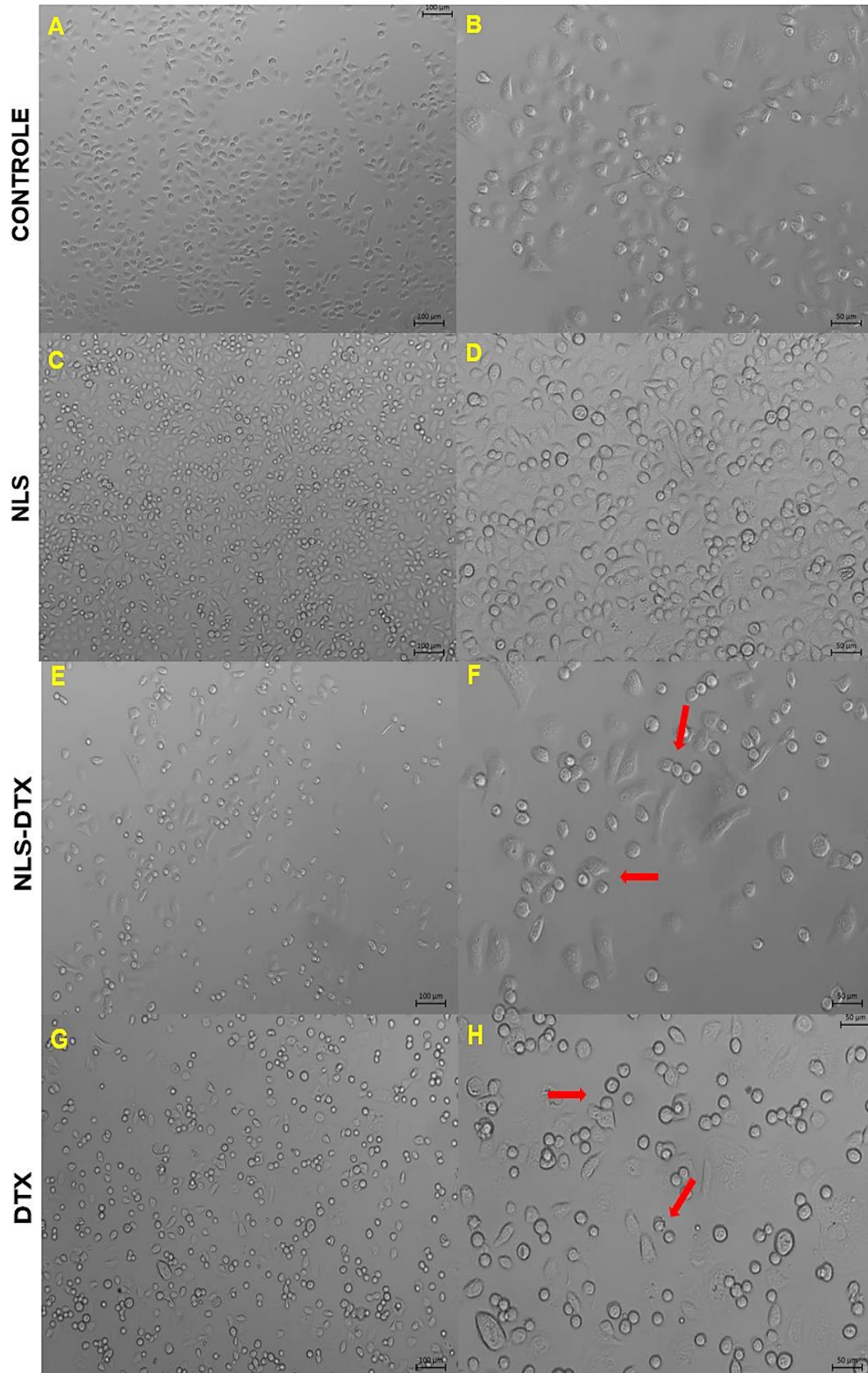


Figura 21 - Alterações morfológicas das células AGS em Contraste de Fase após 24 h de tratamento. (A-B) - Controle sem tratamento aumento de 10x e 20x, respectivamente. (C-D) - NLS aumento de 10x e 20x, respectivamente; (E-F) NLS-DTX aumento de 10x e 20x, respectivamente; (G-H) DTX aumento de 10x e 20x, respectivamente. As alterações morfológicas foram analisadas sob microscópio de luz. As setas apontam células com morfologia arredondadas, sugerindo perda das adesões.

Após a exposição aos tratamentos de NLS-DTX e DTX, as células ficaram com o formato mais arredondado e mantiveram um menor número de células aderidas. As células que foram expostas ao NLS, apresentaram um aumento na sua população, sem alteração da sua forma característica quando comparada ao controle, embora tenham algumas células flutuando no poço, possivelmente devido à alta confluência.

As células sem tratamento, possuem uma superfície celular com várias projeções citoplasmáticas, como podemos ver através da Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 22). Isso indicou que o DTX causou resposta ao estresse das células com a sua exposição e o microambiente local das células foram alterados. Mudanças no aspecto morfológico são sinais de que as células sofrem de estresse e/ou estão em processo de morte. Após a exposição aos tratamentos de NLS-DTX, as células perderam as projeções citoplasmáticas, houve um aumento de volume, ficaram com o formato mais arredondado e mantiveram um menor número de células aderidas.

CONTROLE

NLS-DTX

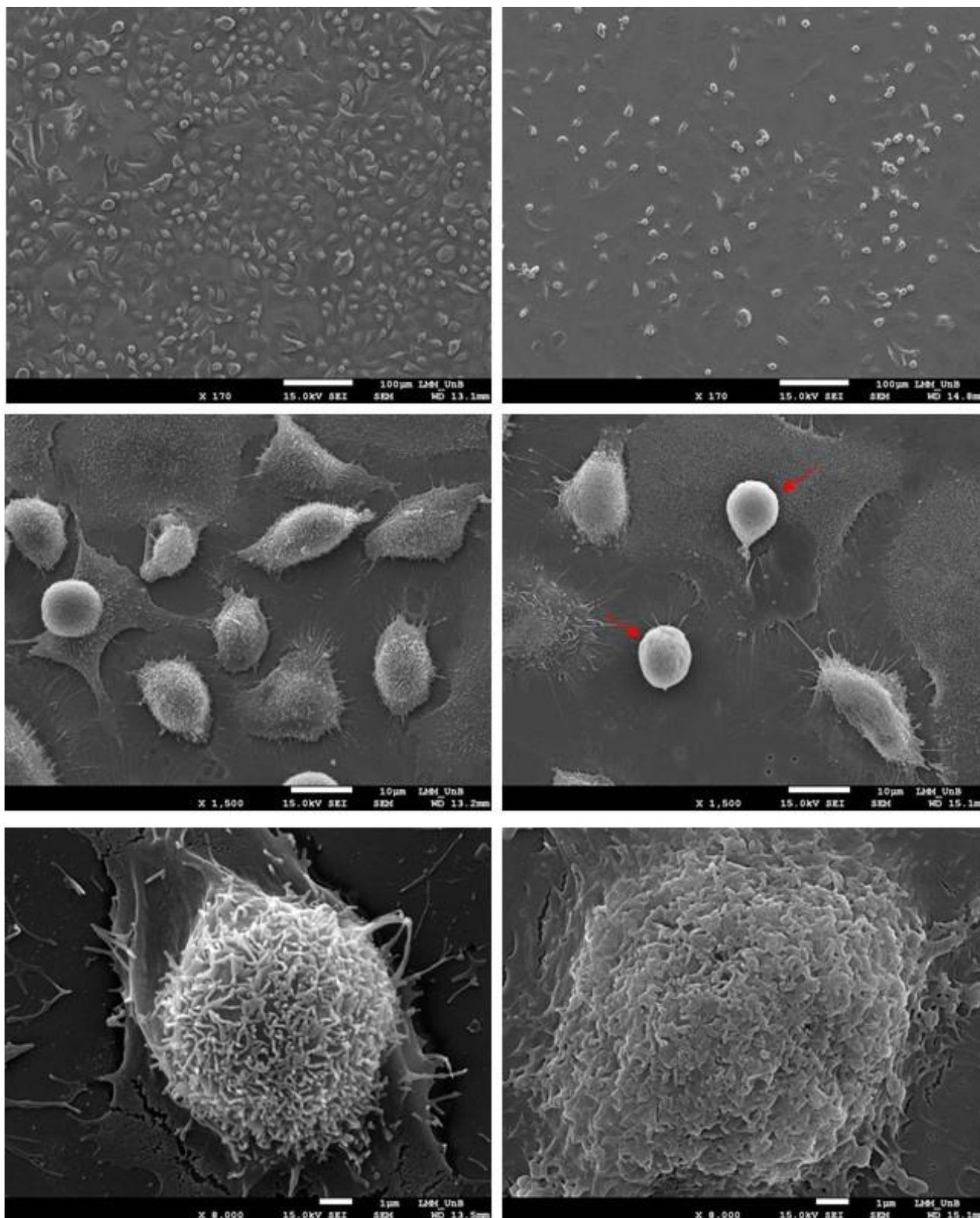


Figura 22 - Micrografia da linhagem AGS por Microscopia Eletrônica de Varredura. Controle: células de adenocarcinoma gástrico AGS. NLS-DTX: células de adenocarcinoma gástrico tratadas com NLS-DTX na concentração de 10µg/ml por 24 h. As setas apontam células com morfologia arredondadas indicando perda das adesões citoplasmáticas. Aumentos de 170X, 1000X e 8.000X.

Estudos realizados em nosso grupo, avaliaram o efeito da NLS-DTX, em linhagem celular 4T1 e MDA-MB-231, e comprovaram as mudanças na morfologia e adesão destas células durante o tratamento (DA ROCHA et al, 2020; PAIVA et al, 2022). Em células de câncer de ovário, o DTX pode efetivamente inibir a formação de pseudópodes celulares, impedir a direção entre as células, reduzir a área de extensão celular e tornar as células malformadas (HOU et al, 2021b).

4.4 Atividade de NLS-DTX sobre os microtúbulos de células AGS

Os componentes mais importantes do citoesqueleto eucariótico são os microtúbulos, que são conhecidos por desempenhar papéis importantes na divisão celular, migração, sinalização e tráfego intracelular e, portanto, são importantes mediadores da proliferação de células cancerígenas e processos de metástase.

O docetaxel induz a hiper estabilização dos microtúbulos se ligando a β -tubulina das células. Essa ligação, faz como que os microtúbulos se tornem mais estáveis, bloqueando o ciclo de divisão da célula. Para confirmar se o DTX continua a sua função antimitótica mesmo após a sua encapsulação, foi realizado uma imunomarcagem com β -Tubulina nas células de AGS tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX e DTX, NLS no volume correspondente ou meio de cultura (controle) por 24 h.

As células AGS não tratadas possuem o citoesqueleto íntegro, com a rede de microtúbulos organizados, extensos e distribuídos por toda a célula. As células tratadas com NLS apresentam morfologia semelhante com as não tratadas, mantendo o citoesqueleto íntegro e os microtúbulos organizados (Figura 23). Nas células tratadas com NLS-DTX e DTX é possível visualizar que efeitos semelhantes, causando a desestruturação do citoesqueleto, deformações celulares, microtúbulos desorganizados e estabilizados ao redor do citoplasma, sugerindo uma alteração na dinâmica dos microtúbulos ocasionada pelo DTX conforme já relatado em estudos anteriores (QIU et al., 2017; DA ROCHA et al, 2020, PAIVA et al, 2022).

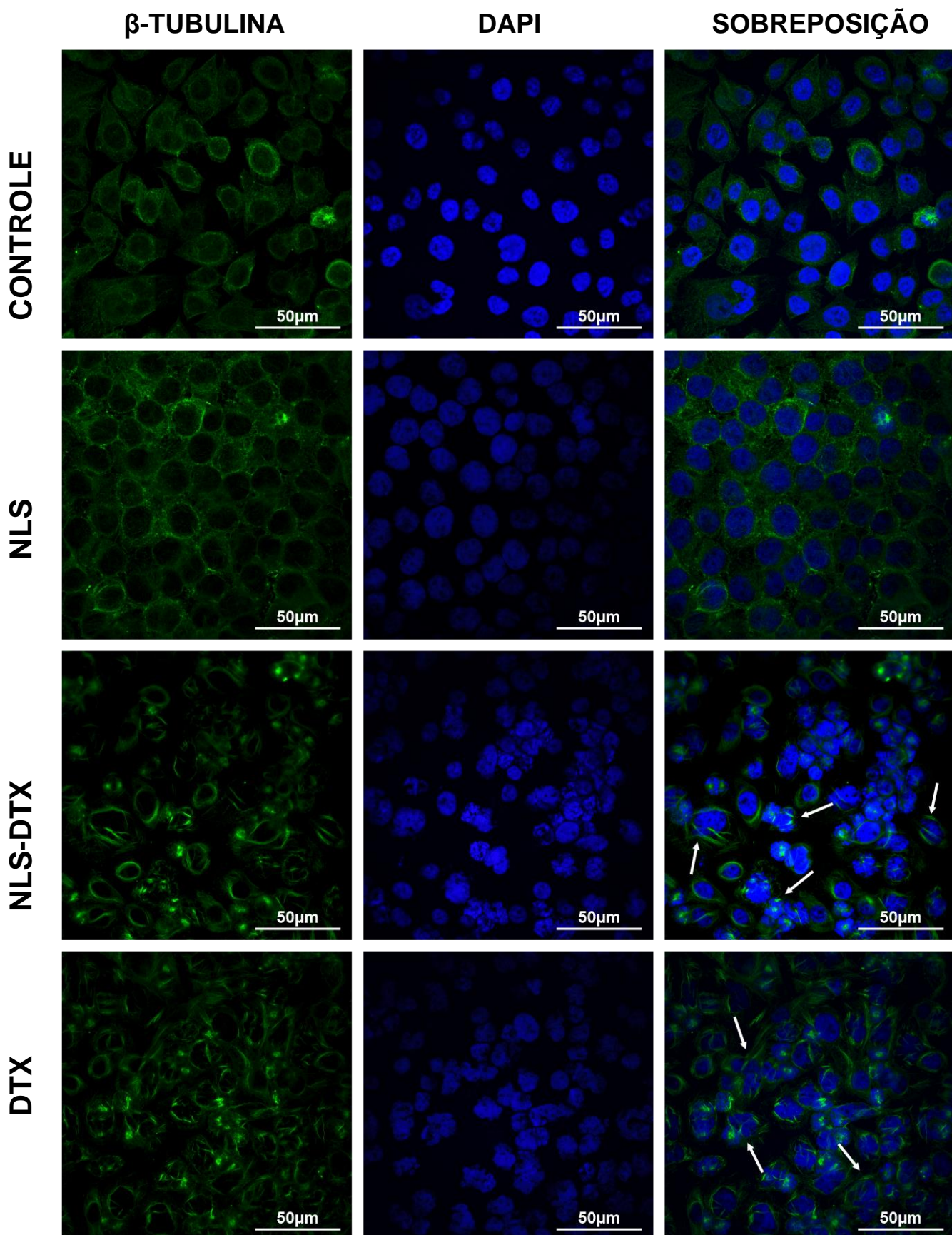


Figura 23 - Ensaio de imunofluorescência de células AGS mostrando os efeitos causados após os tratamentos na organização dos microtúbulos. As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- β -tubulina (verde), DNA das células foi marcado com DAPI (azul) e combinados (sobreposição), para células AGS não tratadas ou tratadas com NLS, NLS-DTX ou DTX 10 μ g/mL por 24 h. As setas mostram a desorganização dos microtúbulos.

4.5 *Expressão de β - Catenina*

Também foram realizados ensaios com β -catenina, molécula envolvida em mecanismos de homeostase de células maduras (diferenciação, polarização e migração celular). A crescente busca por biomarcadores envolvidos na carcinogênese gástrica, é de grande importância na pesquisa oncológica (MORIN 1999; HIREMATH ET AL. 2022).

As células AGS não tratadas têm β -catenina intacta e distribuída por toda a célula (Figura 24). As células tratadas com NLS têm morfologia semelhante às não tratadas, mantendo a β -catenina intacta e organizada. Em células tratadas com NLS-DTX e DTX é possível visualizar efeitos semelhantes, causando rompimento da membrana, deformações celulares, perda de adesão, presença de β -catenina acumulada em pontos ao redor do núcleo, sugerindo alteração na estrutura celular causada pela DTX. Alguns estudos indicam que alterações nos níveis de expressão de β -catenina estão associadas a características morfológicas agressivas e mau prognóstico em pacientes com câncer (ANTHONY ET AL. 2020; LEI ET AL. 2022).

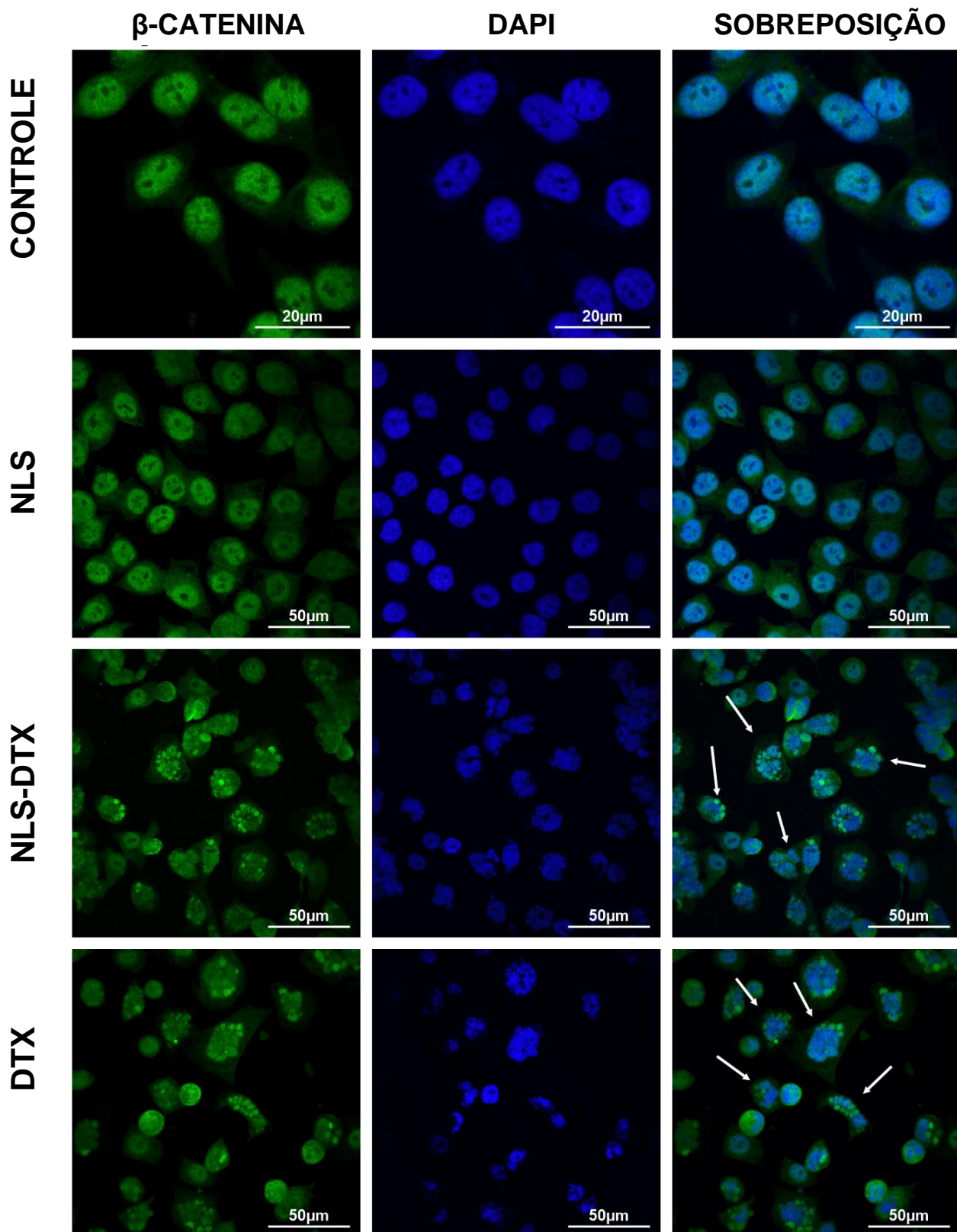


Figura 24 - Ensaio de imunofluorescência de células AGS mostrando os efeitos causados após os tratamentos na organização da β -Catenina. As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- β -Catenina (verde), DNA das células foi marcado com DAPI (azul) e combinados (sobreposição), para células AGS não tratadas ou tratadas com NLS, NLS-DTX ou DTX 10 μ g/mL por 24 h. As setas mostram a desorganização da β -Catenina.

A via de sinalização Wnt/ β -catenina é conhecida como a via canônica e sua função é regular a atividade nuclear da β -catenina na transcrição gênica e subsequente expressão proteica (ANTHONY ET AL. 2020; YU ET AL. 2021). Esta via está frequentemente envolvida na carcinogênese gástrica, e várias proteínas podem sofrer mutações ou serem expressas de forma atípica no tecido do tumor gástrico (ANTHONY ET AL. 2020; LEI ET AL. 2022). Foi visto que a desregulação citosólica da proteína beta-catenina está diretamente relacionada ao desenvolvimento de neoplasias (LECARPENTIER ET AL. 2019; CHATTERJEE ET AL. 2022).

4.6 Ensaio de Wound Healing

Um dos mecanismos mais importantes para o desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares é a motilidade de células de um local para outro. Evento esse, que pode ocorrer, de maneira individual ou em grupo de células (RORTH, 2009; YAMADA E SIXT, 2019). Esse mesmo mecanismo, permite que células neoplásicas se desprendam do tumor primário e migrem para o seu sítio metastático, através dos vasos sanguíneos e linfáticos propiciando o aparecimento de metástases. Esse evento desencadeia uma série de processos celulares, entre eles: adesão, migração, invasão e proliferação.

O processo de migração eventualmente ocorre em respostas a sinais químicos, como: reparação de feridas, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e metástase tumoral (VICENTE-MANZANARES & HORWITZ, 2011).

O ensaio de migração celular *in vitro* se apresenta como um método capaz de fornecer dados sobre a capacidade de migração de modelos celulares de células aderentes. Sendo baseado na observação da movimentação das células da borda que, após a criação de uma lacuna artificial, chamada de "risco", em uma monocamada celular confluyente, se moverão em direção à abertura para fechar o "risco" até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente. O processo de inibição da migração das células e direção a região raspada *in vitro* mimetiza a inibição do processo de migração *in vivo* e fornece dados iniciais sobre a interferência da droga no processo metastático típico de tumores malignos (LIANG et al., 2007).

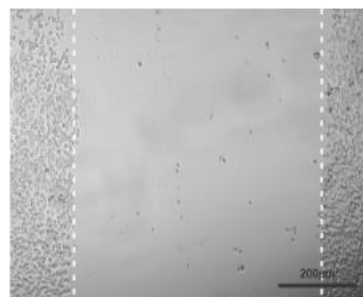
Esse ensaio teve como objetivo observar de maneira qualitativa, a imagem após a região raspada ser submetida aos tratamentos com as NLS-DTX, DTX na concentração estabelecidas de 10 µl/ml, a NLS em volume equivalente e grupo controle. Submetidos a quatro condições: presença de 1% ou 10% de SFB, presença de 1% + 1µM de colchicina ou 10% de SFB + 1µM de colchicina. Permitindo a visualização dos principais eventos relacionados a migração: polarização celular, reorganização do citoesqueleto, dinâmica de adesão, direcionalidade e velocidade da recuperação da lesão.

Em 24 h após a lesão, podemos observar que ambas dos tratamentos com NLS-DTX e DTX foram capazes de inibir a migração celular com a presença de 1% ou 10% de SFB, e com a ausência ou presença de colchicina, causando mudanças nas formas das células e na diminuição de células aderidas.

No grupo controle e com a presença de NLS, houve um aumento na proliferação celular e migração no tratamento com 10% de SFB, as células localizadas nas bordas da ranhura migraram em conjunto na direção da borda oposta, na tentativa de ocupar o espaço vazio. Com o SFB a 1%, houve uma diminuição da velocidade de migração, mas não sendo prejudicada a estrutura da célula, apresentando o mesmo padrão da SFB a 10%.

Na presença de colchicina, houve uma diminuição das células aderidas e sua morfologia tornou-se mais arredondada, possivelmente pela ação da colchicina na rede de microtúbulos, mesmo assim, ainda houve recuperação celular do que os tratamentos com a presença do Docetaxel.

0h

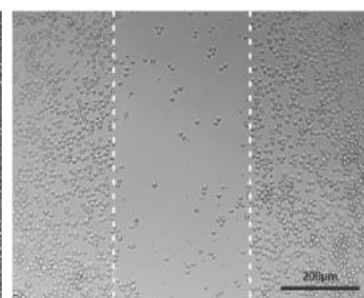
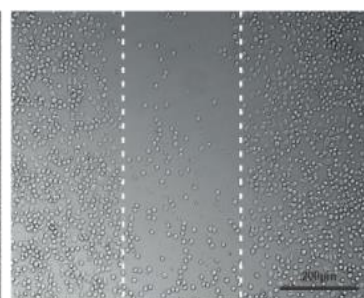
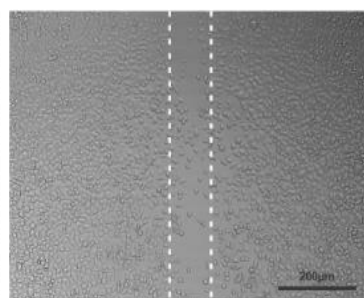
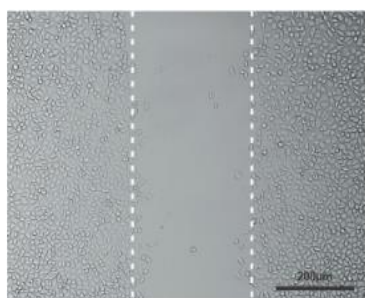


SFB 1%

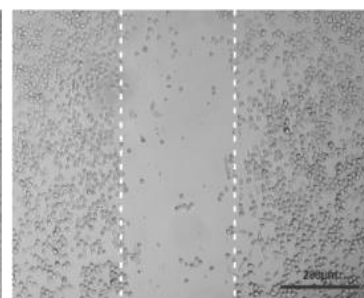
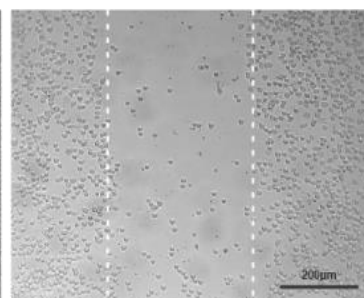
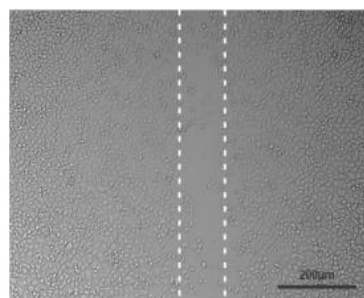
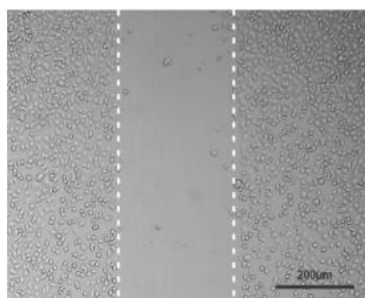
SFB 10%

SFB 1%+
COLCHICINASFB 10%+
COLCHICINA

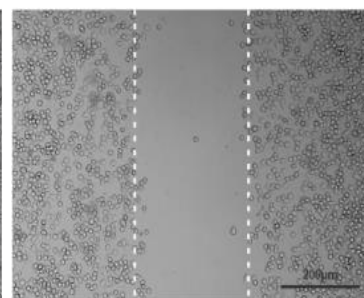
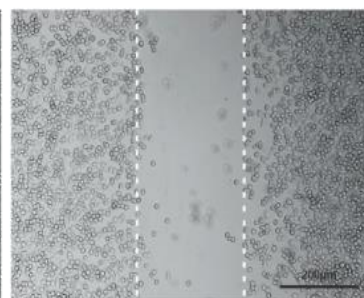
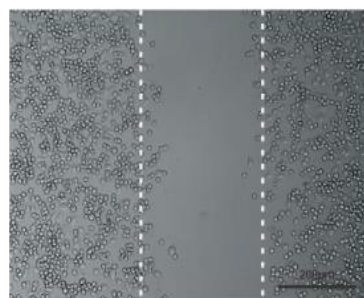
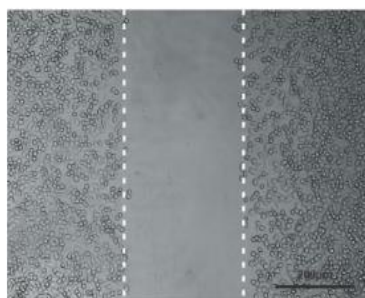
CONTROLE



NLS



NLS-DTX



DTX

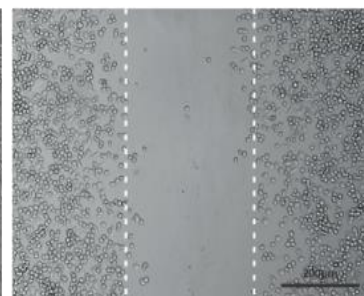
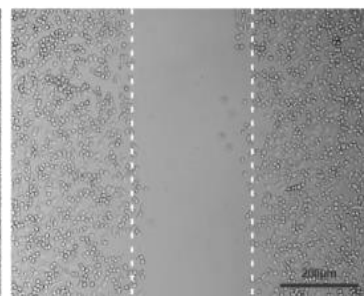
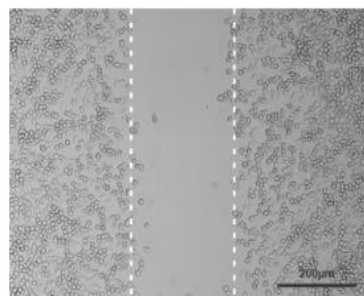
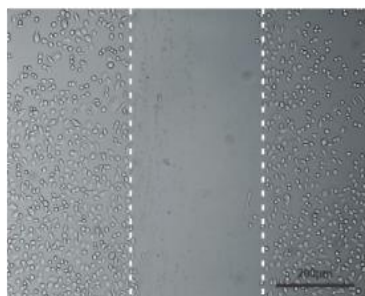


Figura 25. Ensaio de Migração Celular em Células AGS por 24h. Controle (1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina); NLS (1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina); NLS-DTX ((1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina) e DTX ((1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina). As células foram tratadas com NLS, NLS-DTX, DTX 10 µg/ml por 24h.

Em 48h após a lesão, os tratamentos com NLS-DTX e DTX foram capazes de inibir a migração celular em todas as quatro situações, havendo uma diminuição mais significativa na presença da colchicina, que pode ter intensificado a ação sobre os microtúbulos, aumentando a falha em se fixar e segregar corretamente os cromossomos interrompendo o ciclo celular. Embora a colchicina não seja utilizada clinicamente no tratamento de câncer, por causa da sua elevada toxicidade, os quimioterápicos retardam a migração celular para cobrir a ranhura em todos os tempos e situações analisadas.

Nos tratamentos com NLS e o grupo controle, houve recuperação total da ranhura na presença de 10% de SFB. Com o SFB a 1%, houve diminuição da velocidade de cobertura da ranhura, mas as células ainda apresentam estrutura similar ao SFB a 10%. Na presença de colchicina, as células tiveram a sua morfologia alterada, mas ainda conseguiram avançar, de forma individual, para onde a ranhura havia sido realizada.

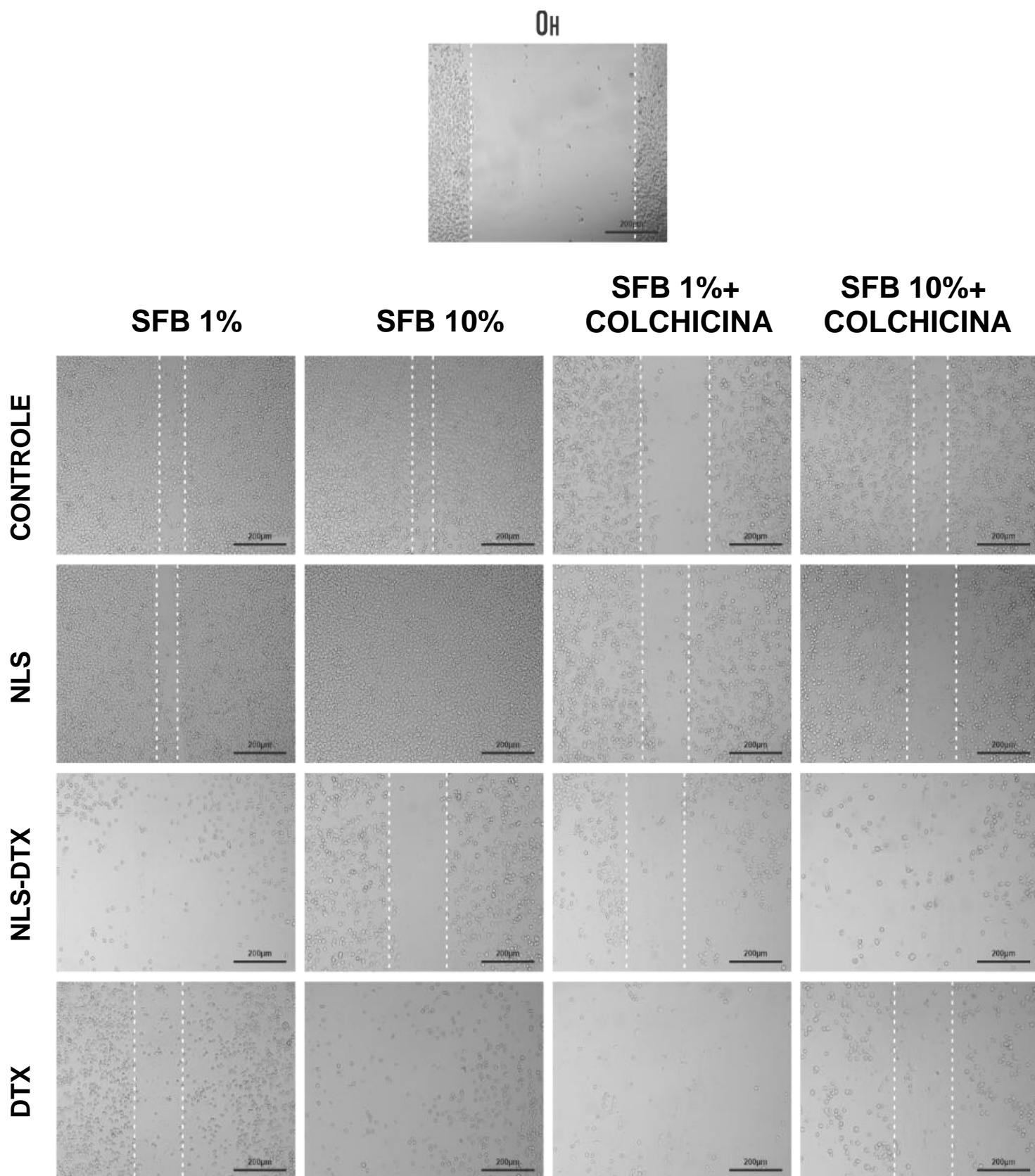


Figura 26. Ensaio de Migração Celular em Células AGS por 48h. Controle (1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina); NLS (1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina); NLS-DTX ((1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina) e DTX ((1% SFB, 10% SFB, 1% SFB + colchicina, 10% SFB + colchicina). As células foram tratadas com NLS, NLS-DTX, DTX 10 µg/ml por 48h.

