



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUAN VITOR ALVES DE LIMA

**FLUOPSINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA
PEGUILADO INDUZ MODULAÇÃO DE VIAS
ALTERNATIVAS DE MORTE CELULAR**

Londrina
2025



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



LUAN VITOR ALVES DE LIMA

**FLUOPSINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA
PEGUILADO INDUZ MODULAÇÃO DE VIAS
ALTERNATIVAS DE MORTE CELULAR**

LUAN VITOR ALVES DE LIMA

**FLUOPSINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA
PEGUILADO INDUZ MODULAÇÃO DE VIAS
ALTERNATIVAS DE MORTE CELULAR**

Trabalho de Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L732 Lima, Luan Vitor Alves de.
Fluopsina C encapsulada em lipossoma PEGuilado induz modulação de vias alternativas de morte celular / Luan Vitor Alves de Lima. - Londrina, 2025.
146 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Tese. 2. Cultura 3D - Tese. 3. Lipossoma - Tese. 4. Morte Celular Regulada - Tese. I. Sérgio Mantovani, Mário. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

LUAN VITOR ALVES DE LIMA

**FLUOPSINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA
PEGUILADO INDUZ MODULAÇÃO DE VIAS
ALTERNATIVAS DE MORTE CELULAR**

Trabalho de Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini
Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Ingrid Felicidade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de julho de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, que sempre foi a minha base. Sou profundamente grato por todo o apoio em cada uma das minhas escolhas e por nunca terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Mantovani, expresso minha sincera gratidão pela orientação exemplar, pelas valiosas trocas de experiências e por ter contribuído significativamente para o meu desenvolvimento como pesquisador.

Ao meu namorado, Matheus, agradeço por ser meu parceiro em todos os momentos, por compartilhar a vida comigo e torná-la ainda mais especial. Também sou grato pela ajuda nos experimentos e pelas conversas científicas.

Aos meus amigos, em especial Liana, Maria e Rafa.

Agradeço também à equipe GENTOX pela convivência e colaboração ao longo desta jornada, em especial à Ingrid, Simone, Sandra, Isa, Isaura, Bia e Luiz.

Agradeço às professoras Dra. Juliana Serpeloni e Dra. Glaura Scantamburlo pelas contribuições apontadas durante minha qualificação.

Agradeço às professoras Dra. Alessandra, Dra. Danielle, Dra. Ingrid e Dr. Roberta pelas contribuições apontadas na minha defesa.

Sou grato à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelo suporte institucional e pela formação sólida oferecida.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL, agradeço pelo fornecimento da fluopsina C, e ao Laboratório de Química da UTFPR, pela colaboração no processo de encapsulamento do composto.

Por fim, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, que permitiu minha dedicação integral à pesquisa.

Lima, Luan Vitor Alves de. **Fluopsina C encapsulada em lipossoma PEGuilado induz modulação de vias alternativas de morte celular**. 2025. 146 p. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor, Londrina, 2025.

RESUMO

A busca por terapias antitumorais eficazes e seletivas é um desafio contínuo na oncologia. A Fluopsina C (FlpC), uma metalodroga organocúprica, apresenta potencial citotóxico, mas sua toxicidade sistêmica limita a aplicação livre. Este estudo avaliou uma nanoformulação de FlpC encapsulada em lipossomas PEGuilados (FlpC-PEG) em modelos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) das linhagens NCI-H460 (carcinoma pulmonar) e HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular). Em 2D, a FlpC-PEG apresentou citotoxicidade com IC_{50} de 1,0 μ M (NCI-H460) e 0,48 μ M (HepG2/C3A), além de induzir disfunção mitocondrial e ruptura de membrana em ambas as linhagens. Em 3D, o tratamento com FlpC-PEG inibiu o crescimento dos esferoides e promoveu modulação diferencial de vias de morte celular. Em NCI-H460, a via apoptótica foi suprimida (redução de *TP53*, *BBC3*; aumento de *TP73*) e houve modulação das vias de cuproptose (*DLAT*, *ATP7B*, *MTF1* e *CDKN2A*) e ferroptose (supressão de *SLC7A11-GPX4*; aumento de *TFRC*). Em HepG2/C3A, destacou-se a necroptose (*RIPK1*, *RIPK3* e *MLKL*), além de genes relacionados a dano genético (*GADD45A*), ciclo celular (*CDKN1A* e *PCNA*), estresse oxidativo (*SLC7A11*), autofagia (*SQSTM1* e *mTOR*) e metabolismo de xenobióticos (*CYPs*, *HNF4 α* e *PPAR γ*). A combinação entre modelos 2D e 3D permitiu uma caracterização mais abrangente dos efeitos da FlpC-PEG, revelando múltiplos mecanismos de ação e a indução de formas alternativas de morte celular regulada. Este é o primeiro estudo a empregar FlpC-PEG em esferoides tumorais humanos, fornecendo evidências robustas de sua eficácia e consolidando seu potencial como metalofármaco promissor para aplicações pré-clínicas.

Palavras-chave: Produtos naturais; Cultura 3D; Nanomedicina; Necrose programada.

Lima, Luan Vitor Alves de. **PEGylated liposome-encapsulated fluopsin C induces modulation of alternative cell death pathways**. 2025. 146 p. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor, Londrina.

ABSTRACT

The search for effective and selective antitumoral therapies remains an ongoing challenge in oncology. Fluopsin C (FlpC), an organocopper metallodrug, exhibits cytotoxic potential, but its systemic toxicity limits its unrestricted application. This study evaluated a nanoformulation of FlpC encapsulated in PEGylated liposomes (FlpC-PEG) in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) models of NCI-H460 (lung carcinoma) and HepG2/C3A (hepatocellular carcinoma) cell lines. In 2D, FlpC-PEG showed cytotoxicity with IC_{50} values of 1.0 μ M (NCI-H460) and 0.48 μ M (HepG2/C3A), along with inducing mitochondrial dysfunction and membrane rupture in both cell lines. In 3D, FlpC-PEG treatment inhibited spheroid growth and promoted differential modulation of cell death pathways. In NCI-H460, the apoptotic pathway was suppressed (reduction of *TP53*, *BBC3*; increase of *TP73*), and there was modulation of cuproptosis (*DLAT*, *ATP7B*, *MTF1*, and *CDKN2A*) and ferroptosis pathways (suppression of *SLC7A11-GPX4*; increase of *TFRC*). In HepG2/C3A, necroptosis (*RIPK1*, *RIPK3*, and *MLKL*) was prominent, in addition to genes related to genetic damage (*GADD45A*), cell cycle (*CDKN1A* and *PCNA*), oxidative stress (*SLC7A11*), autophagy (*SQSTM1* and *mTOR*), and xenobiotic metabolism (*CYPs*, *HNF4 α* , and *PPAR γ*). The combination of 2D and 3D models allowed for a more comprehensive characterization of FlpC-PEG's effects, revealing multiple mechanisms of action and the induction of alternative forms of regulated cell death. This is the first study to employ FlpC-PEG in human tumor spheroids, providing robust evidence of its efficacy and solidifying its potential as a promising metallodrug for preclinical applications.

Key-words: Natural products; 3D culture; Nanomedicine; Programmed necrosis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO:

Figura 1 -	Estrutura molecular da fluopsina C (A) e tioformina (B).....	19
Figura 2 -	(A) Via de biossíntese da Fluopsina C. (B) Regulação dos níveis de cobre no citoplasma bacteriano.....	21
Figura 3 -	Estrutura de um lipossoma com polietilenoglicol (PEG).....	27
Figura 4 -	Diferentes classificações de lipossomas em relação ao número de camadas lipídicas e diâmetro (nm).....	28
Figura 5 -	Diferentes modos de liberação de um fármaco encapsulado em lipossoma	28
Figura 6 -	Retenção lipossomal no microambiente tumoral.....	30
Figura 7 -	Cultura celular em monocamada (2D).....	33
Figura 8 -	Cultura celular 3D: esferoides	34
Figura 9 -	Fotomicrografias de células da linhagem NCI-H460	38
Figura 10 -	Fotomicrografia de células da linhagem HepG2/C3A.....	39

CAPÍTULO 1:

Figura 1 -	Citotoxicidade e cinética de crescimento em células NCI-H460 tratadas com formulações de FlpC livre e FlpC-PEG	62
Figura 2 -	Marcação de mitocôndrias, núcleo, corpúsculos lipídicos e integridade de membrana celular por microscopia de fluorescência de células NCI-H460 tratadas com FlpCPEG	64
Figura 3 -	Análise de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo de células NCI-H460 após 24 h de tratamento com FlpC-PEG	65
Figura 4 -	FlpC-PEG influencia na taxa de crescimento de esferoides	67
Figura 5 -	FlpC-PEG altera as zonas celulares características de esferoides tumorais após 72 h de tratamento	69
Figura 6 -	FlpC-PEG induz dano ao DNA e altera o ciclo celular	70
Figura 7 -	Análise de morte celular e seus mecanismos moleculares em esferoides de NCI-H460 após 24 h de tratamento	73

CAPÍTULO 2:

Figura 1 -	Citotoxicidade, cinética de crescimento e microscopia de time-	
-------------------	--	--

	lapse em células HepG2/C3A tratadas com FlpC livre e FlpC-PEG.....	97
Figura 2 -	Marcação de mitocôndrias, núcleo, corpúsculos lipídicos e integridade de membrana celular por microscopia de fluorescência de células HepG2/C3A tratadas com FlpC-PEG.....	99
Figura 3 -	FlpC-PEG influencia na taxa de crescimento, diminui potencial clonogênico e induz danos no DNA em esferoides de células HepG2/C3A.....	101
Figura 4 -	Análise do ciclo celular, morte celular e mecanismos moleculares em esferoides de 2 HepG2/C3A tratados com FlpC-PEG.....	104

APÊNDICE A:

Figura 1 -	Microfotografias de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento	121
Figura 2 -	Microfotografias de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento	122
Figura 3 -	Microfotografias de esferoides tumorais de células da linhagem NCI-H460	128

APÊNDICE B:

Figura 1 -	Microfotografias de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 24 h de tratamento com Fluopsina C Lipossomal PEGuilada (FlpC-PEG)	132
Figura 2 -	Microfotografias de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 24 h de tratamento com Fluopsina C livre	133
Figura 3 -	Microfotografias de esferoides tumorais de células da linhagem HepG2/C3A.....	135

LISTA DE TABELAS

REVISÃO:

Tabela 1 - Artigos científicos relacionados com a fluopsina C publicados entre 1970 e 2024	21
Tabela 2 - Trabalhos <i>in vitro</i> com células humanas tratadas com fluopsina C.....	24
Tabela 3 - Trabalhos pré-clínicos <i>in vivo</i> com fluopsina C	26
Tabela 4 - Comparação entre os efeitos <i>in vitro</i> de compostos na forma livre e na forma encapsulada em lipossomas	31

CAPÍTULO 1:

Tabela 1 - Volume médio (mm ³) e taxa de crescimento (%) de esferoides de células NCI-H460 após o tratamento com FlpC	66
--	----

CAPÍTULO 2:

Tabela 1 - Volume médio (mm ³) e taxa de crescimento (%) de esferoides de células HepG2/C3A após o tratamento com FlpC-PEG	100
---	-----

APÊNDICE A:

Tabela 1 - Viabilidade celular (ensaio de resazurina).....	120
Tabela 2 - Índice Celular Normalizado de células da linhagem NCI-H460.....	123
Tabela 3 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em monocamada (2D)	124
Tabela 4 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em esferoides tumorais (3D).....	125
Tabela 5 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em monocamada (2D).....	126
Tabela 6 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em esferoides tumorais (3D)	127
Tabela 7 - Sequências iniciadoras dos genes avaliados em RT-qPCR	129
Tabela 8 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR.....	130

APÊNDICE B:

Tabela 1 - Viabilidade celular (ensaio de resazurina).....	131
Tabela 2 - Índice Celular Normalizado de células da linhagem HepG2/C3.....	134
Tabela 3 - Número de colônias formadas a partir de células de esferoides de HepG2/C3A.....	136
Tabela 4 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em esferoides tumorais (3D).....	137
Tabela 5 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em monocamada (2D).....	138
Tabela 6 - Sequências iniciadoras dos genes avaliados em RT-qPCR.....	139
Tabela 7 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR após 6 h de tratamento com Flpc-PG IC ₅₀	140
Tabela 8 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR após 12 h de tratamento com Flpc-PG IC ₅₀	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Cultura bidimensional
3D	Cultura tridimensional
7-AAD	7-Aminoactinomicina D
ABC	Cassete de Ligação ao ATP
ACTB	Beta-actina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP7B	ATPase Transportadora de Cobre tipo 7B
AhR	Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
BBC3	Componente 3 de ligação a BCL2
BECN1	Beclin 1
C-MYC	Proto-oncogene regulador da proliferação
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CCIH	Colangiocarcinoma intra-hepático
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CPCNP	Carcinoma pulmonar de células não pequenas
CPT	Camptotecina
CYP	Família de enzimas do Citocromo P450
CYP1A1, CYP1A2, etc.	Genes codificadores de isoformas específicas de enzimas do Citocromo P450
Cq	Quantificação do ciclo (Cycle quantification)
Ct / $\Delta\Delta Ct$	Ciclo limiar / Delta delta ciclo limiar
Cu(II)	Íon cúprico (estado de oxidação +2 do cobre)
DLAT	Dihidrolipoil acetiltransferase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX / DXR	Doxorrubicina
DSPE	Dietanoilfosfatidiletanolamina
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
ERN1	Sinalização do retículo endoplasmático para o núcleo 1
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio

FDA	Fluoresceína Diacetato
FSP1	Proteína supressora de ferroptose 1
FlpC	Fluopsina C
FlpC-PEG	Fluopsina C nanoencapsulada em lipossoma peguilado
GADD45A	Alfa induzível por dano ao DNA e parada de crescimento celular
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPX1 / GPX4	Glutaciona peroxidase 1 e 4
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona-S-transferase
GUV	Vesícula unilamelar gigante
HIF-1α	Fator Indutível por Hipóxia 1 Alfa
HNF4α	Fator nuclear hepático 4 alfa
HepG2/C3A	Linha celular derivada de carcinoma hepatocelular
IC25 / IC12,5	Concentração inibitória de 25% e 12,5%
IC50	Concentração inibitória capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular
IRE1	Enzima 1 requerida por inositol
IV	Intravenoso
LUV	Vesícula unilamelar grande
MCT	Esferoide tumoral multicelular
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MLKL	Quinase semelhante a domínio de quinase de linhagem mista
MLV	Vesícula lipídica múltipla
RNA_m	RNA mensageiro
MTF1	Fator de transcrição regulador de metais 1
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NCI-H460	Linha celular de carcinoma pulmonar de células não pequenas
NCIti	Índice Celular Normalizado
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2	Fator nuclear relacionado ao eritroide 2
PAO1	NAD(P)H quinona desidrogenase 1
PARP1	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PEG	Polietilenoglicol
PI	Iodeto de Propídio
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PUMA	Modulador de apoptose induzido por p53
PXR	Receptor X de pregnano
RE	Retículo endoplasmático
RIPK1 / RIPK3	Quinase de serina/treonina interagente com receptor 1 e 3
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa em tempo real
RTCA	Análise celular em tempo real
SBF	Soro bovino fetal
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
SLC7A11	Gene codificante do transportador xCT de cistina/glutamato
SQSTM1 / p62	Sequestossomo 1
SUV	Vesícula unilamelar pequena
SYBR Green	Corante fluorescente para qPCR
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
TFRC	Receptor de transferrina
TNTs	Nanotubos de tunelamento
TP53 / TP73	Genes supressores tumorais da família p53
TRAF2	Fator associado ao receptor de TNF 2
UGT	UDP-glicuronosiltransferase
WHO	Organização Mundial da Saúde
Z-VAD-fmk	Inibidor pancaspase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Metalodrogas em terapias anticâncer	16
2.2	Fluopsina C	19
2.2.1	Atividades Biológicas E Aspectos Físico-Químicos Da Fluopsina C.....	19
2.2.2	Biossíntese Da Fluopsina C	20
2.2.3	Estudos Relacionados Com As Atividades Biológicas Da Fluopsina C	21
2.2.4	Atividade Antimicrobiana Da Fluopsina C	24
2.2.5	Estudos Pré-Clínicos <i>In Vitro</i> E <i>In Vivo</i> Com A Fluopsina C	24
2.3	Lipossomas PEGuilados como nanocarreadores de fármacos	26
2.3.1	Aspectos Gerais.....	26
2.3.2	Biodistribuição E Liberação Do Fármaco Encapsulado.....	28
2.3.3	Estratégias Para Direcionar Lipossomas Peguilados Para O Microambiente Tumoral.....	29
2.3.4	Atividade Lipossomal Em Ensaio Pré-Clínicos <i>In Vitro</i>	30
2.3.5	Características Dos Lipossomas Peguilados	31
2.4	Ensaio pré-clínicos de novas moléculas com potencial antiproliferativo	31
2.4.1	Experimentação <i>In Vitro</i> : Cultura Celular Em Monocamada (2D)	32
2.4.2	Experimentação <i>In Vitro</i> : Cultura De Esferoides Tumorais Multicelulares (3D).....	33
2.4.3	Linhagens de células tumorais humanas	37
	BIBLIOGRAFIA	40
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivos específicos	51

4	CAPÍTULO 1.....	52
	Fluopsina C PEGuilada modula vias de cuproptose e ferroptose e reduz o crescimento de esferoide tumoral de células NCI-H460	52
5	CAPÍTULO 2.....	86
	Modulação da expressão de RNAm de vias de necroptose e do citocromo P450 por FlpC-PEG em esferoides de HepG2/C3A	86
6	CONCLUSÃO GERAL.....	117
	APÊNDICES	119
	APÊNDICE A - Material suplementar – Linhagem NCI-H460.....	120
	APÊNDICE B - Material suplementar HepG2/C3A	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade global, com destaque para tumores sólidos como o carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) e o carcinoma hepatocelular (CHC), pois são frequentemente diagnosticados em estágios avançados e apresentam baixa taxa de sobrevivência (BRAY *et al.*, 2024). Embora terapias-alvo tenham trazido avanços, a eficácia clínica ainda é limitada pela resistência tumoral e pelos efeitos adversos sistêmicos (OCEN; KUMAR, 2020). Nesse contexto, persiste a necessidade de identificar compostos com maior seletividade tumoral e capacidade de superar os mecanismos clássicos de evasão de morte celular (HOU *et al.*, 2022).

Entre as alternativas promissoras, destacam-se as metalodrogas, em especial os complexos cúpricos, por sua habilidade em induzir estresse oxidativo e modular vias de morte celular não convencionais (ZHENG *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023). A Fluopsina C (FlpC), um complexo cúprico natural produzido por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces* spp. (MIYAMURA *et al.*, 1972; NAVARRO *et al.*, 2019), representa um exemplo relevante nesse contexto. Dados da literatura, incluindo achados do nosso grupo (ALVES DE LIMA *et al.*, 2022), demonstraram atividade citotóxica *in vitro*, com indução de morte celular não apoptótica, estresse oxidativo, danos ao DNA e inibição da proliferação celular em células MCF-7 (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). No entanto, a continuidade de estudos pré-clínicos com a FlpC na forma livre é limitada devido à sua elevada toxicidade, baixa seletividade por células tumorais (MA *et al.*, 2013) e hepatotoxicidade significativa (NAVARRO *et al.*, 2019).

Para contornar essas limitações, a nanoencapsulação em lipossomas PEGuilados surge como alternativa viável, promovendo maior estabilidade, distribuição seletiva para o microambiente tumoral e menor toxicidade sistêmica (LI *et al.*, 2019; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023). Essa abordagem mostrou resultados clínicos favoráveis com outros fármacos, como a doxorrubicina lipossomal (O'BRIEN *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2023), e pode ser aplicada à FlpC visando potencializar sua eficácia antitumoral com redução da toxicidade. No entanto, os mecanismos moleculares ativados por essa formulação ainda não foram explorados em modelos pré-clínicos tridimensionais de cultura celular.

Nesse cenário, modelos tridimensionais de esferoides tumorais têm

se consolidado como ferramentas avançadas para estudos pré-clínicos, por reproduzirem com maior fidelidade o microambiente tumoral *in vivo* (RIJT; STEFANEK; VALENTE., 2023). Essas estruturas mimetizam gradientes de oxigênio e nutrientes, zonas de proliferação e hipóxia, além de promoverem interações célula-célula, célula-matriz e heterogeneidade fenotípica, aspectos ausentes em culturas bidimensionais (NUNES *et al.*, 2019; ZANONI *et al.*, 2019; ROY *et al.*, 2023; EL HARANE *et al.*, 2023).

Esferoides formados pela linhagem HepG2/C3A destacam-se, especificamente, como modelos relevantes para estudos toxicológicos e farmacológicos, pois reproduzem zonas metabólicas e expressam enzimas-chave de biotransformação hepática, como CYPs, GST e UGT (COLTMAN *et al.*, 2021; ŠTAMPAR *et al.*, 2021). Assim, esses modelos não apenas permitem avaliar a eficácia da FlpC-PEG em um sistema biologicamente mais representativo, mas também oferecem uma plataforma para investigar seus efeitos sobre vias moleculares associadas ao metabolismo de xenobióticos, estresse celular e mecanismos de morte não apoptótica.

Para atingir os objetivos propostos, o trabalho experimental foi estruturado em dois capítulos principais, cada um abordando um modelo tumoral distinto e avaliando os efeitos antiproliferativos e as modulações na expressão de RNAm induzidas pela formulação lipossomal PEGuilada da FlpC.

O Capítulo 1, intitulado “*Fluopsina C PEGuilada modula vias de cuproptose e ferroptose e reduz o crescimento de esferoides tumorais de células NCI-H460*”, investiga os efeitos da FlpC-PEG em culturas 2D e esferoides 3D de carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP – linhagem NCI-H460). Os objetivos específicos foram: (1) comparar a eficácia da FlpC livre e da FlpC-PEG; (2) avaliar os impactos sobre a proliferação e o ciclo celular; e (3) elucidar os mecanismos de estresse e morte celular, com ênfase nas vias de cuproptose e ferroptose.

O Capítulo 2, intitulado “*Modulação da expressão de RNAm de vias de necroptose e do citocromo P450 por FlpC-PEG em esferoides de HepG2/C3A*”, analisa os efeitos da FlpC-PEG em esferoides 3D da linhagem HepG2/C3A, modelo hepatocelular com alta relevância toxicológica e metabólica. Os objetivos foram: (1) comparar os efeitos da FlpC livre e da FlpC-PEG sobre a viabilidade celular e o crescimento tumoral *in vitro*; (2) investigar a ativação de vias de morte celular, com

foco na necroptose; e (3) avaliar a modulação de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, estresse oxidativo e resposta adaptativa celular à exposição ao composto encapsulado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METALODROGAS EM TERAPIAS ANTICÂNCER

Os átomos metálicos são elementos essenciais para as células, pois participam de processos biológicos fundamentais, como a troca de elétrons, catálise e funções estruturais (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017). Em especial, os metais pertencentes ao bloco *d* e às famílias III-XII da tabela periódica destacam-se por sua capacidade de variação de carga em ambientes aquosos, além de formarem complexos metálicos com diferentes geometrias de coordenação (PATTAN *et al.*, 2012). Devido a essa versatilidade, a interação metal-ligante confere metalodrogas com formas geométricas únicas e atividades redox específicas, atribuídas à camada *d* parcialmente preenchida (HAAS; FRANZ, 2009; NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017). Além disso, em sistemas biológicos, as metalodrogas apresentam interações de interesse farmacológico em terapias anticâncer, como é o caso do quimioterápico cisplatina e seus análogos (XIAO *et al.*, 2020; KOPACZ-BEDNARSKA; KRÓL, 2022; LUCACIU *et al.*, 2022; ĆWIKLIŃSKA-JURKOWSKA *et al.*, 2023).

Desde a descoberta da cisplatina, em 1960, os estudos sobre metalodrogas com propriedades anticâncer intensificaram-se (ADHIKARI *et al.*, 2024). Este fármaco revolucionou a quimioterapia devido ao seu mecanismo de ação, que envolve a ligação ao DNA das células cancerosas e a indução de morte celular por apoptose, superando os tratamentos disponíveis na época (JOHNSTONE *et al.*, 2015). Além disso, a cisplatina abriu novas perspectivas para o uso de metais de transição em interações com biomoléculas (LUCACIU *et al.*, 2022; ADHIKARI *et al.*, 2024). Além da platina, outros complexos metálicos, como os de rutênio (LENIS-ROJAS *et al.*, 2022; PENG *et al.*, 2023), ouro (ZHANG *et al.*, 2021; MORENO-ALCÁNTAR *et al.*, 2023) e cobre (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022; ZHENG *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023), vêm sendo explorados em ensaios pré-clínicos e clínicos como alternativas inovadoras em tratamentos anticâncer.

Considerando que a molécula central deste trabalho, a fluopsina C (FlpC), é um complexo metálico à base de cobre, optou-se por detalhar exclusivamente os mecanismos de ação associados a complexos de cobre. Essa abordagem permite explorar de forma mais aprofundada as propriedades específicas desse metal em interações biomoleculares e seu potencial terapêutico,

proporcionando uma análise relevante para os objetivos da pesquisa.

O cobre é um elemento traço essencial para diversos processos biológicos, desempenhando um papel crucial em reações enzimáticas, no desenvolvimento de tecidos e na modulação do sistema imunológico (UMAIR; ALFADHEL, 2019). Como exemplo, atua como cofator no citocromo c oxidase, essencial para a respiração celular, e na enzima superóxido dismutase, que protege as células contra o estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2020).

Recentemente, diferentes grupos de pesquisa têm explorado o potencial de complexos cúpricos com propriedades antitumorais, motivados por evidências de que esses complexos demonstram maior seletividade por células tumorais e eficácia em linhagens resistentes a quimioterápicos convencionais (Zheng *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023; ADHIKARI *et al.*, 2024). Essa seletividade se deve às propriedades únicas dos íons de cobre e à sua capacidade de formar complexos com diferentes ligantes, tornando-os candidatos promissores para terapias anticâncer (ADHIKARI *et al.*, 2024).

Os complexos cúpricos exercem múltiplos efeitos citotóxicos em células cancerosas, incluindo a interação direta com o DNA (SANGEETHA *et al.*, 2018; PARVEEN *et al.*, 2020; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022), inibição da topoisomerase (QI *et al.*, 2022; MOLINARO *et al.*, 2022), supressão da atividade do proteossomo (CHEN *et al.*, 2021), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2022) e indução de morte celular (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023).

No que diz respeito às interações com o DNA, Parveen *et al.* (2020) demonstraram que os complexos enantioméricos 1S e 1R apresentaram atividade de clivagem ao DNA. Além disso, foi observado citotoxicidade em linhagens de câncer hepático Huh7 (IC₅₀: 1S = 51,7 µM; 1R = 42,7 µM), câncer de mama MCF-7 (IC₅₀: 1S = 61,1 µM; 1R = 90,4 µM) e câncer pancreático BxPC3 (IC₅₀: 1S = 76,6 µM; 1R = 65,6 µM) e AsPC1 (IC₅₀: 1S = 54,6 µM; 1R = 54 µM). Em outro estudo, Alves de Lima *et al.* (2022) constataram que o composto FlpC foi genotóxico na linhagem MCF-7, conforme observado no ensaio do cometa, com IC₅₀ de 1,0 µM.

Em relação à atividade de topoisomerase, o complexo 9-Cu demonstrou efeito inibitório sobre as topoisomerasas I e II, além de apresentar efeitos antiproliferativos nas linhagens de câncer de mama MDA-KB2, SK-BR-3 e MCF-7 (QI *et al.*, 2022). Molinaro *et al.* (2022) também observaram que, além da inibição da

topoisomerase I, o complexo Indenoisoquinolina-Cu(II) induziu danos ao DNA, bloqueio do ciclo celular em G₂/M e autofagia nas linhagens HeLa, MDA-MB-231 e HT-29, com IC₅₀ de 0,22 µM, 0,14 µM e 0,36 µM, respectivamente.

Quanto à inibição do proteossoma, o complexo 4 [Cu(sal-D,L-glu)(2-metilimidazol)] demonstrou atividade inibitória na linhagem A549, com IC₅₀ de 0,05 µM (KONARIKOVA *et al.*, 2019). Além disso, os complexos [Cu(OH-PIP)(Phe)Cl], [Cu(OH-PIP)(Gly)(H₂O)]NO₃·2H₂O, [Cu(OH-PIP)(Ala)(Cl)]·H₂O, [Cu(OH-PIP)(Met)]PF₆·2H₂O e Cu(OH-PIP)(Gln)(H₂O)·3H₂O inibiram a atividade proteossômica e induziram apoptose em células MDA-MB-231, com IC₅₀ de 10,99 µM, 10,98 µM, 8,35 µM, 4,92 µM e 9,33 µM, respectivamente (Li *et al.*, 2019).

Complexos de cobre também induzem citotoxicidade pela geração de ERO através da alternância entre os estados Cu(I) e Cu(II) (PERIASAMY *et al.*, 2020). Em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, o complexo Fenolato-Cu(II), com IC₅₀ de 1,6 µM e 1,9 µM, respectivamente, induz aumento de ERO, danos ao DNA, bloqueio do ciclo celular e morte celular (PERIASAMY *et al.*, 2020). Ma *et al.* (2013) foi demonstraram que a FlpC promove a produção de ERO e altera a permeabilidade da membrana mitocondrial em células MCF-7, com uma IC₅₀ de 0,9 µM.

Na indução de morte celular, complexos cúpricos modulam diferentes vias, incluindo apoptose (Li *et al.*, 2019; PERIASAMY *et al.*, 2020), necrose (PERIASAMY *et al.*, 2020), paraptose (HAGER *et al.*, 2020), oncosse (Ma *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022), ferroptose (LIU *et al.*, 2024) e cuproptose (TSVETKOV *et al.*, 2022). Esses mecanismos são de grande interesse clínico, especialmente em casos de resistência tumoral a certos tipos de morte celular. A ferroptose e cuproptose, em particular, têm se destacado como abordagens promissoras contra células cancerosas. Por exemplo, o elesclomol, um ionóforo de cobre, facilita o transporte de Cu(II) para dentro das células, induzindo seletivamente a cuproptose em células com metabolismo mitocondrial elevado (TSVETKOV *et al.*, 2019; TSVETKOV *et al.*, 2022).

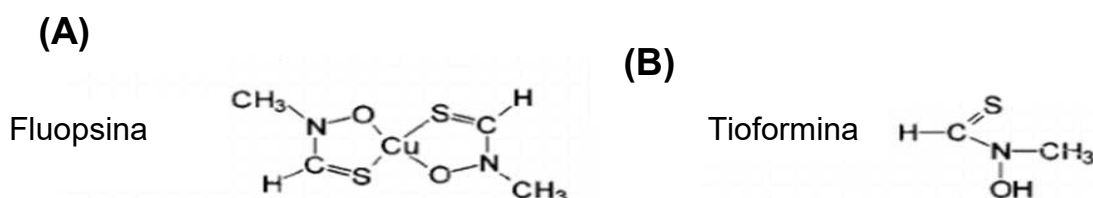
Considerando a diversidade de efeitos biológicos observados em linhagens celulares nesta subseção, bem como a capacidade de induzir formas de morte celular distintas da apoptose, especialmente em células resistentes a essa via, destaca-se que, com exceção da FlpC, todos os compostos mencionados são de origem sintética. Este ponto ressalta a relevância biotecnológica da FlpC como uma molécula natural com considerável potencial terapêutico, reforçando a justificativa para a continuidade de estudos aprofundados em células humanas.

2.2 FLUOPSINA C

2.2.1 Atividades Biológicas E Aspectos Físico-Químicos Da Fluopsina C

A FlpC ou antibiótico YC73 (Fig. 1A) é um metabólito secundário de origem natural produzida por diferentes microrganismos, incluindo *Pseudomonas* MCRL 10107, *Pseudomonas fluorescens* KY 4032, *Streptomyces* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (EGAWA *et al.*, 1970; DEL RIO *et al.*, 1972; MIYAMURA *et al.*, 1972; NAVARRO *et al.*, 2019; PISTORI *et al.*, 2018; SIMIONATO *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; KERBAUY *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). A FlpC tem despertado interesse na comunidade científica devido às propriedades biológicas de ação antibacteriana (NAVARRO *et al.*, 2019, PATTESON *et al.*, 2021; AFONSO *et al.*, 2024), antifúngica (PATTESON *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2024) e antitumoral (MIYAMURA *et al.*, 1972; HEDMAN *et al.*, 2004, MA *et al.*, 2013, ALVES DE LIMA *et al.*, 2022).

Figura 1 – Estrutura molecular da fluopsina C (A) e tioformina (B).



Fonte: (A e B) Chimiak; Przychodzen; Rachon (2001);

Em relação aos aspectos físico-químicos, a FlpC (Fig. 1a) é um complexo metálico termoestável, classificado quimicamente como bis(N-metilthioformohidroxamato)Cu(II), com fórmula molecular $C_4H_8CuN_2O_2S_2$ e massa molecular de 243,8 g/mol (PUBCHEM, 2024). Estruturalmente, a FlpC possui um átomo central de cobre ligado a duas moléculas de tioformina (Figura 1b, caracterizando-se como um complexo cúprico polidentado de baixo peso molecular (EGAWA *et al.*, 1971). A tioformina, pertencente ao grupo dos ácidos tiohidroxâmicos, permite a formação de complexos quelatos com diferentes átomos metálicos, o que

pode resultar em diferentes tipos de fluopsinas (CHIMIÁK; PRZYCHODZEN; RACHON, 2002).