Para que a migração ocorra de forma eficiente, é necessário que as células sejam capazes de se adaptar ao ambiente que as cerca. Portanto, para controlar comportamentos coletivos, é necessário primeiro determinar quais comportamentos celulares individuais contribuem para a resposta coletiva e, em seguida, definir suas contribuições relativas, de modo que a terapia seja projetada para atingir os comportamentos mais significativos da maneira mais eficaz. Podemos concluir com esse ensaio, que a presença da colchicina mostrou-se mais eficiente na inibição da migração celular do que a redução de SFB.

O baixo custo, a versatilidade e a simplicidade que envolve a realização deste ensaio, permite a sua ampla utilização para a testagem de novas moléculas antineoplásicas. Podendo ser utilizado para estudos de angiogênese, metástase, resposta imune e mecanismos ligados a migração celular como polarização, remodelamento da matriz e citoesqueleto.

4.7 Proliferação Celular CFSE

Na análise de proliferação das células, estas foram marcadas com o marcador CFSE, composto fluorescente e permeável à membrana que se caracteriza por interagir com aminas citoplasmáticas. Este marcador entra passivamente nas células viáveis e, depois de ser clivado por esterases citoplasmáticas se torna fluorescente. Assim, a cada divisão a célula divide seu conteúdo fluorescente com a célula-filha, de maneira que a cada geração há metade da fluorescência da geração anterior. Dessa forma é possível acompanhar a taxa de proliferação de células em cultura.

Em 24 h de exposição com CFSE, as células de AGS tratadas com NLS-DTX apresentaram 88% de intensidade de fluorescência enquanto o DTX apresentou 86% de fluorescência, evidenciando a perda da capacidade de proliferação celular (Figura 27). Já a célula AGS controle e o tratamento com NLS tiveram 44,25% e 44,95%, respectivamente, evidenciando a perda da fluorescência através da divisão celular.

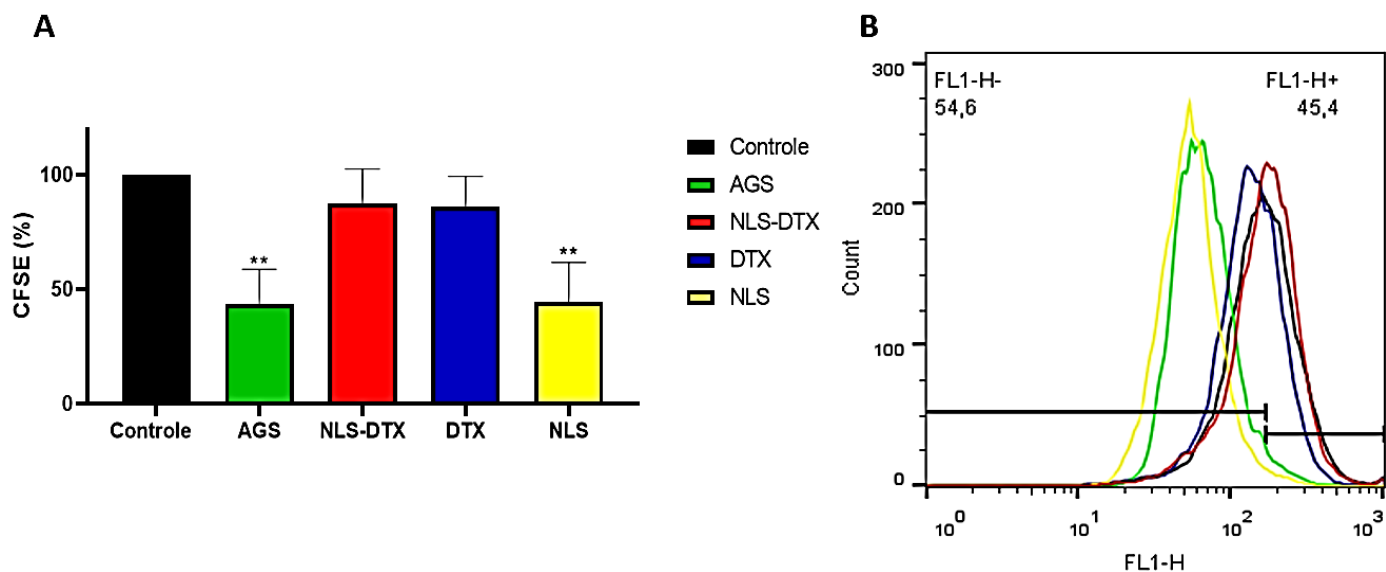


Figura 27: Proliferação Celular de AGS por CFSE em 24 h. (A) Histogramas de proliferação celular por CFSE 24h. (B) Intensidade de fluorescência por 24h. As células foram tratadas com NLS, NLS-DTX, DTX 10 μ g/ml por 24h. A colchicina foi usada como controle. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (** $p < 0,01$).

Em 48h exposição com CFSE (Figura 28), as células de AGS tratadas com NLS-DTX e DTX apresentaram 22% e 23%, respectivamente, a perda de fluorescência desses tratamentos, demonstram que houve perda da capacidade de proliferação celular, pelo que podemos confirmar pelos outros testes deste trabalho, que os tratamentos causam perda da viabilidade celular. Já os tratamentos com NLS e controle, apresentaram 5,5% e 14 %, respectivamente, evidenciando a proliferação celular conforme veremos a seguir no teste de *Real time Cell Analysis*.

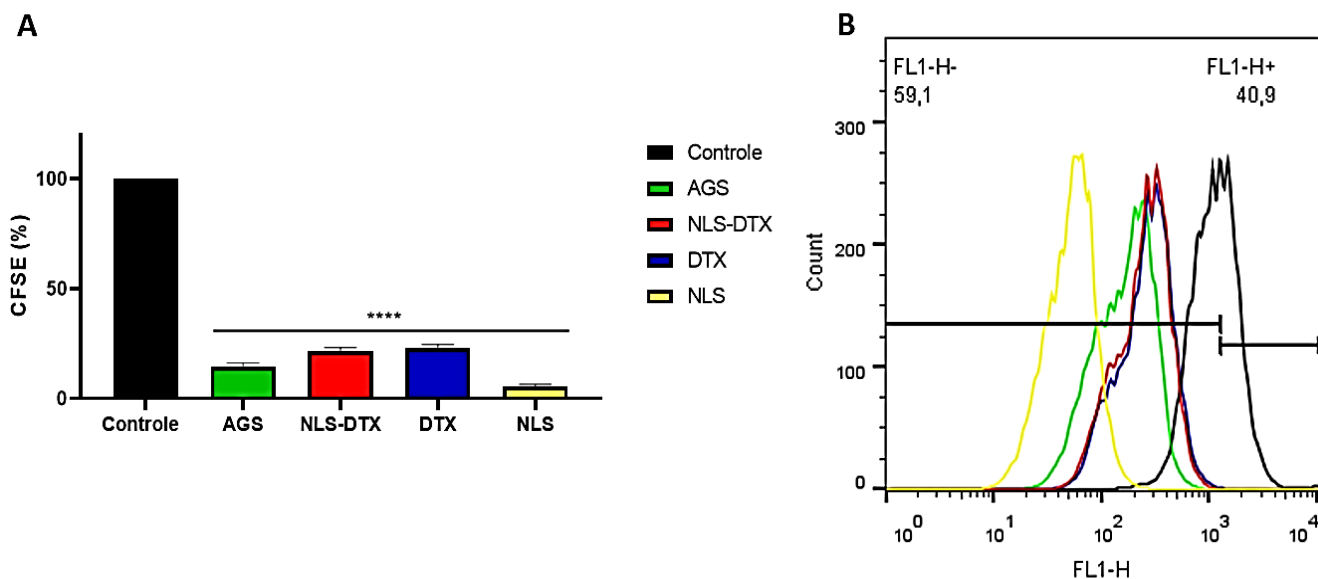


Figura 28: Proliferação Celular de AGS por CFSE em 48 h. (A) Histogramas de proliferação celular por CFSE 48h. (B) Intensidade de fluorescência por 48h. As células foram tratadas com NLS, NLS-DTX, DTX 10 µg/ml por 48h. A colchicina foi usada como controle. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (****p < 0,0001).

A ação citotóxica do DTX surge da interrupção da rede microtubular, que é fundamental para a atividade mitótica, proliferação e sobrevivência celular. Em vários estudos envolvendo NLS associadas ao DTX, demonstraram o efeito inibitório sobre a proliferação em diversos tipos celulares, onde foi notado o potencial citotóxico e apoptótico do tratamento, levando à inibição do crescimento do tumor existente, bem como à prevenção da formação de novos tumores (ZHANG et al, 2010; KIM et al, 2019; KOTHARI et al, 2019; DA ROCHA et al, 2020).

4.8 Proliferação Celular por “Real-Time Cell Analysis”

O ensaio de RTCA (“Real time cell analysis”) consiste em um método de análise de células em tempo real e é uma técnica baseada em eletrodos de impedância e microssensores. O sistema RTCA permite monitoramento contínuo, em tempo real e contínuo da adesão, morfologia, migração e taxa de proliferação celular. O índice celular é a representação da interação das células com um eletrodo de ouro no fundo da placa, no caso da E-plate (placa de proliferação) e na face inferior na CIM-Plate (placa de migração), e a correlação

com a impedância. As leituras eletrônicas mudam à medida que as células se conectam ou se desconectam dos eletrodos de superfície, produzindo uma alteração na impedância que é calculada através de algoritmos matemático e plotada como valores do índice celular (“Cell Index”). Há uma correlação direta entre o número de células conectadas e a leitura do índice celular no equipamento e vice-versa. Essa leitura de impedância pode ser afetada pela qualidade das interações celulares e pelas propriedades aderentes entre cada célula e os eletrodos.

O teste de proliferação expôs diferenças significativas dos grupos de NLS-DTX e DTX em comparação ao controle (Figura 29). A atividade antiproliferativa do docetaxel é mais expressiva após 30 h de exposição. Esses dados corroboram com os testes de viabilidade com MTT, de proliferação com CFSE e os ensaios morfológicos, indicando redução na densidade celular e perda de viabilidade.

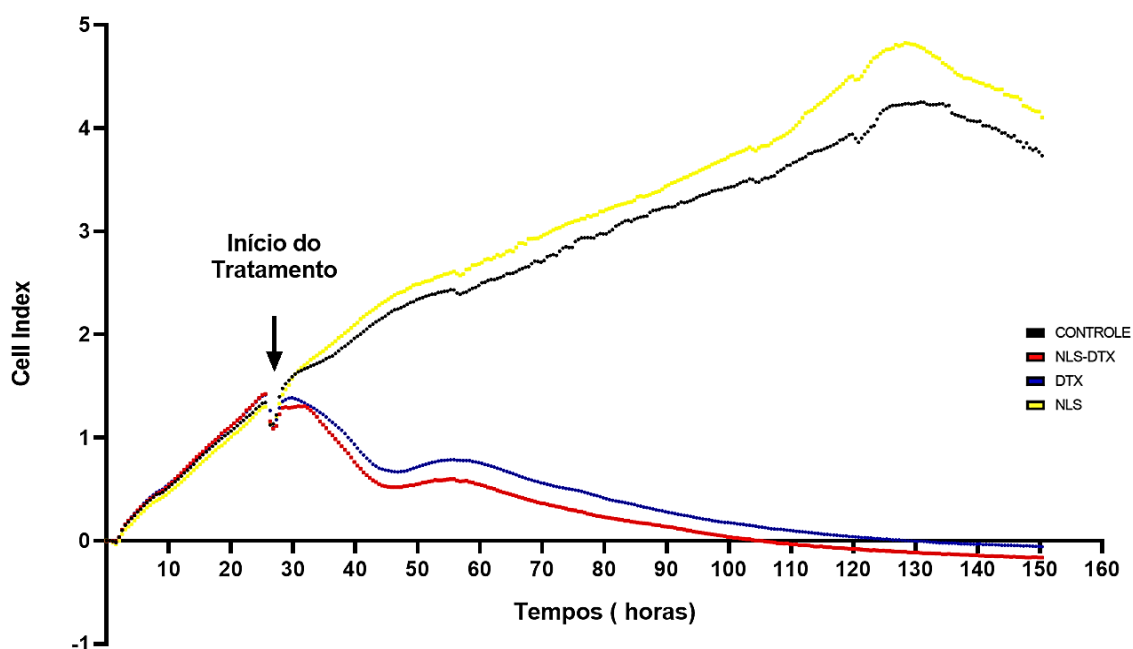


Figura 29: Perfil de proliferação de células de adenocarcinoma gástrico em RTCA. O ensaio de proliferação e adesão celular de RTCA foi realizado durante o tratamento com nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao docetaxel, docetaxel livre e nanopartículas lipídicas sólidas.

5 *CONCLUSÕES*

O docetaxel (DTX) é um dos agentes anticancerígenos mais utilizados, durante décadas tem demonstrado eficácia terapêutica promissora, com ampla aplicação no tratamento de diversos tipos de câncer. Atua em vários processos celulares afetando vários estágios de adesão, proliferação, migração e invasão celular, que são dependentes de mudanças dinâmicas na polimerização e despolimerização dos microtúbulos (principal mecanismo envolvido no efeito antitumoral da Docetaxel).

Docetaxel apresenta vários problemas em relação à entrega aos tecidos-alvos, mas pode-se superar essas barreiras através de sistemas de entrega de drogas, que podem melhorar o desempenho terapêutico do medicamento de várias maneiras. Os resultados aqui apresentados e discutidos, podem contribuir para um melhor direcionamento, através do uso da NLS-DTX, que possam reduzir os efeitos colaterais tóxicos e indesejáveis do docetaxel.

CAPÍTULO II – INTERNALIZAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem sido enfatizado as vantagens ao uso de nanomateriais para formular sistemas de liberação de fármacos (XU et al, 2022). Os nanomateriais foram utilizados em muitos experimentos devido à sua capacidade de melhorar a solubilidade do fármaco, permitir o direcionamento alvo específico, reduzir a toxicidade sistêmica e aumentar a captação celular de drogas encapsuladas (WANG et al, 2021; XU et al, 2022). O conhecimento das vias de internalização celular e o tráfego celular é uma importante área de investigação para garantir o máximo efeito terapêutico das drogas encapsuladas (DONAHUE et al, 2019).

Tem-se a prerrogativa que os nanomateriais permitam superar as limitações da entrega convencional de fármacos comumente utilizados, o que melhoraria os diagnósticos de doenças e a especificidade do tratamento (WANG et al, 2021; ULLDEMOLINS et al, 2021). Compostos de várias naturezas podem ser interiorizados por células por dois mecanismos gerais: mecanismos passivos, nos quais a força motriz é o gradiente eletroquímico dos compostos e não há gasto de energia no processo, e mecanismos ativos, nos quais é necessário gasto de energia da célula para a interiorização do composto (DAVIS et al, 2008; JOHNSON et al., 2017; RENNICK et al, 2021). Em princípio, existem duas principais portas de entrada de materiais na célula, ou seja, fusão direta com a membrana plasmática e endocitose (TASHIMA, 2018; RENNICK et al, 2021).

A captação de líquidos ou macromoléculas pela célula, denominada endocitose, ocorre por meio de dois mecanismos fundamentais. Determinadas moléculas pequenas são captadas por invaginações da membrana plasmática denominadas cavéolas. Já a captação de moléculas maiores ocorre após a ligação a determinados receptores de membrana; a internalização ocorre por um processo de invaginação da membrana impulsionado por uma matriz intracelular

de proteínas denominadas clatrininas (DONAHUE et al, 2019; RENNICK et al, 2021).

As Nanopartículas (NPs) à base de lipídios têm uma série de benefícios, como a alta disponibilidade, o aumento da permeabilidade da membrana, o aumento da capacidade de solubilização, inibição dos transportadores de efluxo, redução da atividade enzimática e capacidade de transportar grandes cargas úteis (DAVIS et al, 2008; SHI et al, 2017; FENTON et al, 2018; HOU et al, 2021; MITCHELL et al, 2021; ULLDEMOLINS et al, 2021; XU et al, 2022,). Devido às suas propriedades físico-químicas, as NPs lipídicas são engolfadas eficientemente pelas células utilizando as vias de endocitose (DUAN et al, 2020; HOU et al, 2021). Também foi constatado que as NPs interagem com a membrana celular, através de seus receptores de membrana reconhece proteínas e outras biomoléculas ligadas à superfície NP (FRTUS et al, 2020; DAWSON & YAN, 2021; LI et al, 2021; ONISHCHENKO et al, 2021).

Em um tratamento quimioterápico é desejado que a droga utilizada cause morte celular programada, evitando dessa forma respostas inflamatórias sistêmicas como efeitos colaterais (SHI et al, 2017; WANG et al, 2021; ULLDEMOLINS et al, 2021). No entanto, uma molécula pode induzir respostas celulares diferentes quando carregadas em nanopartículas, tornando necessário o estudo das vias de morte celular desencadeadas pela combinação droga/carreador. A interiorização de uma molécula contida em nanocarreadores também pode ser diferente ou até mesmo não ocorrer, o que afeta diretamente sua eficiência (SHI et al, 2017; WANG et al, 2021; ULLDEMOLINS et al, 2021).

É essencial estudar como ocorre a endocitose em células submetidas a tratamento farmacológico, pois o meio do processo endocítico que ocorre a interiorização de compostos cujo mecanismo de ação exige o direcionamento a compartimentos intracelulares, com o processamento lisossomal (AKINC & BATTAGLIA, 2013; UZHYTCHAK et al, 2023). Principalmente, porque a liberação de certas drogas carregadas por nanopartículas é mediada pela mudança de pH no ambiente celular, tal como a acidez no interior de tumores sólidos e das organelas endossomos e lisossomos (BHASKAR & LIM, 2017; UZHYTCHAK et al, 2023).

Também é válido ressaltar que o direcionamento de nanopartículas aos lisossomos, embora seja crucial para a liberação de certas drogas no citoplasma, pode fazer com que este processo seja mais lento, quando comparado com a internalização de drogas não direcionadas aos lisossomos (DURBIN et al, 2018; UZHYTCHAK et al, 2023).

2. OBJETIVO

2.1 *Geral*

Este trabalho teve como objetivo avaliar a internalização celular das Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas ao Docetaxel em linhagem celular de adenocarcinoma gástrica (AGS).

2.2 *Específicos*

- Verificar a dinâmica de internalização da NLS-AIPc ao longo de 24h;
- Verificar a via de internalização das NLS-DTX;
- Verificar a internalização celular das nanopartículas qualitativamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Análise das células AGS por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Para visualizar a ultraestrutura e a internalização das nanopartículas, as células AGS foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Foram semeadas 1×10^6 células AGS em placa de 6 poços. Após adesão, as células foram tratadas por 3 e 6 h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX ou apenas o meio de cultura (controle). As células foram então centrifugadas e lavadas para a retirada do meio de cultura. Logo em seguida, foram fixadas em solução Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2) a 4°C por aproximadamente 12 h e pós-fixadas por 30 min em tetróxido de ósmio 2%, ferricianeto de potássio 1,6% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7.2. Após essa etapa, foi realizada a contrastação em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 24 h. A seguir o material foi desidratado em série de acetona (30-100%) e embebido em resina Spurr's. Cortes ultrafinos obtidos em ultramicrótomo (Leica Microsystems, Áustria) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL JEM-1011, JEOL, Japan).

3.2 *Ensaio de internalização com NLS- AIPc*

Para analisar o padrão de internalização das NLS nas células AGS foi feita a associação da NLS-Branca com cloreto de alumínio-ftalocianina, uma substância que apresenta um alto coeficiente de emissão espectral na faixa de comprimentos de onda 650-850 nm, correspondendo ao intervalo da região do vermelho visível. O docetaxel por não ser uma molécula fluorescente impede este tipo de análise. Portanto, essa formulação foi feita exclusivamente para este e para o experimento de avaliação das vias de internalização da NLS. A análise por citometria de fluxo das células tratadas com NLS-AIPc (30 mM) permite a identificação e quantificação de subpopulações de células que internalizaram e/ou tenham nanopartículas presentes na sua membrana e passam a apresentar

fluorescência em seu interior e em sua membrana. A concentração de 3×10^5 células AGS foi cultivada em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células receberam NLS- AIPc diluído em meio de cultivo. O poço que não recebeu o tratamento teve seu meio de cultivo trocado por um meio de cultivo novo. Os tempos de incubação com a NLS- AIPc foram: 0 min, 30 min, 1h, 3h, 6h, 9h, 15h, 18h, 21h e 24h. Decorrido o tempo de tratamento, o meio com tratamento foi retirado, as células foram lavadas com 1mL de PBS e desaderidas com 200 μ L de tripsina 0,25%. As células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 μ L de PBS nas células. A análise foi feita no citômetro FACSCalibur com o auxílio do software CellQuest-Pro. As análises foram feitas a partir de três experimentos independentes.

3.3 *Vias de Internalização*

Neste experimento, foi verificado por qual via de endocitose as NLS- AIPc são interiorizadas pelas células AGS. As células foram plaqueadas 3×10^5 em placas de 12 poços e após 24 h o meio foi removido e o inibidor de endocitose foi adicionado por 1 h. Os inibidores utilizados foram: Filipina (1 μ g/mL) e Nistatina (20 μ g/mL) que bloqueiam a endocitose mediada por caveolinas; Amilorida (0,2 mM) e Citocalasina D (1 μ M) que inibem a macropinocitose e óxido de fenilarsina (0,2 μ M) que inibe vias mediadas por clatrina (FILIPA, 2016). Após, as células receberam tratamento com NLS- AIPc (30 μ M) por 2 h. Para cada tratamento, foram mantidos controles sem incubação com os inibidores. As células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas. Estas foram analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur e 10.000 eventos foram contados por amostra. Os resultados foram tratados pelo programa FlowJO.

3.4 *Análise Estatísticas*

Os resultados experimentais obtidos estão expressos em valores médios com desvios-padrão. As análises foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) pelo software Graph Pad Prism®. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das células AGS por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os conteúdos e a posição das organelas celulares também estão sujeitos a regulação. As vesículas endossomais transportam o material internalizado para os sítios intracelulares apropriados, ou direcionam materiais recém-sintetizados para a superfície celular ou para uma organela-alvo. Nos ensaios de 3h e 6h podemos observar que o núcleo permanece íntegro e as organelas em tamanho e disposição no citoplasma, conforme observado na célula sem tratamento (Figura 30).

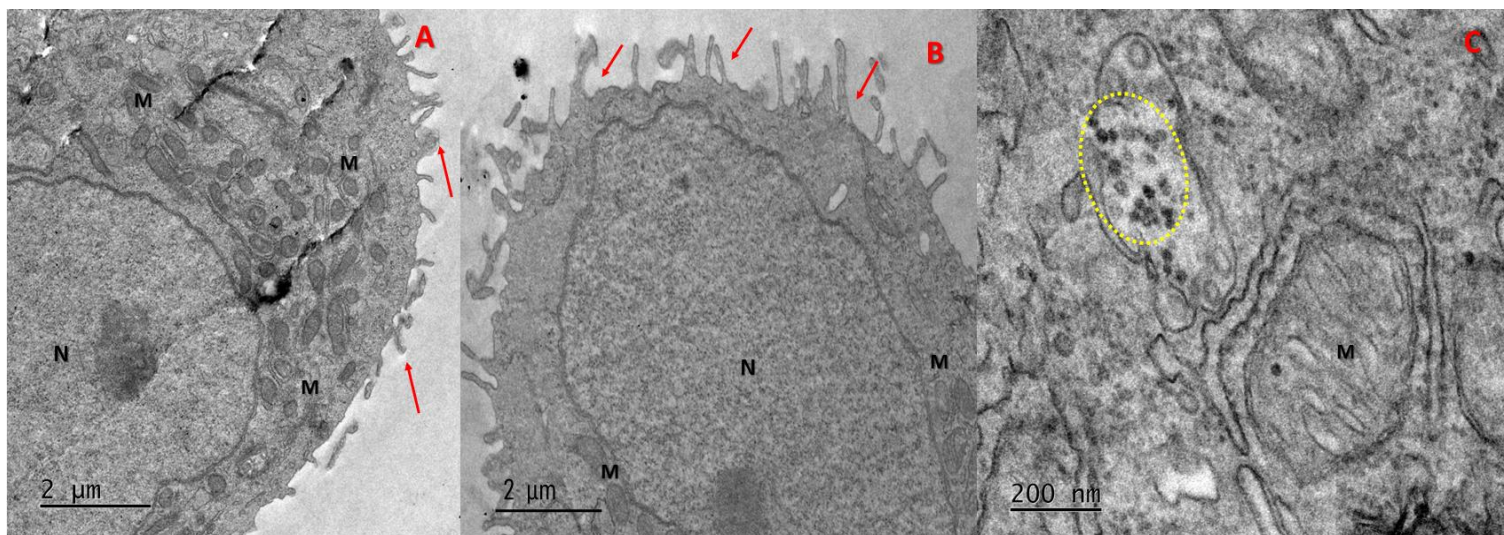


Figura 30: Imagens Ultraestruturais de Células AGS tratadas com NLS-DTX 10 $\mu\text{g/ml}$: A) AGS tratadas por 3 h, B) e C) AGS tratadas por 6 h. (N) núcleo; (M) Mitocôndria; (linha tracejada) aglomerado de NLS-DTX no citoplasma; as setas indicam extensões na superfície da célula.

Morfologicamente, podemos notar que as células expostas ao NLS-DTX por 24 h (Figura 31), apresentam aumento da densidade citoplasmática e agrupamento das organelas com consequente diminuição do volume; também se observa a superfície celular irregular. O núcleo apresenta contorno irregular, onde podemos observar dobras e reentrâncias da membrana nuclear. Durante o processo apoptótico, o núcleo pode se romper em vários fragmentos, através das endonucleases que clivam DNA, produzindo fragmentos.

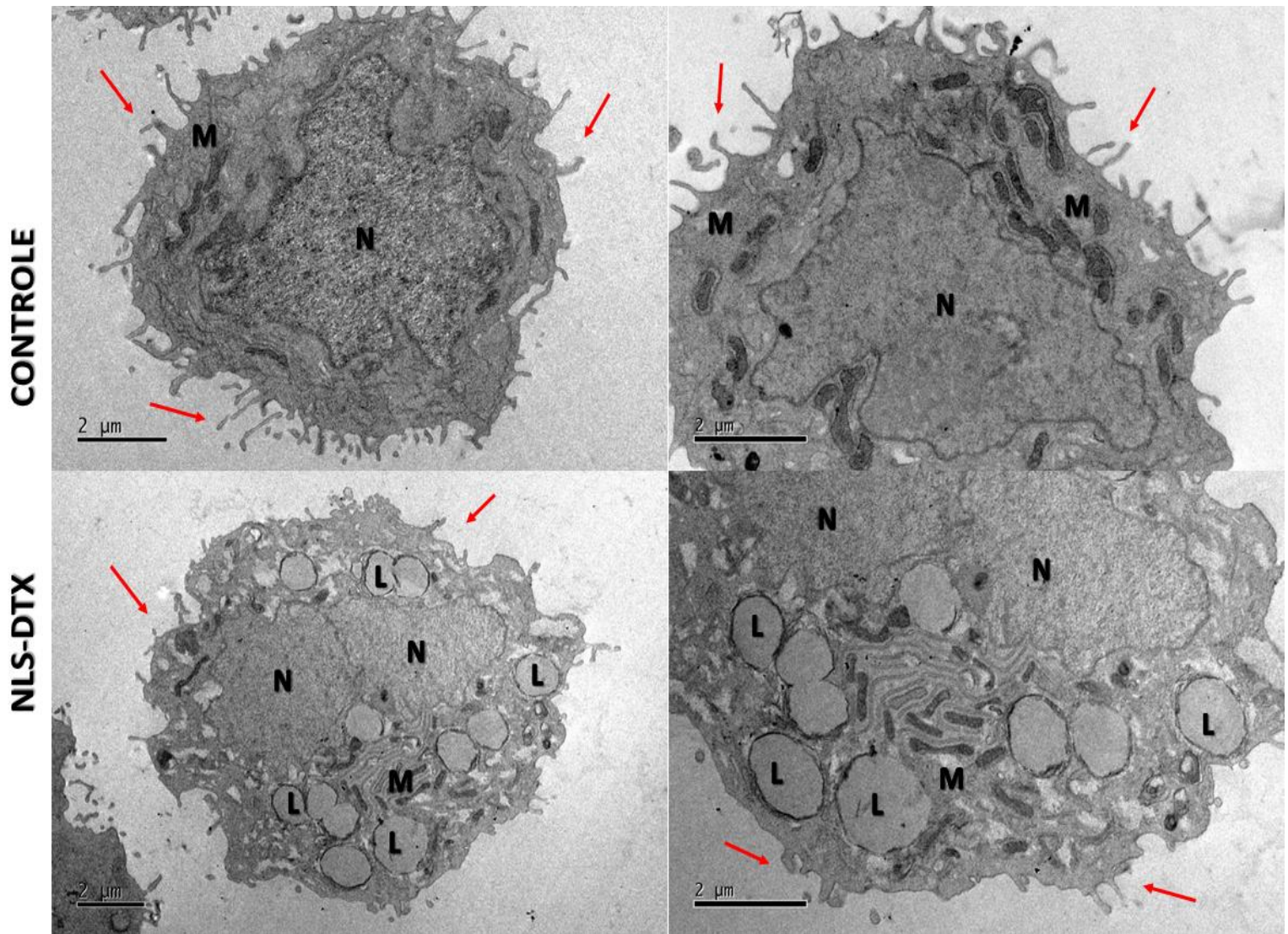


Figura 31: Ultraestrutura de Células AGS tratadas com NLS-DTX 10 µg/ml por 24h: Internalização de NLS-DTX em lisossomos (L). (N) núcleo; (M) Mitocôndria; as setas indicam extensões na superfície da célula.

Quando as células são suprimidas de fatores de crescimento e sinais de sobrevivência, ou são expostas a agentes que danificam o DNA, como por exemplo, após exposição à radiação e fármacos/drogas citotóxicas, vários sensores são ativados. A presença de formação de bolhas citoplasmáticas, e o acúmulo de quantidades alteradas de proteínas mal dobradas no citoplasma, também apresentam características de morte por apoptose.

É importante ressaltar que a função celular pode ser perdida muito antes da morte celular, e que as alterações morfológicas das células lesionadas (ou mortas) instalam-se posteriormente à perda de função e viabilidade celular. Muitas evidências atuais sugerem que vários tipos de NPs se acumulam substancialmente nos lisossomos (RENNICK et al, 2021). Podemos observar

que houve um aumento de acúmulo nos lisossomos. Com esses dados em mãos, a análise da possível ligação entre as reações adversas a medicamentos induzidas por nanomedicina e a disfunção lisossômica é oportuna.

3.2 Internalização com NLS-AIPc

As células AGS foram tratadas com a formulação de NLS-AIPc (30 μ M de ftalocianina) por 24 h e análise foi feita por citometria de fluxo, onde foi possível detectar a fluorescência do composto nas células (MUEHLMANN et al. 2015).

A partir do momento de 0,5 h foi possível notar a presença de partículas fluorescentes nas células. A partir da 1h de exposição ao NLS-AIPc houve um crescente aumento da fluorescência até as 9 h de experimento, onde ocorreu o maior pico de fluorescência. A partir das 15h, houve um decaimento de fluorescência, permanecendo constante até às 24h (Figura 32).

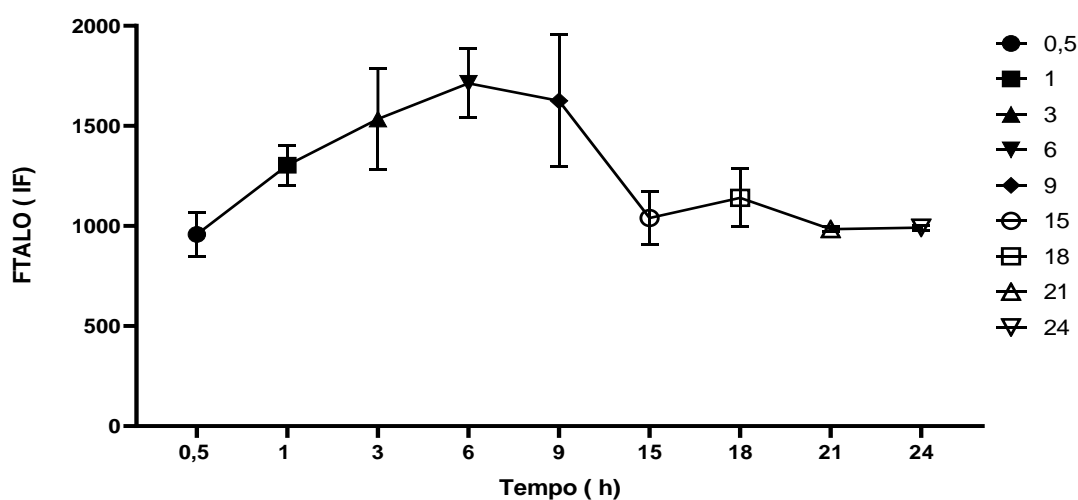


Figura 32. Intensidade relativa de fluorescência das células AGS após internalização da NLS-AIPc. O tempo de exposição é referente às horas em que as células ficaram expostas ao tratamento com a NLS-AIPc. A análise foi feita por citometria de fluxo (comprimento de onda na faixa de 650-850 nm.) Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata.

3.3 Vias de Internalização

Esse experimento visa analisar qual via de endocitose é responsável pela internalização da NLS-AIPc. Foi utilizado como controle positivo as células expostas a NLS-AIPc sem inibidores e como controle negativo as células que não foram expostas aos inibidores e nem a NLS-AIPc.

A endocitose é um processo fisiológico que pode ser dividido em fagocitose (realizada por macrófagos) e pinocitose (dividida em endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose ou endocitose independente de clatrina e caveolina) (WANG et al, 2020). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho (Figura 33), não houve inibição significativa das vias endocíticas pelos inibidores utilizados. É mostrado na literatura que cerca de 50% de toda a atividade endocítica é internalizada independentemente da clatrina e da caveolina (OH et al, 2006).

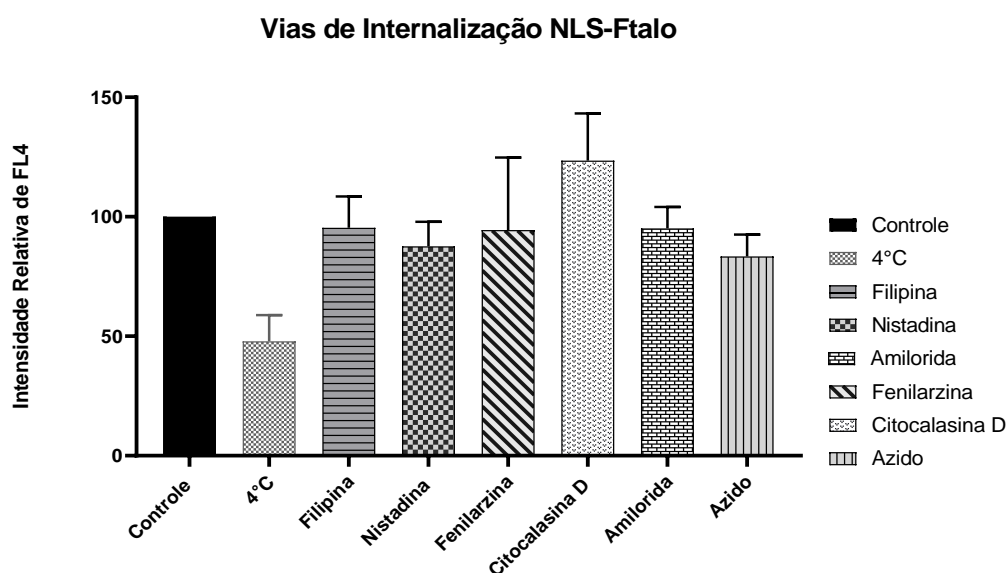


Figura 33 - Internalização de NLS- AIPc por células AGS expostas a diferentes inibidores de endocitose por 3 horas. Células AGS expostas a NLS- AIPc sem inibidores de endocitose foram utilizadas como controle positivo. Experimento realizado em triplicata.

A forma como as nanopartículas são internalizadas depende de uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas dos nanomateriais e o processo de endocitose realizada por cada tipo celular, diretamente ligada à função que determinada célula desempenha em seu tecido de origem (SHETH et al. 2020; SKOTLAND et al. 2020). Espera-se que este processo esteja relacionado com o tipo celular, demonstrando que este é um processo célula-dependente (MIAO et al. 2023).

Apenas no tratamento com 4°C houve redução de 50% na internalização. O comprometimento da produção de energia, devido à baixa temperatura,

diminui a produção de ATP, conseqüentemente inibindo a endocitose (ABUMANHAL-MASARWEH et al. 2019). A temperatura de 4°C tem efeito na fluidez da membrana, fazendo com que os lipídios presentes na membrana se compactam, tornando-os mais rígidos, o que desfavorece o fluxo através da membrana (GIMONDI et al. 2023).

5 CONCLUSÃO

Muitos avanços em técnicas de citometria de fluxo e microscopia através de sondas fluorescentes, possibilitaram uma melhor visualização do processo de endocitose nas células. Mas essas observações continuam a ser desafiadoras devido à natureza complexa dos organismos, pela falta de informações específicas e sondas direcionadas.

A interpretação dos estudos de internalização nem sempre foram diretas, apesar de serem as ferramentas mais utilizadas, disponíveis e fáceis de usar; os inibidores carecem de especificidade para embasar a compreensão dos mecanismos endocíticos em sua totalidade. As limitações incluem o uso de diferentes modelos celulares que manifestam expressão diferencial, podendo ser dependente do tipo de célula e podem afetar mais de uma via endocítica.

A compreensão das interações nanopartícula-célula em nível celular e molecular é absolutamente necessária, bem como estudar respostas nanotoxicológicas crônicas e/ou tardias.

CAPÍTULO III – METABOLISMO

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo celular representa uma rede de reações bioquímicas que convertem nutrientes em metabólitos, as células geram energia e formam macromoléculas (incluindo proteínas, glicose, aminoácidos, lipídios, DNA e RNA), necessários para a manutenção das funções celulares, sustentando o crescimento celular e para minimizar o efeito redox que surgem do aumento da atividade metabólica associada a processos anabólicos. (RODRIGUEZ et al, 2020; BOROUGHS & BERARDINIS, 2021; KIM & LEE, 2021).

Os eventos celulares que promovem o crescimento, proliferação celular ou mesmo senescência, necessitam de ajustes específicos dos níveis de energia e vias metabólicas, que são coordenados com sinais externos e com a regulação do balanço energético (MARTÍNEZ-REYES & CHANDEL, 2021). Em condições homeostáticas, nas células normais, a extensão e a duração dessas reações metabólicas são limitadas.

Em contrapartida, as células alteradas acumulam alterações genéticas e epigenéticas, que lhes permitem escapar dos controles baseados em sua proliferação. Os genes envolvidos no processo carcinogênico, tanto os oncogenes, quanto os supressores de tumor, possuem a capacidade de influenciar a regulação metabólica do organismo de alguma forma (VANDER HEIDEN & DEBERARDINIS, 2017; KIM & LEE, 2021). Além disso, metabólitos selecionados não servem apenas como substratos para geração de energia e biomassa, mas também podem regular a expressão de genes e proteínas e influenciar o comportamento de células não transformadas nas proximidades do tumor (BOEDTKJER & PEDERSEN, 2020).

O câncer pode surgir de diferentes tecidos e tipos de células com características metabólicas distintas (CHEN et al, 2019). A identidade do tumor pode ser determinada por fatores intrínsecos da célula, como as características das lesões oncogênicas em transformação, o fenótipo metabólico da célula de

origem, e pela disponibilidade de metabólitos em um ambiente tecidual específico (OLIVEIRA & URBANO, 2021). A combinação desses fatores pode ajudar a criar tumores com características metabólicas distintas (FOSTER et al, 2018; ZANOTELLI et al., 2019). Dentro do mesmo tecido de origem, a expressão de diferentes oncogenes pode levar a resultados metabólicos não apenas diferentes, mas até mesmo opostos (PISKOUNOVA et al, 2015; TASDOGAN et al, 2020).

Para garantir a proliferação e progressão tumoral, as células cancerígenas, empregam uma variedade de adaptações metabólicas, com a finalidade de adquirir uma demanda contínua de energia e nutrientes (LUNT & VANDER HEIDEN, 2011; CHANDEL, 2021). Seu metabolismo é regulado para aumentar a absorção de nutrientes, para fornecer carbono, nitrogênio, ATP e NADPH para a produção de lipídios, proteínas e nucleotídeos necessários para duplicação celular (REINFELD et al, 2021; TRAN et al, 2021). De fato, as mitocôndrias são uma das principais organelas visadas pelos reguladores do ciclo celular para garantir uma adaptação fisiológica (SPINELLI & HAIGIS, 2018; MARTÍNEZ-REYES et al, 2020; ZHU et al, 2021).

O bioquímico alemão Otto Warburg estabeleceu pela primeira vez uma conexão entre tumorigênese e a desregulação do metabolismo (WARBURG et al, 1927). A adoção do fenótipo invasivo por células transformadas eleva os requisitos de energia da célula, que geralmente exibem uma capacidade aprimorada de absorver glicose do ambiente extracelular (ZANOTELLI et al., 2019; KONDO et al, 2021). Nas últimas décadas, com o avanço dos estudos em mecanismos genéticos e epigenéticos, bem como o avanço de técnicas modernas experimentais com o auxílio da tecnologia, houve um surgimento de novas descobertas que mudaram o paradigma no metabolismo das células cancerígenas (PAVLOVA & THOMPSON, 2016).

É importante destacar que não apenas as células tumorais, mas também as células normais presentes dentro do ambiente tumoral, bem como o equilíbrio metabólico do organismo, podem ter efeitos no metabolismo do câncer,

promovendo o acúmulo e a disseminação de células cancerígenas, reduzindo a capacidade do sistema imunológico de neutralizar o crescimento tumoral e contribuindo diretamente para a letalidade associada ao câncer (GUERRA et al, 2020).

Existem várias evidências que indicam que a resposta imune está associada a modificações no metabolismo tecidual, incluindo a depleção de nutrientes, aumento do consumo de oxigênio e geração de nitrogênio reativo e intermediários de oxigênio (CHEN et al, 2020; HUANG et al, 2020; TERRY et al, 2020). A programação metabólica da célula tumoral não só influencia na apresentação do antígeno e o reconhecimento da célula imune, mas também pode afetar sua função, levando à alteração da imunidade do tumor (LEONE & POWELL, 2020).

Compreender como as adaptações metabólicas das quais os tumores dependem para promover essas mudanças e sustentar o crescimento, mesmo em ambientes metabolicamente desfavoráveis, pode ajudar na construção de novas combinações terapêuticas e, potencialmente, podem sinergizar com as intervenções terapêuticas existentes, como quimioterapia, inibidores direcionados e abordagens de bloqueio do ponto de controle imunológico.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Compreender a dinâmica do metabolismo e organelas celulares da linhagem celular de adenocarcinoma gástrico tratadas com nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao Docetaxel.

2.2 Específicos

I. Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio pelo tratamento das NLS-DTX;

II. Avaliar o efeito do tratamento da NLS-DTX sobre as mitocôndrias e lisossomos;

III. Investigar o tipo de morte após o tratamento com NLS-DTX;

IV. Avaliar a dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α , IL-6), anti-inflamatórias (TGF- β);

V. Dosagem de óxido nítrico;

VI. Avaliar a biogênese dos corpúsculos lipídicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaio de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para a análise de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o reagente CellROX (molecular probes®), sonda fluorescente utilizada para mensurar EROs em células vivas. Células AGS foram plaqueadas na concentração de 3×10^5 células/poço em placas de 12 poços. Após aderidas, as células foram tratadas com NLS-DTX e DTX (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6h e 24h. Como controle positivo, foi utilizado peróxido de hidrogênio 10% por 30 min, antes da incubação com CellROX. As células foram incubadas com 5 μM de CellROX por 30 minutos em estufa a 37°C, e em seguida lavadas com PBS. As células aderidas e em suspensão foram analisadas. Então, 10.000 eventos foram contados por amostra em citômetro. A fluorescência do CellROX foi detectada em comprimento de onda de 520 nm. Os resultados foram analisados usando o software FlowJo® vX 0.7.

3.2 Ensaio do Potencial de Membrana Mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial das células AGS, após o tratamento com NLS-DTX e DTX na concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de docetaxel e NLS no volume equivalente ou apenas meio de cultivo (controle), foi verificado por meio do fluoróforo Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). Este fluoróforo é empregado como corante de mitocôndria. Por ser um composto catiônico, se a membrana mitocondrial estiver despolarizada, há o intercalamento deste marcador na membrana da organela. Assim, agentes que apresentam a capacidade de despolarizar a membrana mitocondrial levam a um decaimento e, conseqüentemente, a uma menor fluorescência da Rodamina 123. Em contrapartida, agentes que promovem a hiperpolarização da membrana levam a uma maior fluorescência da sonda. Quando o potencial da membrana mitocondrial está normal, não há diferença na fluorescência da Rodamina 123 em comparação à fluorescência normal da Rodamina 123 que não será internalizada pelas células. As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas

de 12 poços. Após 24 h e 48h de tratamento com 10 µg/ml de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle), as células foram tripnizadas e lavadas com PBS. Então, o sobrenadante foi descartado e 500µL de PBS 1x com Rodamina 123 (5 µg/mL) adicionado ao “pellet”. Os microtubos foram armazenados por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 300g 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Então, 1 ml de PBS 1x foi adicionado em cada microtubo para que o excesso de rodamina 123 fosse retirado. A lavagem foi realizada duas vezes. Por fim, as amostras foram armazenadas em gelo e analisadas em seguida por Citometria de fluxo (FACSCalibur (Becton Dickinson)). Foram contabilizados 10.000 eventos por amostra e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

3.3 Determinação da densidade de mitocôndrias através da marcação com MitoTracker Green.

As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 h e 48h de tratamento com 10 µg/ml de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle), as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS. As células foram incubadas com o fluoróforo na concentração 150 mM por 30 min, seguindo de tripsinização, centrifugação e lavadas com PBS 1X. Por fim, as amostras foram armazenadas em gelo e analisadas em seguida por Citometria de fluxo (FACSCalibur). As amostras foram analisadas em triplicata e em cada uma foram adquiridos 10.000 eventos e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

3.4 Fluorescência da densidade de mitocôndrias através da marcação com MitoTracker Green.

Para avaliar a funcionalidade das mitocôndrias, as células AGS foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e após 24h foram tratadas com NLS-DTX, DTX e NLS na concentração de 10 µg/ml por 24h. Após esse tempo, o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com MitoTracker® Green na concentração 150 mM por 30 min. Após o tempo de tratamento, meio com tratamento foram retirados e as células foram fixadas com

formaldeído 3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Após, as lamínulas foram incubadas por 7 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS SP5).

3.5 Autofagia por Laranja de Acridina

Para analisar o efeito do fluoróforo laranja de acridina nas células AGS, as mesmas foram plaqueadas 3×10^5 em placas de 12 poços e após a aderência, tratadas por 24 h e 48h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX e DTX, em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e acrescido 500 μl de solução de laranja de acridina (1 $\mu\text{g/ml}$) por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e então, analisadas por Citometria de fluxo (FACSCalibur (Becton Dickinson), nos canais FL1 e FL3. Foram contabilizados 10.000 eventos por amostra e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

3.6 Fluorescência por Laranja de Acridina

As células AGS foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e após 24h foram tratadas com NLS-DTX, DTX e NLS na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ por 24h. Após esse tempo, o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com laranja de acridina na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ por 10 minutos. Após, os meios com os tratamentos foram retirados e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS SP5).

3.7 Determinação da Permeabilidade da Membrana Lisossomal

Para analisar o efeito do Vermelho Neutro, células AGS, foram plaqueadas 3×10^5 em placas de 12 poços e após a aderência, foram tratadas

por 24 h e 48h com 10 µg/ml de NLS/DTX e DTX, em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e foi acrescido 500 µl de solução de Vermelho Neutro (10 µg/mL) por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e então, analisadas por Citometria de fluxo (FACSCalibur (Becton Dickinson)). Foram contabilizados 10.000 eventos por amostra e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

3.8 Ensaio de morte celular induzida pelas NLS-DTX

A análise do tipo de morte induzida pelo tratamento após 24h e 48h com nanopartículas lipídicas sólidas foi realizada a partir da marcação das células tumorais AGS com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose e também as células viáveis. Foram semeadas 3 x10⁵ células de AGS em placas de 12 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com NLS-DTX e DTX na concentração 10 µg/mL de docetaxel e NLS no volume equivalente a NLS-DTX ou receberam apenas meio de cultivo (controle). Antes de completar as 48 h de tratamento com as NLS-DTX e o DTX, o grupo controle para apoptose foi tratado com 10 mM de peróxido de hidrogênio. Após, tanto as células aderentes como as flutuantes foram recolhidas e centrifugadas a 500 g por 5 min para a retirada do meio. O pellet foi lavado com PBS e as células foram centrifugadas. Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) e o grupo controle de necrose foi aquecido à 90°C. Foram adicionados 3 µL de anexina-V nas amostras e depois incubadas por 15 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados e os tubos a partir desse momento foram mantidos no gelo, seguido da adição de 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 µg/mL). O grupo controle de apoptose foi marcado somente com anexina-V e o grupo controle de necrose somente com PI. As células foram incubadas por mais 5 min no gelo, lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no Citômetro FACSCalibur (Becton

Dickinson) com o auxílio do software CellQuest-Pro. As análises foram realizadas a partir de três experimentos independentes.

3.9 Determinação do nível de Ca^{2+} Intracelular

O Fluo-4 fluorescente verde ligado ao éster acetoximetílico (Fluo-4/AM) foi usado para determinar o nível de Ca^{2+} intracelular. O AM não fluorescente é clivado pela esterase e torna o Fluo-4 livre para ligar Ca^{2+} e emitir um sinal fluorescente. As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 h e 48h de tratamento com 10 μ g/ml de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle), as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS. As células foram expostas a 2 μ L de Fluo-4/AM por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. O nível de Ca^{2+} intracelular foi analisado usando o canal FL1, no citometro FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.10 Dosagem de Óxido Nítrico

As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas por 24 h com 10 μ g/ml de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle). A produção de NO foi determinada pela dosagem do total de nitrito (NO_2^-) nas amostras sobrenadante de cultura celular, utilizando o método de Griess (GRISHAM et al., 1996). Para o preparo do reagente de Griess foram misturadas quantidades iguais (1:1) sulfanilamida a 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato a 0,1%, em ácido fosfórico a 2,5%. Em uma microplaca de 96 poços foram colocados 50 μ L de cada amostra, em triplicata. Foi construída uma curva padrão com nitrito de sódio ($NaNO_2$) nas concentrações de 100 - 1,56 μ m. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de reagente de Griess aos poços que continham as amostras para a realização da curva. O controle da reação (branco) foi feito pela adição de 50 μ L de meio de cultura adicionados 50 μ L do reagente de Griess. Essa placa foi incubada à temperatura ambiente para permitir o desenvolvimento e a estabilização do cromóforo. A absorbância da reação foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540nm. Após a leitura, esses dados foram analisados no programa SoftMax. A análise de regressão linear foi usada para calcular as

concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio.

3.11 Dosagem de Citocinas

As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 h de tratamento com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle), as citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α , IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- β), provenientes do sobrenadante da cultura celular de AGS tratadas, foram analisadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). As microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com Soro Fetal Bovino 5% em PBS e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com solução 0,05% Tween-20 em tampão PBS, foram adicionadas as amostras (50 μL) e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-citocinas conjugados à biotina foram adicionados às placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptavidina peroxidase e incubada por 20 min à temperatura ambiente. Após novas lavagens, substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina foi adicionado às placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. Os níveis de citocinas foram demonstrados a partir da leitura em 450 nm no aparelho SpectraMax. Após a leitura, esses dados foram analisados no programa SoftMax.

3.12 Ensaio da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos

As células AGS 3×10^5 foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas por 24 h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de NLS-DTX, DTX, NLS e meio de cultura (controle). Para analisar e quantificar a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) foi utilizado uma sonda fluorescente lipofílica, BODIPY 493/503 (Life technologies), usada para a identificação de lipídios neutros intracelulares (triglicerídeos e ésteres de colesterol) presentes em grandes quantidades em

CLs. Para a quantificação de CLs, as células foram incubadas com uma solução de bodipy/PBS 1 x na concentração de 1/5000 por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após esse período as mesmas foram lavadas com PBS 1 x por 3 vezes, ressuspensas em 500µL de paraformaldeído 1% e mantidas a 4°C até leitura por citometria de fluxo (FACSCalibur) no canal FL1 em escala logarítmica. O gate, quando aplicado, foi plotado na população de células viáveis, excluindo-se os restos celulares da análise. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10. Experimento feito em três ensaios independentes.

3.13 Análise Estatística

Os resultados experimentais obtidos estão expressos em valores médios com desvios-padrão. As análises foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) pelo software Graphpad Prism®. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS) são subprodutos celulares normais que desempenham um papel importante no metabolismo celular (ZOROV et al, 2014). Diferentes tipos celulares tumorais produzem níveis maiores de espécies reativas de oxigênio quando comparadas com suas contrapartes normais no câncer (MOLONEY & COTTER, 2018) No câncer, as EROs têm um papel duplo promovendo carcinogênese e proliferação celular e pode causar vários danos celulares e levar à morte celular de acordo com seu nível intracelular. Sabe-se que um aumento na produção de EROs está principalmente relacionado ao estresse mitocondrial.

Nesse estudo, utilizamos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como controle de intensidade de liberação de EROs, devido ao seu alto potencial danoso às células (GIORGIO et al, 2007). Em 6h, podemos notar que os tratamentos e a célula sem tratamento não produziram mais EROs que o H_2O_2 , não ocorrendo diferença significativa entre os grupos (figura 34).

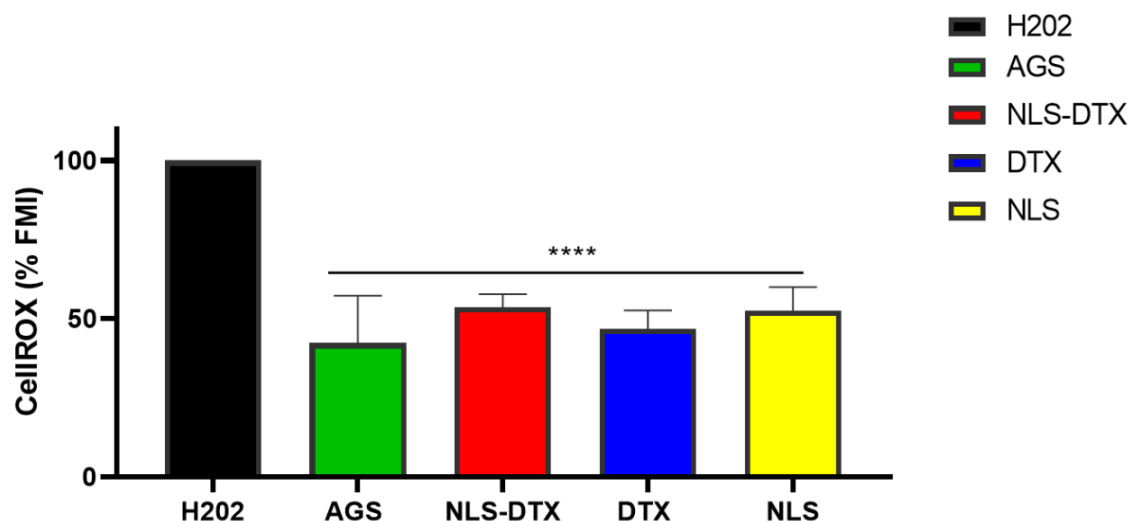


Figura 34 - Produção de espécies reativas de oxigênio por células AGS após os tratamentos por 6h. As células de AGS foram expostas a 10 μ g/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. Peróxido de hidrogênio (controle positivo). **** $P < 0,0001$.

Em 24h, podemos perceber que os tratamentos NLS-DTX, DTX e NLS aumentaram a intensidade de produção de EROs, em relação ao tratamento de 6h (Figura 35). Conforme mencionado anteriormente, a ação do docetaxel ocorre no momento da divisão celular, o qual acontece por volta de 22h, o que pode justificar o aumento das EROs, devido à alta atividade metabólica celular.

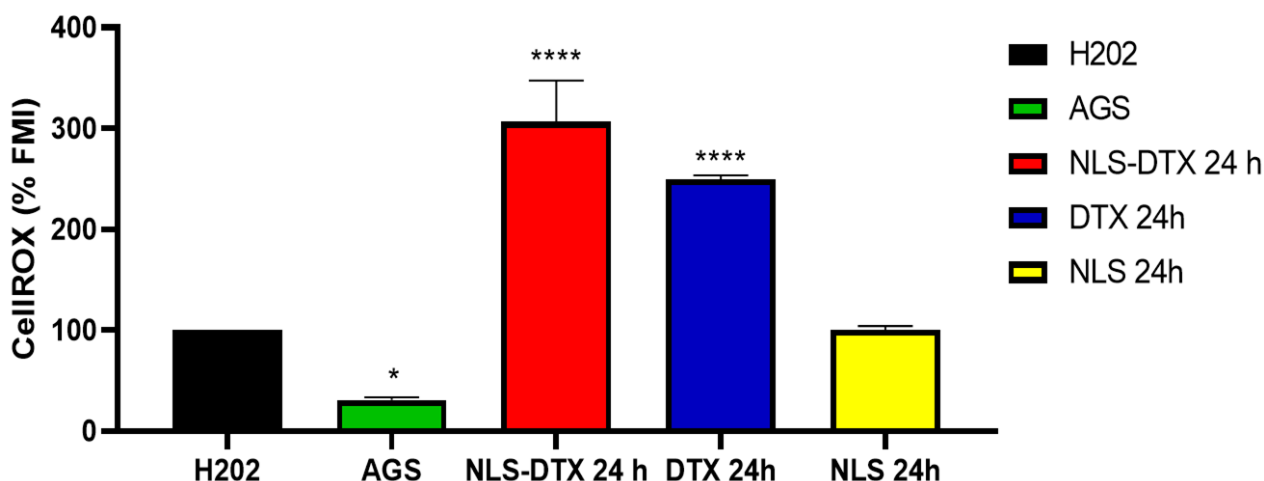


Figura 35 - Produção de espécies reativas de oxigênio por células AGS após os tratamentos por 6h. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. Peróxido de hidrogênio (controle positivo). * P<0.05 e ****P<0,0001.

O tratamento com NLS-DTX produziu 3x mais EROs do que H₂O₂, enquanto o tratamento com DTX teve um aumento de 2,5x mais EROs do que H₂O₂. O tratamento com NLS dobrou sua atividade de EROs em relação ao tratamento de NLS de 6h, mas ainda foi bem menor do que os tratamentos com DTX. Indicando que o aumento foi pela ação do DTX e não pela presença de NLS. A célula AGS manteve constante sua atividade de EROs nos dois tempos, evidenciando que o aumento ocorreu por influência dos tratamentos. Vários trabalhos utilizando docetaxel ou formulações contendo docetaxel comprovam o efeito da alta atividade de EROs (FABIAN et al, 2022; FÁTIMA et al, 2022; JURCZYK et al, 2022; GUPTA et al, 2023).

A elevada produção de EROs no câncer demonstra induzir uma grande variedade de efeitos biológicos, que podem incluir aumento da proliferação celular, dano ao DNA, instabilidade genética, adaptação, lesão e morte celular,

autofagia e resistência aos tratamentos quimioterápicos (AZMANOVA & PITTO-BARRY; 2022; GANESH et al, 2022). O resultado depende do histórico genético do câncer, dos tipos de EROs envolvidos, seus níveis e duração da exposição (AZMANOVA & PITTO-BARRY; 2022).

Níveis elevados de EROs em processos carcinogênicos podem ser resultado da redução de enzimas de eliminação de radicais livres, aumento do metabolismo da glicose (efeito Warburg), aumento da atividade do receptor na célula, atividade oncogênica, aumento da presença de fatores de crescimento e citocinas ou devido ao aumento da produção intracelular de oxidantes a partir da mitocôndria, NADPH oxidases (NOX), ciclooxigenases (COX), lipoxigenases e enzimas do citocromo P450 (HEIDEN et al, 2009; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014; PANIERI & SANTORO, 2016; AZMANOVA & PITTO-BARRY, 2022; WANG et al, 2023).

4.2 *Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial*

As mitocôndrias são organelas eucarióticas, que regulam várias funções vitais na fisiologia celular, sendo o centro de atividades metabólicas para os principais processos biológicos, como funções bioenergéticas, biossintéticas e de sinalização.

No processo oncogênico, as mitocôndrias estão envolvidas em todos os processos, desde a transformação da malignidade celular, formação de metástases e resistências aos tratamentos quimioterápicos (GUERRA et al, 2017; LEE et al, 2022). Devido às grandes diferenças estruturais e funcionais entre mitocôndrias normais e oncogênicas, como as discrepâncias entre as taxas respiratórias, potencial de membrana, mutações genéticas e vias de produção de energia, essa organela destaca-se como um importante alvo na terapia direcionada para o tratamento do câncer.

Summerhayes et al (1982), há mais de 40 anos, relatou pela primeira vez que a maioria das culturas *in vitro* de células cancerígenas epiteliais têm um potencial de membrana mitocondrial (PMM) muito maior (conforme avaliado pela absorção e retenção de corante sensível a PMM – p. ex. rodamina 123) quando comparado a células saudáveis (CHEN 1988 ; CHU et al, 2021). A alteração do

PMM é um evento precoce que causa a liberação do citocromo c no citosol, o início da ativação da caspase e a morte celular por apoptose.

Danos às mitocôndrias estão frequentemente associados à formação de um canal de alta condutância na membrana mitocondrial, chamado poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A abertura desse canal leva à perda de potencial de membrana da mitocôndria e a alterações de pH, comprometendo ainda mais a fosforilação oxidativa. Portanto, em alto nível de PMM, as sondas se concentram na mitocôndria e emitem fluorescência fraca. Quando a PMM diminui, algumas das sondas são liberadas para o citoplasma celular e as concentrações nas mitocôndrias diminuem, causando aumento na intensidade fluorescente (SUMMERHAYES et al, 1982).

Nesse ensaio, podemos observar que não houve diferença significativa no PMM entre os grupos nos ensaios de 6h (FIGURA 36) e 24h (FIGURA 37).

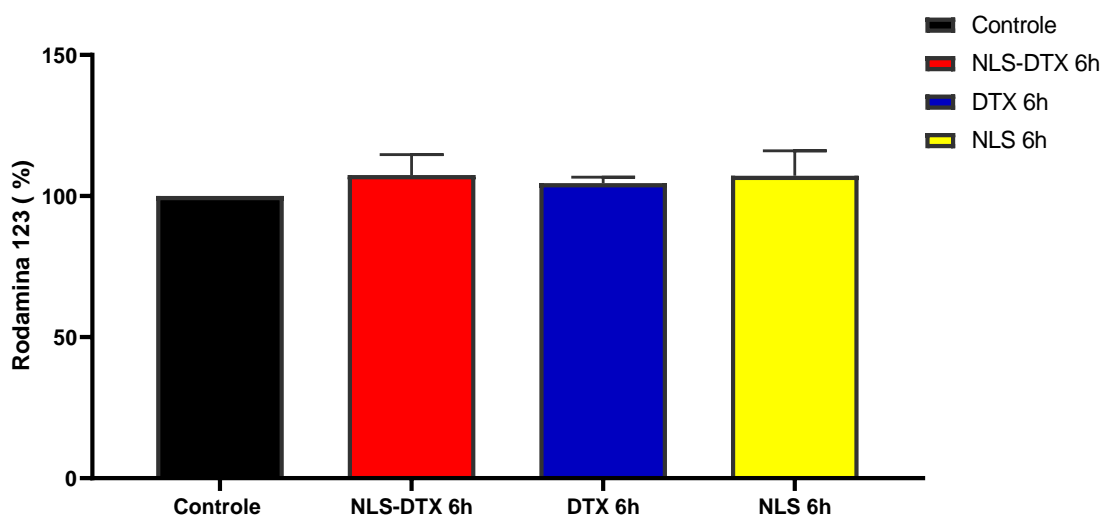


Figura 36: Avaliação do Potencial da Membrana Mitocondrial 6h. As células de AGS foram expostas a 10 $\mu\text{g/ml}$ e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A permeabilização da membrana mitocondrial foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência da rodamina 123.

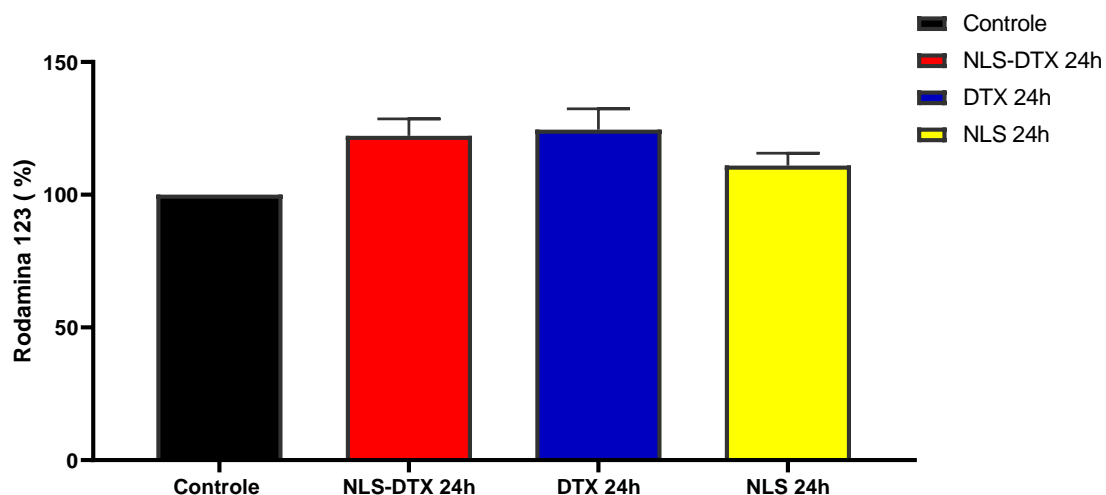


Figura 37: Avaliação do Potencial da Membrana Mitocondrial 24h. As células de AGS foram expostas a 10 $\mu\text{g/ml}$ e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A permeabilização da membrana mitocondrial foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência da rodamina 123.

Decorrido o tempo de 48h, podemos observar que os tratamentos com NLS-DTX e DTX apresentaram aumento na intensidade de fluorescência, evidenciando a despolarização da membrana mitocondrial (Figura 38). A PMM no tratamento com NLS permaneceu constante em todos os tempos.