2.2.2 Biossíntese Da Fluopsina C

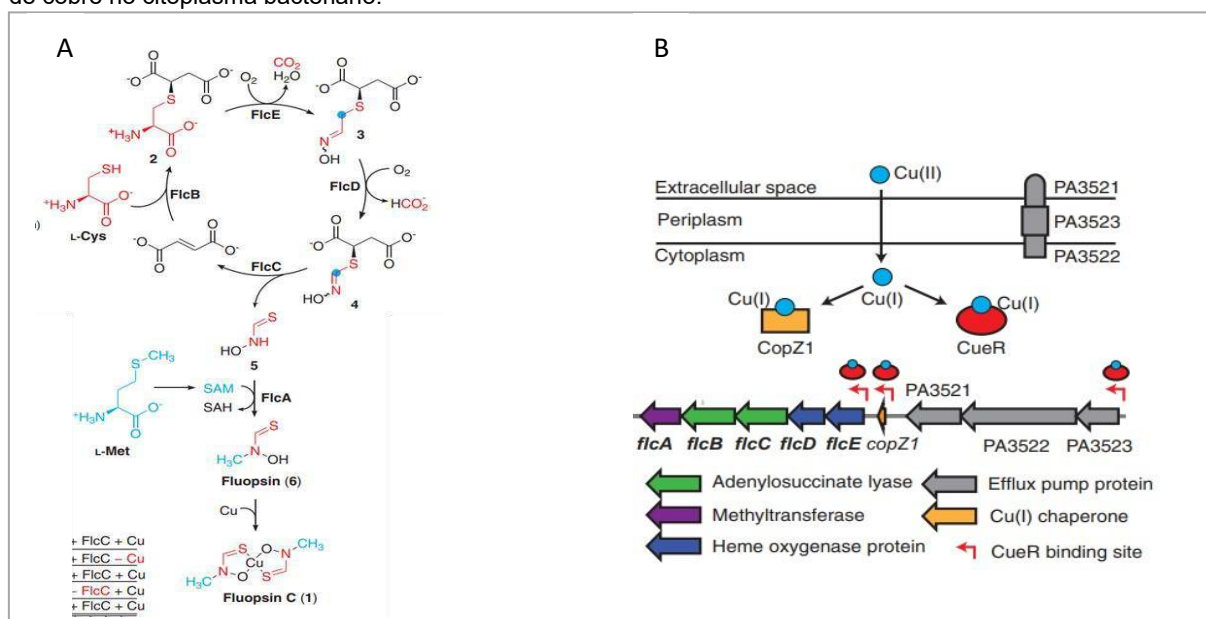
A FlpC utilizada neste trabalho, fornecida pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, chefiado pelo Professor Dr. Galdino de Andrade Filho, foi obtida por meio do metabolismo secundário de *P. aeruginosa* cepa LV. Para a produção de FlpC, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura com cloreto de cobre, conforme descrito na patente PI0803350-1 – INPI, de 12/09/2009, publicada por De Oliveira *et al.* (2016).

Em se tratando da rota de biossíntese, o grupo de pesquisa evidenciou que, na presença de cloreto de cobre, a *P. aeruginosa* utiliza diferentes vias moleculares para eliminar o excesso de cobre do citoplasma. Esse processo ocorre por meio da superexpressão de genes ligados ao sistema de efluxo de íons metálicos, à via de biossíntese da FlpC e a chaperonas de cobre, além da atenuação da expressão de genes relacionados ao sistema de transporte ABC, visando evitar o influxo de cobre (GIONCO *et al.*, 2017).

Em um estudo detalhado sobre a biossíntese (Figura 2a), Patteson *et al.* (2021) cultivaram *P. aeruginosa* cepa PAO1 na presença de sulfeto de cobre. Os autores observaram que o operon PA3515-PA3519 (Figura 2b), que inclui cinco genes (*flcA*, *flcB*, *flcC*, *flcD* e *flcE*), é o conjunto gênico responsável pela produção de FlpC. Cada produto gênico desempenha uma função específica nas etapas que resultam na formação da molécula de FlpC. A enzima FlcB, por exemplo, conjuga L-cisteína (Cys) ao fumarato, enquanto a FlcE catalisa uma descarboxilação oxidativa e N-hidroxilação, seguida pela excisão de metileno pela FlcD. Essas reações produzem uma molécula de tioroxamato com um grupo S-succinil, substrato para a ação de liase da FlcC, que quebra a ligação C-S, liberando tioroxamato e fumarato. O tioroxamato é, então, metilado pela FlcA, formando a fluopsina (tioformina), que, na presença de cobre, produz a FlpC. Vale destacar que a expressão do operon PA3515-PA3519 é regulada pela molécula CueR, que controla os níveis de cobre no citoplasma da bactéria e ativa a expressão do gene CopZ1 (chaperona de cobre), do

operon PA3521-PA3523 (bomba de efluxo) e do próprio operon PA3515-PA3519.

Figura 2 – Via biossintética da fluopsina C (A) Via de biossíntese da Fluopsina C. (B) Regulação da dos níveis de cobre no citoplasma bacteriano.



Disponível em: PATTESON *et al.* (2021).

2.2.3 Estudos Relacionados Com As Atividades Biológicas Da Fluopsina C

Apesar do potencial promissor da FlpC, as informações biológicas disponíveis, especialmente sobre suas interações com células humanas, são escassas. A produção científica reúne apenas 37 artigos publicados entre 1970 e fevereiro de 2025 (Tabela 1), indicando a necessidade de estudos adicionais para aprofundar o conhecimento sobre suas propriedades e potenciais aplicações terapêuticas.

Tabela 1 – Artigos científicos relacionados com a fluopsina C publicados entre 1970 e 2024.

Título do artigo	Ano de publicação	Referência
The structures of fluopsins C and F	1970	Shirahata <i>et al.</i> , 1970
Antibiotic YC 73 of <i>Pseudomonas</i> origin. 1. Production, isolation and properties	1970	Egawa <i>et al.</i> , 1970
New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions)	1970	Itoh; Inuzuka; Suzuki, 1970
Antibiotic YC 73 of <i>Pseudomonas</i> origin. II. Structure and synthesis of thioformin and its cupric complex (YC 73)	1971	Egawa <i>et al.</i> , 1971
Antibiotic YC 73 of <i>Pseudomonas</i> origin. 3. Synthesis of thioformin analogues	1971	Ito <i>et al.</i> , 1971
Syntheses of fluopsins	1971	Shirahata <i>et al.</i> , 1971

An antitumor antibiotic, no. 4601 from <i>Streptomyces</i> , identical with YC 73 of <i>Pseudomonas</i> origin	1972	Miyamura <i>et al.</i> , 1972
Antibiotics from <i>Pseudomonas reptilivora</i> . II. Isolation, purification, and properties	1972	Del Rio <i>et al.</i> , 1972
Further studies on synthesis and antimicrobial activity of thioformin analogues	1974	Miyagishima <i>et al.</i> , 1974
Copper and iron as determinant factors of antibiotic production by <i>Pseudomonas reptilivora</i>	1976	Martinez-Molina; Rio; Olivares, 1976
Antibiotic action of N-methylthioformohydroxamate metal complexes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy	1979	Bell; Friedman; Leong, 1979
Production, isolation and characterization of the antibiotic from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3120	1993	KO <i>et al.</i> , 1993
Use of a Known Substance for the Treatment of Cancer and Bacterial and Fungal Infections. WO 2004050095 A1	2004	Hedman <i>et al.</i> , 2004
Metal ion complexes of thioformin: A density functional study	2007	Kakkar; Dua; Gahlot, 2007
Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the <i>Pseudomonas</i> strain against the <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> 306 strain	2011	De Oliveira <i>et al.</i> , 2011
Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells	2013	Ma <i>et al.</i> , 2013
Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a <i>Pseudomonas</i> strain against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strains	2013	Cardozo <i>et al.</i> , 2013
The control of <i>Lactobacillus</i> sp. by extracellular compound produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil	2013	Góis, <i>et al.</i> , 2013
Evaluation of antibiotic activity produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain against <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>Pruni</i>	2014	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
Bioactive organocopper compound from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inhibits the growth of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	2016	De Oliveira <i>et al.</i> , 2011
Effect of a metalloantibiotic produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> on <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)-producing	2016	Kerbaui <i>et al.</i> , 2016
The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of <i>Botrytis cinerea</i> produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain	2017	Simionato <i>et al.</i> , 2017

New insights about antibiotic production by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : a gene expression analysis	2017	Gionco <i>et al.</i> , 2017
Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain	2017	Munhoz <i>et al.</i> , 2017
Low-molecular-weight metabolites produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> as an alternative to control Huanglongbing in <i>Citrus sinensis</i> cv. Valencia	2018	Pistori <i>et al.</i> , 2018
Fluopsin C for Treating Multidrug-Resistant Infections: <i>In vitro</i> Activity Against Clinically Important Strains and <i>in vivo</i> Efficacy Against Carbapenemase-Producing <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2019	Navarro <i>et al.</i> , 2019
Enhanced production of target bioactive metabolites produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain	2019	Bedoya <i>et al.</i> , 2019
Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field Conditions	2019	Barazetti <i>et al.</i> , 2019
Fluopsin C: a potential candidate against the deadly drug-resistant microbial infections in humans	2020	Sharma, 2020
Determining the Targets of Fluopsin C Action on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria	2020	Navarro <i>et al.</i> , 2020
Biosynthesis of fluopsin C, a copper-containing antibiotic from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2021	Patteson <i>et al.</i> , 2021
Whole-Genome Sequence of Bioactive Compound-Producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain LV	2021	Simionato <i>et al.</i> , 2021
Secondary metabolite from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain exhibits antibacterial activity against <i>Staphylococcus aureus</i>	2022	Bartolomeu-Gonçalves <i>et al.</i> , 2022
Fluopsin C: A Review of the Antimicrobial Activity against Phytopathogens	2022	Afonso <i>et al.</i> , 2022
DNA damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotic cell death of MCF-7 cells treated with fluopsin C	2022	Alves de Lima <i>et al.</i> , 2022
Fluopsin C Promotes Biofilm Removal of XDR <i>Acinetobacter baumannii</i> and Presents an Additive Effect with Polymyxin B on Planktonic Cells	2024	Afonso <i>et al.</i> , 2024
Antifungal effect of a metabolite of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain on azole-resistant <i>Candida albicans</i>	2024	Moreira <i>et al.</i> , 2024

Fonte: o próprio autor (2025)

2.2.4 Atividade Antimicrobiana Da Fluopsina C

De modo geral, a maioria dos artigos analisou os efeitos da FlpC em micro-organismos, incluindo patógenos humanos e fitopatógenos. A FlpC demonstrou atividade contra diversos fitopatógenos, como *Xanthomonas arboricola* pv (VASCONCELLOS *et al.*, 2014), *X. citri* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011), *Botrytis cinerea* (SIMIONATO *et al.*, 2017) e *Candidatus liberibacter asiaticus* (PISTORI *et al.*, 2018). Além disso, mostrou-se eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes a múltiplos medicamentos, destacando seu potencial como uma nova classe de droga para tratar infecções em humanos causadas por microrganismos patogênicos (NAVARRO *et al.*, 2019; PATTESON *et al.*, 2021; BARTOLOMEU-GONÇALVES *et al.*, 2022; AFONSO *et al.*, 2024; MOREIRA *et al.*, 2024). Esses achados são relevantes, especialmente frente à crescente resistência aos antibióticos disponíveis (SHARMA, 2020).

2.2.5 Estudos Pré-Clínicos *In Vitro* E *In Vivo* Com A Fluopsina C

Estudos *in vitro* com células humanas expostas à FlpC incluíram uma variedade de linhagens tumorais e não tumorais, permitindo avaliar seu potencial citotóxico em diferentes contextos celulares. Os valores de IC₅₀, apresentados na Tabela 2, demonstram a eficácia da FlpC, destacando sua ação inibitória em células tumorais e a menor toxicidade em linhagens não tumorais. Miyamura *et al.* (1972) observaram atividade inibitória em células de adenocarcinoma cervical, enquanto Hedman *et al.* (2004), na patente WO2004/050095, relataram IC₅₀ em linhagens de mieloma, linfoma, leucemia, carcinoma pulmonar e adenocarcinoma renal. Ma *et al.* (2013) e Lima *et al.* (2022) também demonstraram a ação inibitória da FlpC em adenocarcinoma mamário. Desse modo, torna-se evidente o potencial da FlpC em atuar sobre diferentes perfis de sensibilidade celular.

Tabela 2 – Trabalhos *in vitro* com células humanas tratadas com fluopsina C

Referência	Linhagem	Câncer	IC ₅₀	Mecanismo de Ação
Miyamura <i>et al.</i> , (1972)	HeLa	Adenocarcinoma cervical	0,79 µM	-
Hedman <i>et al.</i> , (2004)	U-937 GTB	Linfoma	0,05 µM	-
	U-937ucr	Linfoma	0,14 µM	-
	8226/S	Mieloma	0,19 µM	-

	8226 DOX40	Mieloma	0,19 μ M	-
	8226 LR-5	Mieloma	0,21 μ M	-
	ACHN	Adenocarcinoma renal	0,57 μ M	-
	CEM/S	Leucemia	0,26 μ M	-
	CEM/R	Leucemia	0,33 μ M	-
	NCI-H69	Carcinoma pulmonar	0,09 μ M	-
	NCI- H69AR	Carcinoma pulmonar	0,14 μ M	-
	HTERT-RPE1	Não tumoral – retina	123 μ M	-
Ma <i>et al.</i> , (2013)	MCF7	Adenocarcinoma de mama	0,9 μ M	↓ Integridade de membrana Liberação LDH ↑ Espécies Reativas de Oxigênio
	MD-MBA-231	Adenocarcinoma de mama	1,03 μ M	↓ ATP Destruição do citoesqueleto Morte celular
	HL7702	Não tumoral - hepática	2,7 μ M	-
	HMLE	Não tumoral - mama	2,4 μ M	-
Lima <i>et al.</i> , (2022)	MCF7	Adenocarcinoma de mama	1,0 μ M	Parada do ciclo celular (G ₁) Genotoxicidade ↓ Formação de colônias ↓ Potencial Membrana Mitocondrial ↓ Taxa de crescimento esferoide tumoral Morte celular Modula mRNA de genes envolvidos com estresse de retículo, estresse oxidativo, danos ao DNA, ciclo celular e morte celular

Na literatura, apenas dois artigos investigaram as respostas celulares após exposição à FlpC, e apenas um deles explora os mecanismos moleculares por meio da expressão gênica. Ma *et al* (2013) relataram que a FlpC causa perda da integridade de membrana, liberação do conteúdo citoplasmático, aumento de ERO, depleção de ATP, destruição do citoesqueleto e morte celular por oncoses. Alves de Lima *et al.* (2022) observaram que a FlpC induz citotoxicidade de forma dose-dependente, causando parada do ciclo celular na fase G₁, dano ao DNA, diminuição do potencial clonogênico, alteração no potencial de membrana mitocondrial, morte celular e modulação de mRNA de genes envolvidos com estresse de retículo, estresse oxidativo, danos ao DNA, ciclo celular e morte celular. Além disso, em cultura 3D, a FlpC reduziu a taxa de crescimento de esferoides tumorais.

Em estudos *in vivo*, a FlpC tem sido avaliada quanto à sua toxicidade e eficácia antitumoral, apresentando resultados promissores (Tabela 3). Em estudos com ratos, Itoh *et al.* (1970) relataram uma LD₅₀ para a FlpC entre 3 e 9 mg/kg,

enquanto Navarro *et al.* (2019) observaram uma LD₅₀ de 4 mg/kg, hepatotoxicidade moderada, mas ausência de nefrotoxicidade. Além disso, não foi detectada presença de FlpC no sangue dos animais tratados, sugerindo uma rápida metabolização e biotransformação em moléculas quimicamente distintas, embora essa hipótese ainda careça de comprovação (NAVARRO *et al.*, 2019). Em modelos tumorais *in vivo*, Hedman *et al.* (2004) demonstraram que o tratamento com FlpC (1 mg/kg) apresentou efeito antitumoral em ratos Sprague Dawley machos xenotransplantados com células tumorais CCRF-CEM e ACHN.

Embora a FlpC apresente efeitos farmacológicos promissores, sua toxicidade é uma preocupação relevante (MA *et al.*, 2013; NAVARRO *et al.*, 2019). Estratégias nanofarmacológicas, como o uso de lipossomas PEGuilados para carrear bioativos, mostram-se alternativas promissoras para minimizar esses efeitos tóxicos e preservar a eficácia terapêutica, sendo essa a abordagem utilizada nesta tese.

Tabela 3 – Trabalhos pré-clínicos *in vivo* com fluopsina C

Referência	Animal	*Adm	Doses	LD ₅₀	Resposta Biológica
Hedman <i>et al.</i> , 2004	Sprague Dawley macho	IV	Dia 1: 1 mg/Kg Dia 4: 2mg/Kg	-	Atividade antitumoral em células CCRF-CEM xenotransplantadas
Itoh <i>et al.</i> , 1970	Mus musculus	IV	-	3 - 9 mg/Kg	-
Navarro <i>et al.</i> , 2019	Camundongo albino suíço fêmea	IV	única: 1 mg/kg única: 2 mg/kg única: 3 mg/kg Duas doses: 1 mg/kg / 8h Duas doses: 2 mg/kg / 8h	4 mg/Kg	-Hepatotoxicidade moderada - Nefrotoxicidade ausente - Ausência de fluopsina C na circulação

*administração IV = Intravenoso

2.3 LIPOSSOMAS PEGUILADOS COMO NANOCARREADORES DE FÁRMACOS

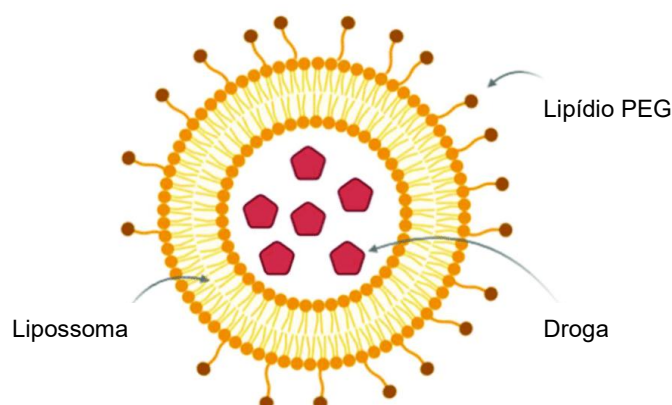
2.3.1 Aspectos Gerais

Doxil®, o primeiro medicamento em lipossoma contendo doxorubicina, foi lançado nos Estados Unidos em 1995 para o tratamento de câncer de ovário e sarcoma de Kaposi associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Logo após, a NeXstar Pharmaceuticals desenvolveu o DaunoXome® como transportador de daunomicina. Desde então, vários produtos baseados em lipossomas foram introduzidos na prática clínica, consolidando os lipossomas como

nanocarreadores promissores na farmacologia, especialmente em terapias oncológicas (LIU; CHEN; ZHANG, 2022).

Os lipossomas PEGuilados (Figura 3) são estruturas formadas por moléculas lipídicas com a adição de polietilenoglicol (PEG), um polímero inerte que aumenta a estabilidade dos lipossomas no organismo (WANG *et al.*, 2023). A eficácia do encapsulamento de fármacos em lipossomas PEGuilados depende de diversos fatores, incluindo a composição e lamelaridade dos fosfolipídios, a rigidez da bicamada lipídica, a proporção entre lipídio e fármaco, a liberação de fármaco *in vitro* e as interações específicas entre o fármaco e os lipossomas (RAMEZANI *et al.*, 2009). Na composição lipídica, podem ser incluídos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e colesterol, que conferem propriedades biofísicas específicas, como carga elétrica, fluidez e capacidade de fusão, essenciais para alcançar os objetivos terapêuticos (LIU, BRAVO, LIU, 2021).

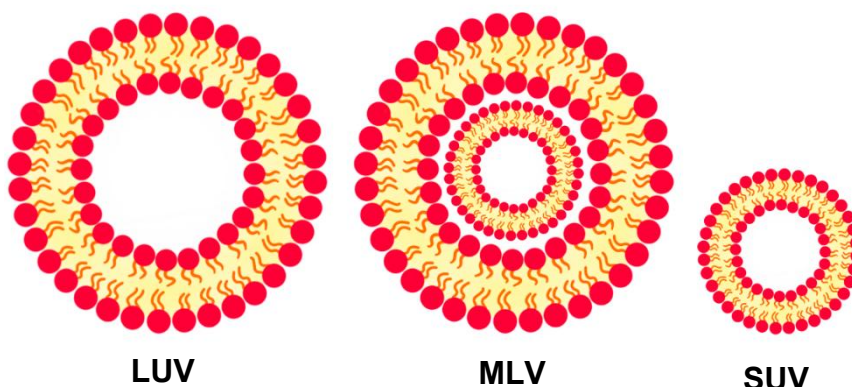
Figura 3 – Estrutura de um lipossoma com polietilenoglicol (PEG).



Fonte em: adaptado de BARROS *et al* (2020).

Os lipossomas podem ser classificados com base em seu tamanho e no número de camadas lipídicas em sua estrutura (Figura 4). Quando possuem apenas uma bicamada lipídica, são denominados de vesículas unilamelares, classificadas em pequena vesícula unilamelar – SUV (*small unilamellar vesicle*, de 25 a 100 nm), vesícula grande unilamelar – LUV (*large unilamellar vesicle*, de 100 a 400 nm) e vesícula gigante unilamelar – GUV (*giant unilamellar vesicle*, > 1 μ m). Em contraste, os lipossomas multilamelares - MLV (*multiple lipid vesicle*) contêm várias bicamadas lipídicas (Gonzalez-Gomez, Hosseinidoust, 2020).

Figura 4 – Classificações de lipossomas em relação ao número de camadas lipídicas e diâmetro (nm). SUV: vesícula pequena unilamelar; LUV: vesícula grande unilamelar; MLV: lipossomas multilamelares.

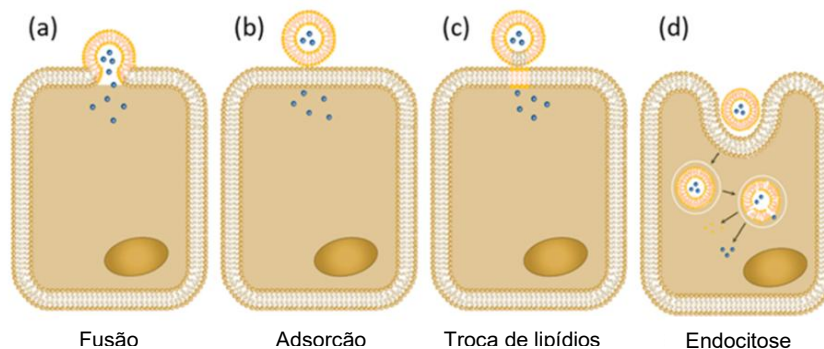


Fonte: De autoria própria.

2.3.2 Biodistribuição E Liberação Do Fármaco Encapsulado

A biodistribuição e liberação de fármacos encapsulados em lipossomas para células eucarióticas podem ocorrer por quatro mecanismos: fusão, adsorção, troca lipídica e endocitose (Figura 5).

Figura 5 – Diferentes modos de liberação de um fármaco encapsulado em lipossoma



Disponível em: adaptado de GONZALEZ-GOMEZ; HOSSEINIDOUST (2020)

Na fusão, o lipossoma entra em contato direto com a membrana plasmática e os lipídios da bicamada lipossomal se fundem com os da célula, permitindo a liberação do fármaco. Na adsorção, ocorre uma atração entre os lipídios do lipossoma e da membrana celular, superando as forças de repulsão e favorecendo a adesão do lipossoma à célula. A troca lipídica envolve a transferência de lipídios entre o lipossoma e a membrana celular, facilitando a entrega do conteúdo. Por último, a endocitose envolve a fagocitose do lipossoma, que é internalizado em endossomos

e degradado por enzimas lisossômicas, liberando o fármaco no interior da célula (GONZALEZ-GOMEZ, HOSSEINIDOUST, 2020).

Em relação à taxa de depuração no plasma, os lipossomas clássicos apresentam uma alta taxa de depuração, sendo rapidamente reconhecidos e eliminados pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (SFM) (DARAEI *et al.*, 2016). Quando administrados por via intravenosa, esses lipossomas interagem com lipoproteínas plasmáticas de alta densidade, o que leva a uma rápida diminuição da concentração do fármaco e seu acúmulo em tecidos não-alvo associados ao SFM, reduzindo a eficácia terapêutica (LI *et al.*, 2019). Em contraste, os lipossomas PEGuilados foram desenvolvidos para superar essas limitações. Com a incorporação de polietilenoglicol (PEG) à bicamada lipídica, esses lipossomas apresentam um perfil mais vantajoso. O PEG cria uma camada higroscópica ao redor do lipossoma, dificultando seu reconhecimento precoce pelos macrófagos e prolongando significativamente seu tempo de meia-vida na circulação (LI *et al.*, 2019). Além disso, os lipossomas PEGuilados são biocompatíveis, biodegradáveis (GONZALEZ-GOMEZ, HOSSEINIDOUST, 2020) e possuem baixa imunogenicidade e antigenicidade, tornando-os mais eficazes para a entrega direcionada de fármacos (BULBAKE *et al.*, 2017).

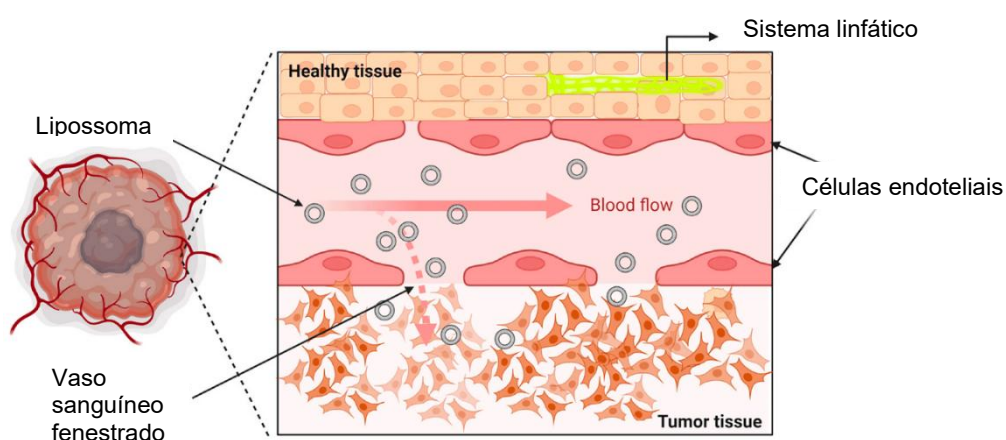
No entanto, a efetividade de lipossomas com PEG também apresenta desafios dependendo da formulação e célula-alvo, como o tempo de liberação do fármaco encapsulado e a interação dos lipossomas com endossomos após a internalização (GHAFERI *et al.*, 2022; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023). Esses aspectos permanecem como áreas de estudo contínuo para otimizar o uso dos lipossomas PEGuilados em terapias direcionadas, maximizando sua especificidade e eficácia.

2.3.3 Estratégias Para Direcionar Lipossomas Peguilados Para O Microambiente Tumoral

Uma vantagem essencial dos lipossomas PEGuilados é o direcionamento passivo para o microambiente tumoral (Figura 6), caracterizado pela permeabilidade capilar aumentada nessas regiões, o que permite o extravasamento dos lipossomas, sua penetração no interstício e posterior retenção nos tumores (HANSEN *et al.*, 2015; KALYANE *et al.*, 2019). Esse fenômeno, conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), ocorre devido à estrutura

desorganizada da vasculatura tumoral e à drenagem linfática deficiente dos tecidos neoplásicos, possibilitando a acumulação dos lipossomas no microambiente tumoral (LI *et al.*, 2019; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023). Esse mecanismo passivo é determinante para a eficácia dos lipossomas na entrega de fármacos em tumores, liberando de forma controlada o conteúdo terapêutico diretamente nas células cancerosas (HANSEN e al., 2015; KALYANE *et al.*, 2019; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023).

Figura 6 – Retenção lipossomal no microambiente tumoral.



Disponível em: adaptado de FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023

2.3.4 Atividade Lipossomal Em Ensaios Pré-Clínicos *In Vitro*

A aplicação de lipossomas como sistemas de entrega de fármacos em estudos *in vitro* com células tumorais humanas tem crescido significativamente. Esse modelo permite aumentar a citotoxicidade de compostos bioativos, requerendo concentrações menores em comparação à forma livre do mesmo composto para atingir efeitos terapêuticos similares (EL-SHAFIE *et al.*, 2020; MARVERTI *et al.*, 2020; GU *et al.*, 2021; NISHA *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2021; ZAWILSKA *et al.*, 2021; GHAFERI *et al.*, 2022). Essa vantagem ocorre devido à capacidade dos lipossomas de promover uma liberação mais direcionada e controlada, o que maximiza a ação do composto nas células-alvo e minimiza efeitos em células não tumorais (FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023). A comparação entre os efeitos do composto na forma livre e na forma encapsulada em lipossomas pode ser observada na Tabela 4, que evidencia o ganho de eficiência terapêutica proporcionado por essa tecnologia de

encapsulamento.

Tabela 4 - Comparação entre os efeitos *in vitro* de compostos na forma livre e na forma encapsulada em lipossomas

	Molécula	Linhagem celular e IC ₅₀					
		A549	U20S	WI-38	HEK293		
El-Shafie <i>et al</i> , (2020)	Nedaplatin - µg/mL	4,04	13,78	3,07	5,23		
	Nedaplatin Lipossomal	1,39	7,50	3,67	6,33		
Gu <i>et al</i> , (2021)		A549	SGC-7901	HepG2	BEL-7402	HeLa	NIH3T3
	Ir1 - µM/mL	33	32,5	28,1	65,7	44,3	37,9
	Ir1 Lipossomal - µM/mL	9,7	5,0	10,2	14,3	24,1	13,3

2.3.5 Características Dos Lipossomas Peguilados

Neste trabalho, foi utilizado lipossoma PEGuilado desenvolvido em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, sob a coordenação do Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, e o Laboratório de Química 5 da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina, chefiado pelo Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça. As características biofísicas dos lipossomas estão descritas na dissertação de Mickely Liuti Dealis (Catálogo CAPES – Código: 10306216).

A formulação lipídica dos lipossomas PEGuilados foi composta por fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) conjugado com polietilenoglicol 2000 (PEG), conferindo carga negativa (potencial zeta de -21,4 mV), diâmetro de 180 nm e eficiência de encapsulamento de 84%. A produção envolveu a formação de um filme lipídico com SPC, colesterol e DSPE-PEG 2000, seguido da adição de uma solução de FlpC (1.000 µM) em DMSO (10%) e tampão fosfato (90%). Após homogeneização e sonicação, foram formadas vesículas multilamelares que, por extrusão, resultaram em lipossomas unilamelares de aproximadamente 180 nm.

2.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DE NOVAS MOLÉCULAS COM POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO

A pesquisa de novos compostos terapêuticos é um processo complexo e multidisciplinar que transforma continuamente a prática médica e científica

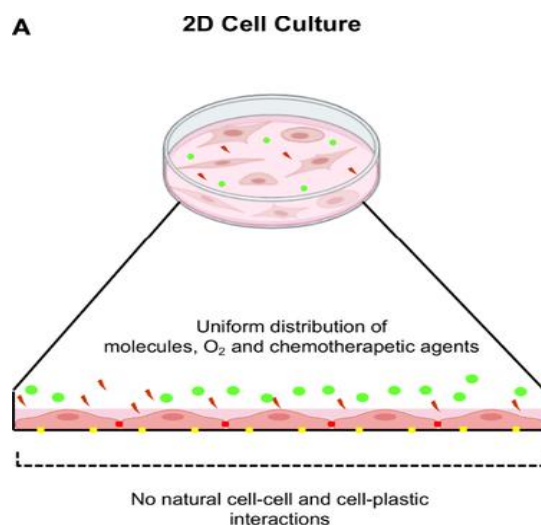
(EDER; HERRLING, 2015). A aprovação de novos fármacos envolve rigorosos testes experimentais que buscam comprovar a eficácia e segurança dessas moléculas para a saúde humana (SILBER, 2010). Os ensaios pré-clínicos constituem uma fase fundamental neste processo, utilizando abordagens metodológicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para verificar a bioatividade e os mecanismos de ação do composto de interesse (HUGHES *et al.*, 2011). Esses testes, apesar de serem avaliações iniciais, fornecem dados essenciais que auxiliam na compreensão das interações biológicas, vias moleculares, segurança e na preparação para os ensaios clínicos subsequentes (SILBER, 2010; NG, 2015).

2.4.1 Experimentação *In Vitro*: Cultura Celular Em Monocamada (2D)

O cultivo celular em monocamada, ou cultura celular 2D, é uma metodologia amplamente utilizada na pesquisa pré-clínica para avaliar os efeitos biológicos de novas moléculas em diferentes tipos de células, especialmente em estudos com células tumorais humanas (KAPAŁCZYŃSKA *et al.*, 2018). Na prática experimental, as células são cultivadas em superfícies aderentes, tendo como fonte de nutrientes meio de cultura sintético, geralmente suplementado com soro bovino fetal (SBF) para fornecer fatores de crescimento (Figura 7). As células em cultura são mantidas em uma atmosfera úmida e controlada, a 37°C e com 5% de CO₂ (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013). Essa abordagem se destaca por sua simplicidade e reprodutibilidade, tornando-a uma ferramenta prática e amplamente acessível para estudos experimentais (HIRSCH; SCHILDKNECHT, 2019).