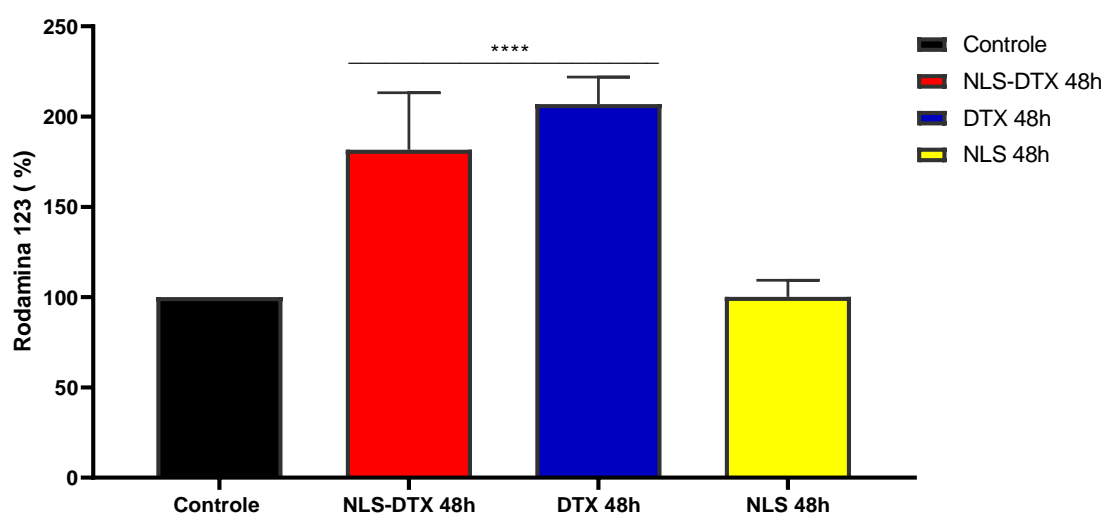


Figura 38: Avaliação do potencial da membrana mitocondrial por 48h. As células de AGS foram expostas a 10 $\mu\text{g/ml}$ e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A permeabilização da membrana mitocondrial foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência da rodamina 123. **** $P < 0,0001$.

Foi demonstrado em estudos com células de câncer de próstata resistentes ao docetaxel, que o potencial de membrana mitocondrial tem papel na promoção a metástase e invasão no câncer de próstata (ZHANG et al, 2023). Gupta et al, (2022, 2023) demonstraram que a nanoencapsulação de docetaxel apresentou ser mais eficaz em termos de geração de EROs e depleção do potencial de membrana mitocondrial, em células de câncer de pulmão e câncer oral humanos.

A maioria dos estudos que relataram observações de alto PMM de células cancerígenas foi realizada usando culturas *in vitro*. Momcilovic et al. (2019) usaram uma técnica de imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET) para investigar o PMM de células de câncer de pulmão *in vivo*. Foi encontrado uma heterogeneidade de PMM dependente do subtipo de tumor nesses modelos de camundongos - tumores adenocarcinomas têm um PMM mais alto, enquanto pequenos tumores de carcinoma de células escamosas têm PMM mais baixo.

Em síntese, descobriu-se que as células cancerígenas têm funções mitocondriais altamente desreguladas, que podem se manifestar como diferenças em seus PMM, em diferentes intensidades nos diversos tipos celulares (CHEN, 1988; VYAS et al., 2016). Além disso, essa heterogeneidade metabólica emergiu como uma importante marca registrada da célula cancerígena e um promissor potencial alvo terapêutico (WARD & THOMPSON, 2012; ASHTON et al, 2018).

4.3 *Análise da Massa Mitocondrial*

Como foi relatado no tópico anterior, as mitocôndrias são organelas intracelulares importantes por causa de seu papel desempenhado no metabolismo celular, proliferação e morte celular programada. O metabolismo energético mitocondrial desempenha um papel importante no desenvolvimento de tumores humanos, incluindo o câncer gástrico (RICKARD et al, 2023). Portanto, medir os parâmetros mitocondriais nas células cancerígenas é fundamental para entender os processos mitocondriais subjacentes à progressão do tumor e para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

A detecção da massa mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o MitoTracker™ Green (Invitrogen™), marcador mitocondrial permeável às células vivas é usado para a identificação de mitocôndrias independente do seu potencial de membrana. A massa mitocondrial representa o equilíbrio entre as taxas de biogênese e degradação da mitocôndria. Logo, esta análise foi realizada a fim de buscar compreender se a NLS-DTX possui influência direta na degradação dessas organelas.

Podemos observar que no tempo de 24h, houve redução da massa mitocondrial em todos os tratamentos comparados ao grupo controle (Figura 39). Houve uma redução de 24% em NLS-DTX, 28% em DTX e 12% em NLS. Essa redução se reflete diretamente na capacidade das células de produzirem novas mitocôndrias e regularem sua forma e quantidade de acordo com a demanda energética e condições de estresse oxidativo (COSTANZINI et al, 2019).

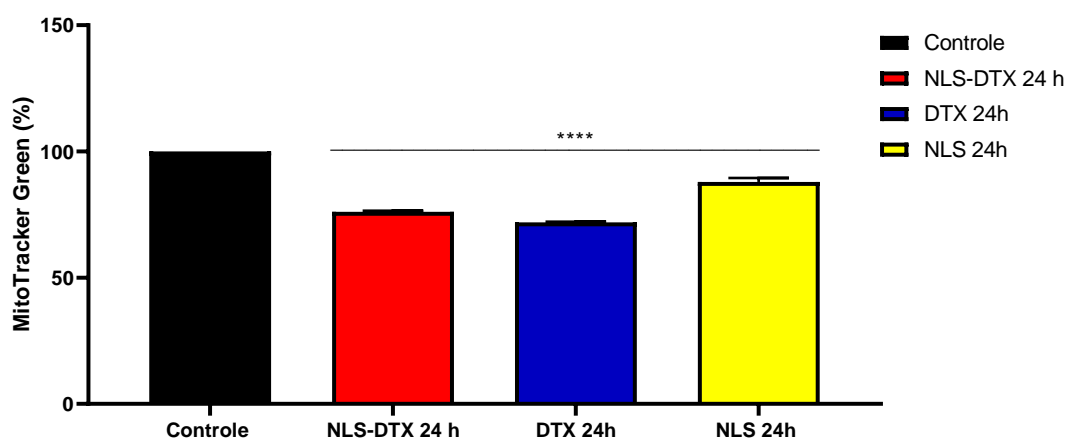


Figura 39: Avaliação do Massa Mitocondrial 24h. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A densidade mitocondrial foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência do MitoTracker Green. ****P<0,0001.

Já no tempo de 48h, NLS-DTX apresentou um aumento da massa mitocondrial de 6% em relação ao grupo controle. DTX e NLS permaneceram abaixo, com redução de 16% e 24% respectivamente (Figura 40).

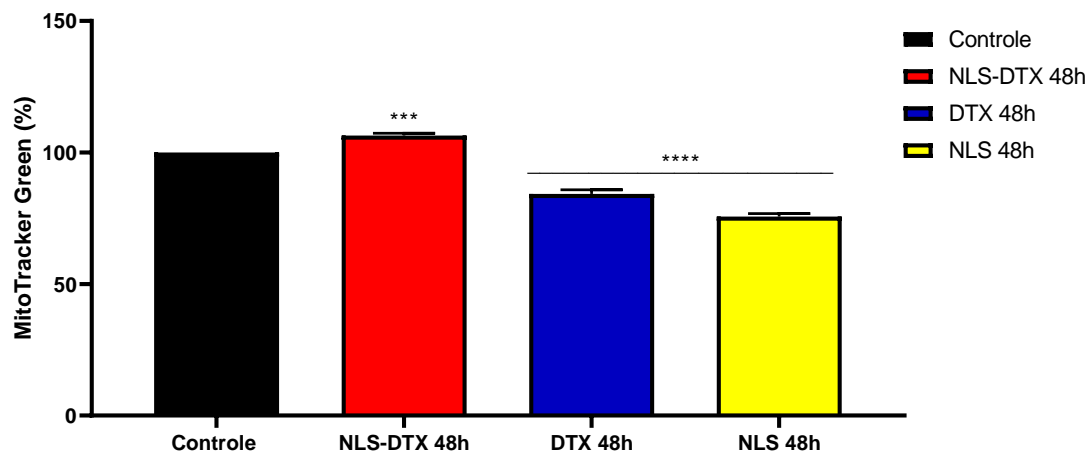


Figura 40: Avaliação do Massa Mitochondrial 48h. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A densidade mitocondrial foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência do MitoTracker Green. *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

De acordo com os dados obtidos, pode-se sugerir que a célula perde parte da função de biogênese da mitocôndria e a organela tem seu formato alterado, fazendo com que não seja capaz de suprir toda a demanda energética necessária para o bom funcionamento (Figura 41). Portanto, pode ser sugerida uma relação direta entre os tratamentos proposto nesse estudo e a quantidade de mitocôndrias disponíveis no citoplasma. Adaptações ao mau funcionamento mitocondrial também foram associadas à resistência a medicamentos (GUERRA et al, 2017; LEE et al, 2022).

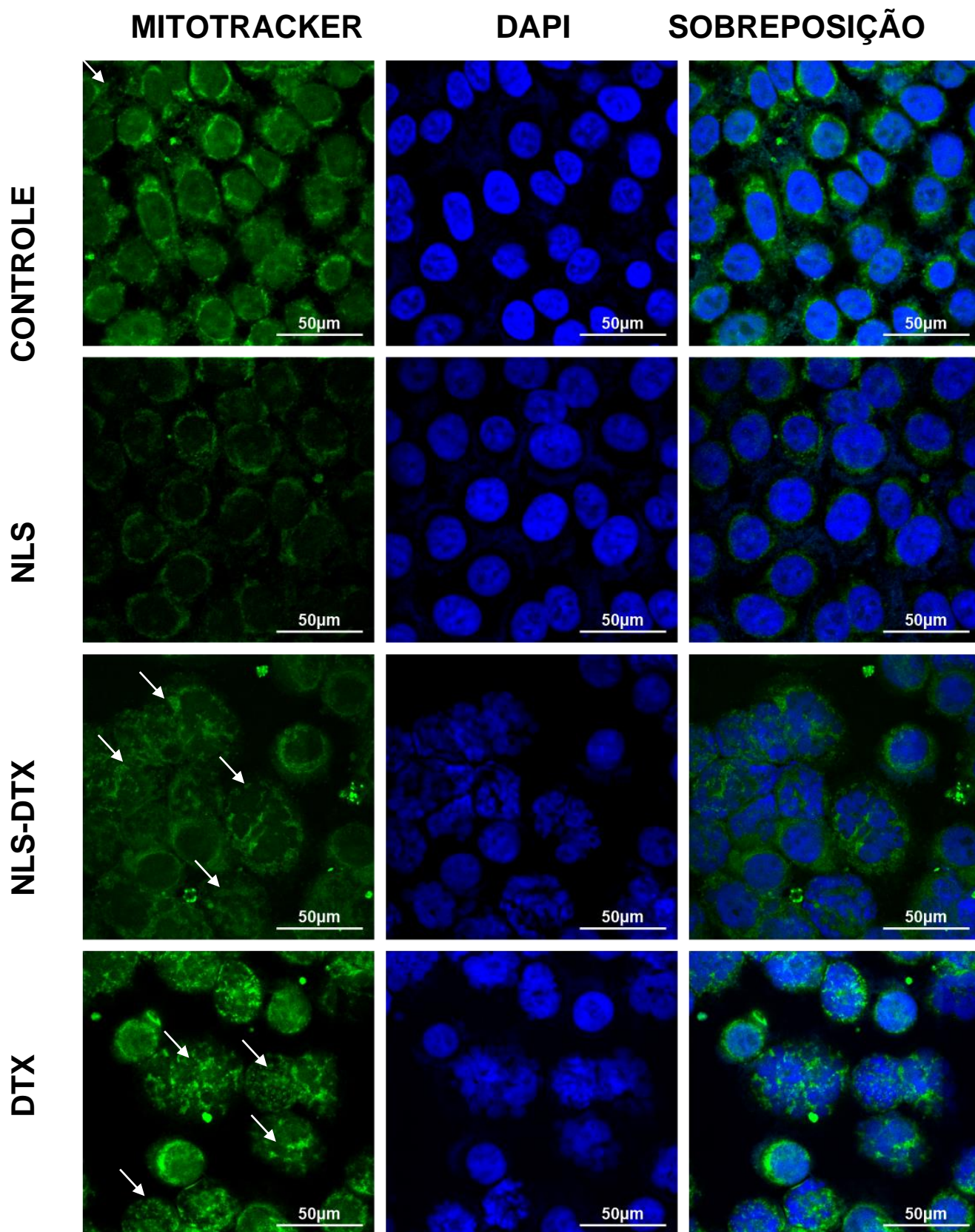


Figura 41 - Fluorescência da Massa Mitochondrial em células AGS por Mitotracker Green após os tratamentos. As células foram imunomarcadas com Mitotracker Green (verde), DNA das células foi marcado com DAPI (azul) e combinados (sobreposição), para células AGS não tratadas ou tratadas com NLS, NLS-DTX ou DTX 10 µg/mL por 24 h. As setas mostram a desorganização das mitocôndrias no citoplasma.

4.4 Autofagia por Laranja de Acridina

A autofagia é um processo dinâmico de degradação de componentes celulares e está reconhecidamente envolvida em processos fisiológicos e patológicos. Por isso, um melhor entendimento desse processo é necessário para se ter maior precisão em intervenções terapêuticas. Análise de autofagia pela razão de fluorescências do marcador laranja de acridina é uma ferramenta para análise da evolução tumoral.

O fluoróforo Laranja de Acridina (LA) é um marcador básico metacromático, que se difunde através da membrana citoplasmática e fica retido nos compartimentos celular com baixos pH, resultando numa fluorescência laranja brilhante dos lisossomos (organelas vesiculares ácidas) (canal FL3) e verde difusa no restante da célula (canal FL1), sendo assim, um método rápido e barato para a detecção deste tipo de organelas, que aumentam durante a indução de autofagia. LA não se intercala com DNA de células vivas intactas e não se acumula em outras organelas não ácidas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi (DELIC et al, 1991; KUSUSAKI et al, 2000)

Após 24h e 48h de exposição às amostras, o processo autofágico das células AGS foi avaliada com laranja de acridina (LA), um corante lisossomo trópico que se acumula em organelas ácidas. Aqui, foi observada nos tratamentos com NLS-DTX e DTX aumento significativo do sinal de fluorescência.

No tempo de 24h (Figura 42), podemos observar que no canal FL1 (verde) houve aumento de 42% de intensidade de fluorescência de NLS-DTX, comparado ao controle, e de 37% de aumento em DTX (Figura 43). NLS não apresentou aumento significativo em relação aos tratamentos. No canal FL3 (Laranja), NLS-DTX e DTX tiveram o mesmo comportamento, tiveram um aumento de 26% de intensidade de fluorescência (Figura 44). O NLS não teve aumento significativo.

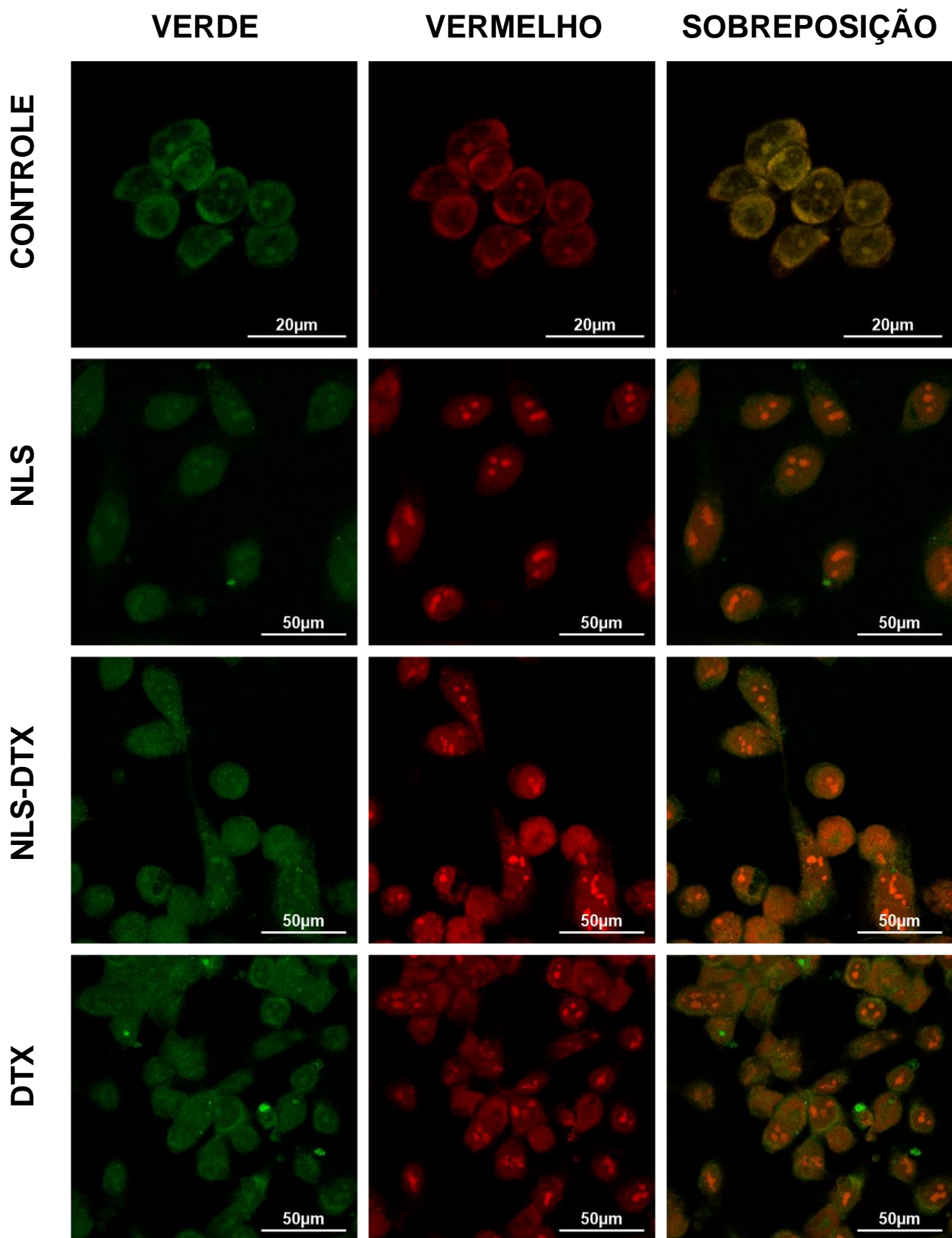


Figura 42 - Fluorescência de Autofagia com Marcação de Laranja de Acridina em células AGS. As células foram imunomarcadas com o fluoróforo laranja de acridina em dois canais de espectro (Verde e Vermelho) e combinados (sobreposição), para células AGS não tratadas ou tratadas com NLS, NLS-DTX ou DTX 10 µg/mL por 24 h.

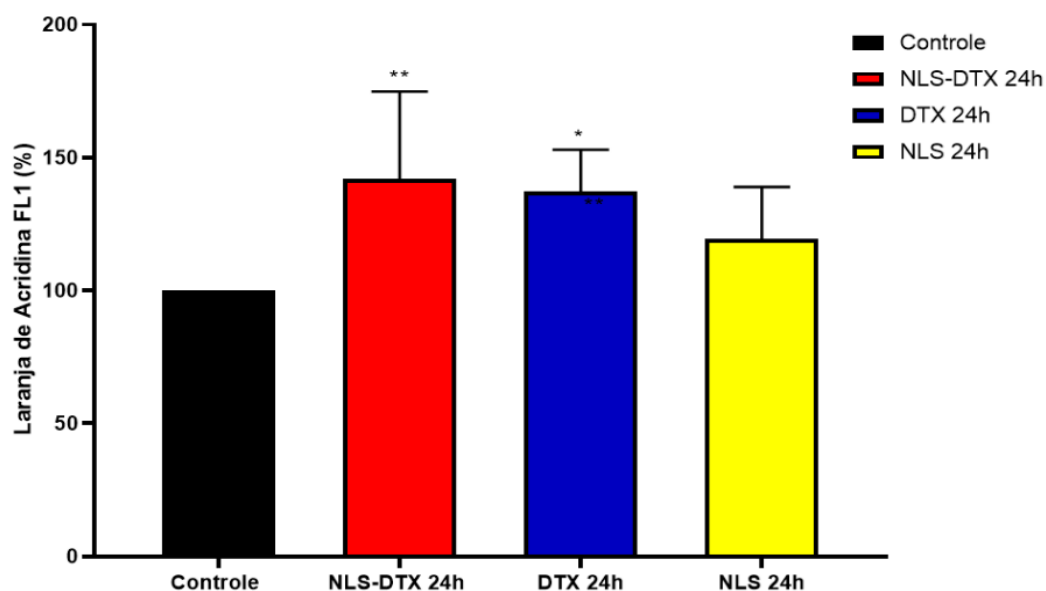


Figura 43: Marcação com Laranja de Acridina por 24 h Canal FL1. Tratadas com NLS-DTX por 24h. Intensidade Relativa do canal FL1. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$.

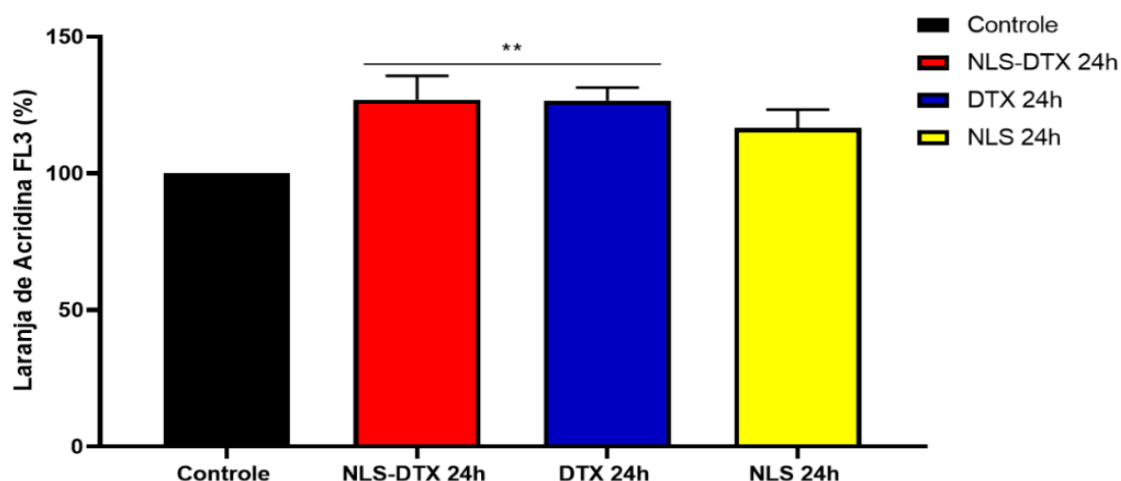


Figura 44: Marcação com Laranja de Acridina por 24 h Canal FL3. Tratadas com NLS-DTX por 24h. Intensidade Relativa do canal FL3. ** $P < 0.01$.

No tempo de 48h, podemos observar que no canal FL1 (verde) houve aumento de 47% de intensidade de fluorescência de NLS-DTX, comparado ao controle, e de 100% de aumento em DTX (Figura 45). NLS não apresentou aumento significativo em relação aos tratamentos. No canal FL3 (Laranja), NLS-DTX apresentou um aumento de 51%, DTX teve um aumento de 112% e NLS teve aumento de 34% (Figura 46).

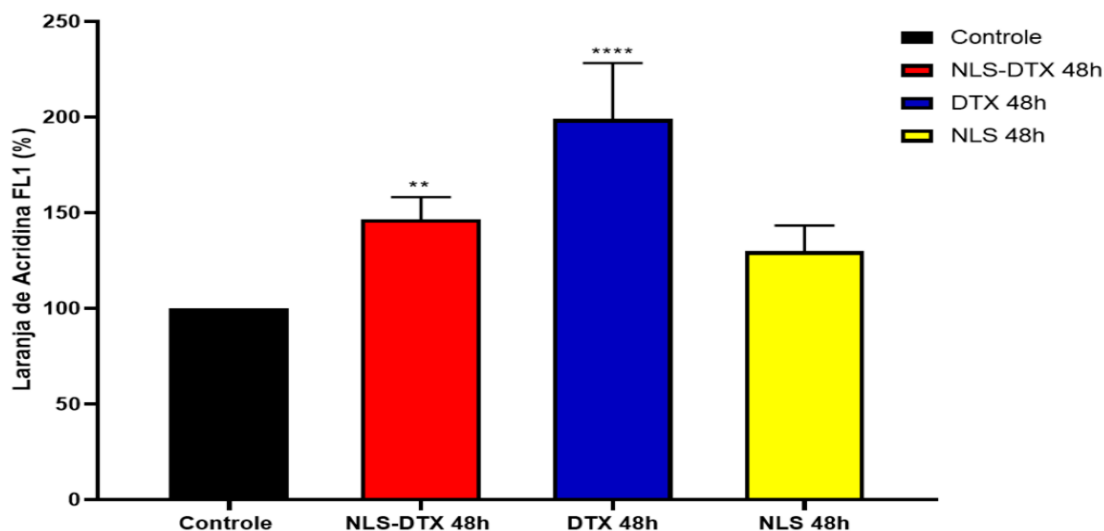


Figura 45: Marcação com Laranja de Acrídina por 48 h Canal FL1. Tratadas com NLS-DTX por 48h. Intensidade Relativa do canal FL1. **P<0.01, ****P<0.0001.

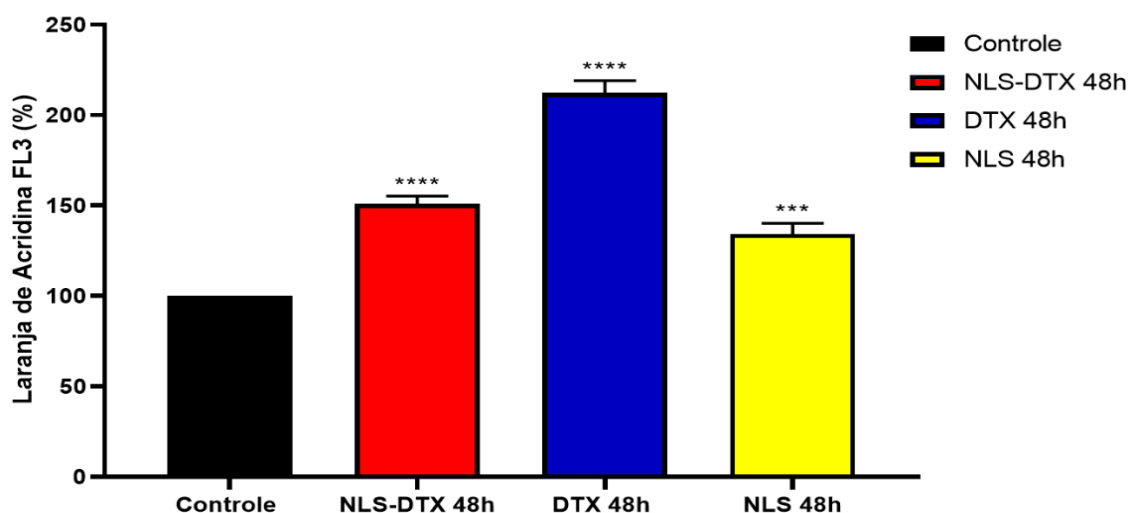


Figura 46: Marcação com Laranja de Acrídina por 48 h Canal FL3. Tratadas com NLS-DTX por 48h. Intensidade Relativa do canal FL3. ***P<0.001 e ****P<0.0001.

O aumento da fluorescência verde (canal FL1) nos tratamentos de NLS-DTX e DTX, podem estar relacionados aos danos às membranas lisossômicas que resultam num extravasamento das suas enzimas para o citoplasma e a ativação de hidrolases ácidas em pH intracelular ácido da célula lesionada.

A autofagia é um processo conservado de reciclagem de organelas celulares e proteínas mal dobradas, sendo definida como a degradação lisossômica intracelular e é fortemente regulada por genes relacionados à autofagia (MIZUSHIMA & KOMATSU, 2011; RAKESH et al, 2022). É uma das

primeiras defesas contra o dano do estresse oxidativo, mostrando ser regulada em resposta a níveis elevados de EROs (TAUCHER et al, 2022).

A importância dos microtúbulos no fluxo autofágico é reconhecida há muito tempo, e seu papel na iniciação da autofagia, tráfego e fusão lisossômica tem sido continuamente estudado nas últimas décadas (BORHANI, 2023; ŠKUBNÍK et al, 2023). A ligação entre quimioterápicos alvos de microtúbulos e autofagia são extremamente complexas, a resistência a esses medicamentos pode se desenvolver por meio da promoção da forma citoprotetora da autofagia (XU et al, 2022).

Foi demonstrado que o 3-MA em combinação com o DTX, superou a autofagia induzida por DTX e melhorou a sensibilidade das células de adenocarcinoma pulmonar ao DTX (PAN et al, 2014). Células de câncer de próstata resistentes ao docetaxel aumentam o fluxo autofágico via regulação positiva da expressão da proteína FOXM1. Além disso, o knockdown do FOXM1 sensibiliza as células ao DTX tanto *in vitro* quanto *in vivo*, associado a uma diminuição do fluxo autofágico e a um menor número de autofagossomos (LIN et al, 2020).

NPs PLGA foram usados para entregar o DTX, que foram internalizados e convertido dentro dos lisossomos levando à inibição da morte celular. Foram utilizados juntamente com inibidores de autofagia, o que aumentou o efeito terapêutico do DTX no modelo de camundongos portadores de tumor MCF-7 (ZHANG et al 2014a). Resultados semelhantes foram observados em NPs H40-PLA carregados com DTX, onde NPs DTX-H40-PLA induziram autofagia *in vitro* e *in vivo* em modelo de câncer de mama. A adição de inibidores de autofagia aos NPs DTX-H40-PLA bloqueou a autofagia e inibiu de forma impressionante o crescimento do tumor (ZHANG et al 2014b).

No entanto, a ausência de experimentos de inibição da autofagia mais específicos e rigorosos, como o silenciamento de genes relacionados à autofagia, deixa lacunas nas conclusões em questão e nos mostra ser um importante nicho de estudos em oncologia e perspectivas no desenvolvimento de terapias alvo (WEIJUN et al 2019; BORHANI et al 2023).

4.5 Análise da Permeabilidade da Membrana Lisossomal

Por muito tempo, os lisossomos foram considerados apenas como compartimentos de reciclagem e descarte de resíduos metabólicos celulares (BALLABIO & BONIFACINO 2020). Mas, atualmente, vem sendo reconhecido o seu papel como importante regulador da homeostase de nutrientes, apoptose, autofagia e tráfego de membrana, processos dos quais estão envolvidos na manutenção da energia no câncer (FENNELLY & AMARAVADI 2017; OTOMO & YOSHIMORI 2017; FARIS et al 2018; BALLABIO & BONIFACINO 2020).

Parâmetros lisossômicos que abrangem alterações na expressão e/ou atividade das enzimas lisossômicas, tamanho, volume, número, pH, posicionamento, motilidade e propriedades da membrana lisossômica, são alterados durante a transformação cancerosa (WANG et al 2018). Dado seu ambiente ácido interno e o grande número de enzimas catabólicas contidas no lúmen lisossômico, a manutenção da barreira da membrana lisossômica é crucial para garantir a saúde e a sobrevivência celular (WANG et al 2018).

Foi observado neste estudo aumento da permeabilidade do lisossomo em células tratadas com NLS-DTX e DTX nos tempos de 24h (Figura 47) e aumentando consideravelmente em 48h (Figura 48), indicando sinal de apoptose ou autofagia e complementando o resultado de PMM.

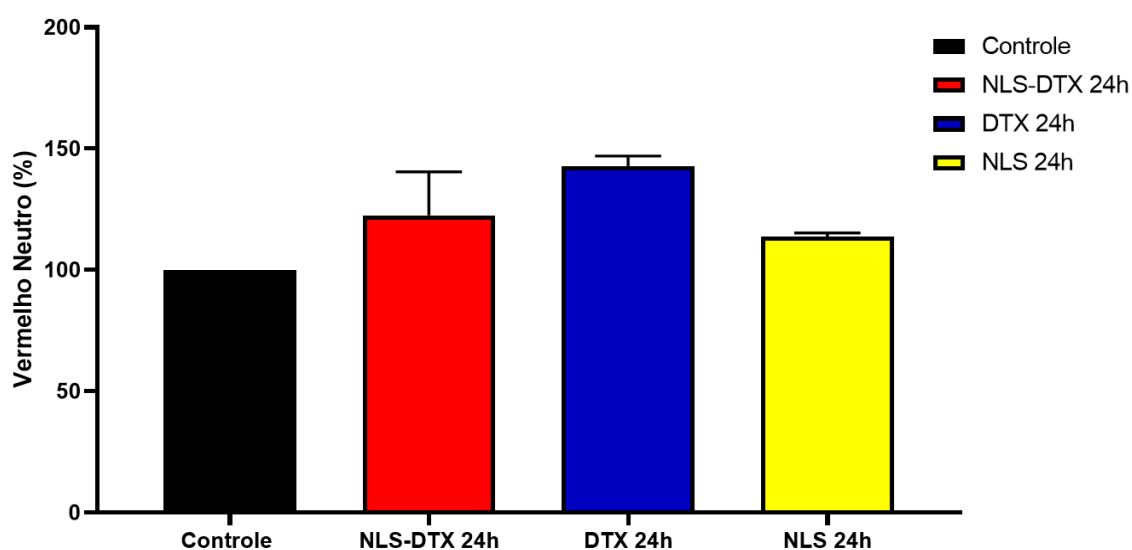


Figura 47: Avaliação da Permeabilidade da Membrana Lisossomal por 24h. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A permeabilização da membrana lisossomal foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência do corante Vermelho Neutro

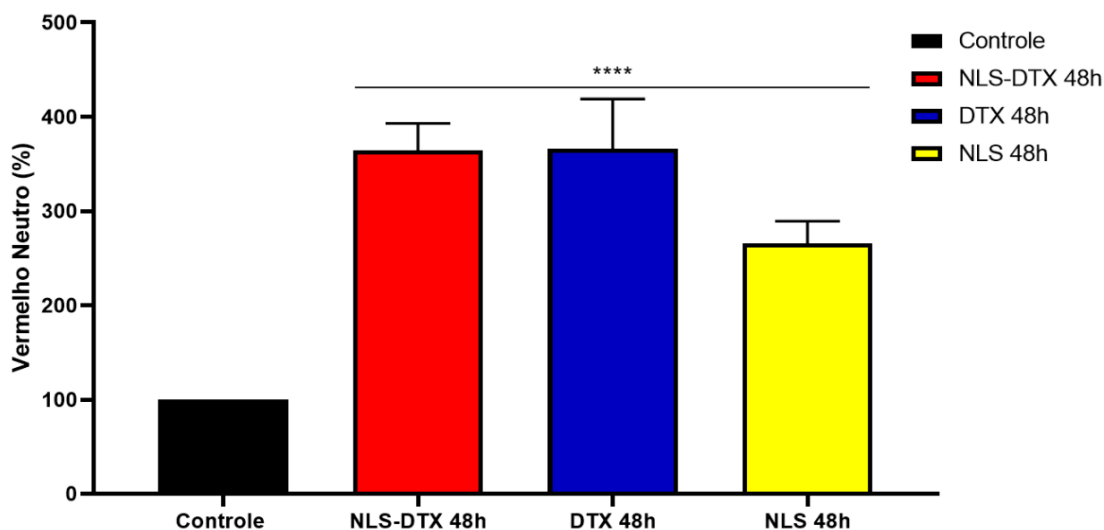


Figura 48: Avaliação da Permeabilidade da Membrana Lisossomal por 48h. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml de NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. A permeabilização da membrana lisossomal foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência do corante Vermelho Neutro. ****P<0,0001.

Os lisossomos danificados são seletivamente degradados pela lisofagia, ou seja, a remoção autofágica dos lisossomos para evitar as consequências potencialmente perigosas (OTOMO & YOSHIMORI 2017; WANG et al 2018). Quando ocorrem casos graves de PML, as células não são mais capazes de sustentar a lisofagia e os mecanismos de resposta ao estresse são incapazes de reparar os lisossomos danificados (WANG et al 2018; PAPADOPOULOS et al 2020).

Catepsinas específicas são liberadas dos lisossomos permeabilizados, resultando em dano mitocondrial e apoptose (WANG et al 2018; KILLACKEY et al 2020). Nessa situação, o lisossomo se rompe resultando em liberação maciça de enzimas lisossômicas e morte celular descontrolada. Observando os dados dos tratamentos envolvendo NLS-DTX e DTX, podemos observar que houve, aumento do volume dos lisossomos observados por MET (Figura 31), uma maior Permeabilização de Membrana Lisossomal, Potencial Membrana Mitocondrial, aumento de acidez do citoplasma e morte celular, sugerindo uma forte ligação com disfunção lisossômica grave.

Já nos tratamentos com NLS podemos observar um aumento da PML comparada com o grupo controle, mas não houve alterações na PMM e nem foi constatada morte celular neste grupo. Em contraste com a PML induzida pelos tratamentos NLS-DTX e DTX, as células aparentemente não entraram no ciclo

de "PML-lisofagia-PML", mas foram capazes de se livrar dos lisossomos danificados sobrecarregados, ou adaptar a capacidade para atingir um novo ponto de ajuste alostático (SHIN 2020). Embora a lisofagia sirva para aliviar o estresse lisossômico, ela obviamente depende da presença de uma fração lisossômica intacta para garantir a manutenção do fluxo autofágico nas células saudáveis (SHIN 2020).

4.6 Tipo de morte celular causada pelos tratamentos

A morte celular é um processo fisiológico que mantém o desenvolvimento biológico, a homeostase do meio interno e ocorre quando o processo de lesão celular é irreversível. Durante muito tempo, acreditava-se que era resultado de apenas dois processos distintos: apoptose (conhecida como morte celular programada) ou necrose (morte celular descontrolada).

No entanto, nos últimos anos vários estudos voltados para a compreensão de toda a dinâmica envolvida nesse processo, várias outras formas de morte celular foram descobertas, destacando que uma célula pode morrer por vários caminhos diferentes. Acreditava-se que existia uniformidade morfológica, estudos recentes mostraram que tipos morfológicos semelhantes de morte celular escondem um alto grau de heterogeneidade funcional, bioquímica e imunológica.

Os tipos de morte celular são classificados como morte celular programada (MCP) e não programada (necrose), de acordo com as diferentes características morfológicas da morte. Algumas alterações morfológicas e moleculares ocorrem durante o processo de apoptose nas células, sendo elas a perda de aderência com a matriz extracelular, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e ativação de caspases, não induzindo uma resposta inflamatória. Muitos tratamentos antitumorais possuem atividades sobre esses mecanismos, como é o caso do Docetaxel (ALBANO et al 2019). Já a necrose é caracterizada pelo extenso inchaço celular, colapso de organelas, aglomeração e degradação aleatória do DNA nuclear, extensa lesão e/ou arrebatamento da

membrana plasmática, que geralmente induzem uma resposta inflamatória local ou mesmo sistêmica.

Durante muito tempo, a apoptose foi considerada o único tipo de MCP e a necrose era considerada como um mecanismo acidental de morte celular. Nas duas últimas décadas, após vários trabalhos e pesquisas, sabe-se atualmente que a necrose pode ocorrer de forma regulada e generalizada nas células (YU et al 2020). Representando uma classe significativa de morte celular e uma grande família que inclui necroptose, piroptose, ferroptose e outras formas menos comuns, como morte celular dependente de lisossomos (MCDL), necrose causada pela transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), morte celular necrótica induzida por liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETosis) e morte celular entótica (Entose) (TANG et al, 2019; VOROBEVA & CHERNYAK, 2020). E outros com mecanismos desconhecidos de necrose celular programada. É possível que esses MCPs incomuns não sejam processos independentes de morte programada, mas sim um fenômeno concomitante das quatro primeiras mortes celulares principais.

Ao analisar os resultados dos ensaios de viabilidade celular realizados neste trabalho, no tempo de 24h (Figura 49), podemos visualizar que os tratamentos NLS-DTX e DTX apresentaram 88,2% e 76,9%, respectivamente, de marcação para Anexina V, mostrando que houve exposição de fosfatidilserina na camada externa das suas membranas plasmáticas, sendo este um dos mais importantes sinais de células com a morte apoptótica. O tratamento com NLS não apresentou alteração do padrão de viabilidade quando comparada a célula não tratada.

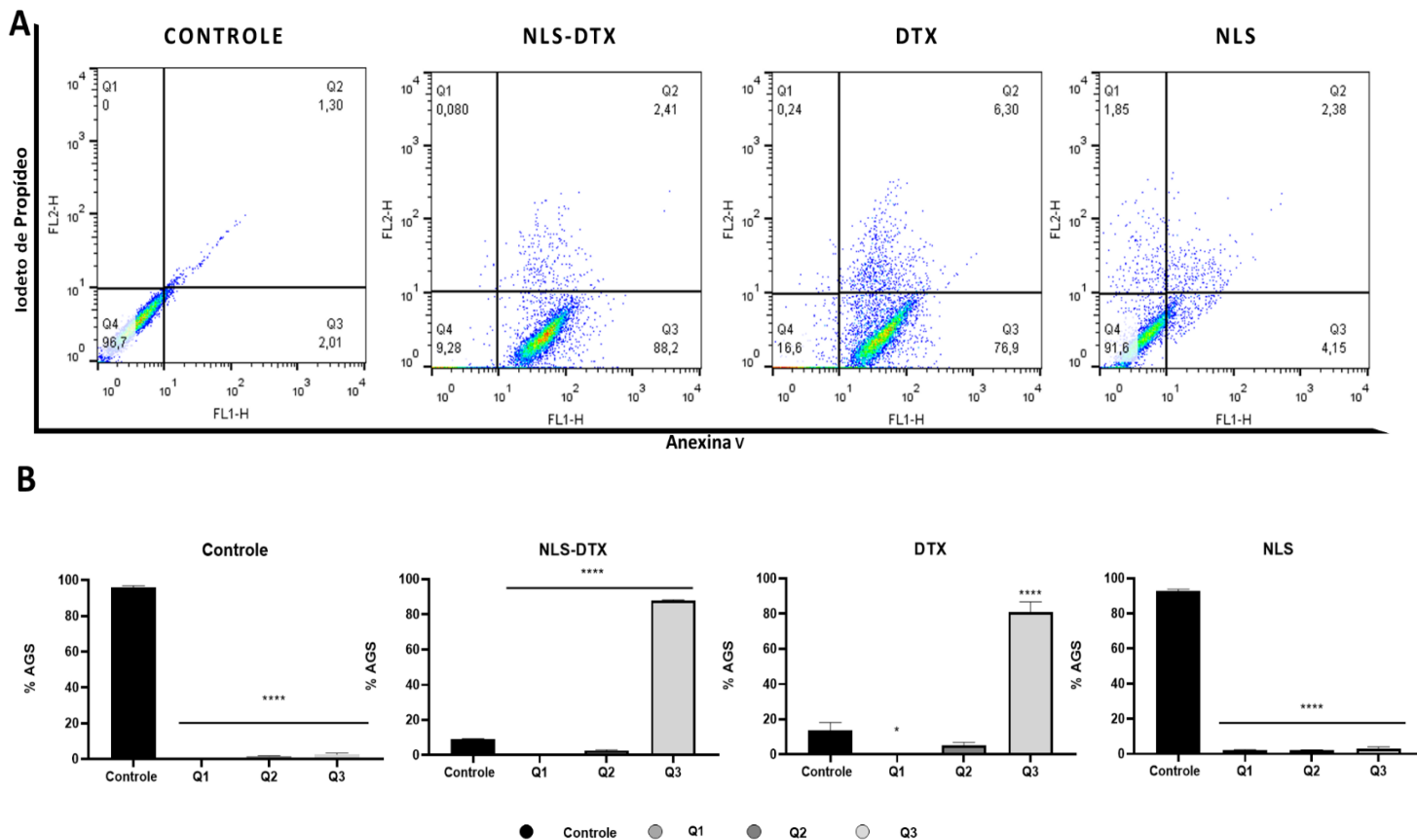


Figura 49 – Morte Celular pelo tratamento com as NLS-DTX em células AGS por 24h. **Controle:** (Q4) quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis; **Q1:** quadrante superior esquerdo às células marcadas com PI; **Q2:** quadrante superior direito às células com dupla marcação e o **Q3:** quadrante inferior direito às células marcadas com Anexina V. **A-** Histograma **B-** Análise estatística dos tratamentos. * $P < 0.05$ e **** $P < 0.0001$. Os dados representam a média \pm SEM, comparados ao controle não tratado.

No tempo de 48h (Figura 50), podemos visualizar que houve uma alteração no padrão de morte celular, comparada ao tempo de 24h, o tratamento com NLS-DTX apresentou 87,9% das células mortas, sendo que desse total, 55,4% de células foram marcadas somente com Anexina V, mostrando que houve exposição de fosfatidilserina na camada externa das suas membranas plasmáticas, sendo este um dos mais importantes sinais de células apoptóticas; e apresentou 32,5% de marcação tanto para Anexina V e quanto para PI, indicando que houve danos à membrana plasmática que geralmente estão associadas à necrose. No entanto, estudos relatam ruptura da membrana plasmática nos estágios finais de apoptose.

Já o DTX apresentou um total de 85,7% células mortas, das quais 52,3% de células foram marcadas somente com Anexina V e 33,4 % de marcação tanto

para Anexina V quanto para PI. O tratamento com NLS não apresentou alteração do padrão de viabilidade quando comparada a célula não tratada.

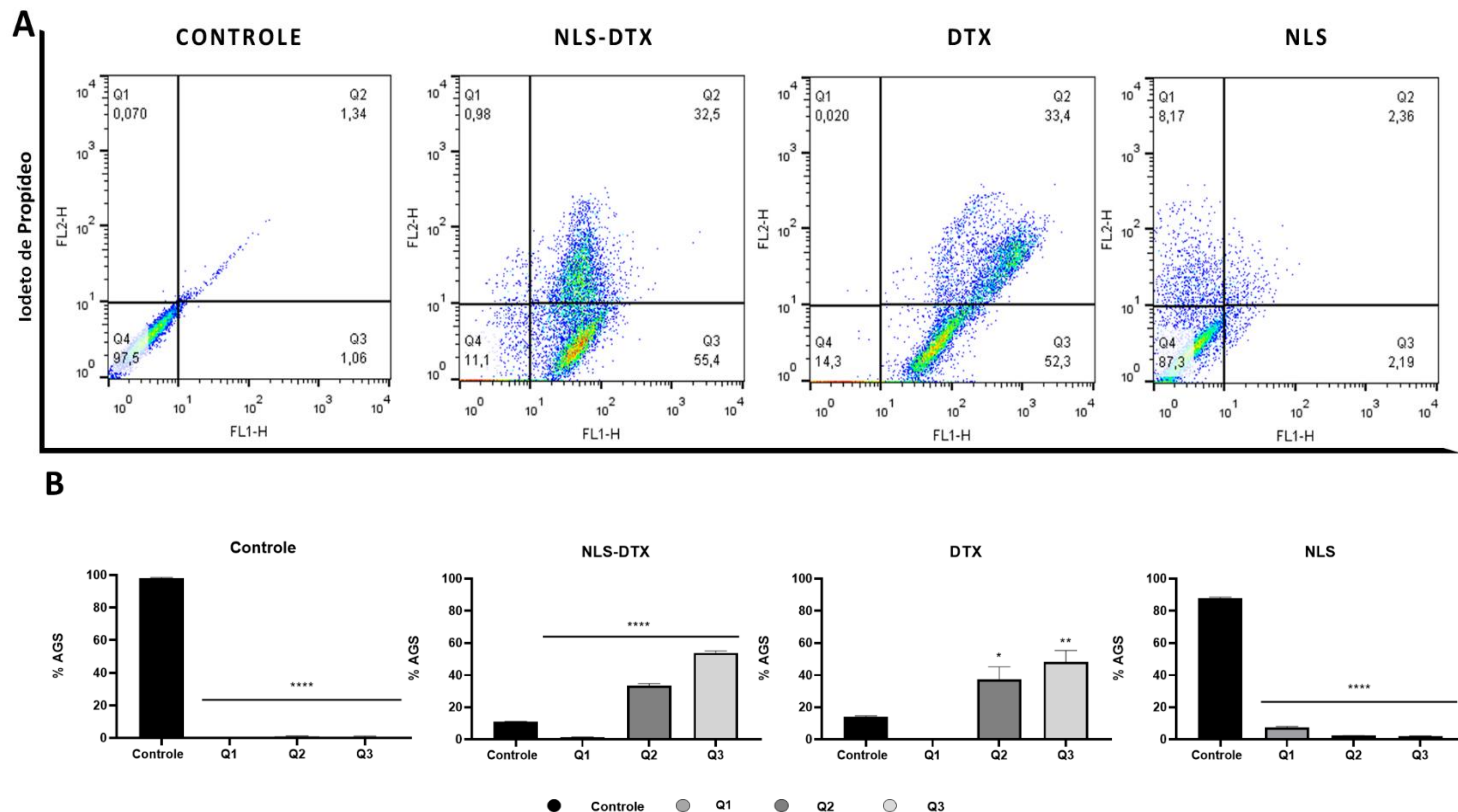


Figura 50 – Morte Celular pelo tratamento com as NLS-DTX em células AGS por 48h. Controle: (Q4) quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis; **Q1:** quadrante superior esquerdo às células marcadas com PI; **Q2:** quadrante superior direito às células com dupla marcação e o **Q3:** quadrante inferior direito às células marcadas com Anexina V. **A-** Histograma **B-** Análise estatística dos tratamentos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e **** $P < 0,0001$. Os dados representam a média \pm SEM, comparados ao controle não tratado.

Em nosso trabalho também foram avaliados os parâmetros de Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM), Permeabilidade da Membrana Lisossomal PML, EROs, cálcio intracelular e autofagia, que apresentaram alterações significantes nos tratamentos com NLS-DTX e DTX. A necrose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) refere-se à morte celular induzida por alterações no microambiente intracelular, como sobrecarga de cálcio na mitocôndria e acúmulo de EROs (IZZO et al, 2016). A morte celular dependente de autofagia (MCDA) é causada pela ativação excessiva da autofagia celular, com indutores específicos para esse tipo de morte (TANG et al, 2019). Outro tipo de MCP que é mediado por hidrolases ou cálcio liberado dos lisossomos e é caracterizado pela ruptura dos lisossomos (MCDL) (TANG et al, 2019).

Existem muitas semelhanças bioquímicas e estruturais entre os eventos de apoptose, necrose e autofagia. Como a relação precisa entre autofagia e morte celular e entre lisossomos e morte celular permanece não definida, não é possível determinar se os resultados obtidos pelo tempo de 48h nos tratamentos de NLS-DTX e DTX, são necroptose, apoptose tardia ou ferroptose causada por autofagia, ruptura e liberação de conteúdo lisossômico ou uma forma completamente nova de MCP.

Wang et al. (2022), exploraram a relação entre treze tipos de morte celular e câncer gástrico para melhorar o seu manejo clínico. Nesse artigo foi fornecido uma revisão detalhada dos vários tipos de morte celular, que influenciam a progressão do câncer gástrico e seus efeitos na proliferação, invasão, migração e papel da resposta imune que pode agir diretamente nas células tumorais ou modular o seu microambiente tumoral.

4.7 Determinação do nível de Ca^{2+} intracelular

O cálcio intracelular (Ca^{2+}) é indiscutivelmente o sinal celular mais importante para que a informação biológica seja transmitida intracelularmente e podem codificar diversos processos fisiológicos, desde a divisão celular, transcrição e diferenciação de genes, fosforilação de proteínas, contratilidade e motilidade celular, neurotransmissão, secreção de fluidos e proteínas, proliferação e morte celular (BRINI et al, 2013; PINTO et al, 2015; BOOTMAN & BULTYNCK, 2022).

O Ca^{2+} é armazenado em organelas intracelulares para manter uma baixa concentração citosólica e liberado mediante estímulos específicos para produzir um aumento local de íons que servem como cofatores para eventos de sinalização (CREMER et al. 2020). A maior parte do cálcio armazenado é sequestrada na rede membranosa do retículo endoplasmático (ER), mas também os lisossomos e as mitocôndrias servem como organelas de retenção de cálcio (CHRISTENSEN et al. 2002; BAGUR et al. 2017; GARBINCIUS & ELROD, 2022).

A desregulação do Ca^{2+} está envolvida em numerosas patologias, como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, neurodegeneração, distúrbios neuromusculares, diabetes e câncer (KAVALALI, 2020; VALLESE et al 2020). Os primeiros trabalhos fazendo ligação direta entre canais de cálcio e câncer, foram publicados na década de 80, quando estudos confirmaram a inibição do crescimento do câncer usando bloqueadores de canais de cálcio específicos (LEE et al, 1988; BATRA & ALENFALL, 1991; TAYLOR & SIMPSON, 1992).

A remodelação das vias fluxo de Ca^{2+} favorece a mudança fenotípica do estado normal para o estado altamente proliferativo, a sinalização aberrante pode aumentar a proliferação celular e a angiogênese, enquanto interrupções na homeostase do Ca^{2+} estão associadas ao aumento da apoptose e autofagia nas células cancerígenas (DELIERNEUX et al, 2020; MARCHI et al, 2020; MISSIROLI et al, 2020 TAJADA & VILLALOBOS, 2020).

São regulados de formas diferentes em alguns tipos de câncer, podemos citar como exemplo, os canais de PIEZO, que desempenham papel importante em processos de transdução mecânica, aparecem superexpressos no estômago, mama, próstata e glioma, onde regulam a proliferação celular, migração/invasão e angiogênese, mas são oncosuppressores no pulmão e no osteossarcoma, indicando que a desregulação do Ca^{2+} pode produzir efeitos em ambas as extremidades do espectro (RIDONE et al, 2019; DE FELICE & ALAIMO 2020).

Nesse estudo foi observado que os tratamentos NLS-DTX e DTX induziu a liberação dependente de tempo de Ca^{2+} no citosol (Figura 51 e 52). No entanto, nenhuma alteração no nível de Ca^{2+} foi observada após a exposição aos tratamentos de NLS. Sabe-se que a remodelação da sinalização de Ca^{2+} contribui para processos fisiopatológicos graves. As alterações da PML e PMM podem desestabilizar as trocas de Ca^{2+} .

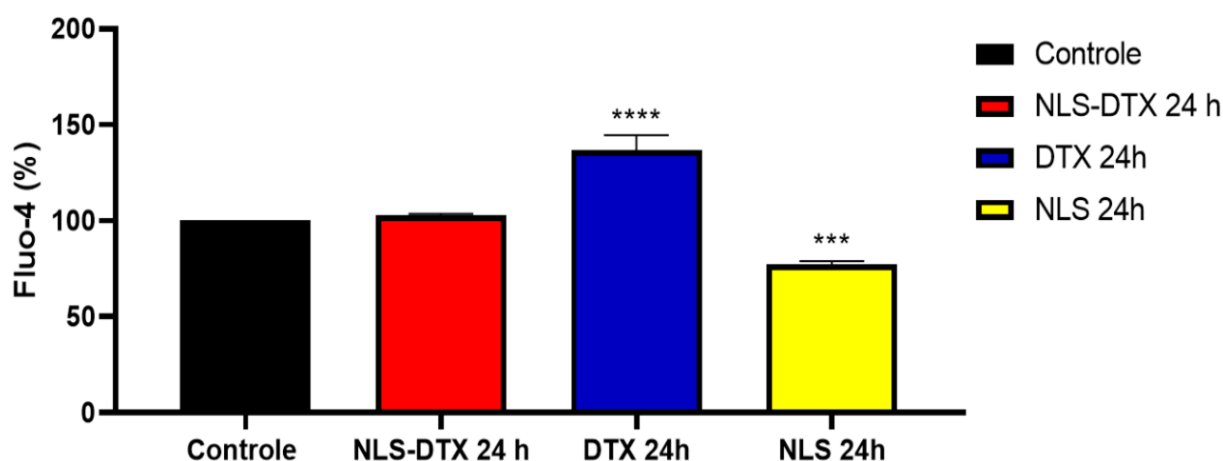


Figura 51: Avaliação de nível de Ca^{2+} intracelular por 24h. As células de AGS foram expostas a 10 $\mu\text{g/ml}$ e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. Peróxido de hidrogênio (controle positivo). *** $P < 0.001$ e **** $P < 0,0001$.

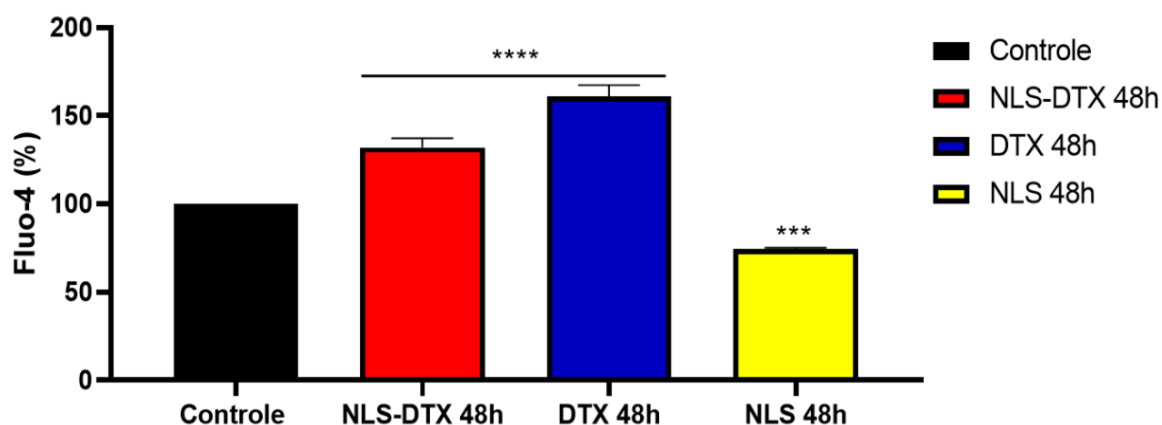


Figura 52: Avaliação de nível de Ca^{2+} intracelular por 48h. As células de AGS foram expostas a 10 $\mu\text{g/ml}$ e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. Peróxido de hidrogênio (controle positivo). *** $P < 0.001$ e **** $P < 0,0001$.

A relação entre o metabolismo alterado no câncer e sua regulação da sinalização de Ca^{2+} permanece relativamente inexplorada, frequentemente associa-se aspectos-chave da progressão do câncer, como proliferação tumoral, transformação maligna, escape da morte celular e resistência a agentes anticancerígenos. Portanto, a compreensão desses mecanismos é uma grande promessa para o sucesso do tratamento.

4.8 Dosagem de Óxido Nítrico por Nitrato

A sinalização aberrante de NO é uma característica central de muitos distúrbios importantes, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (SCHIFFER et al, 2020; CARLSTROM, 2021; LUNDBERG & WEITZBERG,

2022). A família das sintases de óxido nítrico (NOS) compreende as NOS induzível (iNOS), NOS endoteliais (eNOS) e NOS neuronais (nNOS) (XU & LIU; 1998). Vale ressaltar, que vários estudos mostraram que todas as três isoformas podem estar envolvidas na promoção ou inibição da etiologia do câncer (VANNINI et al, 2015; HU et al, 2020).

Em nosso estudo, podemos observar que a NLS-DTX e NLS obtiveram um aumento de 37% em relação ao grupo controle (sem tratamento), enquanto DTX teve redução de 14% em relação ao grupo controle (Figura 53). Nos mostrando que o aumento da expressão de NO pode ter sido ocasionado pela presença NLS, o que pode ser algo muito positivo a ser explorado a nível terapêutico, funcionando como doador de NO, que pode promover a vasodilatação, facilitando a entrega de drogas e um aumento na infiltração de células T CD8⁺ e células dendríticas, que são essenciais para efeitos antitumorais.

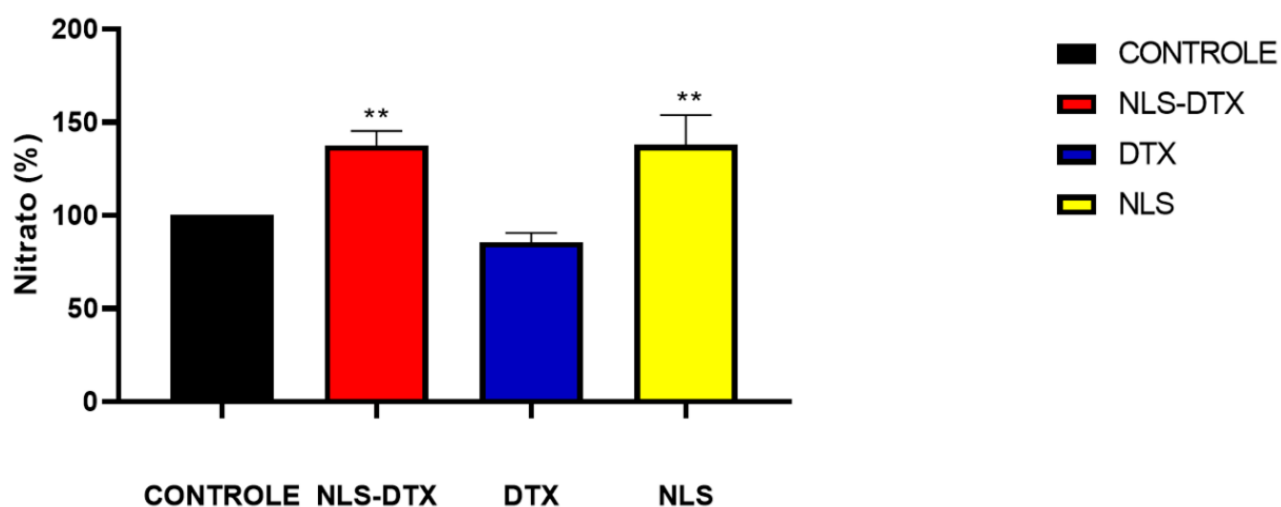


Figura 53: Dosagem de Óxido Nítrico em AGS. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. **P<0,01.

Por exemplo, foi demonstrado que o paclitaxel inibe o efeito de intensificação da metástase da galectina-3, estimulando a produção de NO em células de câncer hepático humano, HepG2 (SAYED-AHMAD & MOHAMAD, 2005). Xu et al. (2021) encapsularam o paclitaxel em nanopartículas, que romperam os vasos sanguíneos e permitiram que as células T se infiltrassem nos locais do tumor.

A molécula de NO tem um papel complexo no câncer, pode promover a vasodilatação e estimular a angiogênese, ao mesmo tempo em que possui propriedades citotóxicas e imunomoduladoras (MIRANDA et al., 2021; JIANG et al, 2022). Altas concentrações de NO (geradas por macrófagos ativados) mostra ter efeitos citotóxicos, podendo mediar a apoptose de células cancerígenas e a inibição do crescimento do câncer (JIANG et al, 2022; LI et al, 2023; SOUNDARARAJAN et al, 2023). Em contraste, em concentrações (relativamente) baixas de NO, pode promover a angiogênese, favorecer o crescimento, proliferação, progressão tumoral e a metástase (SOUNDARARAJAN et al, 2023).

Em um pequeno ensaio clínico de fase 1/2, foram examinados recentemente os efeitos do L-NMMA, um inibidor não específico da NOS, em combinação com DTX em mulheres com câncer de mama triplo negativo quimiorresistente. Foi descoberto que a combinação foi bem tolerada e observaram indicações de uma resposta quimioterápica melhorada, conforme avaliado pela redução no tamanho do tumor e uma diminuição nos neutrófilos fenotipicamente promotores de tumor (CHUNG et al., 2021).

Sung et al. (2019) criaram um sistema de nano entrega que permite a liberação direcionada de NO em camundongos com carcinoma hepatocelular experimental. O tratamento com este sistema normalizou os vasos tumorais, o que melhorou a entrega e a eficácia de várias modalidades de tratamento, ao mesmo tempo em que reprogramou o sistema imunossupressor do microambiente do tumor em direção a um fenótipo imunoestimulador.

O efeito apoptótico do NO também está relacionado ao tipo celular (LIM, et al, 2009; JI et al, 2016). Estudos demonstraram que o NO promove a apoptose em células de carcinoma hepatocelular (LIU et al, 2017) , enquanto o NO inibe a apoptose em células de melanoma (HE et al, 2014).

Numerosos desafios permanecem ao tentar modular os eventos de sinalização de NO no tratamento do câncer (BASUDHAR et al, 2017; KHAN et al., 2020; PAUL et al, 2021; JIANG et al, 2022). Dado o papel central do NO em uma variedade de sistemas da fisiologia humana, qualquer droga que interfira nesses sistemas deve ser direcionada com precisão, tanto espacialmente,

temporariamente, quanto em termos de concentração (CINELLI et al, 2020; HU et al, 2020; CARLSTROM, 2021). A maioria dos estudos, concordam que o papel de NO no câncer dependerá de onde e em que momento ele é gerado, por quais células, sua concentração celular, o meio redox, a abundância de elementos-alvo do NO, bem como o microambiente tumoral (HU et al, 2020; MIRANDA et al., 2021).

4.9 *Dosagem de Citocinas*

O microambiente tumoral pode gerar uma inflamação crônica que impulsiona a iniciação, proliferação, progressão, metástase e resistência quimioterápica. Esse ambiente tumoral promove a secreção de citocinas, em diferentes etapas da progressão do câncer. Essas citocinas podem inibir o desenvolvimento do tumor (citocinas anti-inflamatórias), mas, em contraste, pode favorecer o processo inflamatório crônico (citocinas pró-inflamatórias) que tolera o crescimento tumoral de forma autócrina e parácrina e tem sido associado ao mau prognóstico do câncer (CALDER,2015).

Esses conjuntos de citocinas presentes no microambiente tumoral podem ser detectados na circulação, sendo potencialmente úteis como biomarcadores tumorais, que podem auxiliar na detecção, previsão de resultados e orientar nas escolhas terapêuticas.

Citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , I-6, IL-12)

O TNF- α é uma citocina e adipocina que funciona como um importante mediador inflamatório e da resposta imune celular, induzindo o recrutamento e ativação de células inflamatórias. Podem estar envolvidas na diferenciação celular, proliferação de células tumorais, invasão tumoral e metástase e participar da transição epitélio-mesenquimal (SETHI & HOTAMISLIGIL, 2021).

É produzido principalmente por macrófagos e em menor quantidade por células B e T (citotóxicas CD8⁺ e CD4⁺ Th1), células *Natural Killer*, mastócitos, fibroblastos, osteoclastos, células endoteliais e musculares. Pode atuar tanto na sinalização autócrina como parácrina (WU & ZHOU, 2010; SETHI &

HOTAMISLIGIL, 2021). A secreção de altas concentrações desta citocina pode resultar em citotoxicidade (WEBSTER & VUCIC, 2020). Além disso, o TNF- α tem sido referido como um fator inflamatório relacionado à promoção do câncer gástrico (OSHIMA et al, 2014). Em nosso estudo, podemos ver que o tratamento com NLS-DTX teve redução de 40% da expressão da citocina TNF- α (FIGURA 54). Enquanto os tratamentos com DTX e NLS não tiveram redução significativa.