Apesar de suas vantagens, a metodologia de cultura 2D apresenta limitações significativas devido à simplicidade do modelo biomimético com o *in vivo*. Por se tratar de uma monocamada, ela não consegue reproduzir as complexidades tridimensionais e o microambiente característico dos tecidos *in vivo*, especialmente em tumores sólidos, onde a arquitetura multicelular e o microambiente influenciam a resistência celular a fármacos e as interações entre células (COSTA *et al.*, 2016; JENSEN; TENG, 2020).

Figura 7- Cultura celular em monocamada (2D)



Fonte: SALINAS-VERA *et al* (2022).

2.4.2 Experimentação *In Vitro*: Cultura De Esferoides Tumorais Multicelulares (3D)

Os esferoides tumorais multicelulares (MCTs) são modelos de cultura celular tridimensional que funcionam como uma abordagem metodológica entre a cultura celular em monocamada e modelos de tumores sólidos *in vivo* (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2021; ROY *et al.*, 2023). Diferente da cultura em monocamada, os esferoides tumorais biomimetizam aspectos estruturais e funcionais do microambiente tumoral (ROY *et al.*, 2023). Por exemplo, o microambiente é caracterizado pela interação célula-célula, célula-matriz extracelular e por gradientes bioquímicos de nutrientes, fatores de crescimento e oxigênio (Figura 8), que influenciam diretamente os comportamentos das células tumorais, promovendo heterogeneidade fenotípica e modulando a resposta a tratamentos específicos (JUNTTILA; DE SAUVAGE, 2013; ZANONI *et al.*, 2019; ROY *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023).

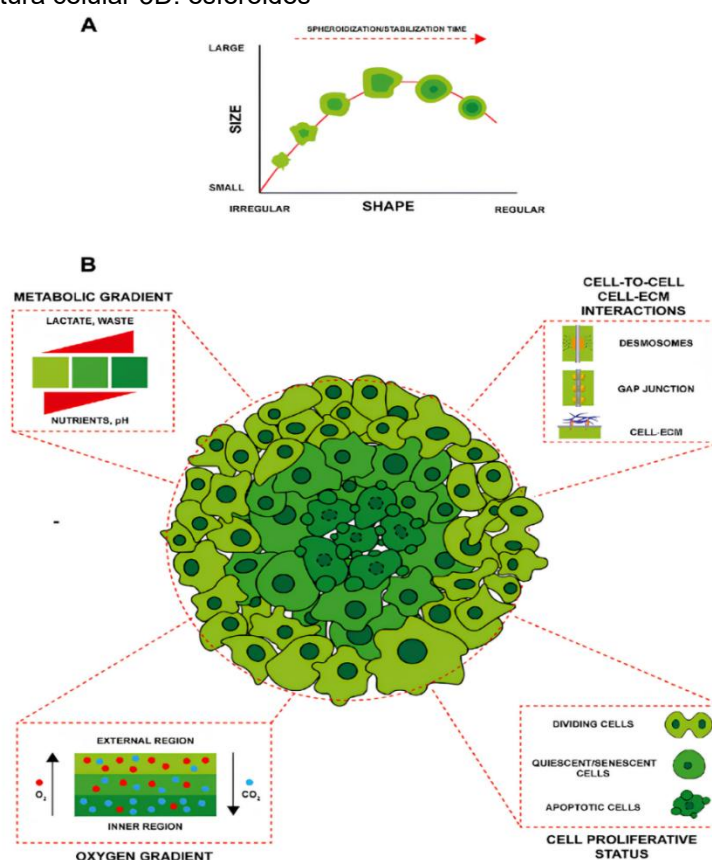
2.4.2.1 Produção e organização estrutural dos esferoides

A produção de esferoides pode ser realizada por meio de diferentes técnicas, sendo a técnica de sobreposição líquida - “Liquid Overlay Technique” uma das mais utilizadas devido à sua simplicidade e eficácia (COSTA *et al.*, 2024). Neste método, as células são semeadas em superfícies não aderentes, geralmente em

placas de cultura revestidas com agarose, que impedem a adesão celular à placa (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Essa superfície não aderente força as células a se agregarem entre si, promovendo a formação de esferoides, em um processo denominado esferoidização (TUNG *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2021).

A esferoidização é possível devido à produção e liberação de proteínas que compõem a matriz extracelular (MEC), além de proteínas que compõem as junções celulares (YEON *et al.*, 2013; Zanoni *et al.*, 2019). Inicialmente, a adesão entre as células é mediada por integrinas e pela MEC, seguida por interações específicas por meio de moléculas de adesão como E-caderina e N-caderina (IVANOV; GRABOWSKA, 2018; HAN *et al.*, 2021) Como consequência, esses mecanismos de adesão sustentam o crescimento compacto dos esferoides, forma uma barreira que dificulta a difusão dos compostos e replica características de tumores avasculares, exibindo zonas celulares e bioquímicas específicas e cinética de crescimento que seguem um padrão semelhante aos tumores sólidos reais (ZANONI *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2024).

Figura 8 - Cultura celular 3D: esferoides



Fonte: Zanoni *et al* (2020).

Devido à agregação celular e compactação nos esferoides, observam-se três camadas celulares com diferenças no comportamento de proliferação e no metabolismo (Figura 8). Por exemplo, a camada externa, em contato direto com o meio de cultura, é composta por células com elevada taxa de divisão celular, devido ao melhor suprimento de nutrientes e oxigênio. A camada intermediária, com exposição intermediária a esses fatores, contém células em estado de quiescência ou senescência, e são metabolicamente ativas. Além disso, a camada interna do esferoide, a menos exposta, é composta por células mortas ou em necrose devido à baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes, além do acúmulo de resíduos metabólicos (ZANONI *et al.*, 2019; METZGER *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2024).

2.4.2.2 Aspectos bioquímicos e fisiológicos dos esferoides

Os esferoides tumorais, além de mimetizar a arquitetura tumoral, também mimetizam o microambiente fisiológico e bioquímico dos tumores sólidos, o que inclui condições de hipóxia, pH ácido e gradientes metabólicos específicos (NUNES *et al.*, 2019; ZANONI *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2024). Em um ambiente tumoral *in vivo*, a baixa concentração de oxigênio (hipóxia) e o aumento da acidez são características fundamentais que afetam a sobrevivência celular e a resposta às terapias anticâncer (JUNTTILA; DE SAUVAGE, 2013; ZANONI *et al.*, 2019; ROY *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023). Nos esferoides, a camada interna reproduz condições de hipóxia e privação de nutrientes, forçando as células sobreviventes a adaptarem seu metabolismo para sobreviver. Nessa região, predominam vias glicolíticas anaeróbicas, que resultam na produção de lactato, contribuindo para a acidificação do ambiente extracelular (TRÉDAN *et al.*, 2007; KOPPENOL *et al.*, 2011; ROY *et al.*, 2021).

Devido à presença de diferentes camadas celulares no esferoide, o mecanismo de ação do fármaco deve ser considerado. Por exemplo, drogas que promovem danos ao DNA e induzem a morte celular por meio da formação de ERO têm dificuldade em atingir células em regiões de hipóxia (TRÉDAN *et al.*, 2007). Além disso, drogas que atuam na proliferação celular não têm efeito nas camadas intermediária e interna devido à baixa taxa de divisão celular (MINCHINTON; TANOCK, 2006; TRÉDAN *et al.*, 2007). Somado a isso, alterações no pH do meio interno podem promover alterações nas propriedades e na absorção do fármaco

(MINCHINTON; TANOCK, 2006; BAGHBAN *et al.*, 2020), induzir a liberação de fatores que aumentam a taxa de proliferação e sobrevivência das células malignas, influenciar na função das proteínas da MEC e modular a expressão de proteínas envolvidas na resistência quimioterápica (BAGHBAN *et al.*, 2020; ROY *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023).

Outros aspectos relevantes em relação a hipoxia é que nos esferoides ela ativa vias de sinalização que estão associadas ao aumento de resistência a drogas e à sobrevivência celular (BAGHBAN *et al.*, 2020; ROY *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023). A presença de fatores moleculares, como o fator induzível por hipóxia (HIF-1 α), desencadeia uma cascata de respostas adaptativas, incluindo a expressão de genes anti-apoptóticos e de proteínas de remodelação da MEC, que promovem a sobrevivência celular e contribuem para a progressão tumoral (DOUBLIER *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2019). Em esferoides, o HIF-1 α é altamente expresso, enquanto nas culturas 2D essa expressão é praticamente ausente (DOUBLIER *et al.*, 2012; ROY *et al.*, 2023).

2.4.2.3 Ferramentas para análises morfológicas

Ferramentas de inteligência artificial, como AnaSP e ReViSP, são fundamentais para a análise de esferoides tumorais, especialmente na avaliação morfológica e quantitativa desse modelo 3D (LEE *et al.*, 2024). O AnaSP é um software de código aberto que utiliza scripts em MATLAB para segmentar e extrair parâmetros morfológicos de imagens bidimensionais, como o diâmetro e a esfericidade (PICCININI *et al.*, 2015a). Enquanto, o ReViSP permite a reconstrução volumétrica 3D dos esferoides, transformando máscaras binárias, obtidas das imagens bidimensionais no AnaSP, em representações tridimensionais (PICCININI *et al.*, 2015b).

A integração de ferramentas como AnaSP e ReViSP representa um avanço na padronização das análises de esferoides, permitindo a quantificação de parâmetros estruturais e facilitando a correlação entre características morfológicas e respostas a tratamentos (PICCININI *et al.*, 2015b; LEE *et al.*, 2024). Essa abordagem automatiza a análise de imagens, reduz a variabilidade nos dados e fortalece o uso dos esferoides como modelos confiáveis na triagem de fármacos antiproliferativos (PICCININI *et al.*, 2015b; LEE *et al.*, 2024).

2.4.2.4 Limitações dos esferoides

Embora os modelos de esferoides sejam eficazes em replicar características dos tumores sólidos, eles apresentam limitações importantes. A falta de similaridade histológica com o tecido tumoral *in vivo* e a instabilidade estrutural e funcional a longo prazo podem limitar a pesquisa e aumentar os custos (GILAZIEVA *et al.*, 2020; ROY *et al.*, 2023). Outro desafio é a variabilidade no formato e tamanho dos esferoides, que compromete a uniformidade e a reprodutibilidade dos resultados, sendo a pré-seleção dos esferoides recomendada para aprimorar a confiabilidade dos dados (MEHTA *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023).

2.4.3 Linhagens de células tumorais humanas

2.4.3.1 Câncer de pulmão: linhagem NCI-H460

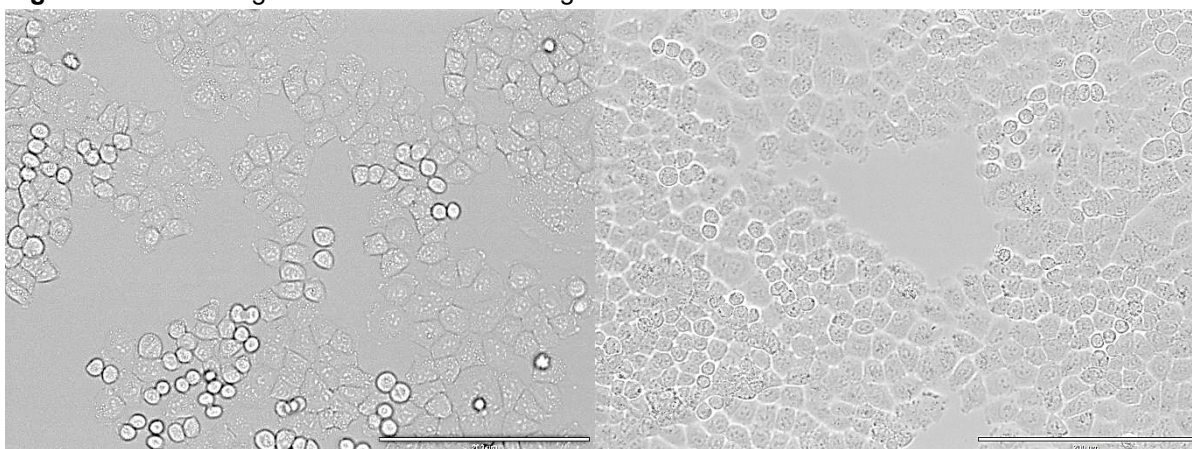
O câncer de pulmão é uma das principais causas de mortalidade por câncer em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente 1,8 milhão de mortes anuais (ASHRAFI *et al.*, 2022). Além disso, é uma doença molecularmente heterogênea, dividida em dois subtipos principais: carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) e carcinoma pulmonar de pequenas células (CPCP). O CPCNP é subdividido em adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas pulmonares e carcinoma de grandes células pulmonares, representando juntos 85% de todos os casos de câncer de pulmão, enquanto os 15% restantes são constituídos pelo CPCP (MARINO *et al.*, 2019; BADE *et al.*, 2020).

Os mecanismos de resistência aos tratamentos no câncer de pulmão representam um dos principais desafios na clínica. Essa resistência pode surgir de mutações genéticas, alterações epigenéticas, efluxo desregulado de drogas, hipóxia tumoral, mudanças no microambiente tumoral e diversas outras alterações celulares e moleculares (BUKOWSKI *et al.*, 2020). Abordar esses desafios pode levar ao aprimoramento das abordagens terapêuticas atuais e ao aumento da sobrevivência dos pacientes (ASHRAFI *et al.*, 2022).

Para investigar esses mecanismos e desenvolver novas estratégias terapêuticas, linhagens celulares humanas são utilizadas *in vitro*. Um exemplo é a linhagem celular NCI-H460 (Figura 9), que foi isolada em 1982 a partir de um fluido

pleural de um paciente do sexo masculino com câncer pulmonar. Esta linhagem é de origem epitelial, subtipo CPCNP, apresenta crescimento aderente e é classificada com nível de biossegurança 1. Em relação ao seu cariótipo, possui um número modal de 57 cromossomos, variando entre 53 e 65, caracterizando-a como uma linhagem humana hipotriplóide. Além disso, as células NCI-H460 expressam mRNA de p53 em níveis comparáveis ao tecido pulmonar normal e não apresentam anormalidades estruturais significativas no DNA (ATCC, 2024).

Figura 9 - Fotomicrografias de células da linhagem NCI-H460



Fonte: Laboratório de Genética Toxicológica da UEL

2.4.3.2 Câncer hepático: linhagem HepG2/C3A

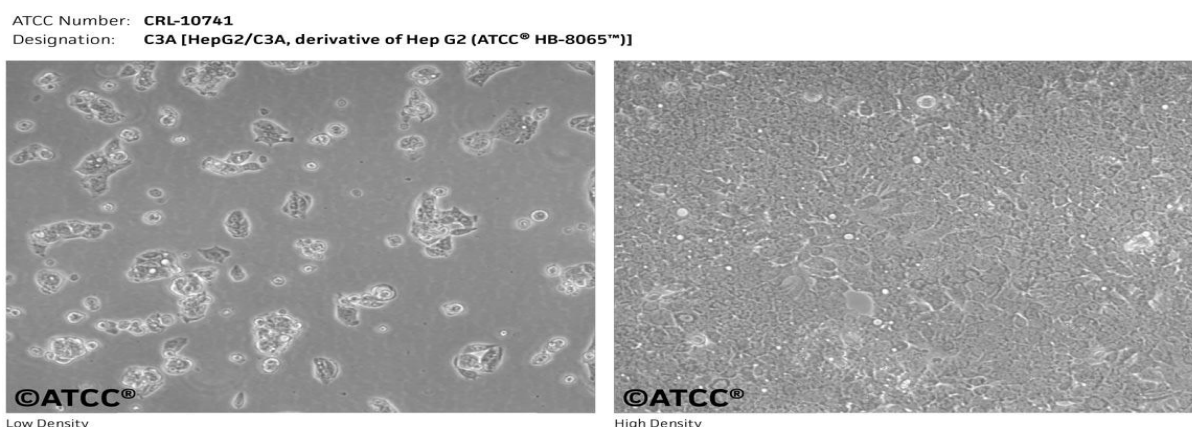
O câncer de fígado é o quinto tipo de câncer mais comum e a quarta principal causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. Os dois principais tipos de câncer primário de fígado são o carcinoma hepatocelular (CHC) e o colangiocarcinoma intra-hepático (CCIH) (CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY; FISHER; SARKAR, 2021). Enquanto o CCIH se origina dos ductos biliares, o CHC surge dos hepatócitos, as principais células parenquimatosas do fígado, representando mais de 80% dos casos de câncer primário de fígado globalmente (CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY; FISHER; SARKAR, 2021).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CHC incluem hábitos como o consumo excessivo de álcool, infecções virais como hepatites B e C, obesidade e exposição a toxinas como aflatoxinas (CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY; FISHER; SARKAR, 2021). A patogênese do CHC é complexa e envolve desregulação do ciclo celular, alterações na metilação do DNA, instabilidade

cromossômica, imunomodulação, transição epitelial-mesenquimal, aumento de células-tronco cancerosas e desregulação de microRNAs (miRNAs) (OGUNWOBI *et al.*, 2019).

Entre as linhagens estudadas de CHC, destaca-se a HepG2/C3A (Figura 10), que foi isolada de um paciente masculino com carcinoma hepatocelular. Essa linhagem é de origem epitelial, apresenta crescimento do tipo aderente e possui nível de biossegurança 1. À medida que as células se tornam confluentes, há uma redução acentuada na secreção de alfafetoproteína e um aumento na secreção de albumina. As células têm atividade de metabolização de nitrogênio comparável à de fígados de rato perfundidos. Além disso, não há evidência da presença de genoma do vírus da hepatite B nessa linhagem celular (ATCC, 2024).

Figura 10 – Fotomicrografia de células da linhagem HepG2/C3A



Fonte: ATCC (2024)

O uso de linhagens de CHC, como a HepG2/C3A, é vantajoso por derivarem de hepatócitos e expressarem enzimas de fase I e II envolvidas na biotransformação de fármacos, o que permite detectar compostos genotóxicos que requerem ativação metabólica (WILKENING; STAHL; BADER, 2003; COLTMAN *et al.*, 2021). As células HepG2/C3A são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade, incluindo ensaios cometa e análises de micronúcleos (COLTMAN *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2022). Para aumentar a relevância fisiológica, os esferoides 3D de HepG2/C3A mostram maior sensibilidade a compostos genotóxicos em comparação com culturas bidimensionais (2D), associada a uma expressão aumentada de genes metabolizadores de fármacos (COLTMAN *et al.*, 2021).

BIBLIOGRAFIA

ACHILLI, Toni-Marie; MEYER, Julia; MORGAN, Jeffrey R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012.

ADHIKARI, Suman *et al.* A review on metal complexes and its anti-cancer activities: Recent updates from *in vivo* studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116211, 2024.

AFONSO, Leandro *et al.* Fluopson C Promotes Biofilm Removal of XDR *Acinetobacter baumannii* and Presents an Additive Effect with Polymyxin B on Planktonic Cells. **Antibiotics**, v. 13, n. 9, p. 875, 2024.

ALVES DE LIMA, Luan Vitor *et al.* DNA damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotoc cell death of MCF-7 cells treated with fluopson C. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 21, p. 896-911, 2022.

American Type Culture Collection. HepG2/C3A. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/crl-3581>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

American Type Culture Collection. NCI-H460. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-177/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

BADE, Brett C.; CRUZ, Charles S. Dela. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in chest medicine**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2020.

BAGHBAN, Roghayyeh *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, p. 1-19, 2020.

BARANOSKI, Adrivanio *et al.* Piperlongumine inhibits antioxidant enzymes, increases ROS levels, induces DNA damage and G2/M cell cycle arrest in breast cell lines. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 87, n. 7, p. 294-309, 2024.

BARAZETTI, André Riedi *et al.* Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field Conditions. **Microbial Probiotics for Agricultural Systems: Advances in Agronomic Use**, p. 193-204, 2019.

BARTOLOMEU-GONÇALVES, Guilherme *et al.* Secondary metabolite from *Pseudomonas aeruginosa* LV strain exhibits antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 67414-67435, 2022.

BEDOYA, J. C. *et al.* Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 17, p. 545-556, 2019.

BELL, Stuart J.; FRIEDMAN, Stanley A.; LEONG, John. Antibiotic action of N-methylthioformohydroxamate metal complexes. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 15, n. 3, p. 384-391, 1979.

BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.

BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

BULBAKE, U. *et al.* Liposomal formulations in clinical use: an updated review. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 12, 2017.

CARDOZO, Viviane F. *et al.* Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2013.

CHEN, Jenny Ling-Yu *et al.* Preclinical evaluation of PEGylated liposomal doxorubicin as an effective radiosensitizer in chemoradiotherapy for lung cancer. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 197, n. 12, p. 1131-1142, 2021.

CHEN, Xin *et al.* Targeting ubiquitin–proteasome system with copper complexes for cancer therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 649151, 2021.

CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY, Saranya; FISHER, Paul B.; SARKAR, Devanand. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. **Advances in cancer research**, v. 149, p. 1-61, 2021.

CHIMIĄK, Andrzej; PRZYCHODZEN, W.; RACHON, J. The thiohydroxamate system. **Heteroatom Chemistry: An International Journal of Main Group Elements**, v. 13, n. 2, p. 169-194, 2002.

COLTMAN, Nicholas J. *et al.* Application of HepG2/C3A liver spheroids as a model system for genotoxicity studies. **Toxicology letters**, v. 345, p. 34-45, 2021.

COSTA, Elisabete C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 8, p. 1427-1441, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>

COSTA, Elisabete C. *et al.* Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 8, p. 1672-1685, 2014.

ĆWIKLIŃSKA-JURKOWSKA, Małgorzata *et al.* Disparities in Cisplatin-Induced Cytotoxicity—A Meta-Analysis of Selected Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5761, 2023.

DA SILVA VASCONCELLOS, Fernanda Corrêa *et al.* Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni. **Agricultural Sciences**, v. 2014, 2014.

DA SILVA, Daniela Almeida *et al.* Copper in tumors and the use of copper-based compounds in cancer treatment. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 226, p. 111634, 2022.

DA SILVA, Matheus Felipe *et al.* Diosgenin increases BBC3 expression in HepG2/C3A cells and alters cell communication in a 3D spheroid model. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 879, p. 503512, 2022.

DA SILVA, Matheus Felipe *et al.* Regulation of cytokinesis and necroptosis pathways by diosgenin inhibits the proliferation of NCI-H460 lung cancer cells. **Life Sciences**, v. 330, p. 122033, 2023.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DARAEI, Hadis *et al.* Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

DE OLIVEIRA SILVA, Nayane *et al.* Cellular and molecular antiproliferative effects in 2D monolayer and 3D-cultivated HT-29 cells treated with zerumbone. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 3, p. 1561-1573, 2024.

DE OLIVEIRA, Admilton Goncalves *et al.* Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 113, 2016.

DE OLIVEIRA, Admilton Goncalves *et al.* Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas strain* against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2011.

DE SOUZA NETO, Lauro Ribeiro *et al.* In silico strategies to support fragment-to-lead optimization in drug discovery. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 93, 2020.

DEL RIO, Luís A. *et al.* Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora* II. Isolation, Purification, and Properties. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 3, p. 189-194, 1972.

DOUBLIER, Sophie *et al.* HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. **BMC cancer**, v. 12, p. 1-15, 2012.

EGAN, William J.; MERZ, Kenneth M.; BALDWIN, John J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867-3877, 2000.

EGAWA, Yoshiyuki *et al.* Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. I. **The Journal of**

antibiotics, v. 23, n. 6, p. 267-270, 1970. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.267>

EL-SHAFIE, Salma *et al.* Encapsulation of nedaplatin in novel pegylated liposomes increases its cytotoxicity and genotoxicity against a549 and u2os human cancer cells. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 863, 2020.

FRIEDRICH, Juergen *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.

FULTON, Melody D.; NAJAH-MISSAOUI, Wided. Liposomes in cancer therapy: how did we start and where are we now. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6615, 2023.

GHAFERI, Mohsen *et al.* Impact of PEGylated liposomal doxorubicin and carboplatin combination on glioblastoma. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2183, 2022.

GHOSE, Arup K.; VISWANADHAN, Vellarkad N.; WENDOLOSKI, John J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55-68, 1999.

GILAZIEVA, Zarema *et al.* Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2727, 2020.

GIONCO, Bárbara *et al.* New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: a gene expression analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 66, 2017.

GÓIS, Cíntia Greice Matsuoca *et al.* The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, n. 03, p. 194, 2013.

GONZALEZ GOMEZ, A.; HOSSEINIDOUST, Zeinab. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 896-908, 2020.

GU, Yiyang *et al.* Studies of anticancer activity *in vivo* and *in vitro* behaviors of liposomes encapsulated iridium (III) complex. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 109-122, 2021.

GUO, Boda *et al.* Cuproptosis induced by ROS responsive nanoparticles with elesclomol and copper combined with α PD-L1 for enhanced cancer immunotherapy. **Advanced Materials**, v. 35, n. 22, p. 2212267, 2023.

HAAS, Kathryn L.; FRANZ, Katherine J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4921-4960, 2009.

HAGER, Sonja *et al.* High copper complex stability and slow reduction kinetics as key parameters for improved activity, paraptosis induction, and impact on drug-resistant

cells of anticancer thiosemicarbazones. **Antioxidants & redox signaling**, v. 33, n. 6, p. 395-414, 2020.

HAN, Se Jik; KWON, Sangwoo; KIM, Kyung Sook. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer cell international**, v. 21, p. 1-19, 2021.

HANSEN, Anders E. *et al.* Positron emission tomography based elucidation of the enhanced permeability and retention effect in dogs with cancer using copper-64 liposomes. **ACS nano**, v. 9, n. 7, p. 6985-6995, 2015.

HEDMAN, R.; Levenfors, J.; Stanislaw, P.; Welch, C.; Daugherty, S. Use of a Known Substance for the Treatment of Cancer and Bacterial and Fungal Infections. WO 2004050095 A1. 2004. Available online: <https://patents.google.com/patent/WO2004050095A1/en> (acessado em fevereiro 2023).

HIRSCH, Cordula; SCHILDKNECHT, Stefan. In vitro research reproducibility: Keeping up high standards. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1484, 2019.

ITOH, Seiga; INUZUKA, KEIICHI; SUZUKI, TAKEO. New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). **The Journal of Antibiotics**, v. 23, n. 11, p. 542-545, 1970.

IVANOV, Delyan P.; GRABOWSKA, Anna M. Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41160, 2017.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.

JOHNSTONE, Timothy C.; SUNTHARALINGAM, Kogularamanan; LIPPARD, Stephen J. Third row transition metals for the treatment of cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2037, p. 20140185, 2015.

JUNTTILA, Melissa R.; DE SAUVAGE, Frederic J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346-354, 2013.

KAKKAR, Rita; DUA, Amita; GAHLOT, Pragma. Metal ion complexes of thioformin: A density functional study. **Polyhedron**, v. 26, n. 18, p. 5301-5308, 2007.

KALYANE, Dnyaneshwar *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252-1276, 2019.

KAPALCZYŃSKA, Marta *et al.* 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science**, v. 14, n. 4, p. 910-919, 2018.

KERBAUY Gilselena, *et al.* Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing. **Current Pharmacology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 389-397, 2016.

KO, Hack-Ryong *et al.* Production, isolation and characterization of the antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa* 3120. **Applied Biological Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 428-433, 1993.

KOMURA, Hiroshi; WATANABE, Reiko; MIZUGUCHI, Kenji. The trends and future prospective of *in silico* models from the viewpoint of ADME evaluation in drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 11, p. 2619, 2023.

KONARIKOVA, K. *et al.* Schiff base Cu (II) complexes as inhibitors of proteasome in human cancer cells. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 120, n. 9, p. 646-649, 2019.

KOPACZ-BEDNARSKA, Anna; KRÓL, Teodora. Cisplatin—Properties and clinical application. **Oncology in Clinical Practice**, v. 18, n. 3, p. 166-176, 2022.

KOPPENOL, Willem H.; BOUNDS, Patricia L.; DANG, Chi V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325-337, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3038>

LEE, Jaehun *et al.* Optimization of Tumor Spheroid Preparation and Morphological Analysis for Drug Evaluation. **BioChip Journal**, v. 18, n. 1, p. 160-169, 2024.

LENIS-ROJAS, Oscar A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* biological activity of ruthenium 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione arene complexes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13594, 2022.

LI, Dong-Dong *et al.* Novel copper complexes that inhibit the proteasome and trigger apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 9, p. 1328-1335, 2019.

LI, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry*, v. 164, p. 640-653, 2019.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* CAS: 528: DC% 2BD3MXitVOhs7o% 3D: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. vol. 46, issue 1-3. **Adv Drug Deliv Rev**, p. 3-26, 2001.

LIU, Di *et al.* Disulfiram/copper complex improves the effectiveness of the WEE1 inhibitor Adavosertib in p53 deficient non-small cell lung cancer via ferroptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1870, n. 8, p. 167455, 2024.

LIU, Jia *et al.* Copper-based metal–organic framework overcomes cancer chemoresistance through systemically disrupting dynamically balanced cellular redox homeostasis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 144, n. 11, p. 4799-4809, 2022.

LIU, Peng; CHEN, Guiliang; ZHANG, Jingchen. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1372, 2022.

LIU, Yibo; BRAVO, Karla M. Castro; LIU, Juewen. Targeted liposomal drug delivery: A nanoscience and biophysical perspective. **Nanoscale Horizons**, v. 6, n. 2, p. 78-94, 2021.

LUCACIU, Roxana Liana *et al.* Metallo-drugs in cancer therapy: Past, present and future. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6485, 2022.

MA, Li-sha *et al.* Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1093-1100, 2013.

MARINO, Federica Zito *et al.* Molecular heterogeneity in lung cancer: from mechanisms of origin to clinical implications. **International journal of medical sciences**, v. 16, n. 7, p. 981, 2019.

MARTINEZ-MOLINA, Eustoquio; RIO, LA DEL; OLIVARES, J. Copper and iron as determinant factors of antibiotic production by *Pseudomonas reptilivora*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 41, n. 1, p. 69-74, 1976.

MARVERTI, Gaetano *et al.* A peptidic thymidylate-synthase inhibitor loaded on pegylated liposomes enhances the antitumour effect of chemotherapy drugs in human ovarian cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 12, p. 4452, 2020.

MEHTA, Geeta *et al.* Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of controlled release**, v. 164, n. 2, p. 192-204, 2012.

METZGER, Wolfgang *et al.* Flow cytometric quantification of apoptotic and proliferating cells applying an improved method for dissociation of spheroids. **Cell Biology International**, v. 45, n. 8, p. 1633-1643, 2021.

MIYAMURA, Sadao *et al.* An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas* origin. **The Journal of antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 369-370, 1972. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.25.369>

MOLINARO, Caroline *et al.* A novel copper (II) indenoisoquinoline complex inhibits topoisomerase I, induces G2 phase arrest, and autophagy in three adenocarcinomas. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 837373, 2022.

MOREIRA, Caroline Lucio *et al.* Antifungal effect of a metabolite of *Pseudomonas aeruginosa* LV strain on azole-resistant *Candida albicans*. **Revista Uningá**, v. 61, p. eUJ4662-eUJ4662, 2024.

MORENO-ALCÁNTAR, Guillermo; PICCHETTI, Pierre; CASINI, Angela. Gold complexes in anticancer therapy: From new design principles to particle-based delivery systems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 62, n. 22, p. e202218000,

2023.

MUEGGE, Ingo; HEALD, Sarah L.; BRITTELLI, David. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.

MUNHOZ, Luana Delgado *et al.* Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1282592, 2017.

MYUNG, Yoochan; DE SÁ, Alex GC; ASCHER, David B. Deep-PK: deep learning for small molecule pharmacokinetic and toxicity prediction. **Nucleic Acids Research**, p. gkae254, 2024.

NAVARRO, Miguel Octavio Pérez *et al.* Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: *in vitro* activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2431, 2019.

NAVARRO, Miguel Octavio Pérez *et al.* Determining the targets of Fluopsin C action on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1076, 2020.

NDAGI, Umar; MHLONGO, Ndumiso; SOLIMAN, Mahmoud E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug design, development and therapy**, p. 599-616, 2017.

NISHA, Raquibun *et al.* Assessments of *in vitro* and *in vivo* antineoplastic potentials of β -sitosterol-loaded PEGylated niosomes against hepatocellular carcinoma. **Journal of Liposome Research**, v. 31, n. 3, p. 304-315, 2020.

NUNES, Ana S. *et al.* 3D tumor spheroids as *in vitro* models to mimic *in vivo* human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2019.

OGUNWOBI, Olorunseun O. *et al.* Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 19, p. 2279, 2019.

PARVEEN, Sabiha *et al.* Enantiomeric copper based anticancer agents promoting sequence-selective cleavage of G-quadruplex telomeric DNA and non-random cleavage of plasmid DNA. **Metallomics**, v. 12, n. 6, p. 988-999, 2020.

PATTESON, Jon B. *et al.* Biosynthesis of fluopsin C, a copper-containing antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. **Science**, v. 374, n. 6570, p. 1005-1009, 2021.