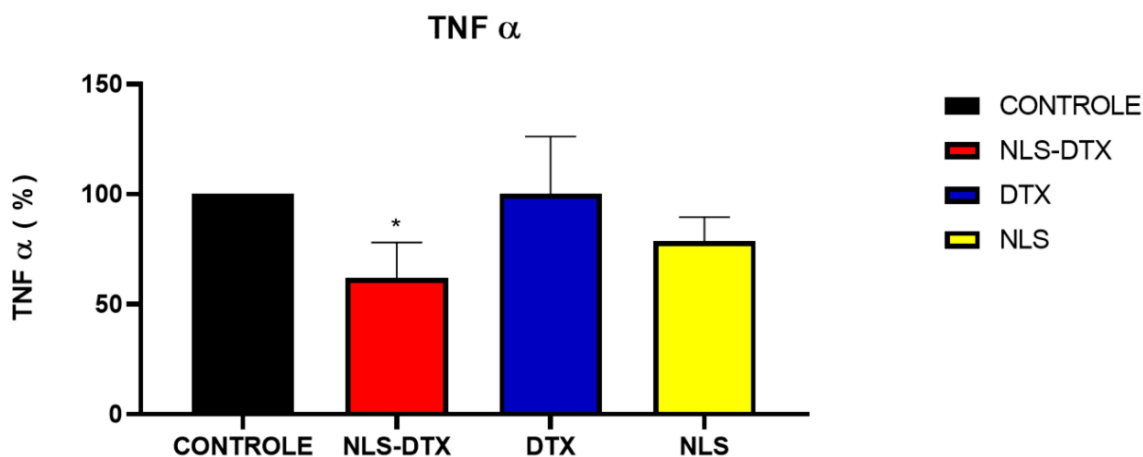


Figura 54. Modulação da secreção da citocina TNF- α 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de TNF- α foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média \pm SEM. *P<0.05.

A IL-6 é uma citocina multifuncional e uma adipocina que desempenha um papel significativo na indução do crescimento do tumor, que claramente tem efeitos promotores de tumor e pró-inflamatórios (VGONTZAS et al, 1997; IBRAHIM, 2010). Originalmente, foi identificado como fator estimulador de células B-2 (BSF-2) e o indutor da produção de imunoglobulina (MURAGUCHI et al, 1988). A transcrição de IL-6 é induzida por vários estímulos, como TNF- α e EROs (YOON et al, 2010; MURAKAMI et al, 2019). Promove a sinalização Wnt, que contribui para a tumorigênese gástrica.

Quando a IL-6 é altamente expressa por células cancerígenas, pode-se observar a resistência múltipla a drogas (RMD), possivelmente através da indução autócrina de células tronco cancerígenas, sugerindo um papel da citocina na evasão das células tumorais para a morte celular induzida por drogas (CONZE et al, 2001; YI et al, 2013; LEE et al, 2014; JIA et al, 2017). Enquanto a

inibição pode ressensibilizar o tumor contra as drogas quimioterápicas (HE et al, 2011; SHI et al, 2012).

Em nosso estudo, podemos observar que os tratamentos com DTX e NLS obtiveram uma regulação negativa de 30%, enquanto o tratamento com NLS-DTX teve um efeito terapêutico melhor, apresentando uma regulação negativa de 40% (Figura 55).

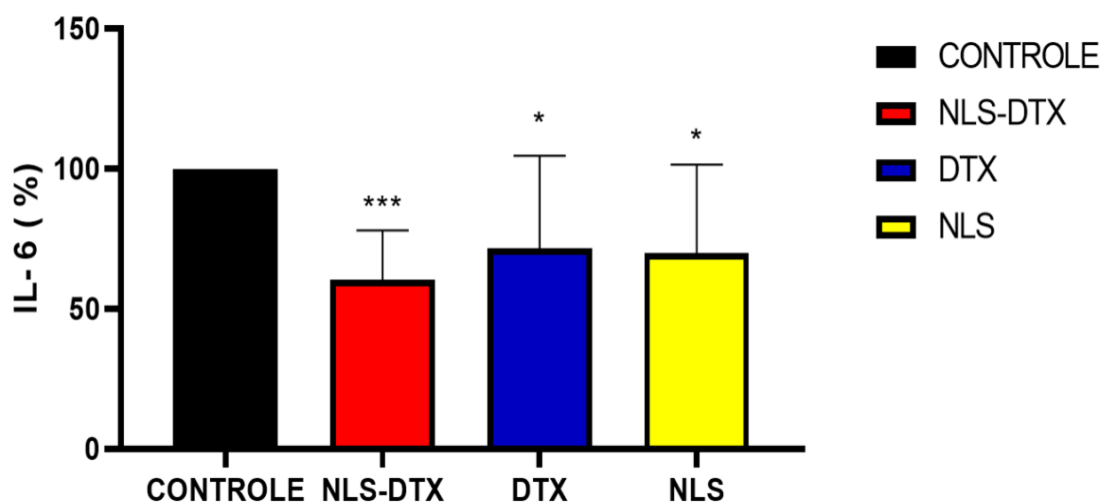


Figura 55. Modulação da secreção da citocina IL-6 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-6 foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média \pm SEM. * $P < 0.05$ e *** $P < 0,001$.

A IL-12 é um membro de uma pequena família de citocinas pró-inflamatórias heterodiméricas, produzidas e expressas principalmente pela célula apresentadora de antígeno, como células dendríticas e macrófagos ativados, dependendo do contexto imunológico (VIGNALI & KUCHROO, 2012; TENG & BOWMAN, 2015; ZHENG et al, 2016). Amplifica a resposta imune tipo 1 em câncer gástrico. Em nosso estudo, podemos observar que ocorreu uma regulação negativa maior no tratamento com NLS-DTX de 46%, enquanto DTX foi de 14 % e NLS de 32% (Figura 56).

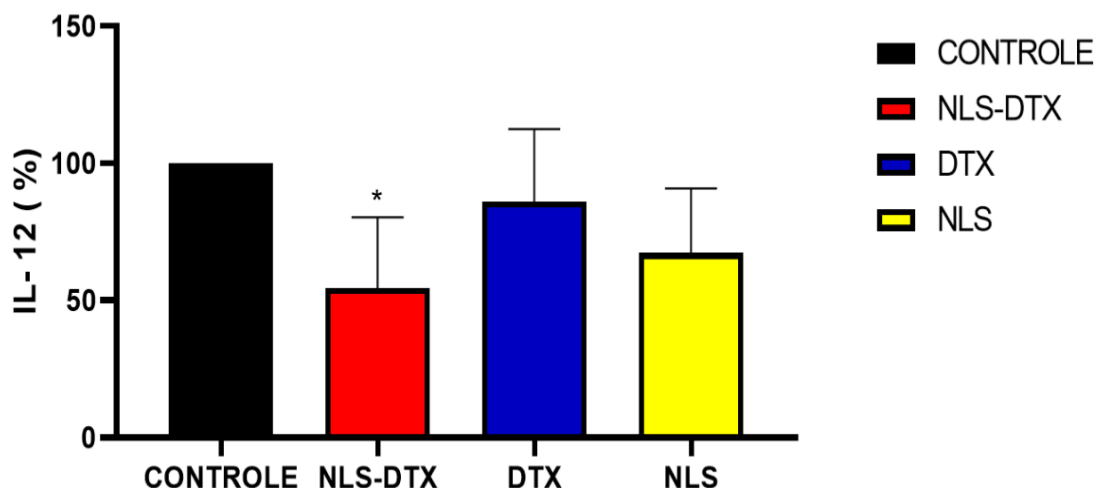


Figura 56. Modulação da secreção da citocina IL-12 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-12 foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média \pm SEM. * $P < 0.05$.

Citocinas anti-inflamatórias (TGF- β)

A sinalização de TGF- β contribui para a transição epitelial-mesenquimal (EMT), que induz a regulação positiva da capacidade metastática e quimio-resistência em células cancerígenas (CHUNG & LIM, 2014). Estimula a síntese de colágeno em fibroblastos e células cancerígenas, o que leva à fibrose difusa no caso de câncer gástrico cirroso (WANG et al, 2017).

No câncer de mama triplo negativo e ovário, o TGF- β induz a resistência a taxanos e as medições do nível de TGF- β podem ser usadas para prever as respostas ao tratamento com quimioterápicos (BHOLA et al, 2013; ZHU et al, 2018). Em nosso estudo, não encontramos diferença significativa entre os tratamentos quando comparada ao grupo controle, ocorrendo apenas uma pequena redução de 14% no grupo tratado com NLS (Figura 57).

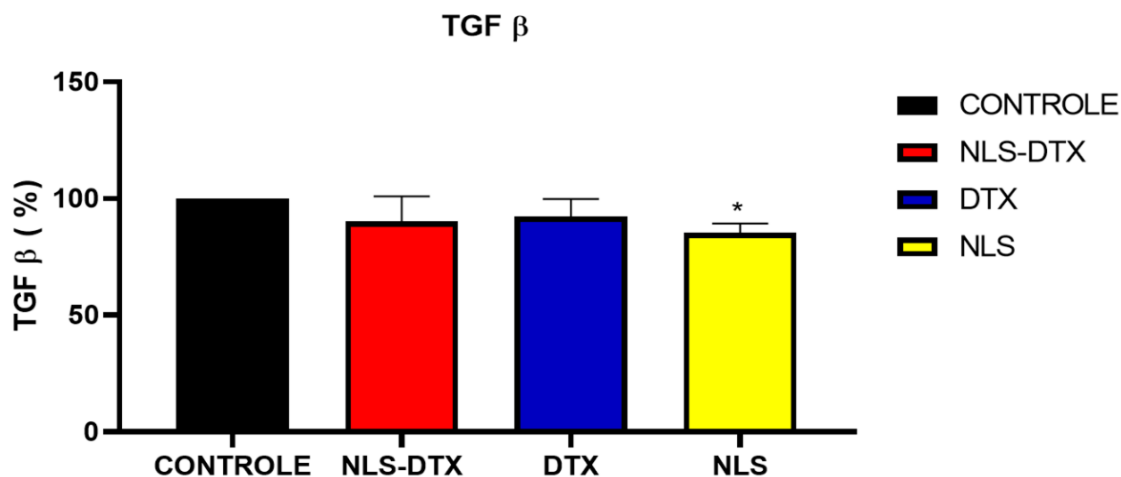


Figura 57. Modulação da secreção da citocina TGF- β 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de TGF- β foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média \pm SEM. * $P < 0.05$.

A morte celular está envolvida em diversos níveis na progressão do câncer gástrico. Podemos citar que a inibição do processo apoptótico é uma causa da extensa proliferação de células de câncer gástrico, mas a morte celular anormal de células imunes, como macrófagos, linfócitos regulados por citocinas secretadas por tumores e receptores de superfície, pode ser vital para que as células do câncer gástrico escapem da resposta imune (LAZĂR et al, 2018; CHEN et al, 2020).

As citocinas, os receptores de citocina e a quantificação de proteínas específicas do câncer na circulação tem uma aplicação potencial para o diagnóstico e prognóstico do câncer e tornaram-se os tópicos atuais de pesquisa. Isso porque são relativamente fáceis de medir e podem fornecer uma alternativa não invasiva para o diagnóstico.

Entretanto, a pesquisa atual sobre imunidade tumoral do câncer gástrico é consideravelmente menor do que a do pulmão, cólon e outros cânceres, e vários mecanismos clássicos de ação não foram confirmados no câncer gástrico. Isso pode estar relacionado com as características anatômicas, fisiológicas e histológicas únicas do tecido gástrico (LIU et al, 2022).

4.10 Análise da Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos

Os lipídios são uma classe de biomoléculas bastante diversificada, que podem ser implicadas numa série de cenários fisiopatológicos (AMEER et al, 2014; CRUZ et al., 2020; YOON et al., 2021; VASSEUR & FABIENNE, 2022; ZADOORIAN et al, 2023). Em células normais, a biogênese lipídica, o armazenamento de gotículas lipídicas e a oxidação de ácidos graxos, normalmente, estarão em equilíbrio dinâmico (KANE & LYNCH, 2019). Enquanto durante a tumorigênese, a oxidação lipídica pode afetar a progressão do tumor, favorece o processo metastático e está diretamente ligado a resistência aos tratamentos quimioterápicos, bem como na recorrência da doença (RAK et al, 2014; SHYU et al, 2019; BUTLER et al, 2020; DUBEY et al, 2020).

As alterações no metabolismo da glicose estão bem reconhecidas durante o processo tumoral. Mas, as células cancerígenas também são capazes de alterar outros processos, como é o caso do metabolismo lipídico, causando um aumento significativo no conteúdo lipídico, por meio da ativação excessiva a síntese endógena ou a absorção de lipídeos e lipoproteínas exógenas (BAENKE et al, 2012; LIU et al, 2017; TIRINATO et al, 2017; DHIMAN et al, 2020).

A presença de corpúsculos lipídicos (CLs) nas células tumorais tem sido relacionada com processos neoplásicos e inflamatórios, estando ligada a muitos aspectos da produção de mediadores inflamatórios, ativação, sinalização, proliferação, motilidade e diferenciação celular (ACCIOLY et al, 2008; BOZZA, 2010; HERSHEY et al., 2020; SU et al, 2020; WANG et al, 2022).

CLs são organelas citoplasmáticas constituídas por uma monocamada fosfolipídica, de tamanho nano a micro que armazenam lipídios neutros (por exemplo, ésteres de colesterol) e proteínas, apresentam papel importante na homeostase lipídica e energética, comunicação entre organelas distintas (estando intimamente associada ao retículo endoplasmático) e possível contribuição em outros processos vitais celulares, como na degradação de proteínas (NIAVARANI et al, 2019; DHIMAN et al, 2020; ZHANG et al, 2022).

Supostamente os CLs aprisionam drogas anticancerígenas, que os torna incapazes de atingir seus alvos terapêuticos, que em muitos casos, são específicos para ação no núcleo celular, levando a diminuição da sua eficácia (BALDO et al, 2022). A inibição da formação dos CLs poderia diminuir o aprisionamento do fármaco e seria útil para a diminuição da progressão do câncer e pode ser realizado por três principais abordagens: bloqueio da captação de lipídios, bloqueio da síntese de lipídios ou bloqueio da lipólise intracelular (SNAEBJORNSSON et al, 2020).

Analisamos a biogênese de CLs em células de AGS. O tratamento com NLS-DTX apresentou uma maior expressão, representando um aumento de 3x em relação ao controle não tratado, o tratamento com DTX teve um aumento de 2x em relação ao controle não tratado e o tratamento NLS não apresentou alteração significativa em relação ao grupo controle (Figura 58).

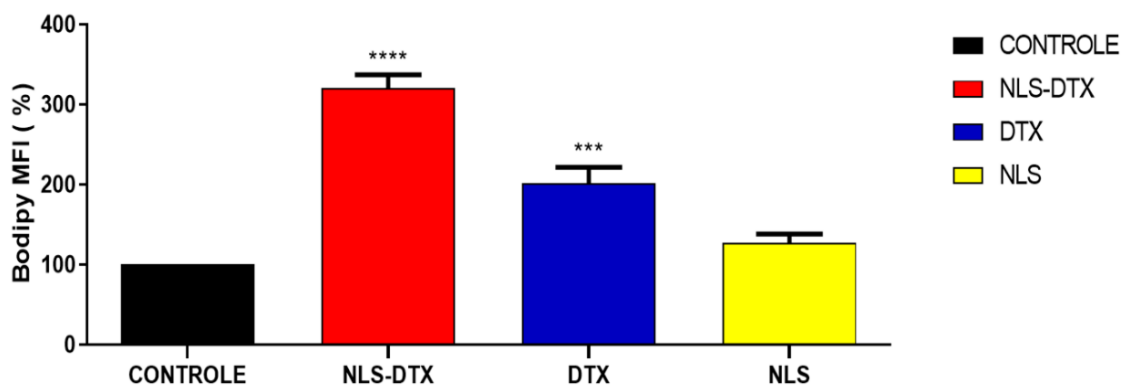


Figura 58. Análise da Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos em células AGS. As células de AGS foram expostas a 10 µg/ml e NLS-DTX e DTX; e a NLS e meio de cultura em volume equivalente. ***P<0,001 e ****P<0,0001.

Foi demonstrado que células precursoras B transformadas foram incubadas em meio de contendo soro deficiente em lipoproteínas e foi observado uma inibição significativa do crescimento e aumento de morte celular; quando houve a reposição da suplementação do soro com lipoproteínas, o crescimento foi restaurado; sugerindo que o crescimento, proliferação e sobrevivência das

células dependem do metabolismo lipídico (HUANG et al, 2016; LIU et al, 2017). A presença de CLs em cânceres também tem sido relacionada com a presença de células *natural killer* e com o aumento da metástase (NIAYARANI et al, 2019).

Embora seja pouco estudada, a lipofagia parece desempenhar um papel duplo no câncer, indicando ser dependente do tipo de célula ou do tipo de proteína estudada (ZHANG et al, 2022). A degradação de CLs por lipofagia aumenta a viabilidade das células de hepatocarcinoma e protege as células de câncer de próstata sensíveis a andrógenos (KAINI et al, 2012; LU et al, 2015). A inibição farmacológica da lipólise na linhagem celular de câncer colorretal induziu acúmulo de CLs e a morte celular, enquanto alterava o perfil das células-tronco tumorais em favorecimento de um fenótipo mesenquimal mais agressivo (ASSUMPÇÃO et al, 2017). A superexpressão de uma proteína reguladora da autofagia, aumentou a lipofagia de CLs enquanto sensibilizou as células HeLa à apoptose (MUKHOPADHYAY et al, 2017).

Várias vias regulatórias do metabolismo lipídico foram identificadas e estão associadas à resistência ao Docetaxel no câncer de próstata, destacados os que controlam o metabolismo de glicerofosfolípidos, sinalização de esfingolípidos e ferroptose (INGRAM et al, 2021). Foi demonstrado que perfis lipídicos foram elevados em pacientes pós-operatórios de câncer de mama, especialmente em mulheres na pré-menopausa, em decorrência do tratamento com taxanos (HE et al, 2020). Enfatizando que o monitoramento lipídico, a prevenção e tratamento da dislipidemia devem ser levados em consideração durante a quimioterapia (HE et al, 2020). Em estudos com tecidos de tumor mamário de camundongos BRCA1, com mutação resistente ao docetaxel, foi demonstrado que o conteúdo de colina foi maior em comparação com os controles sensíveis ao docetaxel (VAN ASTEN et al, 2015).

Diferentes tipos de neoplasias apresentam a lipogênese aumentada como fator comum, sendo esta alteração mais observada em cânceres de cólon, mama e próstata. O metabolismo lipídico no câncer gástrico demonstra uma síntese aumentada de lipídios, β -oxidação regulada positivamente e a decomposição oxidativa de ácidos graxos (XIAO & ZHOU, 2017). Enjoji et al. (2016) relataram

um acúmulo significativo de CLs em células de câncer gástrico, principalmente na lipogênese e no armazenamento de lipídios. Futuramente, espera-se que a compreensão do metabolismo lipídico anormal durante a progressão do câncer gástrico, seja um caminho determinante para a eficácia do seu tratamento.

5 CONCLUSÃO

A aplicação clínica do DTX apresenta um amplo espectro de benefícios associados, mas ainda é limitada devido aos seus efeitos colaterais, decorrentes do seu comportamento não direcionado especificamente. Técnicas baseadas em nanotecnologia podem ajudar esses medicamentos, melhorando a sua farmacocinética e biodistribuição, contribuindo para aumentar os seus efeitos terapêuticos.

Compreender as vias envolvidas na reprogramação metabólica do câncer é de suma importância para o desenvolvimento de quimioterápicos eficientes. Como parte do metabolismo celular, a mitocôndria auxilia na sobrevivência ou morte das células; assim como o vazamento lisossômico causa aumento da acidez citosólica, quebra descontrolada de componentes celulares e morte celular por necrose. Os estudos aprofundados em entender como essas organelas funcionam no processo tumoral, estão emergindo como uma nova estratégia terapêutica para sensibilizar as células tumorais e superar a resistência aos medicamentos.

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos a algum grau de estresse oxidativo, induzido principalmente por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Recentemente, ficou claro que existem vários subtipos de apoptose e que há uma sobreposição entre apoptose, necrose e autofagia, que parece depender do tipo de câncer, contexto genético e/ou estágio da doença. Assim como, destacamos a importância de conhecer a interconexão de íons como Ca^{2+} no câncer, perfil das citocinas que medeiam o processo inflamatório e o papel do metabolismo lipídico.

Começar a explorar e destacar a importância dessas interconexões, analisando o perfil metabólico removerá várias lacunas remanescentes no nosso campo de estudo, ajudará a entender melhor os múltiplos mecanismos moleculares que afetam o desenvolvimento e manutenção tumoral, metástase do tumor e ajudará a projetar e desenvolver medicamentos de nova geração, com o objetivo de fornecer mais orientações sobre a estratificação de risco,

terapia individualizada para tumores e quebrar todas as barreiras de defesa do câncer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS



Figura 59: Esquema conclusivo sobre os resultados obtidos no trabalho. (Criado pela autora)

Com os dados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que o tratamento com NLS-DTX e DTX causou a superprodução de EROs, o mau funcionamento mitocondrial e lisossomal, o acúmulo de corpúsculos lipídicos e cálcio, processos que estão intimamente associados à morte celular induzida pelos tratamentos com NLS-DTX e DTX (Figura 59).

Por consequência, o tratamento causou alterações nas proteínas estruturais presentes nas células AGS (β -tubulina e β -catenina), levando a alterações em sua morfologia, perda de adesão, perda do potencial de formação de colônias, perda do potencial proliferativo e de migração, bem como a modulação do perfil de citocinas (diminuição das citocinas pro-inflamatórias) (Figura 59).

Enquanto a formulação de NLS, não apresentou alterações significativas quando comparada ao grupo controle, não nos indicando associação com os processos envolvidos na morte celular, mostrando-se eficiente na sua função de

entrega de fármacos e nos mostrando um efeito terapêutico a ser explorado pelo aumento da dosagem de óxido nítrico.

Considerando as descobertas citadas, é clara a necessidade de otimizar a terapia do câncer gástrico; seja isto feito por meio da busca por novas moléculas ou com o emprego de nanopartículas, que podem permitir maior eficiência do tratamento. A ampliação desse conhecimento é de suma importância, na aplicação prática das doenças em que, sua patogênese, envolve o desequilíbrio homeostático das células teciduais, como o câncer, sem comprometer os demais tecidos.

A encapsulação do docetaxel em nanopartículas lipídicas sólidas poderá reduzir os efeitos colaterais, melhorar a sua eficácia e o tratamento do tumor (MARTINS et al., 2010; ZHAO et al., 2012, MCKEAGE, 2017). As nanopartículas lipídicas sólidas têm se apresentado como estruturas promissoras na condução de vários compostos, uma vez que podem ser adaptados a diversas vias de administração e transportam os fármacos citotóxicos diretamente para interagir com as células específicas dos tumores (DANHIER, 2010; WONG, 2010; MCKEAGE, 2017, ROCHA et al, 2020).

7 CONCLUSÕES GERAIS

Com os dados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que:

- O efeito citotóxico das NLS-DTX nas células AGS foi maior do que na linhagem de fibroblasto;
- O efeito das NLS-DTX influenciou na capacidade de formar colônias, na adesão, proliferação celular e migração das células AGS;
- Houve alterações estruturais das proteínas β - tubulina e β -catenina;
- A dinâmica da internalização da NLS-AIPc, iniciou no tempo de 30min e atingiu seu pico as 9h de tratamento. Enquanto que a única via de internalização que obtivemos inibição, foi a de 4°C;
- Houve aumento da produção de espécies reativas;
- Houve alterações no comportamento das mitocôndrias e lisossomos quando tratadas com NLS-DTX e DTX;
- Houve mudança do perfil de morte celular entre os tempos de 24h e 48h, onde primeiramente ocorreu somente exposição de fosfatidiserina e no segundo momento houve dupla marcação, indicando rompimento da membrana da célula AGS;
- A dosagem de óxido nítrico demonstrou aumento na presença de NLS;
- Houve diminuição do perfil das citocinas pró-inflamatórias;
- Com os tratamentos de NLS-DTX, ocorreu aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos.

8. *PERSPECTIVAS PROPOSTAS PARA A CONTINUIDADE DESSE TRABALHO*

- O comportamento da NLS-DTX deve ser investigado adequadamente, em diferentes tipos celulares de tumores.
- Compreender como a interação das NLS-DTX pode contribuir para a plasticidade da AGS, especialmente trocas fenotípicas entre os estados de proliferação, migração e diferenciação.

Uma estratégia que busca unir as vantagens da terapia alvo e fármacos citotóxicos são a conjugação das nanopartículas com anticorpos que se ligam especificamente a receptores das células tumorais, melhorando a seletividade da terapia e melhorando a sua eficácia.

- Estudar os componentes do citoesqueleto, como os filamentos de actina e tubulina, que são cruciais para a migração celular. Essas proteínas formam polímeros dinâmicos altamente versáteis, capazes de organizar organelas citoplasmáticas e compartimentos intracelulares, definindo a polaridade celular e gerando forças de protrusão e contração.
- É necessário que haja uma maior investigação com relação aos seus efeitos das NLS-DTX sobre os fibroblastos, apesar de estarem envolvidos no crescimento tumoral e metastático, são células normais, que estão distribuídas por todas as partes do corpo.
- Explorar novas vias de administração para a formulação de NLS-DTX. O tratamento de diversos tipos de câncer, tem sido avaliado por meio da entrega por diferentes vias como oral, intravenosa, intraperitoneal, retal e transdérmica. As diferentes rotas empregadas para a entrega de DTX estão associadas às suas respectivas vantagens e diminuição de suas deficiências terapêuticas.
- Investigar a via de apoptose. Função das caspases e as proteínas anti e pró apoptóticas na ação das NLS-DTX.
- Estudos *in vivo*, para compreender o mecanismo de biodistribuição das NLS-DTX no organismo, metabolismos e sua eficácia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, M. T.; PACHECO, P.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; CARROSSINI, N.; ROBBS, B.K.; OLIVEIRA, S.S.; KAUFMANN, C.; MORGADO-DIAZ, J.A.; BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research*, v. 68, n. 6, p. 1732–1740, 2008.

AJANI, A.; LEE, J.; SANO, T.; JANJIGIAN, Y. Y.; FAN, D. & SONG, S. Gastric adenocarcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 3, p. 1-17, 2017.

AKANDA, M.; SADEQUE, M.D.; MITHU, H.; DOUROUMIS, D. Solid lipid nanoparticles: An effective lipid-based technology for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, V.86, 2023.

AKINC, A.; BATTAGLIA, G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.5, n. 11, 2013.

ALBANO et al. Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol 175, p. 56–64, 2019.

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017

AMEER, F.; SCANDIUZZI, L.; HASNAIN, S.; KALBACHER, H.; ZAIDI, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63, 895–902, 2014.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. *AJCC Cancer Staging Manual*. In: Amin MB, editor. 8th ed. Chicago: American Joint Committee on Cancer/Springer; 2017.

AMORIM, C.A.; MOREIRA, J.P.; RIAL, L.; CARNEIRO, A.J.; FOGAÇA, H.S.; ELIA, C.; LUIZ, R.R.; DE SOUZA, H.S.P. Ecological study of gastric cancer in Brazil: Geographic and time trend analysis. *World Journal Gastroenterology*, v. 20, n.17, p. 5036-5044, 2014.

ANDRADE, B.Y.G. Avaliação da capacidade antitumoral de nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel em células de carcinoma de ovário sensíveis e resistentes in vitro. IB - Mestrado em Biologia Animal (Dissertações). 2018.

ANDRÉS-SÁNCHEZ, N.; FISHER, D.; KRASINSKA, L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci*. 135(11): 2022.

ASHTON, T. M.; MCKENNA, W. G.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; HIGGINS, G. S. Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 24(11), 2482– 2490, 2018.

ASSUMPÇÃO, J. A. F.; MAGALHÃES, K. G.; CORRÊA, J. R. The role of pparγ and autophagy in ros production, lipid droplets biogenesis and its involvement with colorectal cancer cells modulation. *Cancer Cell Int*. 17, 1–12, 2017.

AZMANOVA, M.; PITTO-BARRY, A. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? *ChemBiochem*. 18;23(10), 2022.

BAENKE, F.; PECK, B.; MIESS, H.; SCHULZE, A. Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.*, 6, 1353–1363, 2013.

BALASUBRAMANIAM, S.D.; BALAKRISHNAN, V.; OON, C.E.; KAUR, G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*. 17;55(7):384, 2019.

BALDO, S.; ANTUNES, P.; FELICIDADE, J.F.; SANTOS, F.M.F.; ARTEAGA, J.F.; FERNANDES, F.; PISCHEL, U.; PINTO, S.N.; GOIS, P.M.P. The BASHY platform enables the assembly of a fluorescent bortezomib-GV1001 conjugate. *ACS Med. Chem. Lett.*, 13, 128–133, 2022.

BALLABIO, A.; BONIFACINO, J.S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21(2):101-118, 2020.

BARNES, J. L. et al. Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, v. 46, n. 5, p. 1213–1224, 2018.

BEST, L.M.; MUGHAL, M. GURUSAMY, K.S. Laparoscopic versus open gastrectomy for gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016.

BHASKAR, S.; LIM, S. Engineering protein nanocages as carries for biomedical applications. *NPS Asia Materials*, v.9, n.4, p. 371-18, 2017.

BHOLA, N.E.; BALKO, J.M.; DUGGER, T.C.; KUBA, M.G.; SÁNCHEZ, V.; SANDERS, M. TGF- β Inhibition Enhances Chemotherapy Action Against Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Invest*, 123(3):1348–58, 2013.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: câncer as a paradigma. *Nat Immunol.* 11(10): 889-896, 2010.

BLACKFORD, A. N.; STUCKI, M. How cells respond to DNA breaks in mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 45, 321–331, 2020.

BOCKERSTETT, K.A.; DIPAOLO, R.J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 4,1 47-53. 14, 2017.

BODAKUNTALA, S.; JIJUMON, A.S.; VILLABLANCA, C.; GONZALEZ-BILLAULT, C.; JANKE, C. Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, v.29, n.10, p.804-819, 2019.

BOEDTKJER, E.; PEDERSEN, S.F. The acidic tumor microenvironment as a driver of câncer. *Annu. Rev. Physiol.*, 82, pp. 103-126, 2020.

BOOTMAN, M.D.; BULTYNCK, G. Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a038802, 2020.

BORHANI, S. Autophagy in Cancer Therapy: Advances and Prospects. *Curr Mol Bio Rep* 9, 1-7, 2023.

BOROUGHES, L.K.; DEBERARDINIS, R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol.*17(4):351–9, 2015.

BORRMANN R. Geschwulste des margens. In: Henke F, Lubarsch O, editors. Handbuch spez pathol anat und histo. Berlim: Springer-Verlag, p.864-71. 1926.

BOULAY, G.; VOLORIO, A.; IYER, S.; BROYE, L.C.; STAMENKOVIC, I.; RIGGI, N & RIVERA, M.N. Epigenome editing of microsatellite repeats defines tumor-specific enhancer functions and dependencies. GENES & DEVELOPMENT, 32:1008–1019, 2018.

BRASELMANN, H. et al. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. Radiat Oncol, v. 10, p. 223, 2015.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRINI M, OTTOLINI D, CALÌ T, CARAFOLI E. Calcium in health and disease. Met Ions Life Sci. 13:81-137, 2013.

BUTLER, L.M.; PERONE, Y.; DEHAIRS, J.; LUPIEN, L.E.; DE LAAT, V.; TALEBI, A. Lipids and Cancer: Emerging Roles in Pathogenesis, Diagnosis and Therapeutic Intervention. Adv Drug Delivery Ver, 159:245–93, 2020.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1851, 469, 2015.

CARCAS, L.P. Gastric Cancer Review. Journal of Carcinogenesis, v. 13, p.14 2014.

CESAR, A.C.G.; SILVA, A.E.; TAJARA, E.H. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. Arquivo Gastroenterologia, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 253-259, 2002.

CHANDEL, N.S. Metabolism of proliferating cells. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 13, p. a040618, 2021.

CHANDEL, N.S. Metabolism of proliferating cells. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 13, p. a040618, 2021.

CHAURAWAL, N.; RAZA, K. Nano-interventions for the drug delivery of docetaxel to cancer cells. Health Sciences Review, V. 7, 2023.

CHEN P.H., CAI L., HUFFMAN K., YANG C., KIM J., FAUBERT B., BOROUGHS L., KO B., SUDDERTH J., MCMILLAN E.A. Metabolic diversity in human non-small cell lung cancer cells. Mol. Cell, 76, pp. 838-851.e5, 2019.

CHEN P.H., CAI L., HUFFMAN K., YANG C., KIM J., FAUBERT B., BOROUGHS L., KO B., SUDDERTH J., MCMILLAN E.A. Metabolic diversity in human non-small cell lung cancer cells. Mol. Cell, 76, pp. 838-851.e5, 2019.

CHEN, B.; GAO, A.; TU, B.; WANG, Y.; YU, X.; WANG, Y. Metabolic modulation via mTOR pathway and anti-angiogenesis remodels tumor microenvironment using PD-L1-targeting codelivery. Biomaterials. 255:120187, 2020.

CHEN, B.; GAO, A.; TU, B.; WANG, Y.; YU, X.; WANG, Y. Metabolic modulation via mTOR pathway and anti-angiogenesis remodels tumor microenvironment using PD-L1-targeting codelivery. *Biomaterials*. 255:120187, 2020.

CHEN, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell Biology*, 4(1), 155– 181, 1988.

CHEN, X.; ZHAO, Y.; LUO, W.; CHEN, S.; LIN, F.; ZHANG, X.; CHEN, X.; FAN, S.; SHEN, X.; WANG, Y.I.; LIANG, G. Celastrol induces ROS-mediated apoptosis via directly targeting peroxiredoxin-2 in gastric cancer cells. *Theranostics*. 10:10290–308, 2020.

CHENG, B.; PAN, W.; XING, Y.; XIAO, Y.; CHEN, J.; XU, Z. Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2022.

CHIURILLO, M.A. Role of gene Polymorphisms in Gastric Cancer and its precursor Lesions: Current Knowledge and perspectives in Latin American Countries. *World Journal Gastroenterologia*, v. 20, p. 4503-4515, 2014.

CHMIELEWSKI, N.N.; LIMOLI, C.L. Sex Differences in Taxane Toxicities. *Cancers*, 14, 3325, 2022.

CHRISTENSEN, K.A.; MYERS, J.T.; SWANSON, J.A. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* 115, 599–607, 2002.

CHU, Y.; PARK, J.; KIM, E.; LEE, S. Fluorescent Materials for Monitoring Mitochondrial Biology. *Materials (Basel)*. 2021 Jul 27;14(15):4180, 2021.

CHUNG, H.W.; LIM, J.B. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology* vol. 20,7: 1667-80, 2014.

CONZE, D.; WEISS, L.; REGEN, P.S.; BHUSHAN, A.; WEAVER, D.; JOHNSON, P. Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, 61(24):8851–8, 2001.