PENG, Xiaolong *et al.* Study on antitumor activity of three ruthenium arene complexes *in vitro*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 247, p. 112310, 2023.

PERIASAMY, Vaiyapuri Subbarayan *et al.* Induction of redox-mediated cell death in ER-positive and ER-negative breast cancer cells by a copper (II)-phenolate complex:

an *in vitro* and *in silico* study. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4504, 2020.

PICCININI, Filippo *et al.* Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 118, n. 2, p. 95-106, 2015.

PICCININI, Filippo. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2015.

PISTORI, Juliana F. *et al.* Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in Citrus sinensis cv. Valencia. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, p. 289-296, 2018.

QI, Jinxu *et al.* Pyridoxal hydrochloride thiosemicarbazones with copper ions inhibit cell division via Topo-I and Topo-II α . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 232, p. 111816, 2022.

RAMEZANI, Mohammad *et al.* The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 1-5, 2009.

ROY, Sayoni Maitra *et al.* 3D multicellular tumor spheroids used for *in vitro* preclinical therapeutic screening. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 86, p. 104636, 2023.

ROY, Sayoni Maitra *et al.* Kinetics of nanomedicine in tumor spheroid as an *in vitro* model system for efficient tumor-targeted drug delivery with insights from mathematical models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 785937, 2021.

SALINAS-VERA, Yarely M. *et al.* Three-dimensional 3D culture models in gynecological and breast cancer research. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 826113, 2022.

SANGEETHA, Somasundaram; MURALI, Mariappan. Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu (quamol) Cl] \cdot H₂O. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 2501-2511, 2018.

SHARMA, Divakar. Fluopsin C: a potential candidate against the deadly drug-resistant microbial infections in humans. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0307>

SIMIONATO, Ane Stéfano *et al.* The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

SIMIONATO, Ane Stéfano *et al.* Whole-Genome Sequence of Bioactive Compound-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain LV. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 1, p. e0112020, 2021.

SOAVE, Claire L. *et al.* Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer treatment: discovering novel inhibitors from nature and drug repurposing. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, p. 717-736, 2017.

SUN, Yi *et al.* HIF-1 α /MDR1 pathway confers chemoresistance to cisplatin in bladder cancer. **Oncology reports**, v. 35, n. 3, p. 1549-1556, 2016.

T. DE BARROS, Cecilia *et al.* Cachexia: pathophysiology and ghrelin liposomes for nose-to-brain delivery. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 5974, 2020.

TRÉDAN, Olivier, *et al.* Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007. DOI: 10.1093/jnci/djm135

TSVETKOV, Peter *et al.* Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. **Science**, v. 375, n. 6586, p. 1254-1261, 2022.

TSVETKOV, Peter *et al.* Mitochondrial metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress. **Nature chemical biology**, v. 15, n. 7, p. 681-689, 2019.

TUNG, Yi-Chung *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **Analyst**, v. 136, n. 3, p. 473-478, 2011.

UMAIR, Muhammad; ALFADHEL, Majid. Genetic disorders associated with metal metabolism. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1598, 2019.

VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WANG, Shile *et al.* Liposomes for tumor targeted therapy: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 2643, 2023.

WANG, Yingqiao *et al.* Copper and Copper Complexes in Tumor Therapy. **ChemMedChem**, v. 19, n. 11, p. e202400060, 2024.

WILKENING, Stefan; STAHL, Frank; BADER, Augustinus. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. **Drug metabolism and disposition**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.

ZANONI, Michele *et al.* Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 3, p. 289-301, 2019.

ZAWILSKA, Patrycja *et al.* Novel pegylated liposomal formulation of docetaxel with 3-n-pentadecylphenol derivative for cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 163, p. 105838, 2021.

ZHANG, Juzheng *et al.* Developing a novel anticancer gold (III) agent to integrate

chemotherapy and immunotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 6777-6791, 2021.

ZHENG, Peijie *et al.* Elesclomol: a copper ionophore targeting mitochondrial metabolism for cancer therapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 271, 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antiproliferativos da Fluopsina C encapsulada em lipossoma PEGuilado em modelos tumorais *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações citotóxicas da FlpC tanto em sua forma livre quanto na formulação nanoencapsulada (FlpC-PEG);
- Comparar a eficácia antitumoral das formulações de FlpC;
- Analisar as alterações na morfologia e no comportamento celular;
- Averiguar o potencial genotóxico da FlpC;
- Investigar como a FlpC afeta a progressão do ciclo celular, identificando possíveis pontos de interrupção desse processo;
- Examinar mudanças na atividade mitocondrial e na produção de corpúsculos lipídicos;
- Observar mudanças na integridade de membrana e nas características morfológicas das células, correlacionando-as com o processo de morte celular;
- Estudar a cinética de crescimento dos esferoides tumorais após tratamento com FlpC.
- Analisar a modulação na expressão de mRNAs de genes relacionados ao estresse celular, ciclo celular, cuproptose, ferroptose, necroptose e metabolismo de xenobióticos.

4 CAPÍTULO 1

Fluopsina C PEGuilada modula vias de cuproptose e ferroptose e reduz o crescimento de esferoide tumoral de células NCI-H460

Luan Vitor Alves de Lima^{*1}, Matheus Felipe da Silva¹, Liana Martins de Oliveira¹, Maria Claudia Terkelli de Assis¹; Isabella Cristina Oliveira Carvalho¹; Isaura Maria Fuzinato¹, Simone Cristine Semprebon¹, Danielle Lazarin Bidóia², Ingrid Felicidade¹, Sandra Regina Lepri¹, Phelipe Oliveira Favaron¹, Mickely Liuti Dealis³, Luis Fernando Cabeça⁴, Galdino Andrade Filho³, Mário Sérgio Mantovani¹

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

³ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

⁴ Laboratório de Química 5, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, Brasil

RESUMO

O carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) representa um desafio terapêutico significativo devido à resistência a apoptose e à baixa seletividade de fármacos convencionais. A Fluopsina C (FlpC), uma metalodroga organocúprica, exibe potente atividade antitumoral, mas sua aplicação é limitada pela toxicidade da forma livre. Neste estudo, propusemos superar essa limitação através do encapsulamento da FlpC em lipossomas PEGuilados (FlpC-PEG) para investigar seu mecanismo de ação. Utilizando culturas 2D e esferoides 3D da linhagem NCI-H460, a eficácia e os mecanismos celulares foram investigados por ensaios de viabilidade, microscopia, citometria de fluxo e RT-qPCR. A nanoformulação FlpC-PEG demonstrou eficácia citotóxica significativamente superior ($IC_{50} = 1,0 \mu M$) à da FlpC livre ($IC_{50} > 2,0 \mu M$), reduzindo o crescimento dos esferoides. A análise por RT-qPCR revelou modulação de RNAm de genes de vias da morte celular, na qual a via apoptótica foi suprimida (redução de *TP53*, *BBC3*; aumento de *TP73*) em favor da co-ativação da cuproptose (alteração de *DLAT*, *ATP7B*, *MTF1* e *CDKN2A*) e da ferroptose, esta última impulsionada pela supressão do eixo antioxidante *SLC7A11-GPX4* e pelo aumento e pelo aumento na expressão de *TFRC*, o gene do receptor de transferrina. Portanto, os achados destacam o potencial da FlpC-PEG como candidata promissora para futuros ensaios pré-clínicos em modelos de oncológicos, contribuindo para o avanço de estratégias nanofarmacológicas baseadas em metalodrogas.

Palavras-chave: Cultura 3D; Produtos Naturais; Metalodroga;

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) representa um dos maiores desafios da oncologia, com taxas de sobrevida limitadas devido à alta resistência terapêutica (CAGAN; MEYER, 2017; ASHRAFI *et al.*, 2022). Um mecanismo central dessa resistência é a evasão da apoptose, frequentemente associada a mutações no gene *TP53*, o que ressalta a urgência no desenvolvimento de estratégias que ativem vias de morte celular alternativas e mais eficazes (VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019). Nesse cenário, os metalofármacos à base de cobre surgem como uma classe promissora, dada a sua capacidade de interagir com múltiplas biomoléculas e induzir estresse celular por vias não convencionais (ZHENG *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023; ADHIKARI *et al.*, 2024).

Dentre esses compostos, a Fluopsina C (FlpC), um complexo cúprico natural (MIYAMURA *et al.*, 1972), demonstrou ter uma atividade antitumoral pleiotrópica, induzindo estresse oxidativo, dano ao DNA e disfunção mitocondrial em modelos pré-clínicos (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). Contudo, o avanço da FlpC é dificultado por sua alta toxicidade na forma livre (MA *et al.*, 2013; NAVARRO *et al.*, 2019). Para superar essa barreira, a nanotecnologia oferece uma solução estratégica. O encapsulamento em lipossomas PEGuilados (FlpC-PEG) visa explorar o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) para melhorar a biodisponibilidade e o direcionamento do fármaco ao tumor, aumentando sua eficácia e segurança (LI *et al.*, 2019; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023).

Apesar do potencial teórico da combinação de um complexo de cobre como a FlpC com um nanocarreador, os mecanismos de morte celular desencadeados por tal sistema em modelos que mimetizam a complexidade tumoral, como os esferoides 3D (NUNES *et al.*, 2019; HAN; KWON; KIM, 2021), permanecem pouco explorados. Especificamente, a possibilidade de co-ativar vias de morte regulada ligadas à homeostase de metais representa uma fronteira terapêutica inovadora. Dentre essas vias, destacam-se a cuproptose, uma via de morte dependente de cobre mediada pela toxicidade de proteínas lipoiladas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (TSVETKOV *et al.*, 2022), e a ferroptose, impulsionada pela peroxidação lipídica dependente de ferro (DIXON *et al.*, 2012).

Neste contexto, a hipótese central deste estudo é que a formulação FlpC-PEG não apenas potencializa a citotoxicidade da FlpC, mas o faz ao explorar

essas vias de morte não canônicas. Para testar essa hipótese, este trabalho teve como objetivos: (1) comparar a eficácia da FlpC livre e da FlpC-PEG em modelos 2D e 3D de CPCNP (NCI-H460); (2) avaliar os impactos na proliferação e no ciclo celular; e (3) elucidar os mecanismos de estresse e morte celular induzidos pela FlpC-PEG, com ênfase na investigação das vias de cuproptose e ferroptose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em dois modelos experimentais de cultura celular: monocamada (2D) e esferoides tumorais multicelulares (3D). A cultura 2D foi inicialmente usada para determinar as concentrações citotóxicas das formulações livre e FlpC-PEGuilada (FlpC-PEG), estabelecendo as concentrações de tratamento para o modelo 3D em $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ e 2×IC₅₀ de FlpC-PEG. A FlpC livre foi empregada em concentração equivalente ao IC₅₀ da formulação PEGuilada, visando comparar a eficiência entre as duas formas. Os experimentos em 3D foram executados com base nas respostas observadas no modelo 2D.

2.1 AGENTES QUÍMICOS E INCORPORAÇÃO DA FLPC EM LIPOSSOMAS PEGUILADOS

A FlpC (C₄H₈CuN₂O₂S₂) foi cedida pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina. O nanoencapsulamento da FlpC em lipossomas PEGuilados foi realizado no Laboratório de Química 5 da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina. Um filme lipídico foi preparado com fosfatidilcolina de soja, colesterol e polietilenoglicol 2000 (PEG) conjugado à diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE), seguido da adição de uma solução de FlpC (1.000 µM) em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão fosfato (90%). Após homogeneização e sonicação, formaram-se vesículas multilamelares que, após extrusão, resultaram em lipossomas unilamelares de aproximadamente 180 nm de diâmetro. As soluções lipossomais foram preparadas em duas versões: (1) lipossoma sem FlpC (controle de veículo) e (2) lipossoma com FlpC. Essas soluções (25 µL) foram liofilizadas e armazenadas a 4 °C. Para os tratamentos, os lipossomas foram ressuspendidos em 200 µL de meio de cultura completo. A caracterização físico-química dos lipossomas foi realizada em outro projeto, disponível na dissertação de Mickely Liuti Dealis (Catálogo CAPES – Código: [10306216](#)). Além disso, a solução estoque de FlpC livre foi preparada em DMSO (FlpC livre: 22.400 µM; DMSO 100%).

Os agentes quimioterápicos doxorubicina (DOX; Pharmacia; CAS: 23214-92-8) e camptotecina (CPT; Sigma–Aldrich, CAT. C9911) foram utilizados como controles positivos nas concentrações de 8 μ M e 10 μ M, respectivamente.

2.2 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

A linhagem celular NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) foi obtida da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com ausência de micoplasma confirmada por RT-qPCR. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² usando Minimum Essential Media (MEM; Gibco®, CAT. 41500-034) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Gibco®, CAT. 12657-029), Anfotericina B (250 μ g/mL – Gibco Lote: 2090190), Penicilina (10.000 U/mL) + Estreptomicina (10.000 μ g/mL, Gibco Lote: 2240838) e piruvato de sódio 1 mM (Gibco Lote: 1271397). As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular, verificada com azul de tripan no contador de células Countess II FL (LifeTechnology®), foi considerada aceitável apenas quando superior a 90% para a realização dos experimentos.

2.3 ESFEROIDES TUMORAIS MULTICELULARES: PRODUÇÃO, ESFEROIDIZAÇÃO, PRÉ-SELEÇÃO E DISSOCIAÇÃO

Para a produção dos esferoides tumorais multicelulares, foi utilizada a técnica de sobreposição líquida. Em placa de 96 poços foi adicionado 50 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%), dissolvida em meio de cultura sem SBF, para obtenção de uma superfície não aderente, de acordo com a metodologia descrita por (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Após solidificação da agarose, 3×10^3 células/poço foram semeadas, em um volume final de 150 μ L de meio de cultura completo, centrifugadas a 2500RPM/2 min e armazenadas em incubadora durante 3 dias (período de esferoidização). Antes de receber os tratamentos, os esferoides com morfologias homogêneas foram pré-selecionados, uma vez que a morfologia homogênea é um parâmetro crítico para avaliar respostas celulares na triagem de novos compostos (MEHTA *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023). Para os ensaios de avaliação de células únicas, os esferoides foram coletados e as células dissociadas. Para isso, o sobrenadante foi descartado, 150 μ L de accutase® (Sigma-Aldrich, Lot: SLBL2929V) foram adicionados, os esferoides foram incubados em Thermo-Shaker (1400 RPM/10 min/37 °C) e homogeneizados com micropipeta, de acordo com a

metodologia descrita por Metzger *et al.* (2021).

2.4 ENSAIOS EM MONOCAMADA:

2.4.1 Ensaio de viabilidade celular com resazurina

A viabilidade celular, após tratamento com FlpC livre e FlpC-PEG, foi avaliada utilizando resazurina, um corante azul de baixa fluorescência que, quando metabolizado por células viáveis, se converte em resorufina, um composto rosa fluorescente. Foram semeadas 10^4 células/poço em placa de 96 poços e, após 24h de estabilização, as células NCI-H460 foram tratadas com FlpC e FlpC-PEG (0,4 – 2 μ M), controle negativo, veículo ou DXR por 24 h. Posteriormente, foram incubadas com 60 μ M de resazurina por 2 h. A fluorescência foi mensurada no espectrofotômetro Glomax® (520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão) para estimar a viabilidade celular relativa:

$$\text{Viabilidade Celular Relativa (\%)} = \frac{(A \text{ tratamento} - A \text{ branco})}{(A \text{ controle negativo} - A \text{ branco})} \times 100$$

*A representa o valor de fluorescência

As concentrações citotóxicas (IC_{12,5}, IC₂₅ e IC₅₀) e a correlação de dose-dependência foram determinadas, respectivamente, por regressão não linear e coeficiente de correlação de Pearson, utilizando o software GraphPad Prism 10.1.2. Os dados de viabilidade celular foram expressos como média \pm desvio padrão, com três repetições biológicas e seis repetições técnicas/tratamento.

2.4.2 Cinética de crescimento celular em tempo real - sistema xCELLigence

A cinética de crescimento celular foi monitorada por meio de impedância elétrica no sistema RTCA xCELLigence (Roche Diagnostic, Alemanha), que registra variações no número de células, mudanças morfológicas e aderência, refletindo o comportamento dinâmico das células em tempo real. O sistema foi operado em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. Conforme as instruções do fabricante, 50 μ L de meio de cultura foram adicionados a uma “E-plate” para estabelecer os valores de fundo. Posteriormente, 10^4 células/poço foram semeadas. Após 24 h de estabilização, as células foram tratadas com FlpC (1,0 μ M), FlpC-PEG (IC_{12,5}, IC₂₅ e IC₅₀), controle ou DOX. A impedância foi registrada a cada 15 min por 24 h. As curvas de crescimento foram normalizadas para o Índice Celular (NCl_{ti}) no momento anterior à adição dos

tratamentos, utilizando o software RTCA.

2.4.3 Monitoramento celular por microscopia de “Time-lapse”

Para avaliar mudanças na morfologia e no comportamento celular devido à exposição a FlpC-PEG, foi utilizada a microscopia de Time-lapse. Para isso, $2,5 \times 10^4$ células/poço foram semeadas em placas de 48 poços e, após estabilização, tratadas com FlpC-PEG IC_{50} ou controle. A placa foi incubada a $37^\circ C$ em uma estação de incubação (EVOS Onstage Incubator) com atmosfera controlada de 5% CO_2 durante 24 h. As imagens foram capturadas em intervalos de 3 min utilizando o filtro de contraste de fase do microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com magnificação de $200\times$.

2.4.4 Observação de Componentes Celulares: Mitocôndrias, Núcleo, Corpúsculos Lipídicos e integridade de membrana celular por Microscopia de Fluorescência

Foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 12 poços e estabilizadas por 24 h em incubadora antes de serem tratadas com FlpC-PEG IC_{50} . Após 24 h de tratamento, realizaram-se três abordagens de marcação: (1) Hoechst 33342 (NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent, Invitrogen, EUA) e Rodamina 123 ($5 \mu g/mL$) para marcação do núcleo e das mitocôndrias metabolicamente ativas, respectivamente; (2) Vermelho do Nilo ($10 \mu g/mL$) para detecção de corpúsculos lipídicos; e (3) Iodeto de Propídio ($50 \mu g/mL$) e Diacetato de Fluoresceína (FDA) para avaliação da integridade de membrana e viabilidade, respectivamente. Após 30 min de incubação com cada conjunto de marcadores, microfotografias de fluorescência foram obtidas utilizando o microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.4.5 Análise de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo

Para determinar se a FlpC livre e a FlpC-PEG induzem morte celular por apoptose ou outro tipo de morte celular não apoptótica, utilizou-se o kit GUAVA NEXIN (Merck/Millipore 4500–0450). Este kit detecta a externalização de fosfatidilserina por meio da anexina V e identifica núcleos de células com membrana plasmática rompida por meio do 7-AAD. Além disso, para analisar o conteúdo de DNA e as fases do ciclo celular (Sub- G_1 , G_1 , S e G_2/M), as células foram permeabilizadas com citrato/triton e o DNA corado com iodeto de propídio ($50 \mu g/mL$).

Em placas de 6 poços, $3,2 \times 10^5$ células/poço foram semeadas e estabilizadas em meio de cultura completo. As células foram então tratadas por 24 h com FlpC livre, FlpC-PEG ($IC_{12,5}$, IC_{25} e IC_{50}), controle ou CPT (10 μ M). Após o tratamento, o meio foi reservado e as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e a tripsina inativada com o meio reservado antes de serem centrifugadas a 1500 RPM/5 min. As células ressuspendidas em PBS e incubadas com as respectivas soluções de coloração foram analisadas no citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore), quantificando a fluorescência de cada marcador em 10.000 eventos por amostra.

2.5 ENSAIOS EM ESFEROIDES TUMORAIS MULTICELULARES:

2.5.1 *Análise da cinética de crescimento do volume esferoidal e recuperação da atividade proliferativa*

Os esferoides foram tratados com FlpC-PEG ($\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , e $2 \times IC_{50}$), FlpC livre, controle ou DOX. Microfotografias foram capturadas em filtro de campo claro no microscópio EVOS™ FL Auto (ThermoFisher Scientific, USA) nos tempos 0, 24, 48, e 72 h pós-tratamento. O perímetro dos esferoides foi delimitado manualmente no software AnaSP para gerar máscaras binárias, que foram processadas no software ReViSP (PICCININI *et al.*, 2015) para calcular o volume esferoidal (mm^3). Após 72 h, os esferoides foram transferidos para placas aderentes de 48 poços com 300 μ L de meio completo sem tratamento para observar a recuperação da proliferação celular por 48 h. O ensaio foi realizado com três repetições biológicas e cinco esferoides por tratamento.

2.5.2 *Microscopia de fluorescência em esferoides*

Após 72 h de tratamento, os esferoides do experimento anterior foram submetidos a duas etapas de coloração. Na primeira, utilizou-se uma solução combinada de Hoechst 33342 e Rodamina 123 (5 μ g/mL). Na segunda etapa, aplicou-se uma combinação de Iodeto de Propídio (50 μ g/mL) e Diacetato de Fluoresceína (FDA). Após 30 min de incubação para cada conjunto de marcações, microfotografias de fluorescência foram capturadas utilizando o microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.5.3 *Avaliação de danos no DNA por meio do ensaio do cometa*

Para investigar se a FlpC-PEG induz danos ao DNA, realizou-se o ensaio do cometa alcalino, eletroforese em gel de célula única (Collins *et al.*, 2008). Após 3 h de tratamento, cinco esferoides/tratamento foram coletados e submetidos a um ciclo de dissociação. As células dissociadas foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. As etapas de preparação celular, preparação de lâminas, eletroforese e coloração foram realizadas de acordo com Alves de Lima *et al.* (2022). Para análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,002 µg/mL) e 100 cometas/tratamento foram avaliados no microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com magnificação de 200×. A classificação dos cometas foi realizada visualmente, atribuindo-se escores de 0 a 4, representando um gradiente de ausência de danos (classe 0) a danos máximos ao DNA (classe 4). O índice de dano no DNA foi calculado pela equação: $\sum_{i=0}^4 (i \times n_i)$, conforme Collins *et al.*, (2004).

2.5.4 Análise de ciclo e morte celular por citometria de fluxo

Os esferoides foram tratados por 24 h com FlpC-PEG $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, 2×IC₅₀, FlpC livre, controle ou CPT. Após o tratamento, um conjunto de cinco esferoides por tratamento foi coletado e dissociado. Seguido da dissociação, as células foram submetidas à marcação para ciclo e morte celular e analisadas conforme descrito no item 2.4.5 para cultura 2D.

2.5.5 Quantificação relativa de mRNA Poli-A por meio de RT – qPCR

Os níveis de mRNA Poli-A foram quantificados por RT-qPCR. Para isso, foram utilizados 20 esferoides/tratamento com FlpC-PEG IC₅₀ ou controle por 12 h, em três repetições biológicas. O RNA total foi extraído usando o MiniKit RNeasy® (Qiagen) conforme instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e razão de absorvância UV (A_{260}/A_{280} nm) no Biodrop µLite, aceitando-se amostras com razão entre 1,9 e 2,0. Após verificação da qualidade, 500 ng/µL de RNA total foram utilizados para síntese de cDNA, conforme descrito por Zanetti *et al.* (2019). O cDNA foi diluído em água ultrapura (1:10) e utilizado nas reações com 5 µL do cDNA diluído, 0,5 µL de cada primer e 5 µL de PowerUP™ SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific; Cat. nº 01197264). Realizou-se 45 ciclos no termociclador CFX96 TOUCH™ (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com o manual do fabricante. A especificidade da amplificação e a presença de dímeros de primers foram verificadas por curva de dissociação,

aumentando a temperatura de 55 °C a 95 °C, a uma taxa de 0,5 °C/s.

Foi avaliada a modulação da expressão de RNAm de genes alvos envolvidos na regulação do ciclo celular (*TP53*, *TP73*, *C-MYC*, *CDKN1A* e *BIRC5*), cuproptose (*FDX1*, *SLC31A1*, *MTF1*, *DLAT*, *LIPT1*, *ATP7B*, *BBC3*, *CDKN2A* e *SOD1*), ferroptose (*GPX4*, *GPX1*, *SLC7A11*, *SLC3A2*, *ACSL4*, *NFE2L2*, *NQO1*, *ATF4*, *TFRC*, *GCLM* e *GSR*), necroptose (*RIPK1*, *RIPK3* e *MLKL*), autofagia (*SQSTM1*, *BECN1* e *MTOR*), estresse de retículo (*ERN1*, *TRAF2* e *HSPA5*) e danos ao DNA (*GADD45A* e *PARP1*). As sequências de primers foram obtidas da Sigma – Aldrich, Invitrogen e Integrated DNA Technologies (Material suplementar).

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados usando o software estatístico Graph Pad Prism 10.1.2. A normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade e a independência dos resíduos foram confirmadas pelos testes de Levene e Durbin-Watson, respectivamente ($p > 0,05$). Os dados paramétricos foram avaliados por Análise de Variância (one-way ANOVA) e o teste post-hoc de Dunnett, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. No ensaio RT-qPCR, os valores de Cq dos genes foram normalizados pela média geométrica dos genes constitutivos *GAPDH* e *ACTB* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). As mudanças na expressão gênica foram calculadas pelo método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ de PFAFFL (2001), e apresentadas como médias \pm desvio padrão de fold-change. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando o log₂ de fold-change de amostras não pareadas apresentaram $p < 0,05$ pelo teste t de Student bicaudal e log₂ de fold-change ≥ 1 ou ≤ -1 . Lipossoma vazio foi utilizado como controle em todos os ensaios.

RESULTADOS

3.1 MONOCAMADA

3.1.1 Citotoxicidade E Cinética De Crescimento Celular Em Monocamada

Após 24 h de tratamento, foram observados efeitos citotóxicos tanto com FlpC livre quanto com FlpC-PEG em células NCI-H460 (Fig. 1A). No entanto, FlpC-PEG demonstrou maior eficiência na redução da viabilidade celular, apresentando citotoxicidade em doses mais baixas comparado à FlpC livre. Os valores de $IC_{12,5}$, IC_{25} e IC_{50} para FlpC-PEG foram 0,75 μ M, 0,88 μ M e 1,0 μ M, respectivamente (Fig. 1B), com resposta dose-dependente e correlação de -0,947 ($R^2 = 0,897$). Para FlpC livre, os valores de $IC_{12,5}$ e IC_{25} foram 1,58 μ M e 1,95 μ M, respectivamente. Notavelmente, a concentração de 2 μ M de FlpC livre reduziu a viabilidade para 74,4%, impossibilitando o cálculo de uma IC_{50} para FlpC livre.

Quanto às alterações de impedância detectadas pelo sistema RTCA de cinética de crescimento celular em tempo real, notou-se que os tratamentos com FlpC-PEG nas concentrações IC_{25} e IC_{50} alteraram significativamente os valores de NCl_{ti} (Índice Celular Normalizado) após 3, 12 e 24 h, em comparação ao controle. Após 3 h, houve um aumento no NCl_{ti} com FlpC-PEG IC_{25} ($1,142 \pm 0,013$) e IC_{50} ($1,192 \pm 0,019$) comparado ao controle ($1,081 \pm 0,023$), indicando alterações celulares rápidas com um perfil de resposta similar a compostos genotóxicos (Fig. 1C). Nos períodos subsequentes de 12 e 24 h, o tratamento com FlpC-PEG IC_{50} resultou em reduções de 38,9% ($t_{12h} = 0,921 \pm 0,131$) e 69,6% ($t_{24h} = 0,542 \pm 0,096$) no NCl_{ti} em comparação ao controle ($t_{12h} = 1,785 \pm 0,08$; $t_{24h} = 1,508 \pm 0,075$). FlpC-PEG $IC_{12,5}$ e FlpC livre (1,0 μ M) não mostraram alterações significativas no NCl_{ti} . Esses achados sugerem uma resposta rápida das células NCI-H460 à exposição a FlpC-PEG, afetando seu comportamento. Assim, esses resultados, corroborados pelo ensaio de resazurina, ressaltam a capacidade da FlpC-PEG de modular a viabilidade das células NCI-H460 de forma mais eficaz do que a formulação de FlpC livre.

3.1.2 FlpC-PEG Promove Alterações No Comportamento E Na Morfologia De Células NCI-H460

Com base nos resultados dos ensaios de viabilidade e RTCA (Fig. 1 A-D), utilizou-se microscopia *Time-lapse* para monitorar alterações comportamentais e morfológicas das células NCI-H460. No controle, as células apresentaram

comportamento normal, incluindo arredondamento transitório para divisão, divisão

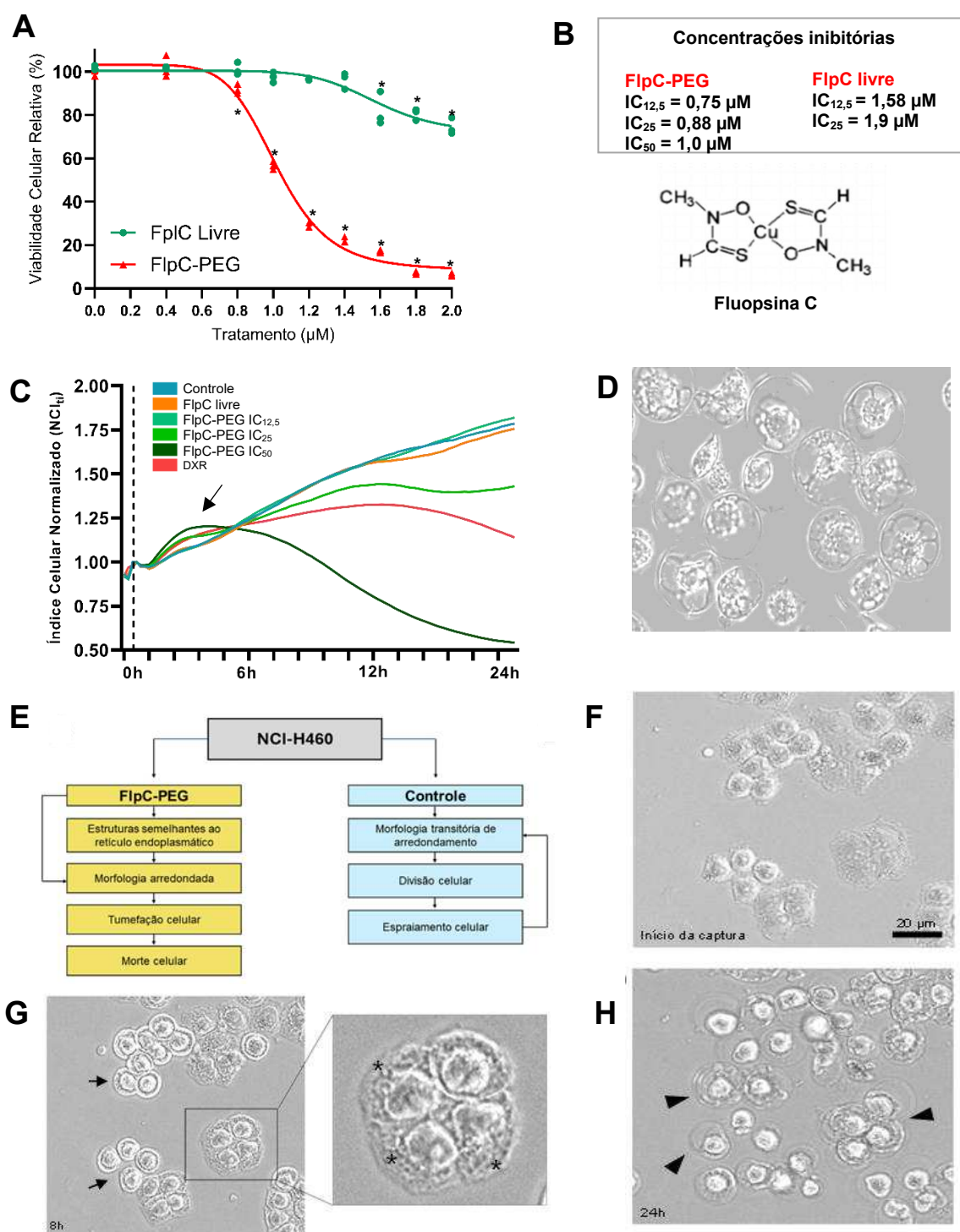


Figura 1. Análise da citotoxicidade, cinética de crescimento e alterações morfológicas em células NCI-H460 tratadas com FpC-PEG. (A) Viabilidade celular após 24 h de tratamento (ensaio de resazurina). (B) Concentrações inibitórias e molécula da fluopsina C. (C) Curva de crescimento celular, com seta indicando padrão genotóxico. (D) Células após 24 h de tratamento com FpC-PEG. (E) Fluxograma dos eventos celulares. (F-H) Alterações morfológicas após tratamento em 0 h (F), 8 h (G) e 24 h (H). Em (G), setas mostram morfologia arredondada e asteriscos, o surgimento de estruturas tipo retículo endoplasmático. Em (H), cabeças de seta indicam tumefação e morte celular. Barras de erro: desvio padrão (n=3). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao controle (ANOVA/Dunnett). Controles: CN (negativo), CV (veículo: lipossoma vazio para FpC-PEG; DMSO 0,006% para FpC livre), CP (doxorubicina 8 µM).

celular, espriamento e aderência pós-divisão e aumento da confluência. No entanto, as células expostas à FlpC-PEG IC₅₀ apresentaram interrupção do ciclo celular e indução de morte celular, como pode ser observado no fluxograma categórico apresentado na Figura 1E. Inicialmente, foram observadas alterações citoplasmáticas e do aparecimento de estruturas tubulares semelhantes ao retículo endoplasmático, perda de adesão e tumefação (aumento do volume citoplasmático), resultando em morte celular (Fig. 1FG). O vídeo pode ser visualizado em: [NCI-H460 controle](#) e [NCI-H460 FlpC-PEG](#).