CORREA, P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterology Clinical North America*, v.42, n.2, p.211-217, 2013.

CORTES, J.E. & PADZUR, R. Docetaxel. *Journal of Clinical Oncology*, v.13, p.2643- 2655, 1995.COSTANZINI, A.; SGARBI, G.; MARESCA, A.; DEL DOTTO, V.; SOLAINI, G.; BARACCA, A. Mitochondrial Mass Assessment in a Selected Cell Line under Different Metabolic Conditions. *Cells* 8 (11): 1–14, 2019.

COWLEY, G.S.; WEIR, B.A.; VAZQUEZ, F.; TAMAYO, P.; SCOTT, J.A.; RUSIN, S.; EAST-SELETSKY, A.; ALI, L.D.; GERATH, W.F.; PANTEL, S.E.; LIZOTTE, P.H.; JIANG, G.; HSIAO, J.; TSHERNIAK, A.; DWINELL, E.; AOYAMA, S.; OKAMOTO, M.; HARRINGTON, W.; GELFAND, E.; GREEN, T.M.; TOMKO, M.J.; GOPAL, S.; WONG, T.C.; LI, H.; HOWELL, S.; STRANSKY, N.; LIEFELD, T.; JANG, D.; BISTLINE, J.; HILL, M.B.; ARMSTRONG, S.A.; ANDERSON, K.C.; STEGMAIER, K.; REICH, M.; PELLMAN, D.; BOEHM, J.S.; MESIROV, J.P.; GOLUB, T.R.; ROOT, D.E.; HAHN, W.C. Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Sci Data*. 2014

CREMER, T.; NEEFJES, J.; BERLIN I. The journey of Ca (2+) through the cell - pulsing through the network of ER membrane contact sites." *Journal of Cell Science* 133(24), 2020.

CROSS, W. C.; GRAHAM, T. A.; WRIGHT, N. A. New paradigms in clonal evolution: punctuated equilibrium in cancer. *The Journal of Pathology*, 240(2), p. 126–136, 2016.

CRUCITTA, S.; CUCCHIARA, F.; MATHIJSEN, R.; MATEO, J.; JAGER, A.; JOOSSE, A.; PASSARO, A.; ATTILI, I.; PETRINI, I.; VAN, S. R.; DANESI, R.; DELRE, M. Treatment-driven tumour heterogeneity and drug resistance: Lessons from solid tumours. *Cancer Treat Rev.*, 2022.

CRUZ, A. L. S.; BARRETO, E.A.; FAZOLINI, N.P.B.; VIOLA, J.P.B.; BOZZA, P.T. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death and Disease*, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2020.

DA ROCHA, M. C. O. et al. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. *JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY*, v. 18, p. 43, 2020.

DANHIER, F., FERON, O., & PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), p. 135–146, 2010.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 43(6):582-592, 2019.

DAVIS, M.E.; CHEN, Z.; SHIN, D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, pp. 771-782, 2008.

DAWSON, K.A.; YAN, Y. Current understanding of biological identity at the nanoscale and future prospects. *Nat. Nanotechnol.*, 16 pp. 229-242, 2021.

DE FELICE, D.; ALAIMO, A. Mechanosensitive Piezo Channels in Cancer: Focus on altered Calcium Signaling in Cancer Cells and in Tumor Progression. *Cancers*, 12, 1780, 2020.

DEANS, C. & MAGGERT, K. A. What do you mean, "Epigenetic"? *Genetics*, v. 199, n. 4, p. 887 - 896, 2015.

DELIC, J.; COPPEY, J.; MAGDELENAT, H.; COPPEY-MOISAN, M. Impossibility of acridine orange intercalation in nuclear DNA of the living cell. *Exp Cell Res.*;194(1):147-53, 1991.

DELIERNEUX, C.; KOUBA, S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; POTIER-CARTEREAU, M.; TREBAK, M.; HEMPEL, N. Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer. *Cells.* 12;9(2):432, 2020.

DHAOUADI, N.; VITTO, V.A.M.; PINTON, P.; GALLUZZI, L.; MARCHI, S. Ca²⁺ signaling and cell death. *Cell Calcium.* 19; 113:102759, 2023.

DHIMAN, R.; CAESAR, S.; THIAM, A.R.; SCHRUL, B. Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: A unified cell biological and biophysical perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 108, 4–13, 2020.

DIANZANI, C.; ZARA, G. P.; MAINA, G.; PETTAZZONI, P.; PIZZIMENTI, S.; ROSSI, F.; GIGLIOTTI, C. L.; CIAMPORCERO, E. S.; DAGA, M.; BARRERA G. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *BioMed Res. Int.*, 895–986, 2014.

DÍAZ-CORÁNGUEZ, M.; LIU, X.; ANTONETTI, D.A. Tight Junctions in Cell Proliferation. *Int J Mol Sci.* 20(23):5972, 2019.

DIETLEIN, F.; THELEN, L. & REINHARDT, H. C. Cancerspecific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet.* 30, p. 326–339, 2014.

DING, L.; BUCKWALTER, J.A.; MARTIN, J.A. DAMPs Synergize with Cytokines or Fibronectin Fragment on Inducing Chondrolysis but Lose Effect When Acting Alone. *Mediators of Inflammation*, 2017.

DONAHUE, N.D.; ACAR, H.; WILHELM, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 143:68-96, 2019.

DOU, J., ZHANG, H., LIU, X., ZHANG, MENG YU Z., GUANGXI. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of docetaxel loaded mixed micelles for oral administration, *Colloids Surf B: Biointerfaces.* v. 1, n. 114, p. 20-7, 2014.

DUAN, Y.T.; DHAR, A.; PATEL, C.; KHIMANI, M.; NEOGI, S.; SHARMA, P.; KUMAR, N.S.; VEKARIYA, R.L. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Adv.*, 10, pp. 26777-2679, 2020.

DUBEY, R.; STIVALA, C.E.; NGUYEN, H.Q.; GOO, Y.H.; PAUL, A.; CARETTE, J.E. Lipid Droplets can Promote Drug Accumulation and Activation. *Nat Chem Biol*, 16:206–13, 2020.

DURBIN, K.R.; PHIPPS, C.; LIAO, X. Mechanistic Modeling of Antibody–Drug Conjugate Internalization at the Cellular Level Reveals Inefficient Processing Steps. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.17, n.6, p. 1341–1351, 2018.

EASWARAN, H.; HSING-CHEN, T.; BAYLIN, S.B. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance.” *Molecular cell* vol. 54,5: 716-27, 2014.

ELDEM, T.; SPEISE, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid microparticles and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharmaveutical research*, 8, (3), pp. 47-54, 1991.

ENJOJI, M.; KOHJIMA, M.; OHTSU, K.; MATSUNAGA, K.; MURATA, Y.; NAKAMUTA, M. Intracellular Mechanisms Underlying Lipid Accumulation (White Opaque Substance) in Gastric Epithelial Neoplasms: A Pilot Study of Expression Profiles of Lipid-Metabolism-Associated Genes. *J Gastroenterol Hepatol*, 31:776–81, 2016.

ETOH, T. et al. “Notes on laparoscopic gastrointestinal surgery-current status from clinical studies of minimally invasive surgery for gastric cancer.” *Journal of visualized surgery*, vol. 3, p. 1-4, 2017.

FABIAN, K.P.; KOWALCZYK, J.T.; REYNOLDS, S.T; HODGE, J.W. Dying of Stress: Chemotherapy, Radiotherapy, and Small-Molecule Inhibitors in Immunogenic Cell Death and Immunogenic Modulation. *Cells*. 11(23):3826, 2022.

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDIL, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, v. 8, n. 1, p. 151-170, 2011.

FARIS, P.; SHEKHA, M.; MONTAGNA, D.; GUERRA, G.; MOCCIA, F. Endolysosomal Ca²⁺ Signalling and Cancer Hallmarks: Two-Pore Channels on the Move, TRPML1 Lags Behind! *Cancers (Basel)*. 27;11(1):27, 2018.

FATIMA, M.; SHEIKH, A.; ABOUREHAB, M.A.S.; KESHARWANI, P. Advancements in Polymeric Nanocarriers to Mediate Targeted Therapy against Triple-Negative Breast Cancer. *Pharmaceutics* 14: 2432, 2022.

FEINBERG, A.P.; LEVCHENKO, A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer. *Science*. 2023

FENNELLY, C.; AMARAVADI, R.K. Lysosomal Biology in Cancer. *Methods Mol. Biol.*, 1594, 293–308, 2017.

FENTON, O.S.; OLAFSON, K.N.; PILLAI, P.S.; MITCHELL, M.J.; LANGER, R. Advances in biomaterials for drug delivery. *Adv. Mater.*, 30, p. 1705328, 2018.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021.

FOCK, K.M. The Epidemiology and Prevention of Gastric Cancer. *Aliment Pharmacology Therapeutics*, v. 40, n.3, p.250-260, 2014.

FOSTER, D.S.; JONES, R.E.; RANSOM, R.C.; LONGAKER, M.T.; NORTON J.A. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight*, 3, p. e99911, 2018.

FOSTER, D.S.; JONES, R.E.; RANSOM, R.C.; LONGAKER, M.T.; NORTON J.A. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight*, 3, p. e99911, 2018.

FRTUS, A.; SMOLKOVA, B.; UZHYTCHAK, M.; LUNOVA, M.; JIRSA, M.; KUBINOVA, S.; DEJNEKA, A.; LUNOV, O. Analyzing the mechanisms of iron oxide nanoparticles interactions with cells: A road from failure to success in clinical applications. *J. Control. Release*, 328, pp. 59-77, 2020.

GANESH, J.M.; DHARMARAJAN, A.; WARRIER, S.; GANDHIRAJAN, R. K. Modulation of reactive oxygen species in cancers: recent advances. *Free Radic Res*. 56(5-6):447-470, 2022.

GAO, H.; CAO, S.; YANG, Z. et al. Preparation, characterization and anti-glioma effects of Docetaxel incorporated albumin-lipid nanoparticles. *Journal Biomedical Nanotechnology*, v. 11, p. 2137-2147, 2015.

GARBINCIUS, J.F.; ELROD, J.W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiol Rev*. 1;102(2):893-992, 2022.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages *Research in pharmaceutical sciences*, 13, (4), p. 288, 2018.

GIBSON, S.B. A matter of balance between life and death: targeting reactive oxygen species (ROS)-induced autophagy for cancer therapy. *Autophagy*, 6 (7), pp. 835-837, 2010.

GILLESPIE, M.S.; WARD, C.M.; DAVIES, C.C. DNA Repair and Therapeutic Strategies in Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2023

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P.G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(9):722-8, 2007.

GLASER, A. P. et al. APOBEC-mediated mutagenesis in urothelial carcinoma is associated with improved survival, mutations in DNA damage response genes, and immune response. *Oncotarget*, v. 9, n. 4, p. 4537–4548, 2018.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. Ed. 25, Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

GREAVES, M; MALEY, CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481, p. 306–313, 2012.

GROELLY, F.J., FAWKES, M., DAGG, R.A.; BLACKFORD, A.N.; TARSOUNAS, M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 23, 78–94, 2023.

GUAN, S.S., WU, C.T., CHIU, C.Y. et al. Polyethylene glycol-conjugated HER2-targeted peptides as a nuclear imaging probe for HER2-overexpressed gastric cancer detection in vivo. *Journal of Translational Medicine* ,16(1):168, p. 1-18, 2018.

GUERRA F, ARBINI AA, MORO L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 1858(8):686-699, 2017.

GUERRA, L.; BONETTI, L.; BRENNER, D. Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy. *Cell Rep*. 32(1):107848, 2020.

GUERRA, L.; BONETTI, L.; BRENNER, D. Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy. *Cell Rep*. 32(1):107848, 2020.

GUIMARÃES, R.M.; MUZI, C.D. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). *Arquivos Gastroenterologia*, v. 49, n.3, p.184-188, 2012.

GULLO, I.; GRILLO, F.; MASTRACCI, L.; VANOLI, A.; CARNEIRO F.; SARAGONI, L.; LIMARZI, F.; FERRO, J.; PARENTE, P.; FASSAN, M. Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes." *Pathologica* vol. 112,3: 166-185, 2020.

GUPTA, P.; SINGH, A.; VERMA, A.K.; KANT, S.; PANDEY, A.K.; KHARE, P.; PRAKASH, V. The Anti-Tumor and Immunomodulatory Effects of PLGA-Based Docetaxel Nanoparticles in Lung Cancer: The Potential Involvement of

Necroptotic Cell Death through Reactive Oxygen Species and Calcium Build-Up. *Vaccines (Basel)*. 26;10(11):1801, 2022.

GUPTA, P.; SINGH, A.; VERMA, A.K.; KANT, S.; PANDEY, A.K.; MISHRA, A.; KHARE, P.; PRAKASH, V. Nanoencapsulation of Docetaxel Induces Concurrent Apoptosis and Necroptosis in Human Oral Cancer Cells (SCC-9) via TNF- α /RIP1/RIP3 Pathway. *Indian J Clin Biochem*. 38(3):351-360, 2023.

GUPTA, R.; KADHIM, M.M.; TURKI, J. A.; QASIM, A.M.; ALSAIKHAN, F.; KHALIMOVNA, M.N.; RAMÍREZ-CORONEL, A.A.; HASSAN, J.Z.; RAMAIAH, P.; NAJAFI, M. The interactions of docetaxel with tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol*. 29; 119:110214, 2023.

HALL, J. E. & GUYTON, A. C. *Tratado de fisiología médica*. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HALL, R. D. & KUDCHADKAR, R. R. BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control* 21, 221–230, 2014.

HAMASHIMA, C. & GOTO, R. Potential capacity of endoscopic screening for gastric cancer in Japan. *Cancer Sci*, 108(1), p. 101-107, 2017.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v.12, n.1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 3, p.57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, n.5, p. 646-74, 2011.

HARRELL, C.R.; DJONOV, V.; VOLAREVIC, V. The Cross-Talk between Mesenchymal Stem Cells and Immune Cells in Tissue Repair and Regeneration. *Int J Mol Sci*. 1;22(5):2472, 2021.

HARRIS, I.S.; DENICOLA, G.M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol*.30(6):440-451, 2020.

HE, T.; WANG, C.; TAN, Q.; WANG, Z.; LI, J.; CHEN, T.; CUI, K.; WU, Y.; SUN, J.; ZHENG, D.; CHEN, J. Adjuvant chemotherapy-associated lipid changes in breast cancer patients: A real-word retrospective analysis. *Medicine* vol. 99,33, 2020.

HE, W.; LUISTRO, L.; CARVAJAL, D.; SMITH, M.; NEVINS, T.; YIN, X.; ET AL. High Tumor Levels of IL6 and IL8 Abrogate Preclinical Efficacy of the γ -Secretase Inhibitor, RO4929097. *Mol Oncol*, 5(3):292–301, 2011.

HERSHEY, B. J.; VAZZANA, R.; JOPPI. D. L.; HAVAS, K.M. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 1, p. 16, 2020.

HOHMANN, T.; DEHGHANI, F. The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, v.8, n.4, p.362-380, 2019.

- HOLMSTRÖM KM, FINKEL T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*15(6):411-21, 2014.
- HOLOHAN, C.; VAN, S. S.; LONGLEY, D.B. & JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13, p. 714–726, 2013.
- HOU, U.; ZHAO, C.; XU, B.; HUANG, Y.; LIU, C. Effect of docetaxel on mechanical properties of ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research*, v.408, Issue 1, 2021b.
- HOU, X.C.; ZAKS, T.; LANGER, R.; DONG, Y.Z. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.*, 6, pp. 1078-1094, 2021.
- HUANG, B.; SONG, B.L.; XU, C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Metab.* 2(2):132–41, 2020.
- HUANG, J.; LI, L.; LIAN, J.; SCHAUER, S.; VESELY, P.W.; KRATKY, D.; HOEFLER, G.; LEHNER, R. Tumor-induced hyperlipidemia contributes to tumor growth. *Cell Rep.* 15, 336–348, 2016.
- HUANG, J.; ZHANG, L.; WAN, D.; ZHOU, L.; ZHENG, S.; LIN, S.; QIAO, Y. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 6(1):153, 2021.
- IBRAHIM, M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes. Rev.* 11, 11–18, 2010.
- ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of stomach cancer. *World journal of gastroenterology* vol. 28,12: 1187-1203, 2022.
- INGRAM, L.M.; FINNERTY, M.C.; MANSOURA, M.; CHOU, C.W.; CUMMINGS, B.S. Identification of lipidomic profiles associated with drug-resistant prostate cancer cells. *Lipids Health Dis*, 20:15, 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020.
- ISHIHARA, S.; HAGA, H. Matrix Stiffness Contributes to Cancer Progression by Regulating Transcription Factors. *Cancers (Basel).* 14(4):1049, 2022.
- IZZO, V.; BRAVO-SAN, P.; SICA, V.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. Mitochondrial permeability transition: new findings and persisting uncertainties. *Trends Cell Biol.* 26:655–67, 2016.
- JAIN, D. S., BAJAJ, A. N., ATHAWALE, R. B., SHIKHANDE, S. S., PANDEY, A., GOEL, P. N. Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route. *Materials Science and Engineering*, v. 63, p. 411-21, 2016.
- JIA, D.; LI, L.; ANDREW, S.; ALLAN, D.; LI, X.; LEE, J.; JI, G.; YAO, Z.; GADDE, S.; FIGEYS, D.; WANG, L. An autocrine inflammatory forward-feedback loop after chemotherapy withdrawal facilitates the repopulation of drug-resistant breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 13:8(7):2932, 2017.

JONES, M.C.; ZHA J.; HUMPHRIES, M. J. Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* vol. 374,1779, 2019.

JORDAN, M.A. & WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, v.4, p. 253-265, 2004.

JUNTTILA, M. R. & DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354, 2013.

JURCZYK M, KASPERCZYK J, WRZEŚNIOK D, BEBEROK A, JELONEK K. Nanoparticles Loaded with Docetaxel and Resveratrol as an Advanced Tool for Cancer Therapy. *Biomedicines* 20;10(5):1187, 2022.

KAEDING, K. E., & ZARET, K. S. Microsatellite enhancers can be targeted to impair tumorigenesis. *Genes & Development*, 32(15-16), p. 991–992, 2018.

KAINI, R. R.; SILLERUD, L. O.; ZHAORIGETU, S.; HU, C. A. A. Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Prostate* 72, 1412–1422, 2012.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*,16, p. 582–598, 2016.

KANE, H.; LYNCH, L. Innate immune control of adipose tissue homeostasis. *Trends Immunol*, 40(9):857–72, 2019.

KAPARAKIS, M.; WALDUCK, A.K.; PRICE, J.D.; PEDERSEN, J.S.; VAN ROOIJEN, N.; PEARSE, M.J.; WIJBURG, O.L.; STRUGNELL, R.A. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*.76(5):2235-9, 2008.

KARAKASHEVA, T.A.; LIN, E.W.; TANG, Q.; et al. IL-6 Mediates cross-talk between tumor cells and activated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 78(17): 4957- 4970, 2018.

KAVALALI, E.T. Neuronal Ca²⁺ signalling at rest and during spontaneous neurotransmission. *J. Physiol*. 598, 1649–1654, 2020.

KELSEY, E. K. & KENNETH S. Z. Microsatellite enhancers can be targeted to impair tumorigenesis. *GENES & DEVELOPMENT*, vol 32, 2018.

KHAIRNAR, S.V.; PAGARE, P.; THAKRE, A.; NAMBIAR, A.R.; JUNNUTHULA, V.; ABRAHAM, M.C.; KOLIMI, P.; NYAVANANDI, D.; DYAWANAPELLY, S. Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 14, 1886, 2022.

KILLACKEY, S.A.; PHILPOTT, D.J.; GIRARDIN, S.E. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol*. 2;219(11), 2020.

KIM, J.; LEE, G. Metabolic control of m (6)A RNA modification. *Metabolites*, 11, p. 80, 2021.

KIM, K.S.; YOUN, Y.S.; BAE, Y.H. Immune-triggered cancer treatment by intestinal lymphatic delivery of docetaxel-loaded nanoparticle. *Journal of*

controlled release: official journal of the Controlled Release Society. ;311-312:85-95, 2019.

KINOSHITA, H.; HIRATA, Y.; NAKAGAWA, H.; et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. *PLoS One*. 8(4):60914, 2013.

KOLIARAKI, V.; HENRIQUES, A.; PRADOS, A.; KOLLIAS, G. Unfolding innate mechanisms in the cancer microenvironment: The emerging role of the mesenchyme. *J Exp Med*. 6;217(4), 2020.

KONDO, H.; RATCLIFFE, C.D.H.; HOOPER, S.; ELLIS, J.; MACRAE, J.I.; HENNEQUART, M.; DUNSBY, C.W.; ANDERSON, K.I.; SAHAI, E. Single-cell resolved imaging reveals intra-tumor heterogeneity in glycolysis, transitions between metabolic states, and their regulatory mechanisms. *Cell Rep.*, 34, p. 108750, 2021.

KORAKE, S.; BOTHIRAJA, C.; PAWAR, A. Design, development, and in-vitro/in-vivo evaluation of docetaxel-loaded PEGylated solid lipid nanoparticles in prostate cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 189:15-27, 2023.

KOTHARI, I.R.; MAZUMDAR, S.; SHARMA, S.; ITALIYA, K.; MITTAL, A.; CHITKARA, D. Docetaxel and alpha-lipoic acid co-loaded nanoparticles for cancer therapy. *Ther Deliv.*;10(4):227–40, 2019.

KRASNOPOLSKY, A.S. & DUDNICHENKO, Y.M. Experimental study of liposomal docetaxel analysis of docetaxel incorporation and stability. *Experimental oncology*, v. 39, 2017.

KREBS J. Structure, Function and Regulation of the Plasma Membrane Calcium Pump in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 18;23(3):1027, 2022.

KUNZ, P.L.; GUBENS, M.; FISHER, G.A.; FORD, J.M.; LICHTENSZTAJN, D.Y.; CLARKE, C.A. Long-Term Survivors of Gastric Cancer: A California Population –Based Study. *Journal of Clinical Oncology*, v.30, p. 3507-3515, 2012.

KUSUZAKI, K.; MURATA, H.; TAKESHITA, H.; HASHIGUCHI, S.; NOZAKI, T.; EMOTO, K.; ASHIHARA, T.; HIRASAWA, Y. Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells. *Anticancer Res*. 20(2A):971-5, 2000.

LACROIX, M.; RISCAL, R.; ARENA, G.; LINARES, L.K.; LE, L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab*. 33:2-22, 2020.

LAFITA-NAVARRO, M.C.; CONACCI-SORRELL, M. Nucleolar stress: From development to cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 136:64-74, 2023.

LANGE, B.M.; CONNER, C.F. Taxanes and taxoids of the genus *Taxus* – a comprehensive inventory of chemical diversity. *Phytochemistry*, 190, 2021.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, v. 64, p.31-49, 1965.

LAZĂR, D.C.; AVRAM, M.F.; ROMOȘAN, I.; CORNIANU, M.; TĂBAN, S.; GOLDIȘ, A. Prognostic significance of tumor immune microenvironment and

immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 24:3583–616, 2018.

LEE, H.J.; ZHUANG, G.; CAO, Y.; DU, P.; KIM, H.J.; SETTLEMAN, J. Drug Resistance via Feedback Activation of Stat3 in Oncogene-Addicted Cancer Cells. *Cancer Cell*, 26(2):207–21, 2014.

LEE, K.; HWANG, H.; NAM, K.T. Immune response and the tumor microenvironment: how they communicate to regulate gastric cancer. *Gut and liver*, 8(2): 131-9, 2014.

LEE, Y.G.; PARK, D.H.; CHAE, Y.C. Role of Mitochondrial Stress Response in Cancer Progression. *Cells.* 11(5):771, 2022.

LEONE, R.D.; POWELL, J.D. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer* 20, 516–531, 2020.

LI, H.M.; WANG, Y.; TANG, Q.; YIN, D.; TANG, C.N.; HE, E.; ZOU, L.; PENG, Q. The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomater.*, 129, pp. 57-72, 2021.

LI, L.; ISHDORJ, G.; GIBSON, S.B. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.*, 53 (7), pp. 1399-1410, 2012.

LI, P.; SHAN, J.X.; CHEN, X.H.; et al. Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res.* 25(5): 588- 603, 2015.

LIN, J.Z.; WANG, W.W.; HU, T.T.; ZHU, G.Y.; LI, L.N.; ZHANG, C.Y.; XU, Z.; YU, H.B.; WU, H.F.; ZHU, J.G. FOXM1 contributes to docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer by inducing AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Cancer Lett.* 28; 469:481-489, 2020.

LIN, S.; LI, Y.; LEUNG, K.; HUANG, C.; WANG, X. Salt Processed Food and Gastric Cancer in a Chinese Population. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, v.15, n.13, p.5293–5298, 2014.

LIU, Q.; LUO, Q.; HALIM, A.; SONG, G. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Lett.* 401, 39–45, 2017.

LIU, Y.; LI, C.; LU, Y.; LIU, CHANG.; YANG, W. Tumor microenvironment-mediated immune tolerance in development and treatment of gastric cancer." *Frontiers in immunology*,13: 1016817. 20, 2022.

LORENZEN, S., STAHL, M., HOFHEINZ, R., LORDICK, F. Influence of Taxanes on Treatment Sequence in Gastric Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 43, p. 42-47, 2020.

LORTET-TIEULENT, J.; GEORGES, D.; BRAY, F.; VACCARELLA, S. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *Int J Cancer.*147(11):3029-3036, 2020.

LU, G.D.; ZHOU, Y.H.; TAMILARASI, J.; YAN, B.; LIM, Y.C.; SRIVASTAVA, S.; SALTO-TELLEZ, M.; HUI, K.M.; SHEN, H.M.; NGUYEN, L.N.; TAN, B.C.; SILVER, D.L.; HOOI, S.C. CCAAT/enhancer binding protein α predicts poorer prognosis and prevents energy starvation-induced cell death in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 61, 965–978, 2015.

LUNT, S.Y.; VANDER HEIDEN, M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, pp. 441-464, 2011.

MAGALHÃES, L, P et al. Variação de peso, grau de escolaridade, Saneamento básico, etilismo, tabagismo e hábito alimentar pregresso em pacientes com câncer de estômago. *Arquivo Gastroenterologia*, v. 45, n.2, 2008.

MAJEWSKI, M.; MERTOWSKA, P.; MERTOWSKI, S.; SMOLAK, K.; GRYWALSKA, E.; TORRES, K. Microbiota and the Immune System-Actors in the Gastric Cancer Story. *Cancers (Basel)*. 8;14(15):3832, 2022.

MANIVANNAN, S.; NAGARAJ, S.; NARAYAN, S. A Reflection on the Mechanism of the Role of Nanoparticles in Increasing the Efficacy of Anti-tumour Properties of Docetaxel. *Curr Pathobiol Rep* 9, 79–91, 2021.

MARCHI, S.; GIORGI, C.; GALLUZZI, L.; PINTON, P. Ca^{2+} Fluxes and Cancer. *Mol. Cell* 78, 1055–1069, 2020.

MARIOLI-SAPSAKOU, G.K.; KOURTI, M. Targeting Production of Reactive Oxygen Species as an Anticancer Strategy. *Anticancer Res.* 41(12):5881-5902, 2021.

MARTEL, C.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology of North America*, v. 42, p. 219-240, 2013.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CARDONA, L.R.; KONG, H.; VASAN, K.; MCELROY, G.S.; WERNER, M.; KIHSHEN, H.; RECZEK, C.R.; WEINBERG, S.E.; GAO, P. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. *Nature*, 585, pp. 288-292, 2020.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N.S. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer* 21, 669–680, 2021.

MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade de docetaxel livre e encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v.1, 2010.

MATUZAKI, T.; SAKAMOTO, C.; MATSUDA, K.; SUZUKI, T.; KONDA, Y.; AKANO, O.; WADA, K.; UCHIDA, T.; NISHISAKI, H.; NAGAO, M. Missense mutations and a deletion of the p53 gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;182(1):215-23, 1992.

MATTHEWS, H.K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R.A.M. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23(1):74-88. 2022.

MÁZLÓ, A.; TANG, Y.; JENEI, V.; BRAUMAN, J.; YOUSEF, H.; BÁCSI, A.; KONCZ, G. Resolution Potential of Necrotic Cell Death Pathways. *Int J Mol Sci.* 20;24(1):16, 2022.

MAZZIOTTA, C.; ROTONDO, J.C.; LANZILLOTTI, C.; CAMPIONE, G.; MARTINI, F.; TOGNON, M. Cancer biology and molecular genetics of A₃ adenosine receptor. *Oncogene*. 41(3):301-308, 2022.

MCKEAGE, K. Nanosomal Docetaxel Lipid Suspension: A Guide to Its Use in Cancer. *Clinical Drug Investigation*, 37(4), p. 405–410, 2017.

MEHRAJ, U.; MUSHTAQ, U.; MIR, M.A.; SALEEM, A.; MACHA, M.A.; LONE, M.N.; HAMID, A.; ZARGAR, M.A.; AHMAD, S.M.; WANI, N.A. Chemokines in triple-negative breast cancer heterogeneity: New challenges for clinical implications. *Semin Cancer Biol.* 86:769-783, 2022

MISHRA, V.; BANSAL, K.; VERMA, A.; YADAV, N.; THAKUR, S.; SUDHAKAR, K.; ROSENHOLM J. Solid lipid nanoparticles: emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 10 (4), p. 191, 2018.

MISSIROLI, S.; PERRONE, M.; GENOVESE, I.; PINTON, P.; GIORGI, C. Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine*, 59, 102943, 2020.

MITCHELL, M.J.; BILLINGSLEY, M.M.; HALEY, R.M.; WECHSLER M.E, PEPPAS, N.A.; LANGER, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 20, pp. 101-124, 2021.

MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 11;147(4):728-41, 2011.

MOLONEY JN, COTTER TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 80:50-64, 2018.

MOMCILOVIC, M.; JONES, A.; BAILEY, S. T.; WALDMANN, C. M.; LI, R.; LEE, J. T.; GOMEZ, A.; ABDELHADY, G.; HOLLOWAY, T.; SCHMID, E.; STOUT, D.; FISHBEIN, M. C.; STILES, L.; DABIR, D. V.; DUBINETT, S. M.; CHRISTOFK, H.; SHIRIHAI, O.; KOEHLER, C. M.; SADEGHI, S.; SHACKELFORD, D. B. In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 575(7782), 380– 384, 2019.

MONTERO, A. et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *The lancet oncology*, v. 6, n. 4, p. 229-239, 2005.

MORSE, D.L.; GRAY, H.; PAYNE, C.M.; GILLIES, R.J. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.4, p. 1495-1504, 2005.

MUEHLMANN, L.A., RODRIGUES, M.C., LONGO, J.P.F. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *J Nanobiotechnol* 13, 36, 2015.

MUKHOPADHYAY, S.; SCHLAEPFER, I.R.; BERGMAN, B.C.; PANDA, P.K.; PRAHARAJ, P.P.; NAIK, P.P.; AGARWAL, R.; BHUTIA, S.K. ATG14 facilitated lipophagy in cancer cells induce ER stress mediated mitoptosis through a ROS dependent pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 199–213, 2017.

MURAGUCHI, A.; HIRANO, T.; TANG, B.; MATSUDA, T.; HORII, Y.; NAKAJIMA, K.; KISHIMOTO, T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167, 332–344, 1988.

MURAKAMI, M.; KAMIMURA, D.; HIRANO, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50, 812–831, 2019.

MURARO, C.L.P.M. Câncer gástrico precoce: contribuição ao diagnóstico e resultado do tratamento cirúrgico. *Revista Colégio Brasileiro de Cirurgias*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 352-358, 2003.

NAGINI, S. Carcinoma of the Stomach: A Review of Epidemiology, Pathogenesis, Molecular Genetics and Chemoprevention. *World Journal Gastrointestinal Oncology*, v.4, n.7, p.156-169, 2012.

NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS genetics*, v. 14, n. 6, 2018.

NEHMÉ, A., VARADARAJAN, P., SELAKUMAR, G., GERHOLD, M., NIEDNER, H., ZHANG, Q., CHRISTEN, R. D. Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 84(11), p.1571–1576, 2001.

NIAPOUR A, SEYEDASLI N. Acquisition of paclitaxel resistance modulates the biological traits of gastric cancer AGS cells and facilitates epithelial to mesenchymal transition and angiogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 395(5):515-533, 2022.

NIAVARANI, S.R.; LAWSON, C.; BAKOS, O.; BOUDAUD, M.; BATENCHUK, C.; ROULEAU, S. Lipid accumulation impairs natural killer cell cytotoxicity and tumor control in the postoperative period. *BMC Cancer*, 19(1):823, 2019.

NIAVARANI, S.R.; LAWSON, C.; BAKOS, O.; BOUDAUD, M.; BATENCHUK, C.; ROULEAU, S.; TAI, L.H. Lipid accumulation impairs natural killer cell cytotoxicity and tumor control in the postoperative period. *BMC Cancer.* 20;19(1):823, 2019.

NOVIKOV, N.M.; ZOLOTARYOVA, S.Y.; GAUTREAU, A.M.; DENISOV, E.V. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 124(1):102-114, 2021.

NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, p. 23–28, 1976.

OHRI, N.; GARG, M.K.; APARO, S.; KAUBISCH, A.; TOME, W.; KENNEDY, T, J. ET AL. Who benefits from adjuvant radiation therapy for gastric cancer? A meta-analysis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 86(2), p. 330-335, 2013.

OJIMA, I., LICHTENTHAL, B., LEE, S., WANG, C., & WANG, X. Taxane anticancer agents: a patent perspective. *Expert opinion on therapeutic patents*, 26(1), p.1–20, 2016.

OLIVEIRA, P.J; URBANO, A.M. Oncometabolism: The switchboard of cancer - An editorial. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*1;1867(2):166031, 2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer>>. 2020.

ONISHCHENKO, N.; TRETIAKOVA, D.; VODOVOZOVA, E. Spotlight on the protein corona of liposomes. *Acta Biomater.*, 134, pp. 57-78, 2021.

OSHIMA, H.; HIOKI, K.; POPIVANOVA, B.K.; OGUMA, K.; VAN ROOIJEN, N.; ISHIKAWA, T.O.; OSHIMA, M. Prostaglandin E₂ signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology*. 140(2):596-607, 2011.