3.1.3 FlpC-PEG Modifica A Distribuição Mitocondrial, Induz Formação De Corpúsculos Lipídicos E Rompe A Membrana Plasmática Em Células Nci-H460

Devido às alterações observadas anteriormente na morfologia e comportamento celular, a microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar componentes celulares como mitocôndrias, núcleo, corpúsculos lipídicos e integridade da membrana.

O tratamento com FlpC-PEG resultou em mudanças significativas na morfologia, distribuição e quantidade das mitocôndrias marcadas com Rodamina 123. Foi observado uma redução na área ocupada por mitocôndrias no citoplasma e uma reorganização destas em forma globular na região perinuclear (Fig. 2A), em contraste com a forma filamentosa nas células controle (Fig. 2A). Além disso, o núcleo permaneceu íntegro, sem fragmentação ou condensação (Fig. 2A), sugerindo a preservação nuclear durante a morte celular induzida por FlpC-PEG.

Em relação a marcação com vermelho do Nilo para evidenciar corpúsculos lipídicos, o tratamento com FlpC-PEG induziu mudanças intracelulares notáveis em comparação ao controle. Foi observado um aumento dessas estruturas no citoplasma, especificamente nas células que ainda estavam aderidas (Fig. 2B), enquanto em células soltas houve acúmulo de corpúsculos lipídicos ao redor do núcleo. Esses achados indicam alterações metabólicas ou resposta ao estresse, como peroxidação lipídica, devido ao tratamento com FlpC-PEG.

Na avaliação da integridade da membrana usando Iodeto de Propídio (PI) e Diacetato de Fluoresceína (FDA), observou-se que o tratamento com FlpC-PEG reduziu a viabilidade celular e provocou perda da integridade da membrana. As células tratadas exibiram marcação positiva para PI (Fig. 2C), indicando que a morte celular induzida pelo tratamento está relacionada à perda da integridade da membrana.

Esses resultados demonstram a capacidade do FlpC-PEG de causar alterações celulares significativas, culminando na ruptura da membrana.

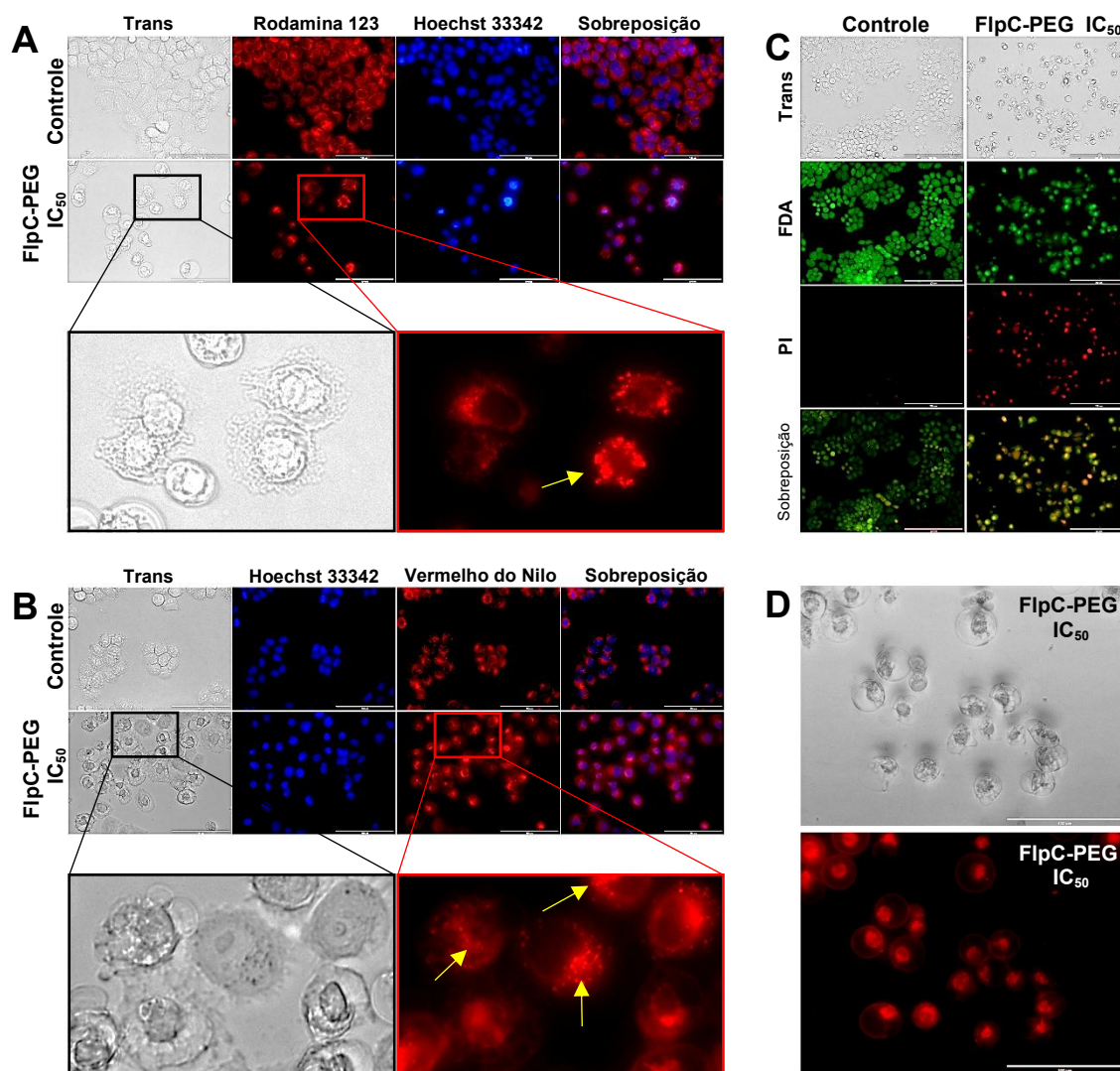


Figura 2 – Marcação de mitocôndrias, núcleo, corpúsculos lipídicos e integridade de membrana celular por microscopia de fluorescência de células NCI-H460 tratadas com FlpC-PEG. (A) Marcação de mitocôndrias metabolicamente ativas; as setas indicam reorganização mitocondrial em forma globular na região perinuclear. Pseudo-cores: *vermelho* = Rodamina 123 - mitocôndrias metabolicamente ativas; *azul* = Hoechst 33342 – núcleo celular; **(B)** Marcação de corpúsculos lipídicos com vermelho do Nilo; as setas indicam a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma. Pseudo-cores: *vermelho* = vermelho do nilo - corpúsculos lipídicos; **(C)** Avaliação da integridade da membrana com FDA e iodeto de propídio; as setas indicam células com rompimento de membrana. Pseudo-cores: *vermelho* = iodeto de propídio (PI) – núcleo de células com membrana rompida; *verde* = Diacetato de Fluoresceína (FDA) – viabilidade celular; **(D)** Morfologia celular durante o processo de morte; escala: 100 µm.

3.1.4 FlpC-PEG Induz Parada De Ciclo E Morte Em Células NCI-H460 Em Monocamada

Em resposta à diminuição da viabilidade do número de células, a citometria de fluxo foi utilizada para quantificar o conteúdo de DNA nas diferentes

fases do ciclo celular e para avaliar a morte celular. Os tratamentos com FlpC-PEG mostraram mudanças significativas no ciclo celular em comparação ao controle, 24 h após o tratamento (Fig. 3A-B). O tratamento com FlpC-PEG IC₅₀ resultou em um aumento significativo de 5,3× em Sub-G₁, aumento de 12,5% em G₁ e uma redução de 59% em S (Fig. 3A). Tratamentos com FlpC livre e FlpC-PEG IC₅₀ afetaram apenas a fase S. Esses resultados indicam que o FlpC-PEG altera a progressão do ciclo celular, especialmente na transição de G₁ para S, reduzindo diretamente a proliferação

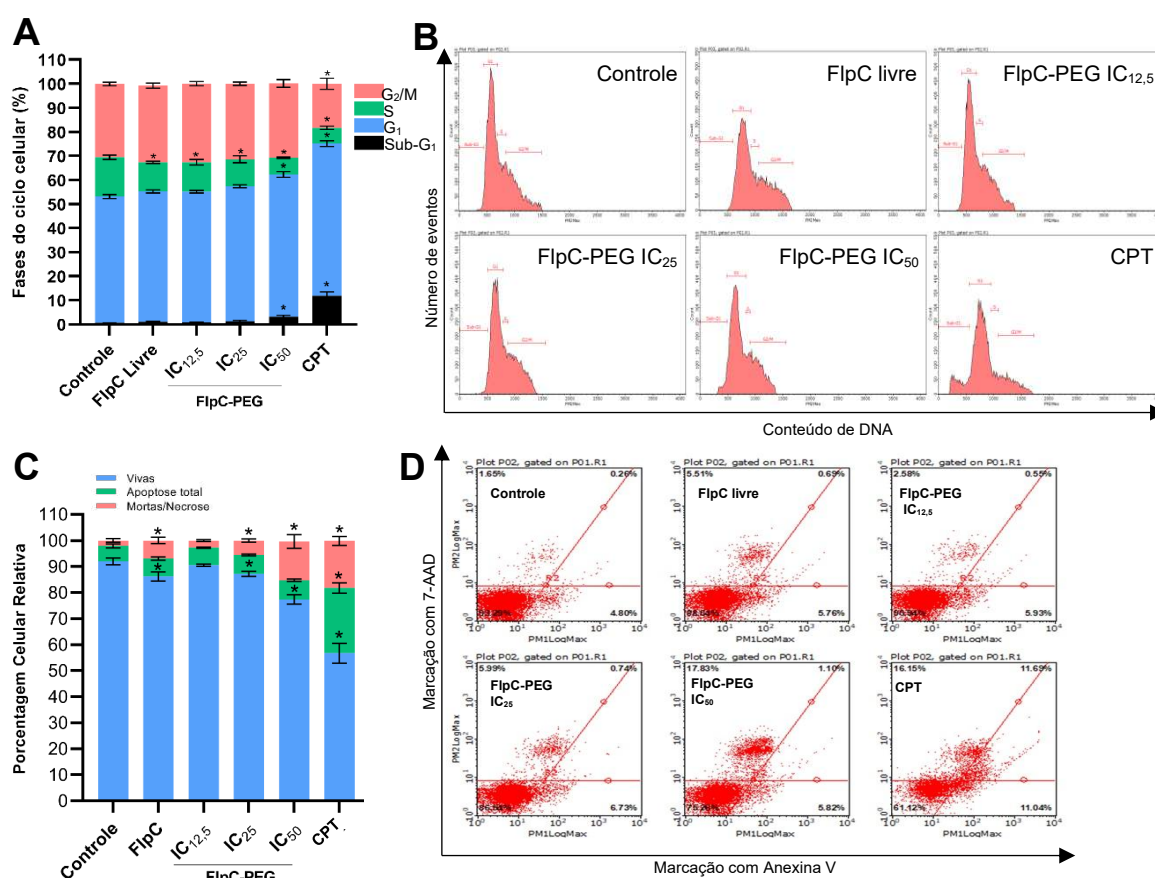


Figura 3 – Análise de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo de células NCI-H460 após 24 h de tratamento com FlpC-PEG. (A) Média percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular. **(B)** Histogramas da distribuição dos conteúdos de DNA obtidos por citometria de fluxo; **(C)** Média percentual de células vivas, apoptóticas e mortas por mecanismos não apoptóticos. **(D)** Gráfico de pontos apresentando a distribuição das células nos quadrantes obtidos no citômetro de fluxo. (*) representa o valor de $p \leq 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett. Valores expressos em média \pm DP; CPT = camptotecina.

celular.

No ensaio de morte celular, os tratamentos com FlpC não resultaram em morte por apoptose, mas promoveram ($p < 0,05$) morte celular por mecanismos não apoptóticos e semelhantes à necrose. Comparativamente, FlpC-PEG IC₂₅ aumentou o número de células mortas em 2,6×, o IC₅₀ em 7× e o FlpC livre em 3,3× (Fig. 3C-D). A morte celular foi caracterizada pela ruptura da membrana, comprovada pela

intercalação de 7-AAD no DNA celular. Esses resultados indicam que o FlpC-PEG induz a morte celular de modo mais efetivo do que sua forma livre.

3.2 CULTURA 3D

3.2.1 FlpC-PEG Reduz A Taxa De Crescimento Dos Esferoides E Diminui A Recuperação Da Atividade Proliferativa

Com base nos resultados dos ensaios em monocamada, adotou-se a metodologia de cultivo 3D com esferoides para melhor mimetizar tumores sólidos *in vitro*. O crescimento dos esferoides foi monitorado em milímetros cúbicos (mm³) após 24, 48 e 72 h, com base no volume inicial (Tabela 1). Esses dados foram então comparados às taxas de crescimento do controle para identificar diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 1 – Volume médio (mm³) e taxa de crescimento (%) de esferoides de células NCI-H460 após o tratamento com FlpC.

Volume médio dos esferoides (mm ³) e taxa de crescimento (%)										
Tratamentos										
	Controle		FlpC livre		FlpC-PEG ½ IC ₅₀		FlpC-PEG IC ₅₀		FlpC-PEG 2×IC ₅₀	
Tempo	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa
0h	0,0779 ± 0,0006	--	0,0785 ± 0,0019	--	0,0788 ± 0,0011	--	0,0786 ± 0,0004	--	0,0764 ± 0,0033	--
24h	0,1026 ± 0,0010	31,7%	0,1008 ± 0,0008	28,3%	0,1013 ± 0,0017	28,6%	0,0990 ± 0,0012	25,9%	0,0864 ± 0,0026	13,2%
48h	0,1369 ± 0,0023	75,7%	0,1324 ± 0,0019	68,6%	0,1302 ± 0,0011	65,2%	0,1294 ± 0,0009	64,5%	0,0993 ± 0,0010	30,0%
72h	0,1804 ± 0,0024	131,6%	0,1701 ± 0,0008	116,6%	0,1693 ± 0,0019	114,8%	0,1655 ± 0,0025	110,4%	0,1207 ± 0,0033	58,1%

A taxa de crescimento dos esferoides foi calculada a partir do volume inicial de cada tratamento.

Nos esferoides controle, observou-se um aumento volumétrico de 31,7% após 24 h, 75,7% após 48 h e 131,6% após 72 h. No tratamento com FlpC livre, os aumentos foram de 28,3%, 68,6% e 116,6%, respectivamente. Com FlpC-PEG a ½ IC₅₀, os aumentos foram de 28,6%, 65,2% e 114,8%. No tratamento com FlpC-PEG IC₅₀, os volumes aumentaram 25,9%, 64,5% e 110,4%. Para FlpC-PEG 2×IC₅₀, os aumentos foram de 13,2%, 30,0% e 58,1%. Esses dados indicam uma modulação no crescimento dos esferoides em resposta aos diferentes tratamentos.

Comparando as taxas de crescimento dos tratamentos com FlpC com as do grupo controle, observaram-se diferenças significativas. Após 24 h, as taxas de crescimento dos tratamentos com FlpC-PEG IC₅₀ e FlpC-PEG 2×IC₅₀ foram significativamente menores (p<0,05) do que no controle, conforme ilustrado na Figura 4A. Após 48 h, os tratamentos com FlpC-PEG ½ IC₅₀, FlpC-PEG IC₅₀ e FlpC-PEG 2×IC₅₀ também apresentaram taxas de crescimento reduzidas em comparação ao

controle ($p < 0,05$). Em 72 h, todos os tratamentos mostraram taxas de crescimento menores ($p < 0,05$) que o controle (Fig. 4A-B).

O tratamento com FlpC-PEG $2 \times IC_{50}$ demonstrou maior efeito em reduzir o crescimento dos esferoides, destacando-se no atraso da progressão volumétrica dos esferoides tumorais. Este resultado evidencia o potencial da FlpC-PEG como um agente antiproliferativo. Além disso, sugere que o FlpC-PEG pode oferecer vantagens significativas sobre a forma livre, que mostrou efeitos significativos apenas após 72 h de tratamento.

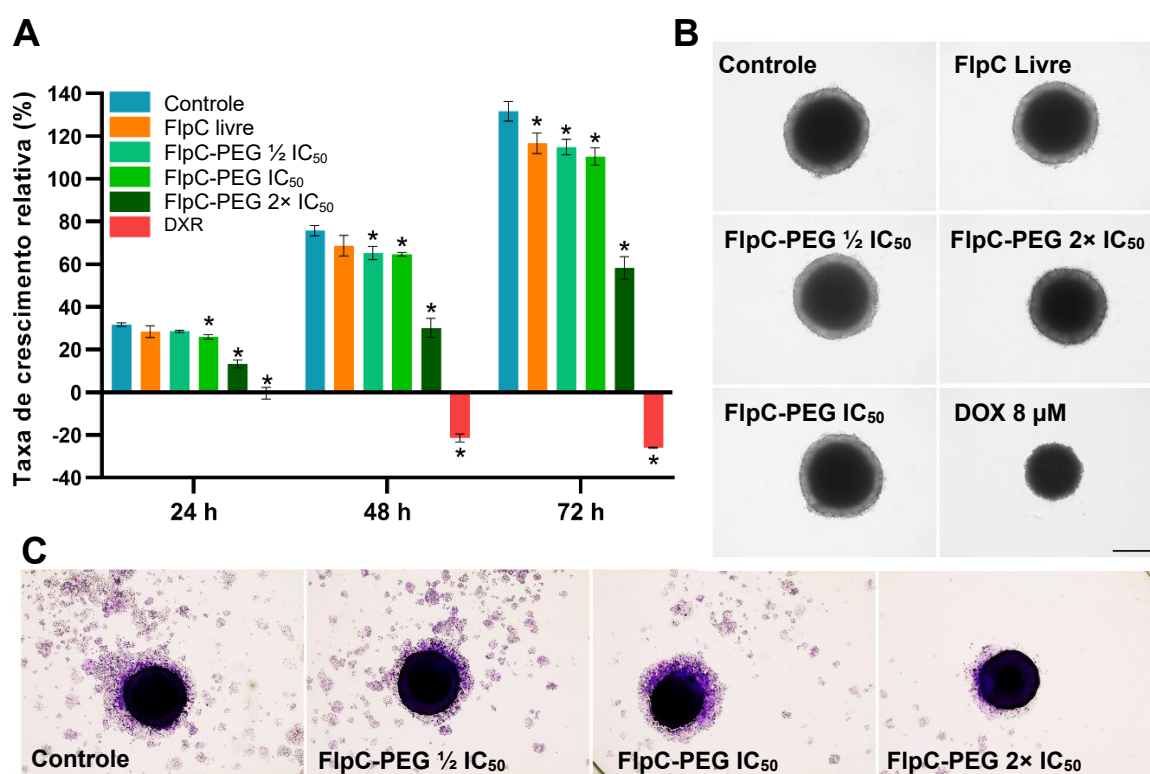


Figura 4 – FlpC-PEG influencia na taxa de crescimento de esferoides de NCI-H460. (A) Taxa de crescimento médio dos esferoides nos tempos 24, 48 e 72 h após tratamento. **(B)** Microfotografias dos esferoides após 72 h de tratamento. Escala: 200 μm ; **(C)** Recultivo dos esferoides em placa aderente por 48 h para avaliar a recuperação da proliferação celular após a remoção dos tratamentos. Esferoides corados com cristal de violeta; (*) representa o valor de $p < 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett. Valores expressos em média \pm DP; $n=5$ esferoides/tratamento/3 repetições; DXR = doxorubicina.

Além dos efeitos sobre a taxa de crescimento, os esferoides foram coletados após 72 h de tratamento e recultivados em meio de cultura completo sem tratamento por mais 48 h para avaliar a recuperação da atividade de proliferação celular. Observou-se que os tratamentos impactaram significativamente a capacidade de recuperação dos esferoides. Por exemplo, os esferoides tratados com FlpC-PEG $2 \times IC_{50}$ apresentaram proliferação celular notavelmente reduzida em comparação ao

controle, que mostrou intensa proliferação ao redor dos esferoides (Fig. 4C). Esse resultado destaca que a influência do FlpC-PEG na capacidade proliferativa das células persiste mesmo após a remoção do tratamento, demonstrando uma vantagem terapêutica na progressão tumoral.

3.2.2 FLPC-PEG ALTERA AS ZONAS CELULARES DE ESFEROIDES TUMORAIS

Após 72 h de tratamento, os esferoides do ensaio de cinética foram analisados por microscopia de fluorescência para avaliar as zonas celulares características de esferoides tumorais, zona de células viáveis (células proliferativas e quiescentes) e zona necrótica (células mortas), como representado na Figura 5A.

Utilizando Hoechst + Rodamina, observou-se que os efeitos citotóxicos são gradativos conforme a dose de FlpC-PEG aumenta. No tratamento com FlpC-PEG $2 \times IC_{50}$, a zona proliferativa foi a mais responsiva, com uma borda celular corada somente com Hoechst, indicando células mortas (negativo para Rodamina), ao contrário do controle, onde houve sobreposição completa entre Hoechst e Rodamina (Fig. 5A).

Na coloração com FDA e PI, foi observado um elevado número de células mortas positivas para PI, demonstrando perda da integridade da membrana. Além disso, houve uma redução no diâmetro da zona necrótica, indicando um impacto significativo do tratamento nas células internas dos esferoides, possivelmente devido à redução do aumento do volume (Fig. 5B).

A coloração com Hoechst+Rodamina revelou que as células na borda dos esferoides, normalmente mais proliferativas, são particularmente suscetíveis ao tratamento, enquanto a coloração com FDA e PI confirmou a eficácia do FlpC-PEG em comprometer a integridade da membrana celular, levando à morte celular, e alterar a dinâmica celular dentro do modelo tumoral.

3.2.3 FLPC-PEG É GENOTÓXICA E MODULA A EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE *GADD45A*

Devido aos resultados observados no RTCA em monocamada, que indicaram um padrão de curva típico de compostos genotóxicos, foi realizado o ensaio do cometa em esferoides para avaliar danos no DNA após 3 h de tratamento com FlpC-PEG, por meio da análise visual (Fig. 6A). A indução de dano ao DNA foi

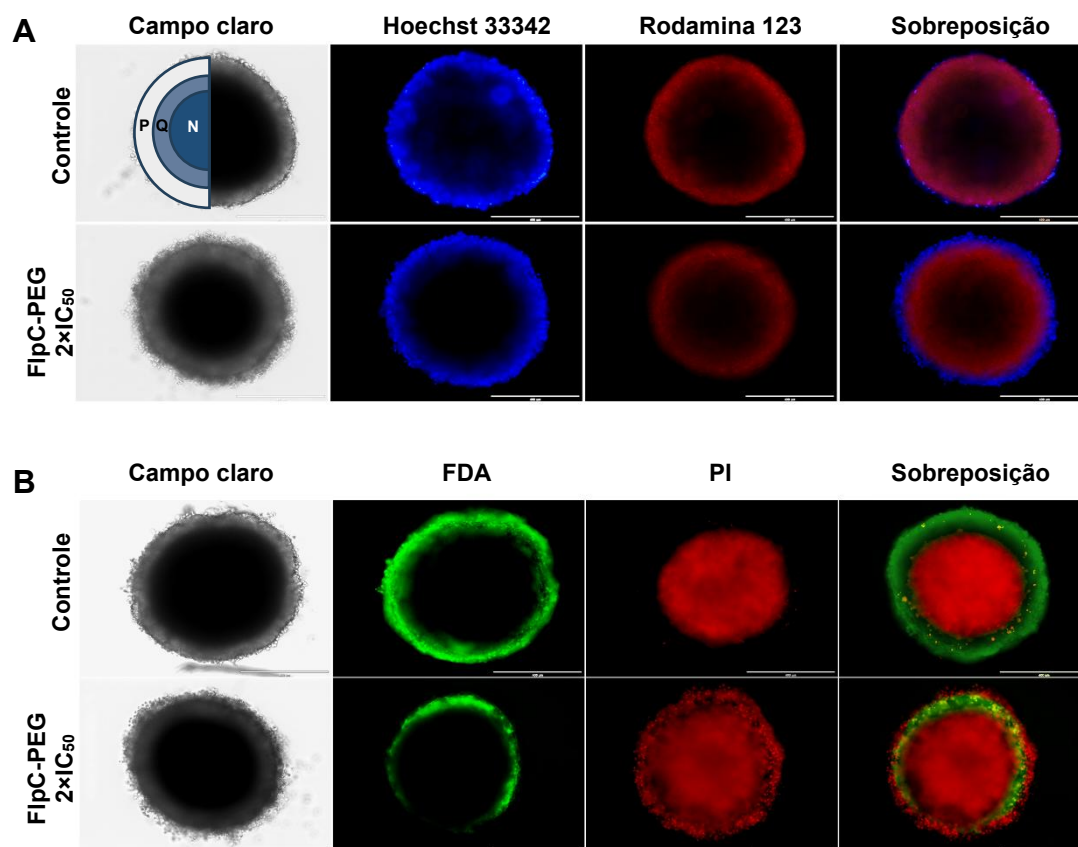


Figura 5 – FIpC-PEG altera as zonas celulares características de esferoides tumorais após 72 h de tratamento com FIpC-PEG. (A) Esferoides corados com Hoescht 33342 (azul - núcleo celular) e Rodamina 123 (vermelho - mitocôndrias metabolicamente ativas). No esferoide controle há uma ilustração indicando as zonas celulares de esferoides tumorais: zona proliferativa (P), zona quiescente (Q) e zona necrótica (N); **(B)** Esferoides corados com diacetato de fluoresceína (FDA; células viáveis) e iodeto de propídio (PI; células com integridade da membrana comprometida); Escala = 400 μ m;

confirmada por índices de dano significativamente maiores ($p < 0,05$) comparados ao controle (índice de dano = 48) em todas as concentrações testadas. Os índices calculados foram 75,7 para FIpC-PEG $\frac{1}{2}$ IC₅₀, 110,7 para FIpC-PEG IC₅₀ e 141,7 para FIpC-PEG 2 \times IC₅₀, conforme mostrado na figura 6B-D. Além disso, observou-se, após 12 h de tratamento com FIpC-PEG IC₅₀, uma regulação positiva do gene *GADD45A* em 2,2 \times (Fig. 6E).

3.2.4 FIpC-PEG Induz Parada De Ciclo Celular E Altera Os Níveis De Mrna De Genes Reguladores Da Divisão Celular: *TP53*, *TP73* E *C-MYC*

O efeito genotóxico da FIpC-PEG, juntamente com a redução na taxa de crescimento dos esferoides e a parada do ciclo celular em monocamada, embasaram a realização do ensaio de ciclo celular nos esferoides. Após 24 h de tratamento, a distribuição dos eventos de ciclo celular para FIpC-PEG 2 \times IC₅₀ diferiu

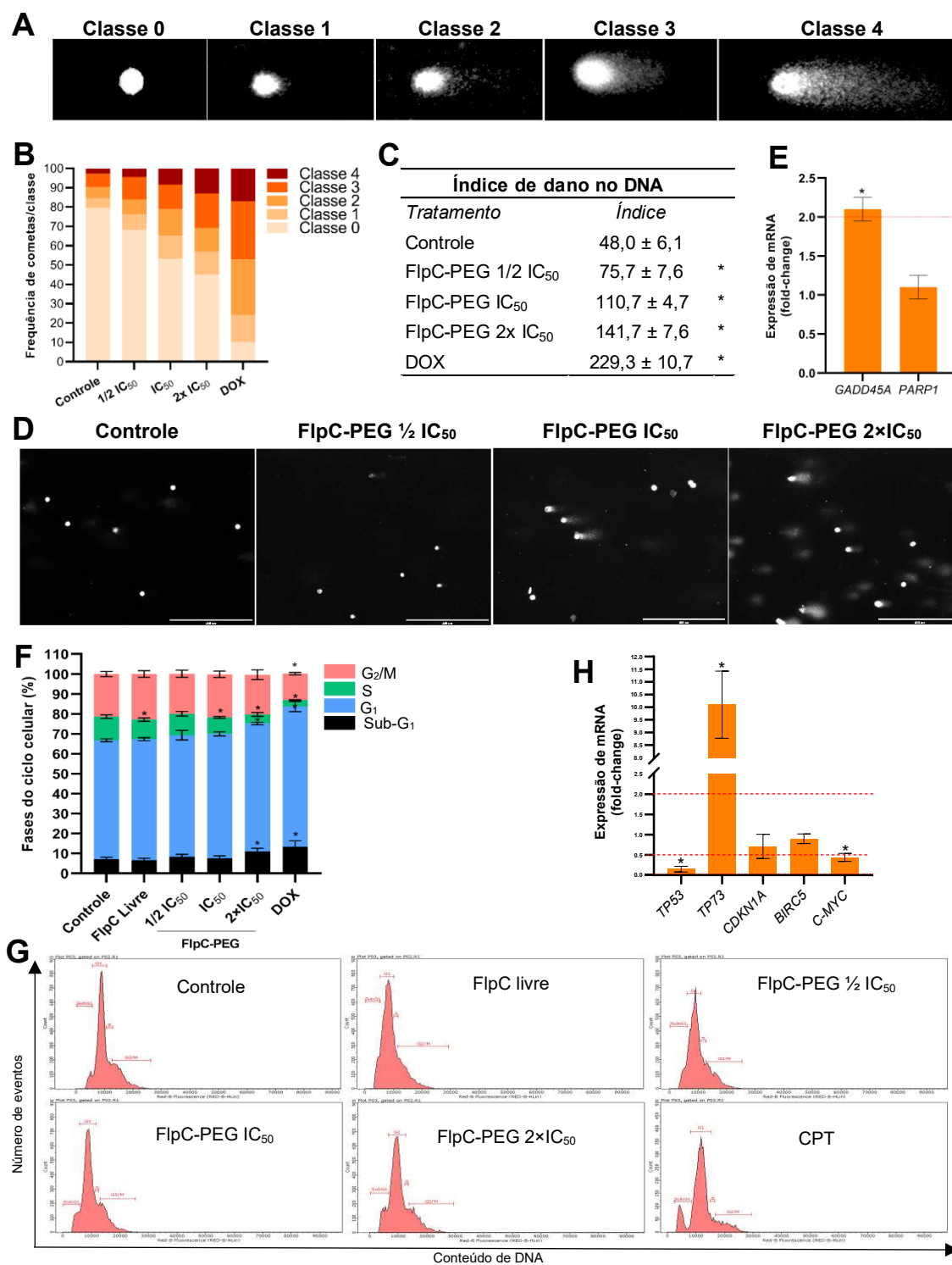


Figura 6. FlpC-PEG induz dano ao DNA e altera o ciclo celular em esferoides de NCI-H460. A figura ilustra: **(A)** a categorização das classes de cometas; **(B)** a frequência das classes observadas por tratamento; **(C)** o índice de dano no DNA, calculado pela fórmula $\sum_{i=0}^4(i \times n_i)$; e **(D)** microfotografias representativas dos cometas. A análise por RT-qPCR, após 12h de tratamento, mostra a expressão de mRNA (em fold-change) de genes relacionados ao **(E)** dano ao DNA e ao **(H)** ciclo celular. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo, após 24h, apresenta **(F)** a média percentual de células nas diferentes fases e **(G)** os histogramas da distribuição do conteúdo de DNA. Todos os valores são expressos como média ± DP de três repetições. O símbolo (*) representa $p < 0,05$ em relação ao controle, determinado por ANOVA seguido de teste de Dunnett para (C) e (F). Para os dados de RT-qPCR (E, H), (†) indica diferenças significativas usando o teste t de Student (\log_2 fold-change) e valores de fold-change ≥ 2 ou ≤ -2 (indicados pelas linhas vermelhas). As análises de cometa e ciclo celular utilizaram 5 esferoides/tratamento, enquanto a RT-qPCR utilizou 20 esferoides/tratamento. CPT: camptotecina.

significativamente do controle. No tratamento com FlpC-PEG $2 \times IC_{50}$, 10,9% dos eventos foram observados em Sub- G_1 , 64,2% em G_1 e 4,5% em S, enquanto no controle essas proporções foram de 7% em Sub- G_1 , 59,7% em G_1 , 11,8% em S (Fig. 6F-G). O tratamento com FlpC-PEG IC_{50} e FlpC livre apresentaram alterações significativa apenas na fase S, com 8,2% e 9,4% dos eventos em S, respectivamente.

Além disso, após 12h de tratamento com FlpC-PEG IC_{50} , observou-se a modulação de genes relacionados ao controle do ciclo celular (Fig. 6H). Especificamente, houve uma regulação negativa dos genes *TP53* (-6,7 \times) e *C-MYC* (-2,3 \times), enquanto o gene *TP73* apresentou uma regulação positiva (10,1 \times).

3.2.5 FlpC-PEG Induz Morte Celular E Modula Genes De Estresse De Retículo, Autofagia, Cuproptose E Ferroptose

Baseando-se nos efeitos citotóxicos da FlpC-PEG observados nos ensaios anteriores, um ensaio de morte celular em esferoides foi realizado por meio de citometria de fluxo após 24 h de tratamento. Similar aos resultados em células cultivadas em monocamada, o tratamento com FlpC-PEG induziu um aumento ($p < 0,05$) de 25% nos eventos de morte celular semelhante à necrose, caracterizado como morte por mecanismos não apoptóticos (FIG. 7 A-B).