OSHIMA, H.; ISHIKAWA, T.; YOSHIDA, G.J.; NAOI, K.; MAEDA, Y.; NAKA, K. TNF-/TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna in tumor cells. *Oncogene*, 33:3820-9, 2014.

OSHIMA, H.; OSHIMA, M.; INABA, K.; TAKETO, M.M. Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in COX-2/mPGES-1 transgenic mice. *EMBO J*. 23(7): 1669- 1678, 2004.

OTOMO, T.; YOSHIMORI, T. Lysophagy: A Method for Monitoring Lysosomal Rupture Followed by Autophagy-Dependent Recovery. *Methods Mol Biol*. 1594:141-149, 2017.

OVERHOLTZER, M., MAILLEUX, A. A., MOUNEIMNE, G., NORMAND, G., SCHNITT, S. J., KING, R. W. et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 966-979, 2007.

PAIVA, K.L.R.; RADICCHI, M.A.; BAO, S.N. In Vitro Evaluation of NLS-DTX Activity in Triple-Negative Breast Cancer. *MOLECULES*, v. 27, p. 4920, 2022.

PALIWAL, R.; PALIWAL, S.R.; KENWAT, R.; KURMI, B.; SAHU, M.K. Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30:3, 179-194, 2020.

PAN, B.; CHEN, D.; HUANG, J.; WANG, R.; FENG, B.; SONG, H.; CHEN, L. HMGB1-mediated autophagy promotes docetaxel resistance in human lung adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 5; 13:165, 2014.

PANIERI, E.; SANTORO, M.M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*. 9;7(6):2253, 2016.

PAPADOPOULOS, C.; KRAVIC, B.; MEYER, H. Repair or Lysophagy: Dealing with Damaged Lysosomes. *J Mol Biol*. 3;432(1):231-239, 2020.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.*, 366, (1), pp. 170-184, 2009.

PARK, E.S.; YOO, J.M.; LIM, Y.; TUDEV. et al. Inhibitory effects of docetaxel on platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells through blocking PDGF-receptor β phosphorylation. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.116, p. 204-213, 2011.

PATEL, A.; TRIPATHI, G.; GOPALAKRISHNAN, K.; WILLIAMS, N.; ARASARADNAM, R.P. Field cancerisation in colorectal cancer: a new frontier or pastures past. *World Journal Gastroenterology*, v.21, n. 13, p. 3763-3772, 2015.

PATEL, T. N.; ROY, S. & RAVI, R. Gastric cancer and related epigenetic alterations. *Ecancermedicalsecience*, 11, p. 1–13, 2017.

PAVLOVA, N.N.; THOMPSON, C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.*, 23, pp. 27-47, 2016.

PENG, F.; LIAO, M.; QIN, R.; ZHU, S.; PENG, C.; FU, L.; CHEN, Y.; HAN, B. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 13;7(1):286, 2022.

PEREZ-MATAS, E.; HANANO, A.; MOYANO, E.; BONFILL, M.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J. Insights into the control of taxane metabolism: Molecular, cellular, and metabolic changes induced by elicitation in *Taxus baccata* cell suspensions. *Front Plant Sci.* 13:942433, 2022.

PERRI, F. et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 111, p. 166–172, 2017.

PETRIOLI, R., MARRELLI, D., ROVIELLO, F. et al. Pathological response and outcome after neoadjuvant chemotherapy with DOC (docetaxel, oxaliplatin, capecitabine) or EOF (epirubicin, oxaliplatin, 5-fluorouracil) for clinical T3-T4 non-metastatic gastric cancer. *Surgical Oncology*, 32, p. 2–7, 2020.

PIAZUELO, M.B.; CORREA, P. Gastric cancer: overview. *Colombia Medica*, v.44, n.3, p.192-201, 2013.

PINTO MC, KIHARA AH, GOULART VA, TONELLI FM, GOMES KN, ULRICH H, RESENDE RR. Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal.* 27(11):2139-49, 2015.

PISKOUNOVA, E.; AGATHOCLEOUS, M.; MURPHY, M.M.; HU, Z.; HUDDLESTUN, S.E.; ZHAO, Z.; LEITCH, A.M.; JOHNSON, T.M.; DEBERARDINIS, R.J.; MORRISON, S.J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527, pp. 186-191, 2015.

POILLET-PEREZ, G.; DESPOUY, R.; DELAGE-MOURROUX, M.; BOYER-GUITTAUT. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.*, 4 pp. 184-192, 2015.

POOROLAJAL, J.; MORADI, L.; MOHAMMADI, Y.; CHERAGHI, Z.; GOHARI-ENSAF, F. Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis." *Epidemiology and health* vol. 42, 2020.

QIU, M., OUYANG, J., SUN, H., MENG, F., CHENG, R., ZHANG, J., CHENG, L., LAN, Q., DENG, C., ZHONG, Z. Biodegradable Micelles Based on Poly (ethylene glycol)-b-poly(lipopeptide) Copolymer: A Robust and Versatile NanoplatforM for Anticancer Drug Delivery, *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 9, n. 33, p. 27587–27595, 2017.

QIU, M.Z.; CAI, M.Y.; ZHANG, D.S.; WANG, Z.Q.; WANG, D.S.; LI, Y.; XU, R.H. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *Journal of Translational Medicine*, v. 11, n.58, 2013.

QURESHI, O. S., KIM, H. S., ZEB, A., CHOI, J. S., KIM, H. S., KWON, J. E., KIM, M. S., KANG, J. H., RYOU, C., PARK, J. S., KIM, J. K. Sustained release docetaxel-incorporated lipid nanoparticles with improved pharmacokinetics for oral and parenteral administration, *Journal of Microencapsulation*, v. 34, n. 3, p. 250–261, 2017.

RAFFAELLO, A.; MAMMUCARI, C.; GHERARDI, G.; RIZZUTO, R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1035–1049, 2016.

RAK, S.; DE ZAN, T.; STEFULJ, J.; KOSOVIĆ, M.; GAMULIN, O.; OSMAK, M. FTIR Spectroscopy Reveals Lipid Droplets in Drug Resistant Laryngeal Carcinoma Cells Through Detection of Increased Ester Vibrational Bands Intensity. *Analyst*, 139:3407–15, 2014.

RAKESH, R.; PRIYADHARSHINI, L.C.; SAKTHIVEL, K.M.; RASMI, R.R. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1868(7):166400, 2022.

REINFELD, B.I.; MADDEN, M.Z.; WOLF, M.M.; CHYTIL, A.; BADER, J.E.; PATTERSON, A.R.; SUGIURA, A.; COHEN, A.S.; ALI, A.; DO, B.T. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment. *Nature*, 593, pp. 282-288, 2021.

RENNICK, J.J.; JOHNSTON, A.P.R.; PARTON, R.G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nat. Nanotechnol.*, 16, pp. 266-276, 2021.

RIBEIRO, A.A.; NARDOCCI, A.C. Desigualdades socioeconômicas na incidência e mortalidade por câncer: revisão de estudos ecológicos, 1998-2008. *Saúde Sociedade São Paulo*, v.22, n.3, p.878-891, 2013.

RICKARD, B.P.; OVERCHUK, M.; CHAPPELL, V.A.; KEMAL, R. M.; SINAWANG, P.D.; NGUYEN, H.T.T.; DEMIRCI, U.; FRANCO, W.; FENTON, S.E.; SANTOS, J.H.; RIZVI, I. Methods to Evaluate Changes in Mitochondrial Structure and Function in Cancer. *Cancers (Basel)*. 29;15(9):2564, 2023.

RIDONE, P.; VASSALLI, M.; MARTINAC, B. Piezo1 mechanosensitive channels: What are they and why are they important. *Biophys. Rev.* 11, 795–805, 2019.

RIHAWI, K.; RICCI, A.D.; RIZZO, A.; BROCCHI, S.; MARASCO, G.; PASTORE, L.V.; LLIMPE, F.L.R.; GOLFIERI, R.; RENZULLI, M. Tumor-Associated Macrophages and Inflammatory Microenvironment in Gastric Cancer: Novel Translational Implications. *Int J Mol Sci.* 7;22(8):3805, 2021.

RODRIGUEZ, C.; PUENTE-MONCADA, N.; REITER, R.J.; SANCHEZ-SANCHEZ, A.M.; HERRERA, F.; RODRIGUEZ-BLANCO, J. Regulation of cancer cell glucose metabolism is determinant for cancer cell fate after melatonin administration. *J Cell Physiol.* 2020.SAIZ, N.; MORA-BITRIA, L.; RAHMAN, S.; GEORGE, H.; HERDER, J.P.; GARCIA-OJALVO, J.; HADJANTONAKIS, A. K. Growth-factor-mediated coupling between lineage size and cell fate choice underlies robustness of mammalian development. *Elife.* 28;9: 2020.

SANNA V., ROGGIO, A. M., POSADINO, A. M., COSSU, A., MARCEDDU, S., MARIANI, A., Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: Formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *Nanoscale Research Letters*, v.6(1), p. 1–9, 2011.

SANTAGOSTINO, S.F.; ASSENMACHER, C.A.; TARRANT, J.C.; ADEDEJI, A.O.; RADAELLI, E. Mechanisms of Regulated Cell Death: Current Perspectives. *Vet Pathol*, 58(4):596-623, 2021.

SCHAEFER, M. H. & SERRANO, L. Cell type-specific properties and environment shape tissue specificity of cancer genes. *Scientific Reports*, 6, 20707, 2016.

SCHILIRO, C.; FIRESTEIN, B.L. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*, 10, 1056. 2021.

SCHNEIDER, G.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAD, R. & SAUR, D. Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nature Reviews Cancer*, 17(4), p. 239–253, 2017.

SCHWARTZ, L.M. “Autophagic Cell Death During Development - Ancient and Mysterious.” *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 656370, 2021.

SETHI, J.K.; HOTAMISLIGIL, G.S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab*. 3(10):1302-1312, 2021.

SHAH, P., BHALODIA, D., SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, v.1, n.24, 2010.

SHARMA, A.; THAKUR, S.; MUTREJA, V.; BHARDWAJ, G. A brief review on phytochemistry and pharmacology of *Taxus baccata* L. *MaterToday: Proc.*, 48 pp. 1569-1574, 2021.

SHARMA, S.V.; LEE, D.Y.; LI, B. et al. A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141:69–80, 2010.

SHI, J.; QU, Y.P.; HOU, P. Pathogenetic mechanisms in Gastric Cancer. *World Journal Gastroenterology*, v. 20, n. 38, p.13804-13819, 2014.

SHI, J.J.; KANTOFF, P.W.; WOOSTER, R.; FAROKHZAD, O.C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer*, 17, pp. 20-37, 2017.

SHI, Z.; YANG, W.M.; CHEN, L.P.; YANG, D.H.; ZHOU, Q.; ZHU, J.; ET AL. Enhanced Chemosensitization in Multidrug-Resistant Human Breast Cancer Cells by Inhibition of IL-6 and IL-8 Production. *Breast Cancer Res Treat*, 135(3):737–47, 2012.

SHIMAZU, T.; WAKAI, K.; TAMAKOSHI, A.; TSUJI, I.; TANAKA, K.; MATSUO, K. Association of vegetable and fruit intake with gastric cancer risk among Japanese: a pooled analysis of four cohort studies. *Annals of Oncology*, v. 25, n.6, p. 1228–1233, 2014.

SHIN, D.W. Lipophagy: Molecular Mechanisms and Implications in Metabolic Disorders. *Mol Cells*. 31;43(8):686-693, 2020.

SHYU, P.J.R.; WONG, X.F.A.; CRASTA, K.; THIBAUT, G. Dropping in on Lipid Droplets: Insights into Cellular Stress and Cancer. *Biosci Rep* 38, 2018.

ŠKUBNÍK, J.; SVOBODOVÁ, P.V.; RUMIL, T.; RIMPELOVÁ, S. Autophagy in cancer resistance to paclitaxel: Development of combination strategies. *Biomed Pharmacother*. 161:114458, 2023.

SNAEBJORNSSON, M.T.; JANAKI-RAMAN, S.; SCHULZE, A. Greasing the wheels of the cancer machine: the role of lipid metabolism in cancer. *Cell Metab*, 31(1):62–76, 2020.

SOBRAL, D.; MARTINS, M.; KAPLAN, S.; GOLKARAM, M.; SALMANS, M.; KHAN, N.; VIJAYARAGHAVAN, R.; CASIMIRO, S.; FERNANDES, A.; BORRALHO, P.; FERREIRA, C.; PINTO, R.; ABREU, C.; COSTA, A.L.; ZHANG, S.; PAWLOWSKI, T.; GODSEY, J.; MANSINHO, A.; MACEDO, D.; LOBO-MARTINS, S.; FILIPE, P.; ESTEVES, R.; COUTINHO, J.; COSTA, P.M.; RAMIRES, A.; ALDEIA, F.; QUINTELA, A.; SO, A.; LIU, L.; GROSSO, A.R.; COSTA, L. Genetic and microenvironmental intra-tumor heterogeneity impacts colorectal cancer evolution and metastatic development. *Commun Biol*. 9;5(1):937, 2022.

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H. Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal, and transdermal applications *Drugs Pharmaceut. Sci.*, 166. p. 213, 2007.

SPENCER, S.L.; GAUDET, S.; ALBECK, J.G., et al. non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL induced apoptosis. *Nature*, 459:428–432, 2009.

SPINELLI, J.B.; HAIGIS, M.C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.*, 20 (7), pp. 745-754, 2018.

SREERANGANATHAN, M.; UTHAMAN, S.; SARMENTO, B.; MOHAN, C.G.; PARK, I.K.; JAYAKUMAR, R. In vivo evaluation of cetuximab-conjugated poly(γ -glutamic acid)-docetaxel nanomedicines in EGFR-overexpressing gastric cancer xenografts. *International Journal of Nanomedicine*, v.12, p. 7165–7182, 2017.

SU, P.; WANG, Q.; BI, E.; MA, X.; LIU, L.; YANG, M.; QIAN, J.; YI, Q. Enhanced lipid accumulation and metabolism are required for the differentiation and activation of tumor-associated macrophages. *Cancer Res*, 80(7):1438–50, 2020.

SUMERA, A.A.; OVAIS, M.; KHAN, A.; RAZA, A. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: a novel drug delivery system. *IET Nanobiotechnology* v. 11,6 621–629, 2017.

SUMMERHAYES, I. C.; LAMPIDIS, T. J.; BERNAL, S. D.; NADAKAVUKAREN, J. J.; NADAKAVUKAREN, K. K.; SHEPHERD, E. L.; CHEN, L. B. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 5292– 5296, 1982.

SUN, L.; ZHAO, P.; CHEN, M.; LENG, J.; LUAN, Y.; DU, B.; YANG, J.; YANG, Y.; RONG, R. Taxanes prodrug-based nanomedicines for cancer therapy. *J Control Release*. 348:672-691, 2022.

SUNG H, ET AL. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.; 71:209-249, 2021.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Estatísticas Globais de Câncer 2020: Estimativas GLOBOCAN de Incidência e Mortalidade Mundial para 36 Cânceres em 185 Países. *CA Câncer J Clin*. 71 :209–249, 2021.

TAJADA, S.; VILLALOBOS, C. Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks. *Frontiers in pharmacology*, vol. 11 968, 2020.

TANG, D.; KANG, R.; BERGHE, T.V.; VANDENABEELE, P.; KROEMER, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 29(5):347-364, 2019.

TASDOGAN, A.; FAUBERT, B.; RAMESH, V.; UBELLACKER, J.M.; SHEN, B.; SOLMONSON, A.; MURPHY, M.M.; GU, Z.; GU, W.; MARTIN M. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature*, 577 pp. 115-120, 2020.

TASHIMA, T. Effective cancer therapy based on selective drug delivery into cells across their membrane using receptor-mediated endocytosis. *Bioorg Med Chem Lett*.;28(18):3015-3024, 2018.

TAUCHER, E.; MYKOLIUK, I.; FEDIUK, M.; SMOLLE-JUETTNER, F.M. Autophagy, Oxidative Stress and Cancer Development.” *Cancers* vol. 14,7 1637, 2022.

TENG, M.W.L.; BOWMAN, E.P.; MCELWEE, J.J.; SMYTH, M.J.; CASANOVA, J.-L.; COOPER, A.M.; CUA, D.J. IL-12 and IL-23 cytokines: From discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med*. 21, 719–729, 2015.

TERRY, S.; ENGELSEN, A.S.T.; BUART, S.; ELSAYED, W.S.; VENKATESH, G.H.; CHOUAIB, S. Hypoxia-driven intratumor heterogeneity and immune evasion. *Cancer Lett*. 2020.

THIBODEAU, G. A. & PATTON, K. T. *Estrutura e Funções do Corpo Humano*. 11ed. São Paulo: Manole, 2002.

TIRINATO, L.; PAGLIARI, F.; LIMONGI, T.; MARINI, M.; FALQUI, A.; SECO, J.; CANDELORO, P.; LIBERALE, C.; DI FABRIZIO, E. An overview of lipid droplets in cancer and cancer stem cells. *Stem. Cells Int*. 2017, 1656053, 2017.

TLSTY, T.D.; COUSSENS, L.M. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.*, 1, pp. 119-150, 2006.

TONG, X.; TANG, R.; XIAO, M.; XU, J.; WANG, W.; ZHANG, B.; LIU, J.; YU, X.; SHI, S. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *J Hematol Oncol*. 8;15(1):174, 2022.

TORTORA, G. J. & DERRICKSON, B. Princípios de Anatomia e fisiologia. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

TOWNSEND, C.M.; EVERS, B.M.; BEAUCHAMP, R.D. & MATTOX, K.L. SABISTON - Tratado de Cirurgia. 19ªed, Saunders Elsevier, 2015.

TRAN D.H.; KESAVAN, R.; RION, H.; SOFLAEE, M.H.; SOLMONSON, A.; BEZWADA, D.; VU, H.S.; CAI, F.; PHILLIPS, J.A.; DEBERARDINIS, R.J.; HOXHAJ, G. Mitochondrial NADP⁺ is essential for proline biosynthesis during cell growth. *Nat. Metab.*, 3, pp. 571-585, 2021.

TU, S.; BHAGAT, G.; CUI, G.; TAKAISHI, S.; KURT-JONES, E.A.; RICKMAN, B.; BETZ, K.S.; PENZ-OESTERREICHER, M.; BJORKDAHL, O.; FOX, J.G.; WANG, T.C. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*. 4;14(5):408-19, 2008.

ULLDEMOLINS, A.; SERASFRANZOSO, J.; ANDRADE, F.; RAFAEL, D.; ABA SOLO, I.; GENER, P.; SCHWARTZ, S. J.R. Perspectives of nano-carrier drug delivery systems to overcome cancer drug resistance in the clinics. *Cancer Drug Resist.* 4(1):44–68. 2021.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (UICC). TNM Classificação de Tumores Malignos - 2010. 7. ed. Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Câncer, p. 325, 2012.

UZHYTCHAK, M.; SMOLKOVÁ, B.; LUNOVA, M.; FRTÚS, A.; JIRSA, M.; DEJNEKA, A.; LUNOV, O. Lysosomal nanotoxicity: Impact of nanomedicines on lysosomal function. *Adv Drug Deliv Rev.*; 197:114828, 2023.

VACCARELLA, S.; GEORGES, D.; BRAY, F.; GINSBURG, O.; CHARVAT, H.; MARTIKAINEN, P.; BRØNNUM-HANSEN, H.; DEBOOSERE, P.; BOPP, M.; LEINSALU, M.; ARTNIK, B.; LORENZONI, V.; DE VRIES, E.; MARMOT, M.; VINEIS, P.; MACKENBACH, J.; NUSSELDER, W. Socioeconomic inequalities in cancer mortality between and within countries in Europe: a population-based study. *Lancet Reg Health Eur.* 28; 25:100551, 2022.

VALLESE, F.; BARAZZUOL, L.; MASO, L.; BRINI, M.; CALI, T. ER-Mitochondria Calcium Transfer, Organelle Contacts and Neurodegenerative Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1131, 719–746, 2020.

VAN ASTEN, J.J.A.; VETTUKATTIL, R.; BUCKLE, T.; ROTTENBERG, S.; VAN LEEUWEN, F.; BATHEN, T.F.; HEERSCHAP, A. Increased levels of choline metabolites are an early marker of docetaxel treatment response in BRCA1-mutated mouse mammary tumors: An assessment by ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Transl. Med.* 13, 114, 2015.

VAN CUTSEM, E.; SAGAERT, X.; TOPAL, B.; HAUSTERMANS, K.; PRENEN, H. Gastric cancer. *Lancet (Lond, Engl)*.388:2654–64, 2016.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* vol. 324,5930 1029-33, 2009.

VANDER HEIDEN, M.G.; DEBERARDINIS, R.J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*, 168, pp. 657-669, 2017.

VASSEUR, S.; FABIENNE, G. Lipids in cancer: a global view of the contribution of lipid pathways to metastatic formation and treatment resistance. *Oncogenesis* vol. 11,1 46. 9, 2022.

VEZZANI, B.; CARINCI, M.; PREVIATI M.; GIACOVAZZI S.; SALA, M.D.; GAFÀ, R.; LANZA, G.; WIECKOWSKI, M.R.; PINTON, P.; GIORGI, C. Epigenetic Regulation: A Link between Inflammation and Carcinogenesis. *Cancers* vol. 14,5 1221, 2022.

VGONTZAS, A.N.; PAPANICOLAOU, D.A.; BIXLER, E.O.; KALES, A.; TYSON, K.; CHROUSOS, G.P. Elevation of Plasma Cytokines in Disorders of Excessive Daytime Sleepiness: Role of Sleep Disturbance and Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1313–1316, 1997.

VIAL, J.; COHEN, M.; SASSIAT, P.; THIEBAUT, D. Pharmaceutical quality of Docetaxel generics versus originator drug product: a comparative analysis. *Current Medical Research and Opinion*, v. 24, p.07, 2008.

VIGNALI, D.A.A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nat. Immunol.* 13, 722–728, 2012.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature*, 469, p. 314–322, 2011.

VOROBEVA, N. V.; CHERNYAK, B. V. NETosis: Molecular Mechanisms, role in Physiology and Pathology. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85,10: 1178-1190, 2020.

VYAS, S.; ZAGANJOR, E.; HAIGIS, M. C. Mitochondria and cancer. *Cell*, 166(3), 555– 566, 2016.

WAGNER, A.D.; SYN, N.L.; MOEHLER, M.; GROTHE, W.; YONG, W.P.; TAI, B.C.; ET AL. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, p.1-30, 2017.

WALEN, K.H. Cell cycle stress in normal human cells: A route to "first cells" (with/without fitness gain) and cancer-like cell-shape changes. *Semin Cancer Biol.* 81:73-82, 2022.

WANG, C.; AGUILAR, A.; OJIMA, I. Strategies for the drug discovery and development of taxane anticancer therapeutics. *Expert Opin Drug Discov.* (11):1193-1207, 2022.

WANG, C; TANG, M.; CHEN, Z.; NIE, L.; LI, S.; XIONG, Y.; SZYMONOWICZ, K.L.; PARK, J.M.; ZHANG, H.; FENG, X. Genetic vulnerabilities upon inhibition of DNA damage response. *Nucleic Acids Research* 49, 8214–8231, 2021.

WANG, D.; YE, Q.; GU, H.; CHEN, Z. The role of lipid metabolism in tumor immune microenvironment and potential therapeutic strategies. *Front Oncol*, 12:984560, 2022.

WANG, F.; GÓMEZ-SINTES, R.; BOYA, P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*. 19(12):918-931, 2018.

WANG, H.; LIU, M.; ZENG, X.; ZHENG, Y.A.; WANG, Y.; ZHOU, Y. Cell death affecting the progression of gastric cancer. *Cell Death Discov.* 8, 377, 2022.

WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, v.6, p. 765–774, 2011.

WANG, J.; LI, Y.Y.; NIE, G.J. Multifunctional biomolecule nanostructures for cancer therapy. *Nat. Rev. Mater.*, 6, pp. 766-783, 2021.

WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; WEI, F.; LIAN, Y.; WU, Y.; GONG, Z.; ZHANG, S.; ZHOU, J.; CAO, K.; LI, X.; XIONG, W.; LI, G.; ZENG, Z. & GUO, C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), p. 761–773, 2017.

WANG, R.; LIANG, L.; MATSUMOTO, M.; IWATA, K.; UMEMURA, A.; HE, F. Reactive Oxygen Species and NRF2 Signaling, Friends or Foes in Cancer? *Biomolecules*. 11;13(2):353, 2023.

WANG, T., ZHU, D., LIU, G., TAO, W., CAO, W., ZHANG, L., WANG, L., CHEN, H., MEI, L., HUANG, L., ZENG, X. DTX-loaded star-shaped TAPP-PLA-b-TPGS nanoparticles for cancer chemical and photodynamic combination therapy, *RSC Advances*. v. 5, p. 50617-50627, 2015.

WANG, X.; ZHOU, Q.; YU, Z.; WU, X.; CHEN, X.; LI, J.; LI, C.; YAN, M.; ZHU, Z.; LIU, B.; SU, L. Cancer-associated fibroblast-derived Lumican promotes gastric cancer progression via the integrin β 1-FAK signaling pathway. *Int J Cancer*. 1;141(5):998-1010, 2017.

WARBURG O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.*, 8, pp. 519-530, 1927.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21(3), 297– 308, 2012.

WATSON, J.D. et al. *Biologia molecular do gene*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

WCRI. WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL/American Institute for Cancer Research CUPR. Diet, nutrition, physical activity and stomach cancer. 2016. Disponível em: <http://www.wcrf.org/sites/default/files/Stomach-Cancer-2016-Report.pdf>

WEEDEN, C. E. Molecular Basis of Disease Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *BBA - Molecular Basis of Disease*, v. 1864, n. 1, p. 89–101, 2018.

WEI, W.; ROSENKRANS, Z.T.; LUO, Q.Y.; LAN, X.; CAI, W. Exploiting Nanomaterial-mediated Autophagy for Cancer Therapy. *Small methods* vol. 3,2 1800365, 2019.

WEIR, H.K.; THOMPSON, T.D.; SOMAN, A.; MOLLER, B.; LEADBETTER, S. The past, present, and future of cancer incidence in the United States: 1975 through 2020. *Cancer*, v. 121(11), p. 1827-1837, 2015.

WIGGERS, W.J.; CAVALHEIRO NETO, A.; MORAIS, C.F. Análise de aspectos epidemiológicos e histopatológicos de 95 pacientes com neoplasia gástrica maligna no oeste do paran : analogia com a literatura brasileira e mundial. *Revista Th ma et Scientia*, v. 6, n. 2, 2016.

WONG HL, CHATTOPADHYAY N, WU XY, BENDAYAN R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretrovirals (ARVs) to the brain in HIV Infection, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p 503-517, 2010.

WU, X.; TAO, P.; ZHOU, Q.; et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 8(13): 20741- 20750, 2017.

WU, Y.; ZHOU, B.P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 102, 639–644, 2010.

XIAO, S.; ZHOU, L. Gastric cancer: Metabolic and metabolomics perspectives (Review). *Int J Oncol*; 51:5-17, 2017.

XU, J.; ELSHAZLY, A.M.; GEWIRTZ, D.A. The Cytoprotective, Cytotoxic and Nonprotective Functional Forms of Autophagy Induced by Microtubule Poisons in Tumor Cells-Implications for Autophagy Modulation as a Therapeutic Strategy. *Biomedicines*. 7;10(7):1632, 2022.

XU, Z., CHEN, L., GU, W., GAO, Y., LIN, L., ZHANG, Z., XI, Y., LI, Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*. v. 30, n. 2, p. 226-32, 2009.

XU, L.; WANG, X.; LIU, Y.; YANG, G.; FALCONER, R.J.; ZHAO, C.X. Lipid nanoparticles for drug delivery. *Adv. NanoBiomed Res*. 2021.

XU, L.; WANG, X.; LIU, Y.; YANG, G.; FALCONER, R.J.; ZHAO, C-X. Lipid nanoparticles for drug delivery. *Adv NanoBiomed Res*. 2(2):2100109, 2022.

YANG, S.C.; LU, L.F.; CAI, Y.; ZHU, J.B.; LIANG, B.W.; YANG, C.Z. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J Control Release*. 2;59(3):299-307, 1999.

YANG, Z.J.; CHEE, C.E.; HUANG, S.; SINICROPE, F.A. The role of autophagy in cancer: Therapeutic implications. *Mol. Cancer*, 10, 1533–1541, 2011.

YI, E.H.; LEE, C.S.; LEE, J.K.; LEE, Y.J.; SHIN, M.K.; CHO, C.H. STAT3-RANTES Autocrine Signaling Is Essential for Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res*, 11(1):31–42, 2013.

YOON, H.; SHAW, J.L.; HAIGIS, M.C.; GREKA, A. Lipid metabolism in sickness and in health: emerging regulators of lipotoxicity. *Mol Cell*, 81(18):3708–30, 2021.

YOON, S.; WOO, S.U.; KANG, J.H.; KIM, K.; KWON, M.-H.; PARK, S.; SHIN, H.-J.; GWAK, H.-S.; CHWAE, Y.J. STAT3 transcriptional factor activated by reactive oxygen species induces IL6 in starvation-induced autophagy of cancer cells. *Autophagy*, 6, 1125–1138, 2010.

YU, J.; ZHONG, B.; XIAO, Q.; DU, L.; HOU, Y.; SUN, H.S.; LU, J.J.; CHEN, X. Induction of programmed necrosis: A novel anti-cancer strategy for natural compounds. *Pharmacol Ther.* 214:107593, 2020.

YUE, Z.; YU, Y.; GAO, B.; WANG, D.; SUN, H.; FENG, Y.; MA, Z.; XIE, X. Advances in protein glycosylation and its role in tissue repair and regeneration. *Glycoconj J.* 2023.

ZABRANSKY, D.J.; JAFFEE, E.M.; WEERARATNA, A.T. Shared genetic and epigenetic changes link aging and cancer. *Trends Cell Biol.* 32(4):338-350, 2022.

ZADOORIAN A, DU X, YANG H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 23:1–17, 2023.

ZANOTELLI, M.R.; RAHMAN-ZAMAN, A.; VANDERBURGH, J.A.; TAUFALLELE, P.V.; JAIN, A.; ERICKSON, D.; BORDELEAU, F.; REINHART-KING, C.A. Energetic costs regulated by cell mechanics and confinement are predictive of migration path during decision-making. *Nat. Commun.*, 10, p. 4185, 2019.

ZHANG, A X.; DONG, Y.; ZENG, X.; LIANG, X.; LI X.; TAO, W. The effect of autophagy inhibitors on drug delivery using biodegradable polymer NPs in cancer treatment *Biomaterials*, 35 pp. 1932-1943, 2014 a.

ZHANG, A.; MIAO, K.; SUN, H.; DENG C. X. Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance. *International journal of biological sciences* vol. 18,7 3019-3033, 2022.

ZHANG, M.; CHEN, F.; SUN, X.; HUANG, Y.; ZENG, Y.; CHEN, J.; WU, S.; XU, C. Sympathetic β_2 -adrenergic receptor blockade overcomes docetaxel resistance in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 21; 657:69-79, 2023.

ZHANG, P.; CHEN, L.; ZHANG, Z.; LIN, L.; LI, Y. Pharmacokinetics in rats and efficacy in murine ovarian cancer model for solid lipid nanoparticles loading docetaxel. *J Nanosci Nanotechnol.*;10(11): 7541–4,2010.

ZHANG, S; PENG, YANG, S.; LI, X.; HUANG, M.; WEI, S.; LIU, J.; HE, G.; ZHENG, H.; YANG, L.; LI, H.; FAN, Q. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death Dis.* 8;13(2):132, 2022

ZHANG, X.; YANG, Y.; LIANG, X.; ZENG, X.; LIU, Z.; TAO, W.; XIAO, X.; CHEN, H.; HUANG, L.; MEI, L. Enhancing therapeutic effects of docetaxel-loaded dendritic copolymer nanoparticles by co-treatment with autophagy inhibitor on breast cancer. *Theranostics.* 15;4(11):1085-95, 2014 b.

ZHAO, M.; SU, M.; LIN, X. et al. Evaluation of docetaxel-loaded intravenous lipid emulsion: pharmacokinetics, tissue distribution, antitumor activity, safety and toxicity. *Pharmaceutical Research*, 27(8), p.1687-1702, 2010.

ZHAO, P.; ASTRUC, D. Docetaxel nanotecnologia em anticâncer terapia. *ChemMedChem*, v. 7, n. 6, p. 952-972, 2012.

ZHENG, H.; BAN, Y.; WEI, F.; MA, X. Regulation of Interleukin-12 Production in Antigen-Presenting Cells. In *Regulation of Cytokine Gene Expression in*

Immunity and Diseases; Ma, X., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 941, pp. 117–138. 2016.

ZHOU, H.; SUN, LINA.; WAN F. Molecular mechanisms of TUG1 in the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells. *Oncology letters*, vol. 18,5: 4393-4402, 2019.

ZHU, D., TAO. W., ZHANG, H., LIU, G., WANG, T., ZHANG, L., ZENG, X., MEI. Docetaxel (DTX) -loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer, *Acta Biomater*, v. 30, p. 144-15, 2016.

ZHU, H.; GU, X.; XIA, L.; ZHOU, Y.; BOUAMAR, H.; YANG, J.; ET AL. A Novel Tgf β Trap Blocks Chemotherapeutics-Induced Tgf β 1 Signaling and Enhances Their Anticancer Activity in Gynecologic Cancers. *Clin Cancer Res*, 24(12):2780–93, 2018.

ZHU, J.; SCHWÖRER, S.; BERISA, M.; KYUNG, Y.J.; RYU, K.W.; YI, J.; JIANG, X.; CROSS, J.R.; THOMPSON, C.B. Mitochondrial NADP(H) generation is essential for proline biosynthesis. *Science*, 372, pp. 968-972, 2021.

ZILBERSTEIN, B. et al. Consenso Brasileiro sobre Câncer Gástrico: Diretrizes para o Câncer Gástrico no Brasil. *Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva*, v. 26, n. 1, p.2-6, 2013.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 94(3):909-50, 2014.