Para elucidar os mecanismos moleculares por trás da morte celular induzida por FlpC-PEG, que é distinta da apoptose, foram analisados os níveis de expressão de mRNA de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático, autofagia, cuproptose e ferroptose, visando compreender os eventos moleculares desencadeados em resposta ao estresse celular, ocasionado pela FlpC-PEG, que resulta em morte celular.

Os resultados obtidos na análise de expressão de mRNA de genes associados ao estresse do retículo endoplasmático (Fig. 7C) e à autofagia (Fig. 7D). O tratamento com FlpC-PEG resultou em um aumento (2,2 \times) na expressão do gene *ERN1*, responsável pela codificação de uma proteína que atua como sensor na via de proteínas desdobradas do retículo endoplasmático. Os mRNA dos genes *TRAF2* e *HSP5A* não apresentaram alterações significativas. Além disso, FlpC-PEG modulou os genes de autofagia, reduzindo a expressão de *BECN1* (-3,5 \times) e aumentando o nível de mRNA de *SQTM1* (3,4 \times), enquanto *MTOR* não apresentou diferença significativa.

Além disso, para compreensão dos mecanismos envolvidos no processo

de morte celular, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA de genes-alvo de três vias de morte celular regulada: (1) cuproptose, em razão da presença de cobre no centro da molécula de FlpC e devido às mudanças na atividade mitocondrial, tumefação celular e preservação nuclear; (2) ferroptose, devido à presença de corpúsculos lipídicos evidenciados com vermelho do Nilo; e (3) necroptose, devido à morfologia semelhante à necrose.

Na análise da expressão de genes moduladores da cuproptose (Fig. 7E), houve regulação negativa dos genes *ATP7B* (-2,5×), *CDKN2A* (-2,5×) e *BBC3* (-3,7×) e regulação positiva dos genes *MTF1*(3,1×) e *DLAT* (2,3×). Não foram observadas mudanças significativas nos genes *FDX1*, *SLC31A1/CTR1*, *LIPT1* e *SOD1*. Na avaliação dos genes moduladores da ferroptose (Fig. 7F), observou-se regulação negativa dos genes *SLC7A11* (-3,8×) e *GPX4* (-11,1×) e regulação positiva do gene *TFRC* (2,5×). Os genes *SLC3A2*, *NFE2L2*, *ATF4*, *NQO1*, *ACSL4*, *GCLM*, *GSR* e *GPX1* não apresentaram modulação significativa. Por fim, em relação aos genes de necroptose, observou-se a regulação positiva do gene *RIPK3* (4,9×), enquanto *RIPK1* e *MLKL* não alteraram significativamente.

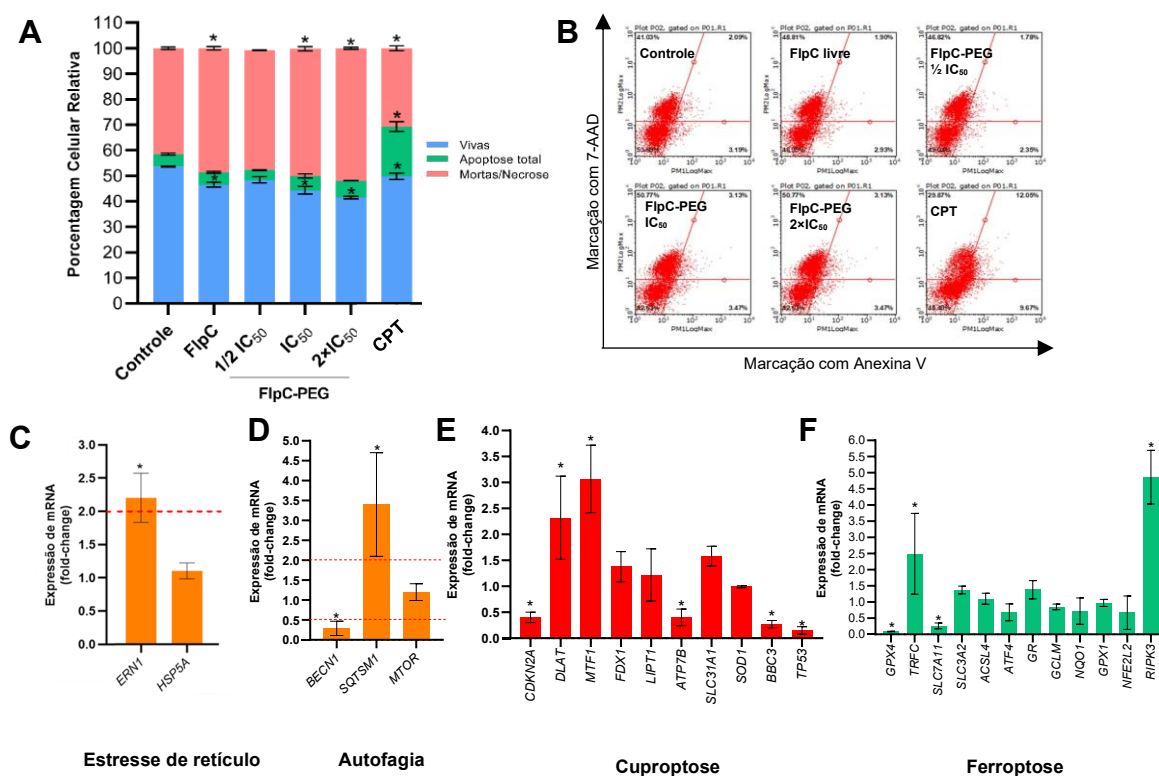


Figura 7 – Análise de morte celular e do mecanismo molecular em esferoides de NCI-H460 tratados com FlpC-PEG. (A) Média percentual de células vivas, apoptóticas e mortas não apoptóticas. **(B)** Gráfico de pontos apresentado a distribuição das células nos quadrantes obtidos no citômetro de fluxo. (*) representa o valor de $p < 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett. Valores expressos em média \pm DP; CPT = camptotecina. **(C)** Análise da expressão de mRNA de genes relacionados com estresse e morte celular, representados em fold-change, por meio de RT-qPCR; (*) indicam diferenças significativas nos valores médios de expressão relativa de mRNA das células tratadas em comparação com os do controle do veículo, conforme determinado usando o teste t de Student (\log_2 fold-change) e valores de fold-change de ≥ 2 ou ≤ -2 (linhas vermelhas nos gráficos); Morte celular – $n = 5$ esferoides/tratamento/3 repetições; RT-qPCR – $n = 20$ esferoides/tratamento/3 repetições;

DISCUSSÃO

Este estudo estabelece que a formulação lipossomal peguilada da fluoposina C (FlpC-PEG) potencializa a eficácia antiproliferativa do composto livre. Nossos dados demonstram que o mecanismo de ação da FlpC-PEG é pleiotrópico, convergindo para a indução de múltiplos mecanismos de estresse que culminam na morte celular por vias não canônicas, notavelmente a cuproptose e a ferroptose em esferoides de NCI-H460.

Embora a FlpC livre exiba alta potência antitumoral [$IC_{50} \leq 1,0 \mu M$ (Ma *et al.*, 2013; Alves de Lima *et al.*, 2022)], sua toxicidade em células não tumorais representa um desafio terapêutico (Ma *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstram que a nanoencapsulação lipossomal supera essa limitação,

com a FlpC-PEG mostrando eficácia superior à da forma livre em células NCI-H460. Este aumento de eficácia é consistente com outras abordagens de encapsulamento para complexos metálicos (GU *et al.*, 2021) e reforça o papel de nanocarreadores na exploração do efeito EPR para otimizar a entrega do fármaco, permitindo a liberação controlada e a potencial redução da toxicidade sistêmica (GHOSH *et al.*, 2021; KALYANE *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; FULTON & NAJAH-MISSAOUI, 2023).

O estresse genotóxico representa um mecanismo de ação primário da FlpC-PEG, desencadeado já nas primeiras horas de exposição. Esta conclusão é suportada por uma dupla evidência: o perfil da curva de impedância, característico de agentes genotóxicos (ABASSI *et al.*, 2009; KE *et al.*, 2011; KHO *et al.*, 2015), e a confirmação direta de danos ao DNA pelo ensaio do cometa em esferoides. A regulação positiva do mRNA do gene *GADD45A* corrobora essa interpretação, sugerindo a ativação de vias de reparo do DNA e checkpoints do ciclo celular (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2021; PALOMER *et al.*, 2024). De forma similar, o tratamento de células MCF-7 com FlpC (1 μ M) também induziu danos ao DNA e modulou a expressão de *GADD45A* (ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). Desse modo, é plausível que o estresse genotóxico decorra da interação direta dos complexos cúpricos com o DNA, causando quebras na fita e danos oxidativos que comprometem a estabilidade genômica (SANGEETHA; MURALI, 2018; PARVEEN *et al.*, 2020).

O estresse celular induzido pela FlpC-PEG se estende ao retículo endoplasmático (RE), um evento suportado por evidências morfológicas e moleculares. Observamos uma reorganização proeminente do RE em células H460, uma alteração associada à citotoxicidade (ZHENG *et al.*, 2018; GARCIA-PARDO; SIMPSON; O'SULLIVAN, 2021) e que pode ser consequência do dano genotóxico ou de perturbações no citoesqueleto, uma vez que FlpC desestabiliza microtúbulos e filamentos de actina (MA *et al.*, 2013). Molecularmente, a regulação positiva de *ERN1*, que codifica o sensor chave da via de resposta a proteínas não enoveladas, IRE1 (HETZ; PAPA, 2018; LE THOMAS *et al.*, 2021), confirma a ativação desta via. Este resultado é consistente com nossos achados anteriores em células MCF-7 (Alves de Lima *et al.*, 2022).

A redução na taxa de crescimento dos esferoides tratados com FlpC-PEG pode decorrer, em parte, do estresse genotóxico, que ativa mecanismos de reparo e provoca alterações no ciclo celular (HERCOG *et al.*, 2020). A análise do conteúdo de DNA confirmou esta hipótese, evidenciando acúmulo de células em G₁ e

aumento em SubG1, tanto em monocamada quanto em esferoides. Estes resultados são consistentes com os observados anteriormente por nosso grupo em células MCF-7 com FlpC livre (ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). A FlpC-PEG, ademais, reduziu a proliferação celular mesmo após a remoção do tratamento, sugerindo um efeito citostático prolongado, comportamento também verificado em esferoides de MCF-7 (ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). A similaridade dos resultados entre os modelos 2D e 3D reforça a eficácia da FlpC-PEG, embora a resposta atenuada em esferoides evidencie a maior resistência associada à organização tridimensional e à barreira à difusão do fármaco (SHAO *et al.*, 2021). A redução da expressão de *C-MYC* reforça a inibição proliferativa, dado o papel central deste proto-oncogene na regulação do crescimento tumoral (CHANVORACHOTE; SRIRATANASAK; NONPANYA, 2020).

Adicionalmente, a análise dos membros da família p53 revelou regulação negativa de *TP53* e aumento de *TP73*, sugerindo um desvio das vias clássicas apoptóticas para mecanismos alternativos de controle celular. Essa compensação, na qual p73 atua como um “hub” na regulação da proliferação e morte celular (DOTSCH *et al.*, 2010), é relevante em CPCNP, onde as mutações em p53 são comuns (DUFFY; SYNNOTT; CROWN, 2017; ZHAO *et al.*, 2022b). De modo similar, em um estudo com células de adenocarcinoma ductal pancreático, o tratamento com um composto organometálico, ferronucleosídeo 1-(S,Rp), induziu aumento de transcritos de *TP73* (RANA *et al.*, 2022).

O tratamento com FlpC-PEG induziu o agrupamento perinuclear de mitocôndrias, uma alteração morfológica indicativa de estresse celular severo e um processo associado à mitofagia (PENDIN; FILADI; PIZZO, 2017; CAO *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2021). Essa observação é consistente com os danos mitocondriais diretos já atribuídos à FlpC, como perda de $\Delta\psi_m$ e depleção de ATP (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022; SHAO *et al.*, 2019). A nível molecular, a redução na expressão de *BECN1* sugere um bloqueio na iniciação da autofagia (LI *et al.*, 2021), enquanto o aumento de *SQSTM1* indica uma tentativa compensatória de degradação seletiva (SÁNCHEZ-MARTÍN; SAITO; KOMATSU, 2019; GUO *et al.*, 2021). Consequentemente, essa aparente falha na mitofagia resulta no acúmulo de organelas disfuncionais, o que agrava a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2021).

A culminação desse colapso mitocondrial é a indução de uma morte celular com características necróticas, como tumefação e perda de integridade de

membrana (BERGHE *et al.*, 2010), confirmada pelo aumento de células 7-AAD positivas em citometria de fluxo e pela visualização de membranas rompidas em esferoides. Este fenótipo não é acompanhado por marcadores de apoptose, o que reforça o viés de morte celular não-apoptótica e independente de caspases da FlpC, já demonstrado anteriormente (MA *et al.*, 2013; ALVES DE LIMA *et al.*, 2022). A regulação negativa do efector pró-apoptótico *BBC3* (PUMA) corrobora, a nível de RNAm, o desvio das vias apoptóticas tradicionais em resposta ao tratamento (ZHENG *et al.*, 2021).

Os dados apresentados sugerem que a resposta celular induzida pela FlpC-PEG é um processo ativo, orquestrado pela ativação simultânea de ao menos duas vias de morte regulada não-apoptóticas, cuproptose e ferroptose. O íon de cobre, componente intrínseco da FlpC, pode atuar como o gatilho central, capaz de promover disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (DIXON *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2023; TSVETKOV *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2023). Essa perturbação se manifesta em fenótipos distintos, como as alterações na morfologia mitocondrial, dano ao retículo endoplasmático e o estresse proteotóxico da cuproptose (LIU; CHEN, 2024; CONG *et al.*, 2025), e a peroxidação lipídica descontrolada que caracteriza a ferroptose (WANG *et al.*, 2020).

Nossos achados indicam que a FlpC-PEG modula a via da cuproptose, um mecanismo de morte dependente do acúmulo de cobre e da sua interação com proteínas lipoiladas do ciclo do TCA (GAO *et al.*, 2023; TSVETKOV *et al.*, 2022). O tratamento desregulou a homeostase do metal, com a redução na expressão de *ATP7B* sugerindo menor efluxo de cobre e consequente toxicidade (GUTTMANN *et al.*, 2020; TSVETKOV *et al.*, 2022; YAN *et al.*, 2023), enquanto o aumento de *MTF1* reflete uma resposta de estresse que, em excesso, pode ser pró-morte (MAO *et al.*, 2023; SONG *et al.*, 2023; ZHAO *et al.*, 2022a). Além disso, observamos um aumento na expressão de *DLAT*, componente do complexo piruvato desidrogenase (CASTEEL; MIERNYK; THELEN, 2011; TSVETKOV *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2022a), cuja lipoilação prejudicada pelo cobre leva ao estresse proteotóxico (NI *et al.*, 2019; TSVETKOV *et al.*, 2022). A relevância desse mecanismo é amplificada no contexto do câncer de pulmão, com sua atividade exacerbada do TCA (KIKUCHI *et al.*, 2020), e pode ser potencializada pela modulação de *TP53/BBC3* e *CDKN2A*, que favorecem o desequilíbrio metabólico e sensibilizam as células à via (AGARWAL *et al.*, 2013; BIAN *et al.*, 2014; TSVETKOV *et al.*, 2022; XIONG *et al.*, 2023; ZHENG *et al.*, 2021;

XIE *et al.*, 2023).

Paralelamente, a FlpC-PEG induz a ferroptose ao modular o eixo de defesa antioxidante sistema Xc^- -GSH-GPX4 (DIXON *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstram redução significativa de *GPX4*, principal inibidor da peroxidação lipídica (AKIYAMA *et al.*, 2021; DIXON *et al.*, 2012; MATHEW *et al.*, 2024), e de *SLC7A11*, transportador de cistina essencial para a síntese de GSH (MATHEW *et al.*, 2024; POLEWSKI *et al.*, 2017). O colapso dessa via é corroborado pelo acúmulo de corpúsculos lipídicos, nos quais os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) armazenados servem como substrato para a peroxidação lipídica descontrolada (DIXON *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2019; DANIELLI *et al.*, 2023). Adicionalmente, o aumento de *TFRC* indica maior captação de ferro (QIN *et al.*, 2024), o que, sabidamente, intensifica a sensibilidade à ferroptose (GENG *et al.*, 2018; JI *et al.*, 2024; ZHU *et al.*, 2021). Esse efeito se assemelha à ação de outros complexos metálicos, como o Cu-1, que em células tumorais aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e depleta o GSH, intensificando a peroxidação lipídica e induz ferroptose (HUANG *et al.*, 2024)

A interação entre as duas vias de morte parece potencializar a citotoxicidade. O próprio cobre pode acelerar a ferroptose ao interagir diretamente com a enzima *GPX4* (XUE *et al.*, 2023). A depleção de GSH, por sua vez, é um ponto de convergência crítico, pois afeta tanto a resistência à ferroptose quanto a homeostase do cobre na cuproptose (BADGLEY *et al.*, 2020; TSVETKOV *et al.*, 2022). Nossos dados também sugerem a ativação de uma via não-canônica de ferroptose, evidenciada pela regulação de *RIPK3* sem alterações em *RIPK1/MLKL*. Isso aponta para uma possível inibição de *FSP1*, um supressor da ferroptose (DOLL *et al.*, 2019), via fosforilação por *RIP3*, intensificando a morte por um mecanismo independente de *GPX4* (LAI *et al.*, 2024).

Dessa forma, a FlpC emerge como uma molécula capaz de modular múltiplos genes da cuproptose e da ferroptose, juntando-se a uma classe de moléculas ionóforas de cobre com atividade antitumoral demonstrada, como elesclomol-Cu(II), disulfiram, clioquinol-Cu, metalochaperona de zinco e piritiona (GUTHRIE *et al.*, 2020; SKROTT *et al.*, 2017; KATSUYAMA *et al.*, 2021; ZAMAN *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

Este estudo estabelece a nanoencapsulação lipossomal PEGuilada como uma estratégia eficaz para potencializar a atividade antitumoral da FlpC em modelos de CPCNP. Verificou-se que a FlpC-PEG promove múltiplos estresses celulares, incluindo danos ao DNA e comprometimento mitocondrial, cuja interação contribui para a ruptura da homeostase celular e ativação de vias de morte regulada. O ponto central deste trabalho é a elucidação de que este colapso, ao contornar as vias apoptóticas clássicas, culmina na indução de duas formas de morte celular regulada dependentes de metais: a cuproptose e a ferroptose. Ressalta-se que a combinação dos modelos 2D e 3D ampliou a compreensão da resposta celular, evidenciando mecanismos distintos que reforçam a complexidade da ação da FlpC-PEG. Em conjunto, nossos achados demonstram o potencial da FlpC-PEG como uma abordagem promissora para o tratamento do CPCNP, ampliando perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em metalofármacos.

BIBLIOGRAFIA

ABASSI, Y. A. *et al.* Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 7, p. 712–723, jul. 2009.

ADHIKARI, S. *et al.* A review on metal complexes and its anti-cancer activities: Recent updates from in vivo studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116211, fev. 2024.

AGARWAL, P. *et al.* Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A-dependent regulation into and out of the cell cycle in a spontaneous canine model of breast cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 6, p. 1355–1363, 16 jun. 2013.

AHMAD, B. *et al.* Natural Polyphyllins (I, II, D, VI, VII) Reverses Cancer Through Apoptosis, Autophagy, Mitophagy, Inflammation, and Necroptosis. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 14, p. 1821–1841, mar. 2021.

AKIYAMA, H. *et al.* Therapeutic Targeting of Ferroptosis Pathway in Combination with Mitochondrial Oxidative Stress Induction in Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 138, n. Supplement 1, p. 1162–1162, 5 nov. 2021.

ALVES DE LIMA, L. V. *et al.* DNA damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotoc cell death of MCF-7 cells treated with fluopsin C. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 21, p. 896–911, 2 nov. 2022.

ASHRAFI, A. *et al.* Current Landscape of Therapeutic Resistance in Lung Cancer and Promising Strategies to Overcome Resistance. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4562, 20 set. 2022.

BADGLEY, M. A. *et al.* Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice. **Science**, v. 368, n. 6486, p. 85–89, 3 abr. 2020.

BERGHE, T. VANDEN *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 6, p. 922–930, 11 jun. 2010.

BIAN, Z. *et al.* Effect of tumor suppressor gene cyclin-dependent kinase inhibitor 2A wild-type and A148T mutant on the cell cycle of human ovarian cancer cells. **Oncology Letters**, v. 7, n. 4, p. 1229–1232, abr. 2014.

CAGAN, R.; MEYER, P. Rethinking cancer: current challenges and opportunities in cancer research. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 4, p. 349–352, 1 abr. 2017.

CAO, J.-J. *et al.* Targeting cancer cell metabolism with mitochondria-immobilized phosphorescent cyclometalated iridium(Ir^{III}) complexes. **Chemical Science**, v. 8, n. 1, p. 631–640, 2017.

CASTEEL, J.; MIERNYK, J. A.; THELEN, J. J. Mapping the lipoylation site of *Arabidopsis thaliana* plastidial dihydrolipoamide S-acetyltransferase using mass spectrometry and site-directed mutagenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1355–1361, nov. 2011.

CHANVORACHOTE, P.; SRIRATANASAK, N.; NONPANYA, N. C-myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target. **Anticancer Research**, v. 40, n. 2, p. 609–618, 3 fev. 2020.

CHEN, X. *et al.* Metal-based proteasomal deubiquitinase inhibitors as potential anticancer agents. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 4, p. 655–668, 16 dez. 2017.

DANIELLI, M. *et al.* Lipid droplets and polyunsaturated fatty acid trafficking: Balancing life and death. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, 27 jan. 2023.

DIXON, S. J. *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, maio 2012.

DOLL, S. *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. **Nature**, v. 575, n. 7784, p. 693–698, 28 nov. 2019.

DOTSCH, V. *et al.* p63 and p73, the Ancestors of p53. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 9, p. a004887–a004887, 1 set. 2010.

DUFFY, M. J.; SYNNOTT, N. C.; CROWN, J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 258–265, set. 2017.

FULTON, M. D.; NAJAH-MISSAOUI, W. Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6615, 1 abr. 2023a.

FULTON, M. D.; NAJAH-MISSAOUI, W. Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6615, 1 abr. 2023b.

GAO, F. *et al.* DLAT as a Cuproptosis Promoter and a Molecular Target of Elesclomol in Hepatocellular Carcinoma. **Current Medical Science**, v. 43, n. 3, p. 526–538, 8 jun. 2023.

GARCIA-PARDO, M. E.; SIMPSON, J. C.; O'SULLIVAN, N. C. A novel automated image analysis pipeline for quantifying morphological changes to the endoplasmic reticulum in cultured human cells. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 427, 8 set. 2021.

GENG, N. *et al.* Knockdown of ferroportin accelerates erastin-induced ferroptosis in neuroblastoma cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 22, n. 12, p. 3826–3836, 2018.

GHOSH, S. *et al.* Synergistic co-loading of vincristine improved chemotherapeutic potential of pegylated liposomal doxorubicin against triple negative breast cancer and non-small cell lung cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and**

Medicine, v. 31, p. 102320, jan. 2021.

GU, Y. *et al.* Studies of anticancer activity *in vivo* and *in vitro* behaviors of liposomes encapsulated iridium(III) complex. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 109–122, 21 fev. 2021.

GUO, B. *et al.* Cuproptosis Induced by ROS Responsive Nanoparticles with Elesclomol and Copper Combined with α PD-L1 for Enhanced Cancer Immunotherapy. **Advanced Materials**, v. 35, n. 22, 2 jun. 2023.

GUO, C. *et al.* SQSTM1/ p62 oligomerization contributes to A β -induced inhibition of Nrf2 signaling. **Neurobiology of Aging**, v. 98, p. 10–20, fev. 2021.

GUTHRIE, L. M. *et al.* Elesclomol alleviates Menkes pathology and mortality by escorting Cu to cuproenzymes in mice. **Science**, v. 368, n. 6491, p. 620–625, 8 maio 2020.

GUTTMANN, S. *et al.* ATP7B knockout disturbs copper and lipid metabolism in Caco-2 cells. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0230025, 10 mar. 2020.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 152, 4 mar. 2021.

HERCOG, K. *et al.* Application of advanced HepG2 3D cell model for studying genotoxic activity of cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114965, out. 2020.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 169–181, jan. 2018.

HUANG, K.-B. *et al.* Cu(II) complex that synergistically potentiates cytotoxicity and an antitumor immune response by targeting cellular redox homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 24, 11 jun. 2024.

JI, W. *et al.* TRIM33 enhances the ubiquitination of TFRC to enhance the susceptibility of liver cancer cells to ferroptosis. **Cellular Signalling**, v. 121, p. 111268, set. 2024.

KALYANE, D. *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252–1276, maio 2019.

KATSUYAMA, M. *et al.* Clioquinol inhibits dopamine- β -hydroxylase secretion and noradrenaline synthesis by affecting the redox status of ATOX1 and copper transport in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 135–148, 9 jan. 2021.

KE, N. *et al.* The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. Em: [s.l.: s.n.]. p. 33–43.

KHO, D. *et al.* Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing

the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. **Biosensors**, v. 5, n. 2, p. 199–222, 16 abr. 2015.

KIKUCHI, N. *et al.* Comparison of the ischemic and non-ischemic lung cancer metabolome reveals hyper activity of the TCA cycle and autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 530, n. 1, p. 285–291, set. 2020.

LAI, K. *et al.* Sensing of mitochondrial DNA by ZBP1 promotes RIPK3-mediated necroptosis and ferroptosis in response to diquat poisoning. **Cell Death & Differentiation**, v. 31, n. 5, p. 635–650, 16 maio 2024.

LE THOMAS, A. *et al.* Decoding non-canonical mRNA decay by the endoplasmic-reticulum stress sensor IRE1 α . **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 7310, 15 dez. 2021.

LEE, J. *et al.* Optimization of Tumor Spheroid Preparation and Morphological Analysis for Drug Evaluation. **BioChip Journal**, v. 18, n. 1, p. 160–169, 21 mar. 2024.

LI, H. *et al.* Mitochondria-Targeting Metallodrugs for Cancer Therapy: Perspectives from Cell Death Modes. **ChemMedChem**, v. 19, n. 15, 14 ago. 2024.

LI, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 640–653, fev. 2019a.

LI, X. *et al.* CUL3 (cullin 3)-mediated ubiquitination and degradation of BECN1 (beclin 1) inhibit autophagy and promote tumor progression. **Autophagy**, v. 17, n. 12, p. 4323–4340, 2 dez. 2021.

LU, X. *et al.* Elesclomol Loaded Copper Oxide Nanoplatform Triggers Cuproptosis to Enhance Antitumor Immunotherapy. **Advanced Science**, v. 11, n. 18, 2 maio 2024.

MA, L. *et al.* Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1093–1100, 27 ago. 2013.

MAITRA ROY, S. *et al.* 3D multicellular tumor spheroids used for in vitro preclinical therapeutic screening. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 86, p. 104636, set. 2023.

MAO, W. *et al.* Cuproptosis-related MTF1 inhibits kidney renal clear cell carcinoma progression by suppressing proliferation and regulating immune cell infiltration. **Acta Materia Medica**, v. 2, n. 3, 2023.

MATHEW, M. *et al.* Induction of Oxidative Stress and Ferroptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells by Niclosamide via Blockade of the Function and Expression of SLC38A5 and SLC7A11. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 291, 27 fev. 2024.

MIYAMURA, S. *et al.* An antitumor antibiotic, no. 4601 from *streptomyces*, identical with yc 73 of *pseudomonas* origin. **The Journal of Antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 369–370, 1972.

NAVARRO, M. O. P. *et al.* Fluopsin C for Treating Multidrug-Resistant Infections: In vitro Activity Against Clinically Important Strains and in vivo Efficacy Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 25 out. 2019.

NI, M. *et al.* Functional Assessment of Lipoyltransferase-1 Deficiency in Cells, Mice, and Humans. **Cell Reports**, v. 27, n. 5, p. 1376- 1386.e6, abr. 2019.

NUNES, A. S. *et al.* 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206–226, 27 jan. 2019.

PALOMER, X. *et al.* GADD45A: With or without you. **Medicinal Research Reviews**, v. 44, n. 4, p. 1375–1403, 24 jul. 2024.

PARVEEN, S. *et al.* Enantiomeric copper based anticancer agents promoting sequence-selective cleavage of G-quadruplex telomeric DNA and non-random cleavage of plasmid DNA. **Metallomics**, v. 12, n. 6, p. 988–999, 1 jun. 2020.

PENDIN, D.; FILADI, R.; PIZZO, P. The Concerted Action of Mitochondrial Dynamics and Positioning: New Characters in Cancer Onset and Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 7, 22 maio 2017.

POLEWSKI, M. D. *et al.* *SLC7A11* Overexpression in Glioblastoma Is Associated with Increased Cancer Stem Cell-Like Properties. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 17, p. 1236–1246, set. 2017.

QIN, J. *et al.* Expression of transferrin receptor/TFRC protein in bladder cancer cell T24 and its role in inducing iron death in bladder cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 274, p. 133323, ago. 2024.

RANA, M. *et al.* A ferrocene-containing nucleoside analogue targets DNA replication in pancreatic cancer cells. **Metallomics**, v. 14, n. 7, 25 jul. 2022.

RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, P. *et al.* Growth arrest and DNA damage-inducible proteins (GADD45) in psoriasis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 14579, 16 jul. 2021.

SÁNCHEZ-MARTÍN, P.; SAITO, T.; KOMATSU, M. p62/ <sc>SQSTM</sc> 1: 'Jack of all trades' in health and cancer. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 1, p. 8–23, 18 jan. 2019.

SANGEETHA, S.; MURALI, M. Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu(quamol)Cl]·H₂O. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2501–2511, fev. 2018.

SHAO, J. *et al.* TPP-related mitochondrial targeting copper (II) complex induces p53-dependent apoptosis in hepatoma cells through ROS-mediated activation of Drp1. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 149, 19 dez. 2019.

SHAO, J. *et al.* The Effect of 2D and 3D Cell Cultures on E-Cadherin Profile and Drug

Resistance in Huh7 Cell. , 10 mar. 2021.

SKROTT, Z. *et al.* Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. **Nature**, v. 552, n. 7684, p. 194–199, 6 dez. 2017.

SONG, L. *et al.* The biological significance of cuproptosis-key gene MTF1 in pan-cancer and its inhibitory effects on ROS-mediated cell death of liver hepatocellular carcinoma. **Discover Oncology**, v. 14, n. 1, p. 113, 28 jun. 2023.

TAN, C.-P. *et al.* Phosphorescent metal complexes as theranostic anticancer agents: combining imaging and therapy in a single molecule. **Chemical Science**, v. 12, n. 7, p. 2357–2367, 2021.

TSVETKOV, P. *et al.* Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. **Science**, v. 375, n. 6586, p. 1254–1261, 18 mar. 2022.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, v. 575, n. 7782, p. 299–309, 14 nov. 2019.

WANG, H. *et al.* Mitochondria regulation in ferroptosis. **European Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 151058, jan. 2020.

WANG, W. *et al.* Ferroptosis inducers enhanced cuproptosis induced by copper ionophores in primary liver cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 42, n. 1, p. 142, 6 jun. 2023.

XIE, J. *et al.* Cuproptosis: mechanisms and links with cancers. **Molecular Cancer**, v. 22, n. 1, p. 46, 7 mar. 2023.

XIONG, C. *et al.* Cuproptosis: p53-regulated metabolic cell death? **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 4, p. 876–884, 8 abr. 2023.

XUE, Q. *et al.* Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis. **Autophagy**, v. 19, n. 7, p. 1982–1996, 3 jul. 2023.

YAN, Y. *et al.* Identification of Lncrna-Mrna Networks in Hepg2 Cells upon ATP7B Knockout and Copper Accumulation. **Iranian Journal of Public Health**, 22 maio 2023.

ZAMAN, S. *et al.* Combinatorial Therapy of Zinc Metallochaperones with Mutant p53 Reactivation and Diminished Copper Binding. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 8, p. 1355–1365, 1 ago. 2019.

ZANONI, M. *et al.* Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 289–301, 4 mar. 2019.

ZHAO, C. *et al.* Determining intracellular lipid content of different oleaginous yeasts by one simple and accurate Nile Red fluorescent method. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 597–605, 3 jul. 2019.

ZHAO, X. *et al.* The expression of cuproptosis-related genes in hepatocellular

carcinoma and their relationships with prognosis. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 14 out. 2022a.

ZHAO, Z. *et al.* Expression and prognostic significance of m6A-related genes in TP53-mutant non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 1, 23 jan. 2022b.

ZHENG, P. *et al.* DNA damage triggers tubular endoplasmic reticulum extension to promote apoptosis by facilitating ER-mitochondria signaling. **Cell Research**, v. 28, n. 8, p. 833–854, 20 ago. 2018.

ZHENG, P. *et al.* Elesclomol: a copper ionophore targeting mitochondrial metabolism for cancer therapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 271, 12 set. 2022.

ZHENG, S. *et al.* Effect of the BBC3 Gene on the Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells Through p53-Regulated Signaling. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 11, n. 1, p. 135–141, 1 jan. 2021.

ZHU, G. *et al.* O-GlcNAcylation enhances sensitivity to RSL3-induced ferroptosis via the YAP/TFRC pathway in liver cancer. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, p. 83, 16 abr. 2021.

ZHU, J.; WANG, K. Z.; CHU, C. T. After the banquet. **Autophagy**, v. 9, n. 11, p. 1663–1676, 3 nov. 2013.

ZHU, L. *et al.* A Ir(III)-phenylquinazolinone complex enhances ferroptosis by selectively inhibiting metallothionein-1. **Chemical Science**, v. 15, n. 27, p. 10499–10507, 2024.

5 CAPÍTULO 2

Modulação da expressão de RNAm de vias de necroptose e do citocromo P450 por FlpC-PEG em esferoides de HepG2/C3A

Luan Vitor Alves de Lima*¹, Matheus Felipe da Silva¹, Liana Martins de Oliveira¹, Maria Claudia Terkelli de Assis¹; Isabella Cristina Oliveira Carvalho¹; Isaura Maria Fuzinato¹, Simone Cristine Semprebon¹, Danielle Lazarin Bidóia², Ingrid Felicidade¹, Sandra Regina Lepri¹, Phelipe Oliveira Favaron¹, Mickely Liuti Dealis³, Luis Fernando Cabeça⁴, Galdino Andrade Filho³, Mário Sérgio Mantovani¹

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

³ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

⁴ Laboratório de Química 5, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, Brasil

RESUMO

A Fluopsina C (FlpC), uma metalodroga natural organocúprica, possui potente atividade citotóxica em células tumorais, mas sua aplicação é limitada pela toxicidade e baixa seletividade da forma livre. Neste estudo, propusemos superar essa limitação com a formulação lipossomal PEGuilada da FlpC (FlpC-PEG) e investigamos seu mecanismo de ação. Culturas bidimensionais (2D) e esferoides tridimensionais (3D) da linhagem metabolizadora HepG2/C3A foram utilizadas para avaliação comparativa entre as formas livre e nanoencapsulada. A FlpC-PEG demonstrou maior eficácia antiproliferativa, com valor de IC₅₀ de 0,48 µM, redução do crescimento esferoidal e diminuição da formação de colônias. A nanoformulação induziu alterações morfofuncionais, como ruptura membrana, desorganização mitocondrial e genotoxicidade. A análise por RT-qPCR revelou uma modulação complexa dos

transcritos de vias de morte celular, com destaque para a necroptose (*RIPK1*, *RIPK3*, *MLKL* e *BBC3*), além de genes relacionados à resposta ao dano genético (*GADD45A*), ciclo celular (*CDKN1A* e *PCNA*), estresse oxidativo (*SLC7A11*), autofagia (*SQSTM1* e *mTOR*) e uma regulação dinâmica de genes do metabolismo de xenobióticos (*CYPs*, *HNF4 α* e *PPAR γ*). Em síntese, a FlpC-PEG atua por mecanismos multifatoriais, envolvendo morte celular não apoptótica e reprogramação metabólica, configurando-se como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de metalofármacos em oncologia experimental.

Palavras-chave: Metalodroga; Produtos Naturais; Cultura 3D; Nanomedicina;

1 INTRODUÇÃO

No contexto da toxicologia, o modelo celular HepG2/C3A é amplamente empregado para investigar efeitos de fármacos e xenobióticos, incluindo danos citotóxicos e genotóxicos mediadas por bioativação metabólica (COLTMAN et al., 2021; ŠTAMPAR et al., 2021; DA SILVA et al., 2022). Essas células mantêm a expressão de enzimas de biotransformação hepática de fase I (como citocromos P450) e fase II (como GST e UGT) (WILKENING; STAHL; BADER, 2003; COLTMAN et al., 2021). O uso de esferoides multicelulares 3D da linhagem HepG2/C3A constitui um modelo fisiologicamente mais representativo para avaliações toxicológicas e farmacológicas (NUNES et al., 2019; COLTMAN et al., 2021; DA SILVA et al., 2022; ROY et al., 2023). Este modelo exhibe maior expressão de genes relacionados ao metabolismo hepático e maior sensibilidade a compostos tóxicos e genotóxicos em comparação a culturas 2D, permitindo a detecção de efeitos não evidentes em modelos convencionais (COLTMAN et al., 2021; ŠTAMPAR et al., 2021).

A FlpC, um metabólito secundário organocúprico produzido por bactérias como *Pseudomonas* spp. (DE OLIVEIRA et al., 2016; NAVARRO et al., 2019), destaca-se como um agente natural com potente atividade citotóxica, previamente demonstrada por nosso grupo de pesquisa em células MCF-7 (ALVES DE LIMA et al., 2022). Descrita nos anos 1970 (EGAWA et al., 1970), é caracterizada por elevada atividade antitumoral *in vitro* (MIYAMURA et al., 1972; MA et al., 2013; ALVES DE LIMA et al., 2022). Evidências demonstram que a FlpC induz morte celular e modula vias de estresse em células tumorais humanas (MA et al., 2013; ALVES DE LIMA et al., 2022). Contudo, sua aplicação farmacológica é limitada pela elevada toxicidade da forma livre, baixa seletividade por células tumorais (MA et al., 2013) e moderada hepatotoxicidade (NAVARRO et al., 2019).

Uma abordagem promissora para superar essas limitações é o encapsulamento da FlpC em lipossomas PEGuilados. Essa estratégia prolonga a circulação na corrente sanguínea (LI et al., 2019; WANG et al., 2023) e promove o acúmulo do fármaco no tumor por meio do efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR), enquanto reduz a exposição de tecidos saudáveis (HANSEN et al., 2015; KALYANE et al., 2019; LI et al., 2019; FULTON; NAJAH-MISSAOUI, 2023). Essa nanofarmacologia já provou eficácia clínica com a doxorubicina lipossomal (Doxil®), que apresenta maior atividade antitumoral e menor cardiotoxicidade em

comparação à forma livre (O'BRIEN et al., 2004; TANG et al., 2023). Analogamente, complexos de cobre encapsulados em lipossomas exibem perfil farmacocinético superior, com maior acúmulo intratumoral e depuração reduzida, sustentando seu uso para potencializar a eficácia da FlpC e minimizar sua toxicidade sistêmica (GAÁL et al., 2020; LEUNG et al., 2022). A internalização eficiente por endocitose ou fusão de membranas, que eleva significativamente a concentração intracelular do fármaco, também é um benefício de formulações lipossomais (GONZALEZ-GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020).

Diante disso, o presente estudo investigou os efeitos da FlpC encapsulada em lipossomas PEGuilados (FlpC-PEG) sobre células HepG2/C3A, utilizando tanto culturas bidimensionais quanto esferoides. Os objetivos foram: (1) investigar os efeitos comparativos da FlpC livre e da FlpC-PEG sobre a viabilidade celular e o crescimento *in vitro*; (2) avaliar a ativação de vias de morte celular, com ênfase na necroptose; e (3) analisar a modulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos, ao estresse oxidativo e à resposta adaptativa das células tumorais frente à exposição ao composto encapsulado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2 CULTURA CELULAR E AGENTES QUÍMICOS

A linhagem HepG2/C3A, livre de micoplasma, foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro e cultivada em MEM (Gibco®, CAT. 41500-034) suplementado com 10% SBF (Gibco®, CAT. 12657-029), Anfotericina B (250 µg/mL, Lote: 2090190), Penicilina-Estreptomicina (10.000 U/mL + 10.000 µg/mL, Lote: 2240838) e piruvato de sódio 1 mM (Lote: 1271397). As células foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂, e, para os experimentos, viabilidade celular acima de 90%, avaliada pelo azul de tripan no contador Countess II FL (LifeTechnology®).

A FlpC (C₄H₈CuN₂O₂S₂) foi cedida pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina e seu nanoencapsulamento em lipossomas PEGuilados foi realizado no Laboratório de Química 5 da UTFPR - Londrina. A formulação lipossomal, descrita por Dealis *et al.* 2025 (dados não publicados), incluiu dois tipos: (1) lipossomas PEGuilados sem FlpC (controle) e (2) lipossomas PEGuilados com FlpC. Além disso, a solução estoque de FlpC livre foi preparada em DMSO (FlpC livre: 22.400 µM; DMSO 100%). Por último, Doxorrubicina (DXR; Pharmacia, CAS: 23214-92-8) e camptotecina (CPT; Sigma–Aldrich, CAT. C9911) foram utilizados como controles positivos em 2 µM e 10 µM, respectivamente.

2.3 Esferoides tumorais multicelulares: cultura 3D

Os esferoides tumorais multicelulares da linhagem HepG2/C3A foram produzidos utilizando a técnica de sobreposição líquida. Para esse processo, os poços de uma placa de 96 poços foram recobertos com agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Foram semeadas 2×10³ células em cada poço, permitindo a formação de esferoides após um período de esferoidização de 7 dias, conforme descrito por Da Silva *et al.* (2022). Para os experimentos, os esferoides foram pré-selecionados (HAN *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023) e, quando necessário, foram dissociados em células únicas (METZGER *et al.* 2021).

2.4 Cultura celular em monocamada:

2.4.1 Viabilidade celular (ensaio de resazurina)

O efeito citotóxico de FlpC livre e FlpC-PEG foi avaliado usando corante resazurina em 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços. Após 24 h de estabilização, as células HepG2/C3A foram tratadas com FlpC e FlpC-PEG (0,05 – 0,8 μ M), controle negativo, veículo ou DXR por 24 h, e incubadas com resazurina (60 μ M) por 3 h. A fluorescência foi mensurada no espectrofotômetro Glomax® (520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão) para estimar a viabilidade celular relativa:

$$\text{Viabilidade Celular Relativa (\%)} = \frac{(A \text{ tratamento} - A \text{ branco})}{(A \text{ controle negativo} - A \text{ branco})} \times 100$$

*A representa o valor de fluorescência

As concentrações citotóxicas (IC_{12,5}, IC₂₅ e IC₅₀) e a correlação de dose-dependência foram determinadas, respectivamente, por regressão não linear e o coeficiente de correlação de Pearson, utilizando o software GraphPad Prism 10.1.2. Os dados de viabilidade celular foram expressos como média \pm desvio padrão, com três repetições biológicas e seis repetições técnicas/tratamento.

2.4.2 Cinética de crescimento celular em tempo real - sistema xCELLigence

A cinética de crescimento celular foi monitorada por impedância elétrica no sistema RTCA xCELLigence (Roche Diagnostic, Alemanha), que mensura variações no número de células, morfologia e aderência em tempo real, em incubadora a 37 °C e 5% CO₂. Após a adição de 50 μ L de meio em uma “E-plate” para ajuste de fundo, 1×10^4 células/poço foram semeadas. Após 24 h de estabilização, as células receberam os tratamentos: FlpC (1,0 μ M), FlpC-PEG (IC_{12,5}, IC₂₅ e IC₅₀), controle ou DXR. A impedância foi registrada a cada 15 min por 48 h e as curvas de crescimento foram normalizadas para o Índice Celular (NCIti) anterior aos tratamentos, pelo software RTCA.

2.4.3 Análise celular por microscopia Time-lapse

Para investigar alterações na morfologia e no comportamento celular após exposição a FlpC-PEG, foi empregada a técnica de microscopia Time-lapse. Foram semeadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 48 poços e, após o período de estabilização, as células foram tratadas com FlpC-PEG IC₅₀. A placa foi mantida a 37°C em uma estação de incubação (EVOS Onstage Incubator) com atmosfera controlada de 5% de CO₂ por 24 h. As imagens foram obtidas a cada 3 minutos utilizando o filtro de contraste de fase do microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com magnificação de 200 \times .

2.4.4 Análise de Componentes Celulares: Mitocôndrias, Núcleo, Corpúsculos Lipídicos e Integridade da Membrana Celular por Microscopia de Fluorescência

Para análise dos componentes celulares, foram cultivadas $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 12 poços, estabilizadas por 24 h em incubadora, e tratadas com FlpC-PEG IC_{50} . Após 24 h de tratamento, foram realizadas três abordagens distintas de marcação celular. A primeira utilizou Hoechst 33342 (NucBlue™ Live ReadyProbes™, Invitrogen, EUA) para marcação do núcleo e Rodamina 123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para identificar mitocôndrias metabolicamente ativas. A segunda abordagem empregou Vermelho do Nilo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualização de corpúsculos lipídicos. Na terceira, foi utilizado o Iodeto de Propídio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combinado ao Diacetato de Fluoresceína (FDA), possibilitando a avaliação da integridade da membrana e viabilidade celular, respectivamente. Após 30 minutos de incubação com cada solução marcadora, as células foram analisadas e microfotografias de fluorescência foram obtidas por meio do microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.5 ENSAIOS EM ESFEROIDES TUMORAIS MULTICELULARES:

2.5.1 Análise da cinética de crescimento do volume esferoidal

Os esferoides foram tratados FlpC-PEG nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , e $2 \times IC_{50}$, além de FlpC livre, controle ou DXR. Microfotografias foram obtidas utilizando o microscópio EVOS™ FL Auto (ThermoFisher Scientific, EUA) com filtro de campo claro nos tempos 0, 24, 48 e 72 h após o início do tratamento. O perímetro dos esferoides foi delineado manualmente no software AnaSP para gerar máscaras binárias. Essas máscaras foram processadas no software ReViSP (PICCININI *et al.*, 2015), permitindo o cálculo do volume esferoidal (mm^3). A taxa de crescimento esferoidal foi calculada com base no volume inicial (tempo 0) para cada tratamento, permitindo a análise do crescimento relativo ao longo do tempo. Posteriormente, as taxas de crescimento dos tratamentos foram comparadas com as taxas do controle em cada ponto de avaliação (24, 48 e 72 h) para identificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O experimento foi conduzido com três repetições biológicas, sendo analisados cinco esferoides por condição experimental.

2.5.2 Análise de formação de colônias

Para avaliar o potencial de formação de novas colônias, os esferoides obtidos no experimento de volume (item 2.4.1) após 72 h de experimento foram coletados e dissociados. Um pool de cinco esferoides por tratamento foi submetido à dissociação celular, seguido pela contagem de células viáveis utilizando azul de tripan. Em seguida, 500 células viáveis foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas em meio de cultura completo sem tratamento por 10 dias, com troca do meio a cada 3 dias. As colônias (≥ 50 células) formadas foram fixadas em solução de metanol e ácido acético glacial (3:1) por 5 minutos, coradas com cristal de violeta a 0,5% por 15 minutos, fotografadas e contabilizadas. Os resultados foram apresentados como média do número de colônias por tratamento \pm desvio padrão.

2.5.3 Avaliação de genotoxicidade: ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi empregado para verificar o perfil de genotoxicidade da FpC-PEG. Após 3 h de tratamento, 5 esferoides por tratamento foram coletados e submetidos ao processo de dissociação celular. As células dissociadas foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS. As etapas de preparação celular, confecção das lâminas, eletroforese e coloração foram realizadas de acordo com Alves de Lima *et al.* (2022). A classificação visual dos cometas foi realizada utilizando o sistema EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) e categorizada em uma escala de 0 a 4, onde 0 representa ausência de danos e 4 corresponde a classe de danos máximo ao DNA (Collins *et al.*, 2004). O índice de dano ao DNA foi calculado pela fórmula: índice de dano ao DNA = $\sum_{i=0}^4 (i \times n_i)$, conforme descrito por Collins *et al.* (2004).

2.5.4 Análise de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo

Os esferoides foram tratados por 24 h com FpC-PEG nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ e 2×IC₅₀, além de FpC livre, controle ou CPT. Após o tratamento, cinco esferoides por grupo foram coletados, dissociados e as células resultantes centrifugadas (1500 RPM por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspendidas em PBS. Para avaliar o perfil de morte celular, utilizou-se o kit GUAVA NEXIN (Merck/Millipore 4500–0450), conforme as instruções do fabricante, para detectar a externalização de fosfatidilserina com anexina V e a integridade da membrana plasmática por meio da marcação nuclear com 7-AAD. Além disso, o

conteúdo de DNA e as fases do ciclo celular (Sub-G₁, G₁, S e G₂/M) foram analisados após a permeabilização das células com solução de citrato/triton e coloração do DNA com iodeto de propídio (50 µg/mL). As células foram analisadas no citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore), com a quantificação da fluorescência de cada marcador em 10.000 eventos/amostra. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

2.5.5 Microscopia de fluorescência em esferoides

Após 24 h de tratamento, os esferoides foram submetidos à coloração com Hoechst 33342, para marcação do conteúdo de DNA, e iodeto de propídio (50 µg/mL), para identificação de células com comprometimento da integridade de membrana. Após um período de incubação de 30 minutos, imagens de fluorescência foram capturadas utilizando o microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.5.6 Quantificação relativa de mRNA Poli-A por meio de RT – qPCR

Após tratamento com FlpC-PEG IC₅₀ ou controle por 6 e 12 h, o RNA total de 20 esferoides por tratamento, em três repetições biológicas, foi isolado utilizando o MiniKit RNeasy® (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e pela razão de absorbância UV (A₂₆₀/A₂₈₀ nm) no Biodrop µLite, considerando-se aceitáveis amostras com razão entre 1,9 e 2,0.

Para a síntese de cDNA, 500 ng de RNA total foram utilizados, conforme descrito por Zanetti *et al* (2019). O cDNA foi diluído em água ultrapura (1:10) e utilizado nas reações com 5 µL do cDNA diluído, 0,5 µL de cada primer e 5 µL de PowerUP™ SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific; Cat. nº 01197264). Realizou-se 45 ciclos no termociclador CFX96 TOUCH™ (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com o manual do fabricante. A especificidade da amplificação e a presença de dímeros de primers foram verificadas por curva de dissociação, aumentando a temperatura de 55 °C a 95 °C, a uma taxa de 0,5 °C/s.

Foram avaliados os níveis de expressão de genes-alvo relacionados ao metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP2C9*, *HNF4-α*, *PPAR-G*, *GST* e *UGT*), regulação do ciclo celular (*C-MYC*, *CDKN1A* e *PCNA*), estresse do retículo endoplasmático (*ERN1*),

danos ao DNA (*GADD45A*) e estresse/morte celular (*BBC3*, *GPX1*, *SLC7A11*, *NFE2L2*, *NQO1*, *SQSTM1*, *BECN1*, *MTOR*, *RIPK1*, *RIPK3* e *MLKL*). Como genes constitutivos, foram utilizados *GAPDH* e *ACTB*. As sequências dos primers foram obtidas da Sigma-Aldrich, Invitrogen e Integrated DNA Technologies (Material suplementar).

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados usando o software estatístico Graph Pad Prism 10.1.2. A normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade e a independência dos resíduos foram confirmadas pelos testes de Levene e Durbin-Watson, respectivamente ($p > 0,05$). Os dados paramétricos foram avaliados por Análise de Variância (one-way ANOVA) e o teste post-hoc de Dunnett, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. No ensaio RT-qPCR, os valores de Cq dos genes foram normalizados pela média geométrica dos genes constitutivos *GAPDH* e *ACTB* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). As mudanças na expressão gênica foram calculadas pelo método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ de PFAFFL (2001), e apresentadas como médias \pm desvio padrão de fold-change. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando o \log_2 de fold-change de amostras não pareadas apresentaram $p < 0,05$ pelo teste t de Student bicaudal e fold-change ≥ 2 ou $\leq 0,5$.

3 RESULTADOS

3.1 MONOCAMADA

3.1.1 Citotoxicidade e cinética de crescimento celular: eficácia aprimorada da FlpC-PEG sobre FlpC Livre

Após 24 h de tratamento, efeitos citotóxicos foram observados para FlpC livre e FlpC-PEG por meio do ensaio de resazurina (Fig. 1A). As células HepG2/C3A apresentaram redução da viabilidade nas concentrações de 0,1-0,8 μM de FlpC-PEG, enquanto, para o FlpC livre, apenas a concentração de 0,8 μM reduziu a viabilidade de forma significativa. Na comparação entre as formulações de FlpC livre e lipossomal, a eficácia do FlpC-PEG foi acentuada, com uma IC_{50} calculada de 0,48 μM , enquanto a concentração de 0,5 μM de FlpC livre foi equivalente a uma $IC_{12,5}$. Além disso, o FlpC-PEG promoveu uma resposta dependente da dose, com uma correlação de -

0,9989 ($R^2 = 0,99$).

Em relação às mudanças de impedância elétrica no sistema RTCA, que refletem o estado celular, diferenças significativas foram observadas no NCl_{ti} após 24 e 48 h de tratamento com FlpC-PEG (IC_{25}) e após 6, 12, 24 e 48 h com FlpC-PEG (IC_{50}), em comparação ao controle (Fig. C-D). Na concentração de IC_{50} , a FlpC-PEG promoveu um aumento inicial de 14% no NCl_{ti} após 6 h, acompanhado de uma inclinação positiva ("slope") 95% superior à do controle. Entretanto, após 24 h de exposição, observou-se uma inversão nessa tendência, com redução significativa do crescimento em comparação ao controle, evidenciada por uma inclinação da curva 33,1% mais acentuada para baixo. Ao final das 48 h, a FlpC-PEG (IC_{50}) apresentou redução de 30,7% no crescimento celular, acompanhada de uma inclinação 61,8% menor em relação ao controle.

3.1.2 FlpC-PEG promove mudanças na morfologia e no comportamento celular

O tratamento com FlpC-PEG induziu alterações significativas no comportamento e na morfologia celular (Fig. 1E). Inicialmente, as células interromperam o processo de divisão celular, tornando-se arredondadas, mas sem a formação de células-filhas (Material S1 - vídeo). Foi observado também o surgimento de estruturas semelhantes ao retículo endoplasmático (Fig. 1E1), seguido pela perda de adesão celular. Na presença de células adjacentes, formaram-se estruturas semelhantes a nanotúbulos de transporte (TNTs) (Fig. 1E4) e possíveis citonemas (Fig. 1E5). Além disso, as células apresentaram tumefação (Fig. 1E2), seguida do rompimento da membrana plasmática (Fig. 1E3). Os vídeos podem ser visualizados em: HepG2/C3A controle e HepG2/C3A FlpC-PEG.

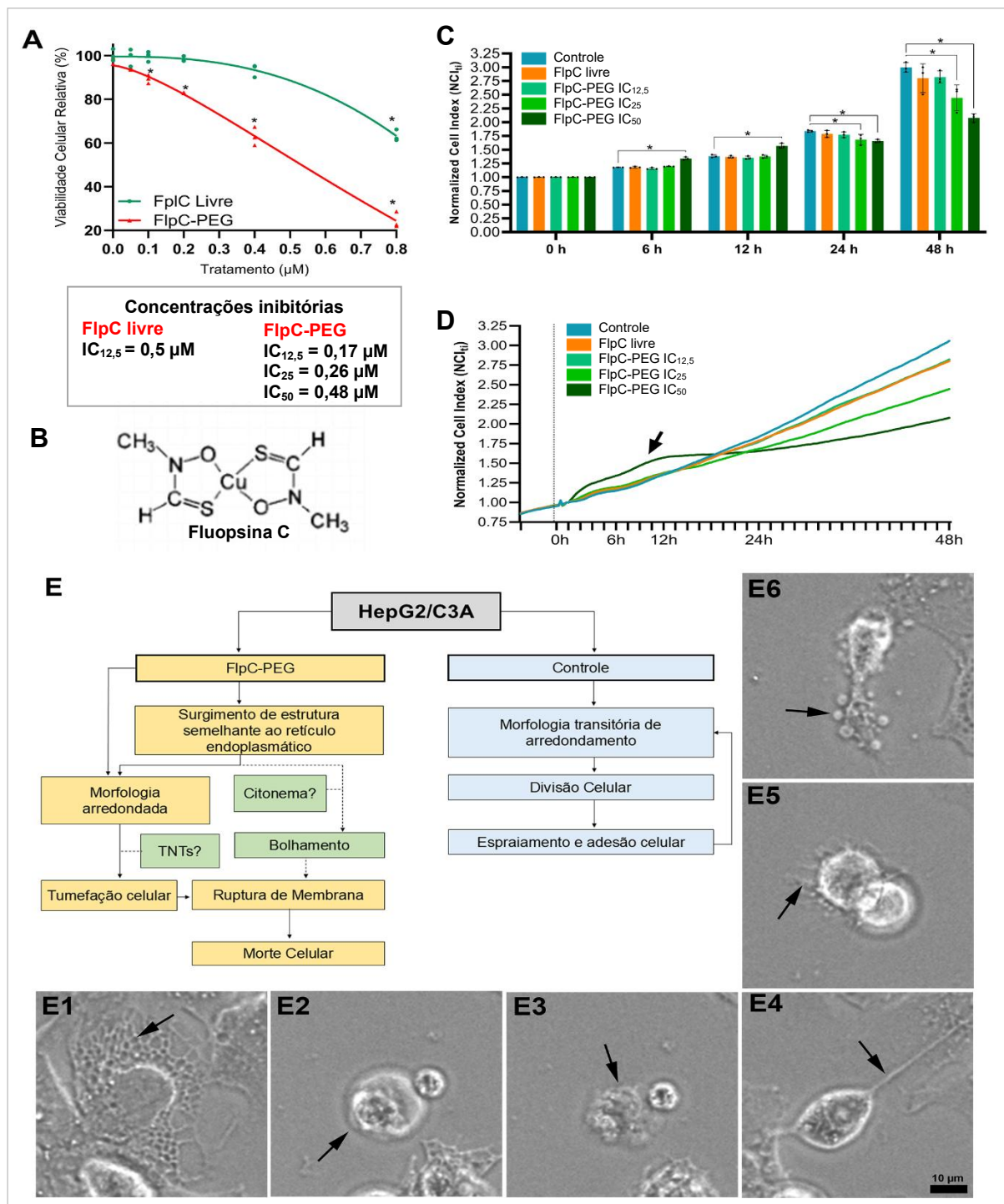


Figura 1 – Citotoxicidade, cinética de crescimento e microscopia de time-lapse em células HepG2/C3A tratadas com FpIC livre e FpIC-PEG. (A) Média da viabilidade celular obtida por meio do ensaio de resazurina após 24h de tratamento. **(B)** Estrutura molecular da FlpC. **(C)** Comparação dos índices celulares normalizados (NCI_t) após tratamentos com as formulações de FlpC em 6, 12, 24 e 48h. **(D)** Curva de crescimento das células expostas às formulações de FlpC. A seta indica padrão de curva característico de compostos genotóxicos; **(E)** Fluxograma categórico contendo o comportamento celular após o tratamento com FpIC-PEG ou controle. **(E1)** A seta indica estrutura semelhante ao retículo endoplasmático; **(E2)** A seta indica tumefação celular; **(E3)** A seta indica rompimento de membrana; **(E4)** A seta indica possível presença de TNT's; **(E5)** A seta indica possível presença de citonema; **(E6)** A seta indica bolhamento celular; as barras de erro representam o desvio padrão da média de três repetições experimentais. (*) p -valor < 0,05 indica diferenças significativas nos valores médios das células tratadas em comparação com as células controle, conforme determinado pela análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. CN, controle negativo; CV, controle do veículo (para FpIC-PEG: lipossoma vazio; para FpIC livre: DMSO 0,003%); CP, doxorubicina (DXR) 2 μM .

3.1.3 FlpC-PEG promove mudanças na distribuição mitocondrial, acúmulo de corpúsculos lipídicos e perda da integridade de membrana

Após 24 h de tratamento com FlpC-PEG IC₅₀, foram detectadas alterações significativas em processos celulares essenciais, indicando estresse induzido pelo composto: (1) a avaliação da integridade da membrana plasmática (Fig. 2A), por meio da marcação com iodeto de propídio, mostrou marcação positiva nas células com morfologia arredondada e com sinais de tumefação celular. Deste modo, demonstrando que a perda da integridade da membrana plasmática está presente no processo de morte celular induzido pela FlpC-PEG; (2) a análise da distribuição mitocondrial (Fig. 2B), realizada com a marcação por rodamina, demonstrou mudanças na organização intracelular. Nas células tratadas, as mitocôndrias apresentaram uma distribuição predominantemente perinuclear, formando agregados globulares, em contraste com as células controle, onde as mitocôndrias estavam uniformemente distribuídas pelo citoplasma, exibindo morfologia filamentar típica; (3) a marcação com Vermelho do Nilo indicou um aumento significativo na presença de corpúsculos lipídicos (Fig. 2C). Nas células aderidas ao substrato, esses corpúsculos estavam amplamente distribuídos no citoplasma e em maior quantidade em relação ao controle.

3.2 CULTURA 3D

3.2.1 FlpC-PEG diminui a taxa de crescimento dos esferoides e a formação de colônias

Ao longo dos tempos avaliados, as taxas de crescimento dos esferoides variaram entre os tratamentos (Tabela 1). No grupo controle, observou-se um aumento de 15,8% após 24 h, 30,3% após 48 horas e 98,0% após 72 h. No tratamento com FlpC Livre, as taxas foram de 13,9%, 29,0% e 84,1% nos mesmos intervalos, respectivamente. O tratamento com FlpC-PEG ½ IC₅₀ apresentou taxas de 12,7%, 28,2% e 84,7%, enquanto o FlpC-PEG IC₅₀ registrou 11,7%, 25,3% e 66,8%. Por fim, o tratamento com FlpC-PEG 2×IC₅₀ resultou nas menores taxas de crescimento, atingindo 8,6% após 24 h, 19,5% após 48 h e 53,4% após 72 h. Quando comparados aos esferoides controle, os tratamentos com FlpC-PEG IC₅₀ e FlpC-PEG 2×IC₅₀ demonstraram diferenças significativas, apresentando taxas de crescimento inferiores ($p < 0,05$) nos períodos de 24, 48 e 72 h (Fig. 3A-B).

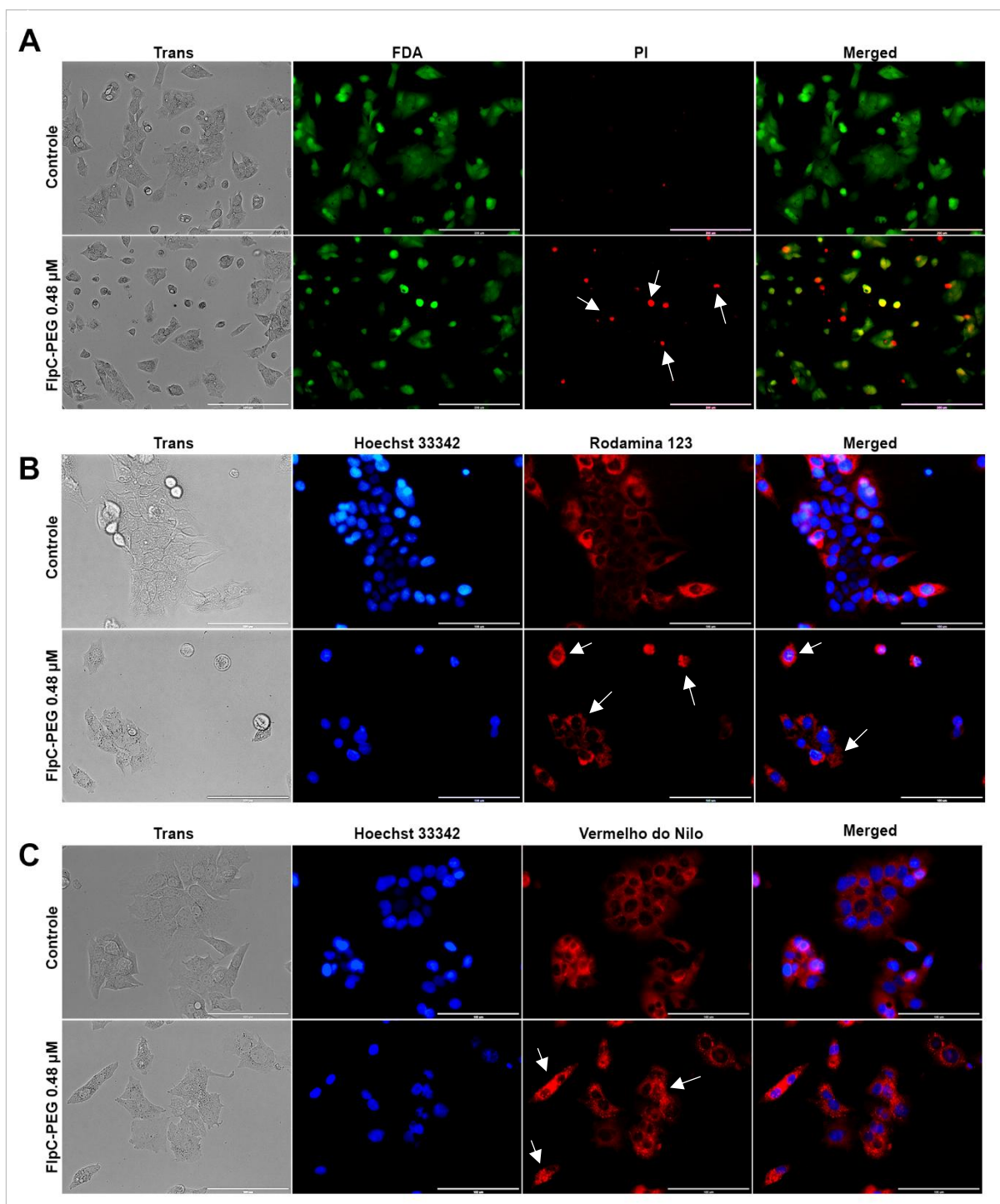


Figura 2 – Marcação de mitocôndrias, núcleo, corpúsculos lipídicos e integridade de membrana celular por microscopia de fluorescência de células HepG2/C3A tratadas com FlpC-PEG. (A) Avaliação da integridade da membrana com FDA e iodeto de propídio; as setas indicam células com rompimento de membrana. Pseudo-cores: *vermelho* = iodeto de propídio (PI) – núcleo de células com membrana rompida; *verde* = Diacetato de Fluoresceína (FDA) – viabilidade celular; escala: 200 µm. **(B)** Marcação de mitocôndrias metabolicamente ativas; as setas indicam reorganização mitocondrial em forma globular na região perinuclear. Pseudo-cores: *vermelho* = Rodamina 123 - mitocôndrias metabolicamente ativas; *azul* = Hoechst 33342 – núcleo celular; escala: 100 µm. **(C)** Marcação de corpúsculos lipídicos com vermelho do Nilo; as setas indicam a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma. Pseudo-cores: *vermelho* = vermelho do nilo - corpúsculos lipídicos; escala: 100 µm.

Tabela 1 – Volume médio (mm³) e taxa de crescimento (%) de esferoides de células HepG2/C3A após o tratamento com FlpC-PEG.

Volume médio dos esferoides (mm ³) e taxa de crescimento (%)												
Tratamentos												
	Controle		FCIpC livre		FlpC-PEG IC _{12,5}		FlpC-PEG IC ₅₀		FlpC-PEG 2×IC ₅₀		DXR	
Tempo	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa	Volume	Taxa
0h	0,0636 ± 0,0011	--	0,0628 ± 0,0021	--	0,0633 ± 0,0003	--	0,0637 ± 0,0012	--	0,0629 ± 0,0005	--	0,0632 ± 0,0002	--
24h	0,0736 ± 0,0006	15.8%	0,0716 ± 0,0034	13.9%	0,0714 ± 0,0016	12.7%	0,0712 ± 0,0013	11.7%	0,0683 ± 0,0002	8.6%	0,0576 ± 0,0027	-8.8%
48h	0,0828 ± 0,0006	30.3%	0,0811 ± 0,0038	29.0%	0,0812 ± 0,0024	28.2%	0,0798 ± 0,0021	25.3%	0,0752 ± 0,0010	19.5%	0,0490 ± 0,0026	-22.4%
72h	0,1259 ± 0,0014	98.0%	0,1157 ± 0,0035	84.1%	0,1170 ± 0,0062	84.7%	0,1062 ± 0,0029	66.8%	0,0965 ± 0,0050	53.4%	0,0689 ± 0,0026	9.00%

A taxa de crescimento dos esferoides foi calculada a partir do volume inicial de cada tratamento.

Além de modular a taxa de crescimento volumétrico dos esferoides, os tratamentos com FlpC-PEG IC₅₀ e FlpC-PEG 2×IC₅₀ induziram uma redução estatisticamente significativa na formação de colônias, quando comparados ao grupo controle (Fig. 3C). Especificamente, o tratamento com FlpC-PEG IC₅₀ resultou em uma diminuição de 24,5% na formação de colônias, enquanto o FlpC-PEG 2×IC₅₀ ocasionou uma redução de 46,8%. Em contraste, os demais tratamentos não demonstraram alterações estatisticamente significativas em relação ao controle.

3.2.2 FlpC-PEG é genotóxica e modula a expressão de mRNA do gene *GADD45A*

No ensaio de cometa, os índices de danos ao DNA foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação ao controle. Após 3 h de exposição, os tratamentos com FlpC-PEG $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ e 2×IC₅₀ apresentaram elevações de 1,5×, 1,9× e 2,3× nos índices de dano, respectivamente (Fig. 3D, E, H). Além disso, a análise da expressão gênica mostrou que, 12 h após o tratamento com FlpC-PEG IC₅₀, ocorreu um aumento de 2× na expressão do mRNA do gene *GADD45A* (Fig. 3F), enquanto não foi observada modulação significativa desse transcrito após 6 horas de exposição.

3.6 FlpC-PEG induz parada do ciclo celular e modula a expressão de mRNA de genes reguladores do ciclo

Após 24 h de tratamento, o conteúdo de DNA foi avaliado, e as porcentagens relativas das células nas diferentes fases do ciclo celular (Sub-G₁, G₁, S e G₂/M) foram determinadas (Fig. 4A-B). Nos esferoides tratados com FlpC-PEG IC₅₀, foi observado um aumento significativo de 23,14% na fase S, acompanhado de uma redução de 12,3% na fase G₂/M, em comparação ao controle. No tratamento com

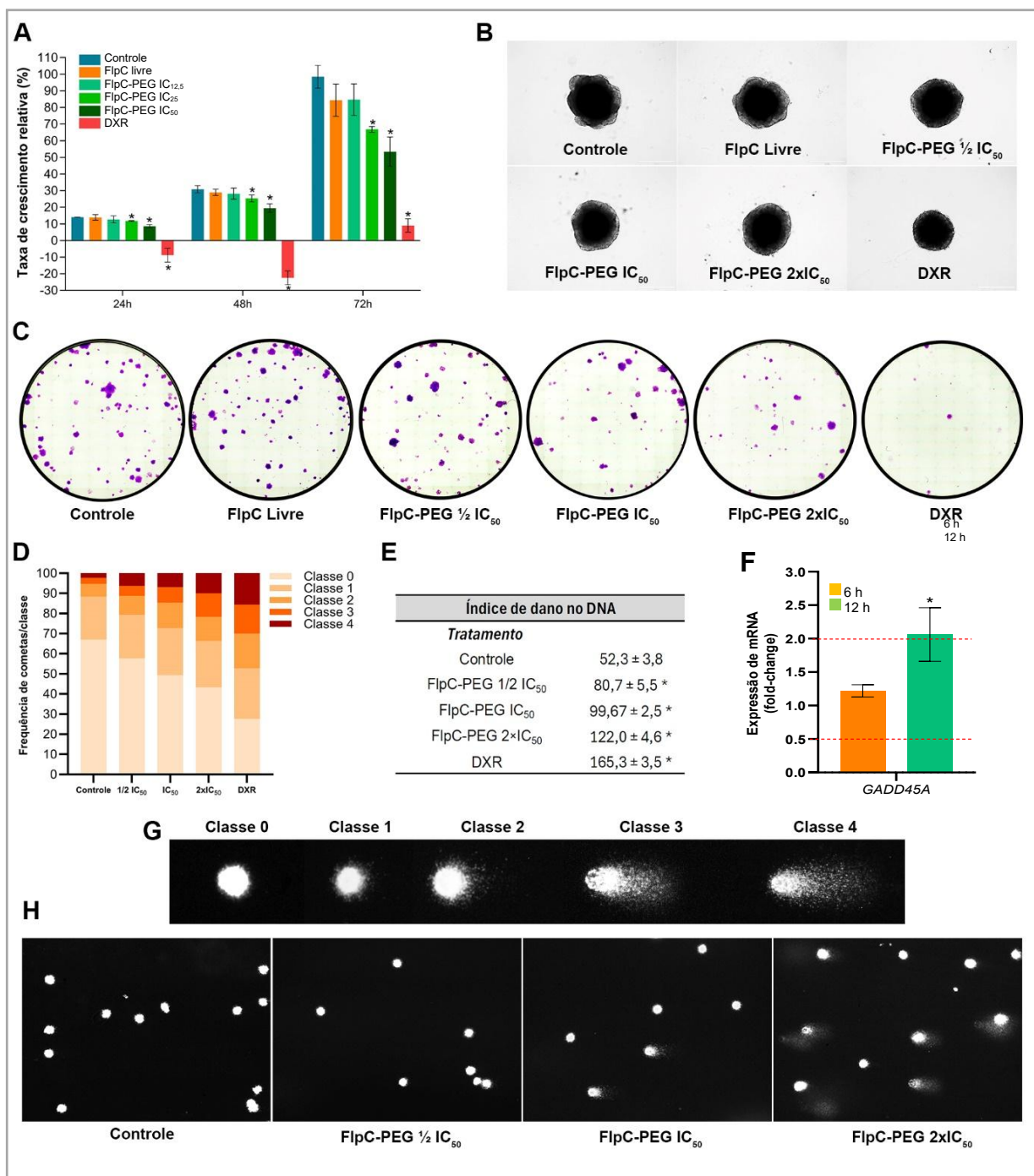


Figura 3 – FlpC-PEG influencia na taxa de crescimento, diminui potencial clonogênico e induz danos no DNA em esferoides de células HepG2/C3A. (A) Taxa de crescimento médio dos esferoides nos tempos 24, 48 e 72 h após tratamento. (B) Microfotografias dos esferoides após 72 h de tratamento. Escala: 200 μ m; (C) Microfotografias das colônias formadas após 7 dias de cultivo sem tratamento, corados com cristal de violeta, provenientes de esferoides previamente tratados por 72 horas. (D) Frequência das classes de cometas observadas em cada tratamento. (E) Índice de dano no DNA calculado a partir das classes observadas de 100 cometas/tratamento. Índice de dano no DNA = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$; (F) Análise da expressão de mRNA de genes relacionados a dano ao DNA, representados em fold-change, por meio de RT-qPCR - (*) indicam diferenças significativas nos valores médios de expressão relativa de mRNA das células tratadas em comparação com os do controle do veículo, conforme determinado usando o teste t de Student (\log_2 fold-change) e valores de fold-change de ≥ 2 ou $\leq 0,5$ (linhas vermelhas nos gráficos); (G) Categorização das classes de cometas. (H) Microfotografias dos cometas em cada tratamento. (*) representa o valor de $p < 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnett. Valores expressos em média \pm DP; cinética de crescimento: $n=5$ esferoides/tratamento/3 repetições; Cometa: $n=5$ esferoides/tratamento/3 repetições; RT-qPCR: $n=20$ esferoides/tratamento/3 repetições; DXR: doxorubicina.

FlpC-PEG na concentração $2 \times IC_{50}$, verificou-se um aumento de 29,4% na fase Sub- G_1 e de 18,7% na fase S, enquanto a fase G_2/M apresentou uma redução de 13,54% em relação ao controle. Os demais tratamentos não induziram alterações significativas na distribuição do conteúdo de DNA entre as diferentes fases do ciclo celular.

Em relação à expressão dos transcritos dos genes associados ao ciclo celular, foi observado um aumento de $2,3 \times$ na expressão do gene *PCNA* após 6 horas de tratamento com FlpC-PEG IC_{50} (Fig. 4C). No entanto, após 12 horas de tratamento, a expressão do gene *PCNA* apresentou uma redução de $2 \times$, enquanto o gene *CDKN1A* apresentou aumento na expressão de $2,2 \times$.

3.2.3 FlpC-PEG induz morte celular e altera a expressão de mRNA de genes de estresse e morte celular

Após 24 h de tratamento, os esferoides exibiram células com integridade de membrana comprometida na camada periférica, evidenciada pela positividade ao iodeto de propídio, tanto nos tratamentos com FlpC-PEG IC_{50} , quanto com FlpC-PEG $2 \times IC_{50}$ (Fig. 4D). A análise por citometria de fluxo revelou uma redução significativa no número de células vivas de 17,5% e 25,2% nos tratamentos FlpC-PEG IC_{50} e $2 \times IC_{50}$, respectivamente, em comparação ao controle. Além disso, foi observado um aumento significativo no número de células submetidas à morte semelhante à necrose, de 14% e 18,4%, respectivamente (Fig. 4F-G).

Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos com o estresse celular, após 6 horas de tratamento, houve um aumento de $2,4 \times$ na expressão do mRNA do gene de estresse oxidativo *SLC7A11* (Fig. 4E). Além disso, observou-se um aumento na expressão de genes relacionados à autofagia (*m-TOR*, $2,9 \times$; *SQSTM1*, $2,1 \times$) e morte celular (*BBC3*, $2 \times$; *RIPK1*, $5,8 \times$; *RIPK3*, $5,1 \times$; *MLKL*, $2,4 \times$) (Fig. 4H). Após 12 horas de tratamento, foi observado um aumento na expressão dos genes associados ao estresse oxidativo (*SLC7A11*, $2 \times$) e morte celular (*BBC3*, $14,2 \times$; *RIPK1*, $2,7 \times$).

3.2.4 FlpC-PEG modula a expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos

Foram quantificados os níveis de expressão dos transcritos de genes que codificam enzimas do citocromo P450 e dos fatores de transcrição que regulam esses genes, ambos essenciais para o metabolismo de xenobióticos (Fig. 4I). Após 6 horas de tratamento com FlpC-PEG, observou-se uma redução na expressão dos

genes de fase 1, especificamente, *CYP2C19* (-2×), *CYP2D6* (-3,2×) e *CYP2E1* (-5,4×), acompanhada de diminuição nos níveis dos fatores de transcrição *HNF4-α* (-2×) e *PPAR-γ* (-2,2×). Em contraste, após 12 horas de tratamento, identificou-se aumento na expressão dos genes de fase 1 (*CYP1A1*, 2,1×; *CYP2B6*, 2,1×; *CYP2C9*, 3,5×, de fase 2 (*GST*, 2,1×) e do fator de transcrição *HNF4-α* (2,3×).

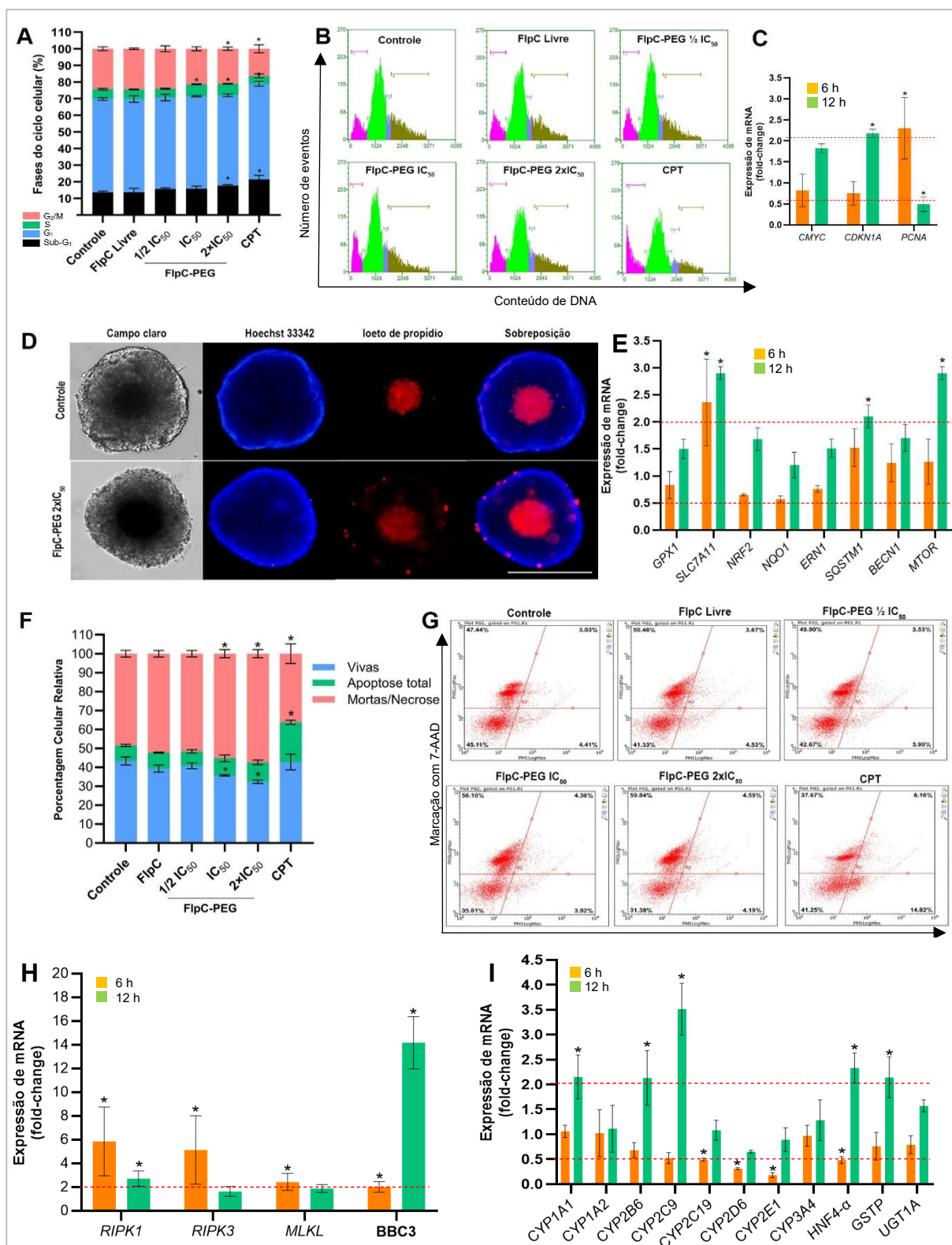


Figura 4 – Análise do ciclo celular, morte celular e mecanismos moleculares em esferoides de HepG2/C3A tratados com FipC-PEG. A figura apresenta a média percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (**A**), histogramas da distribuição do conteúdo de DNA obtidos por citometria de fluxo (**B**), e a expressão de mRNA de genes relacionados ao ciclo celular (**C**). Esferoides corados com Hoescht 33342 (núcleo – azul) e Iodo de Propídio (DNA de células com membrana rompida –

vermelho) são mostrados em **(D)**. A expressão de genes relacionados ao estresse celular **(E)**, necroptose **(H)** e metabolismo de xenobióticos **(I)** também foi avaliada. A média percentual de células vivas, apoptóticas e mortas não apoptóticas **(F)** e a distribuição celular em quadrantes obtidos por citometria de fluxo **(G)** são apresentadas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle foram determinadas por ANOVA seguida do teste de Dunnett para dados de ciclo e morte celular, expressos como média \pm DP. Para os dados de RT-qPCR, as diferenças foram avaliadas pelo teste t de Student considerando valores de \log_2 fold-change ≥ 1 (fold-change ≥ 2 ou $\leq 0,5$), indicados por linhas vermelhas nos gráficos. Foram analisados $n = 5$ esferoides/tratamento (ciclo e morte celular) e $n = 20$ esferoides/tratamento (RT-qPCR), em três repetições independentes. CPT: camptotecina.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que a formulação lipossomal PEGuilada da FlpC aprimora a atividade antiproliferativa em células HepG2/C3A. Nossos achados detalham um mecanismo de ação pleiotrópico, no qual a FlpC-PEG induz múltiplos mecanismos de estresse celular, culminando na morte celular não apoptótica, com destaque para a necroptose, além de modular genes de metabolismo de xenobióticos.

A superioridade citotóxica resulta da melhor entrega intracelular proporcionada pelo nanoencapsulamento, que otimiza a estabilidade e a captação celular (AGRAWAL; BALIGA; LONDHE, 2024). Essa otimização é consistentemente observada em formulações lipossomais de complexos metálicos, que apresentam menores valores de IC_{50} devido à internalização eficiente e consequente aumento da concentração intracelular do fármaco (EL-SHAFIE et al., 2020; GU et al., 2021). A relevância clínica dessa abordagem é reforçada pela melhoria do índice terapêutico, como ilustrado pela doxorrubicina lipossomal (CAELYX™/Doxil®), que demonstra maior eficácia tumoral com toxicidade sistêmica reduzida (O'BRIEN et al., 2004; TANG et al., 2023). Este aspecto é particularmente importante no caso da FlpC, cuja forma livre se caracteriza por elevada toxicidade e baixa seletividade, incluindo hepatotoxicidade moderada (MA et al., 2013; NAVARRO et al., 2019). É fundamental interpretar a citotoxicidade observada em HepG2/C3A como atividade antitumoral, e não como indicativo de hepatotoxicidade em tecido hepático normal. Essa distinção é crucial, visto que lipossomas PEGuilados modulam a biodistribuição via efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR), promovendo acúmulo em tumores e reduzindo a toxicidade sistêmica (GHOSH et al., 2021; FULTON & NAJAH-MISSAOUI, 2023).

Além da citotoxicidade, a FlpC-PEG induziu alterações morfológicas

consistentes com morte celular não apoptótica do tipo oncos, caracterizada por tumefação e ruptura da membrana plasmática, conforme previamente descrito para a FlpC livre em MCF-7 (MA et al., 2013). A formação de nanotúbulos de tunelamento de membrana (TNTs), estruturas de proteção temporária que distribuem o dano tóxico (ZHENG et al., 2021; SIMONE et al., 2023), não foi suficiente para impedir a morte celular, mas pode influenciar a sensibilidade de subpopulações tumorais (PINTO et al., 2021; SARKARI et al., 2024). Intracelularmente, a FlpC-PEG promoveu alterações na organização do retículo endoplasmático (RE), associadas à sua capacidade de gerar estresse oxidativo, danificar o citoesqueleto (MA et al., 2013), induzir genotoxicidade e modular a expressão de genes relacionados ao estresse de RE, conforme demonstrado por nosso grupo (ALVES DE LIMA et al., 2022), sendo compatíveis com a associação entre citotoxicidade e reestruturação do RE (ZHENG et al., 2018; GARCIA-PARDO; SIMPSON; O'SULLIVAN, 2021). O acúmulo perinuclear de mitocôndrias em agregados globulares, em contraste com o padrão filamentar observado nas células controle, indica estresse mitocondrial e disfunção bioenergética (PENDIN; FILADI; PIZZO, 2017).

A eficácia superior da FlpC-PEG em esferoides tumorais de HepG2/C3A é clinicamente relevante, pois este modelo pré-clínico de maior complexidade e capacidade metabólica (COLTMAN et al., 2021; ŠTAMPAR et al., 2021) simula a resistência intrínseca de tumores a fármacos (NUNES et al., 2019; ROY et al., 2023). A restrição significativa da expansão tumoral tridimensional e o comprometimento do potencial clonogênico das células viáveis, indicando danos subletais à proliferação a longo prazo, reforçam o potencial terapêutico da formulação lipossomal. Nossos achados, que demonstram tanto a redução do crescimento esferoidal quanto da clonogenicidade pela FlpC-PEG, são consistentes com trabalhos anteriores do nosso grupo com a FlpC livre em células MCF-7 (ALVES DE LIMA et al., 2022; GOMES et al., 2023).

A genotoxicidade induzida pela FlpC-PEG é um fator crucial que contribui para esses efeitos antiproliferativos. Evidências como a curva característica de genotoxinas (ABASSI et al., 2009; KE et al., 2011; KHO et al., 2015) no ensaio de impedância em monocamada e a confirmação em esferoides pelo ensaio do cometa, reforçam essa interpretação. A FlpC livre já demonstrava genotoxicidade, possivelmente via estresse oxidativo (MA et al., 2013) ou intercalação direta ao DNA, uma propriedade de complexos cúpricos (SANGEETHA et al., 2018; PARVEEN et al.,

2020). A maior sensibilidade dos esferoides de HepG2/C3A à genotoxicidade da FlpC-PEG pode estar associada à expressão aumentada de enzimas metabólicas e genes hepáticos nesse modelo 3D em comparação com o 2D (COLTMAN et al., 2021; ŠTAMPAR et al., 2021). O acúmulo de células na fase S do ciclo celular após o tratamento indica uma interferência direta na replicação do DNA e um bloqueio da transição S→G₂/M, um efeito corroborado pela literatura para complexos cúpricos que induzem parada do ciclo via dano ao DNA e inibição replicativa (MAHENDIRAN et al., 2018; MOLINARO et al., 2020; BALSÀ; BARAN; LEÓN, 2023). Achados similares com FlpC livre em MCF-7 (ALVES DE LIMA et al., 2022), embora com bloqueio em G₁, sugerem que a fase de parada pode variar conforme o tipo celular ou modelo experimental, já que culturas 3D modulam distintamente a progressão do ciclo celular e a ativação de checkpoints (VARADARAJAN et al., 2022).

Em nível molecular, os dados de expressão gênica em esferoides revelam a ativação de vias de dano ao DNA e estresse celular. A modulação positiva de *GADD45A* e *CDKN1A* (p21) após 12 horas de tratamento com FlpC-PEG, genes regulados por p53, sinaliza respostas que promovem a parada do ciclo celular para reparo do DNA ou a indução da morte celular (XIE et al., 2020; AL-ARAFAT et al., 2024). Esses achados estão em consonância com dados prévios do nosso grupo, que demonstraram aumento de *GADD45A*, *CDKN1A* e da enzima antioxidante *GPX1* em células MCF-7 expostas à FlpC livre (ALVES DE LIMA et al., 2022). Além disso, o perfil de expressão de *PCNA*, indução inicial (6 h) seguida por repressão (12 h), reflete uma dinâmica de tentativa de replicação/reparo *versus* a ativação de mecanismos inibitórios frente ao agravamento do dano (BIELINSKY et al., 2019; RØST et al., 2020; OLAISEN et al., 2024). Esse padrão é consistente com o observado para outras metalodrogas cúpricas que inibem a proliferação celular (Kacar et al., 2020). A queda de *PCNA* é compatível com o aumento de *CDKN1A* (p21), que inibe *PCNA* e complexos ciclina-Cdk, bloqueando a função replicativa e consolidando a parada do ciclo (MANSILLA et al., 2020; TICLI et al., 2022; LIU et al., 2020).

Em esferoides de HepG2/C3A, embora *GPX1* não apresentou alteração, a FlpC-PEG induziu uma resposta antioxidante adaptativa, evidenciada pelo aumento da expressão de *SLC7A11* (xCT) em 6 e 12 h. Este transportador de cistina é crucial para a síntese de glutatona, o principal antioxidante intracelular (HE et al., 2023; MATHEW et al., 2024; PECCHILLO CIMMINO et al., 2024), e sua ativação integra a resposta celular ao estresse redox mediado por cobre (BAGHERPOOR et al., 2023).

Contudo, a elevação de *SQSTM1* (p62) e mTOR após 12 h sugere regulação autofágica comprometida, com estímulo simultâneo de vias pró e anti-autofágicas (NAZIO et al., 2013; TSAI et al., 2021). Esse cenário, similar ao de compostos que bloqueiam o fluxo autofágico e intensificam a morte celular (SHEN et al., 2023), indica que a FlpC-PEG pode agravar o dano celular por falha na remoção de componentes danificados. Adicionalmente, o acúmulo de corpúsculos lipídicos em monocamada e a redução do mRNA de *PPAR γ* (6 h) indicam estresse metabólico lipídico e disfunção bioenergética (NOH et al., 2020). A afinidade de complexos cúpricos por corpúsculos lipídicos (HICKEY et al., 2015; XIA et al., 2018) e o papel do cobre no acúmulo lipídico em HepG2 (HAN et al., 2024) reforçam o envolvimento da FlpC-PEG na disfunção metabólica observada.

No contexto das vias de morte celular, nossos dados sugerem a necroptose como um dos principais mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pela FlpC-PEG. Achados semelhantes foram relatados por Alajroush et al. (2024), que observaram ativação da via RIPK3–MLKL em células MDA-MB-231 tratadas com complexos cúpricos, e por Balsa et al. (2019), que relataram ruptura de membrana e necrose em esferoides tratados com $[Cu(trp)_2]$. A necroptose, como mecanismo de ação da FlpC-PEG em esferoides de HepG2/C3A, envolve a modulação dos mRNAs das enzimas que compõem o necrossomo, onde RIPK1 recruta RIPK3, que fosforila MLKL. MLKL fosforilado oligomeriza e transloca para a membrana plasmática, formando poros que culminam na ruptura celular (ZHONG et al., 2022; MOHANTY et al., 2022). Além disso, RIPK3 estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação de enzimas mitocondriais, amplificando o dano celular (SUN et al., 2017; ZHAO et al., 2021; ZHONG et al., 2022).

Notavelmente, a FlpC-PEG também induziu o aumento da expressão de *BBC3* (PUMA), gene classicamente associado à via apoptótica (BELLE et al., 2016). No entanto, estudos recentes descrevem uma função não canônica de PUMA na necroptose, na qual sua expressão é induzida mesmo na ausência de caspases, atuando como amplificadora da necroptose dependente de RIPK3/MLKL (CHEN et al., 2018; WANG et al., 2018; CHEN et al., 2024). A deleção de PUMA compromete a fosforilação de RIPK3 e MLKL, reduzindo a eficácia da morte celular (CHEN et al., 2018). Esses achados indicam que PUMA atua como um regulador positivo da necroptose, especialmente em cenários de inibição da apoptose, mecanismo compatível com observações prévias de morte celular caspase-independente induzida

por FlpC em MCF-7 e MDA-MB-231 (MA et al., 2013). Corroborando, nosso grupo demonstrou que a FlpC promove aumento de *BBC3* em MCF-7, reforçando o papel de PUMA na amplificação da via necrótica (ALVES DE LIMA et al., 2022).

Em relação aos genes envolvidos no metabolismo hepático de xenobióticos, o tratamento com FlpC-PEG promoveu uma modulação temporal da expressão gênica. Esses achados são consistentes com o efeito inibitório de nanopartículas metálicas sobre enzimas do citocromo P450 (YE et al., 2014; CHOI E JOO, 2018; VOSS et al., 2020). Em modelos similares, nanopartículas de ouro e cobre reduziram a expressão de múltiplos CYPs, incluindo CYP2E1, cuja atividade parcialmente desacoplada contribui para a geração de ROS (TANG et al., 2018; ANGIREDDY et al., 2020). A redução de sua expressão pode ter contribuído para mitigar o estresse oxidativo induzido pela FlpC-PEG. Paralelamente, a queda dos níveis de *CYP2C19* e *CYP2D6* reduz temporariamente a capacidade de metabolização de pró-fármacos e xenobióticos, potencialmente prolongando a meia-vida intracelular do composto ativo e intensificando sua ação citotóxica (VOSS et al., 2020). A inibição de *HNF4α* reforça esse cenário, sugerindo regulação transcricional associada à resposta ao estresse (HUCK et al., 2019; WU et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Após 12 h de tratamento, uma resposta adaptativa foi evidente com o aumento de *CYP1A1*, que sugere o envolvimento do fator de transcrição AhR (Kubešová et al., 2016), e a modulação positiva de *CYP2B6* e *CYP2C9*, possivelmente relacionada à ativação dos receptores nucleares CAR e PXR, reativando mecanismos de biotransformação e detoxificação celular (KANNO et al., 2016). O aumento do mRNA de *GST*, enzima da fase II do metabolismo, indica a ativação de vias de conjugação com glutathiona para neutralizar espécies eletrofílicas e eliminar metabólitos tóxicos, mediadas por Nrf2, CAR e PXR (ROONEY et al., 2018). Esse achado é consistente com a indução de *SLC7A11*, discutida anteriormente, cuja função na captação de cistina sustenta a biossíntese de glutathiona, ampliando a resposta antioxidante (HE et al., 2023; MATHEW et al., 2024; PECCHILLO CIMMINO et al., 2024). A modulação positiva de *HNF4α* nesse ponto pode refletir a transição do estresse agudo para a restauração metabólica, compatível com a reativação de CYPs e mecanismos de tolerância celular ao composto (HUCK et al., 2019; WU et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a formulação lipossomal PEGuilada da FlpC potencializa a atividade citotóxica em células HepG2/C3A. A eficácia aprimorada é atribuída à indução de morte celular não apoptótica por necroptose, com alterações morfológicas e disrupções mitocondriais e do retículo endoplasmático. Este trabalho estabelece, pela primeira vez em esferoides tumorais hepáticos, que a FlpC-PEG modula genes associados ao metabolismo hepático, estresse oxidativo, dano ao DNA e vias de morte celular, caracterizando um perfil de ação multifatorial. A integração entre modelos 2D e 3D ampliou a compreensão da resposta celular, evidenciando mecanismos distintos que reforçam a complexidade da ação da FlpC-PEG. Esses achados posicionam a FlpC-PEG como um metalofármaco promissor para estudos pré-clínicos e ampliam o conhecimento sobre o metabolismo celular induzido por compostos organocúpricos encapsulados.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, Y. A. *et al.* Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. *Chemistry & Biology*, v. 16, n. 7, p. 712–723, jul. 2009.
- AGRAWAL, Surendra S.; BALIGA, Vrinda; LONDHE, Vaishali Y. Liposomal Formulations: A Recent Update. *Pharmaceutics*, v. 17, n. 1, p. 36, 2024.
- ALAJROUSH, Duaa Rashad. Use of Cobalt (III) and Copper (II) Complexes With Thiosemicarbazone Ligands and Berberine Chloride as Anti-Cancer Agents Against Triple Negative Breast Cancer. 2024.
- AL-ARAFAT, Tusher- *et al.* Exploring the Role of p53 in Radiosensitivity: A Key Player in Cancer Therapy. *Radiation*, v. 4, n. 4, p. 309-324, 2024.
- ALVES DE LIMA, Luan Vitor *et al.* DNA damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotoc cell death of MCF-7 cells treated with fluopsin C. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 85, n. 21, p. 896-911, 2022.
- ANGIREDDY, Rajesh *et al.* Alcohol-induced CYP2E1, mitochondrial dynamics and retrograde signaling in human hepatic 3D organoids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 159, p. 1-14, 2020.
- BAGHERPOOR, Alireza Jian *et al.* Inhibition of lung adenocarcinoma by combinations of sulfasalazine (SAS) and disulfiram-copper (DSF-Cu) in cell line models and mice. *Carcinogenesis*, v. 44, n. 4, p. 291-303, 2023.
- BALSA, Lucia M.; BARAN, Enrique J.; LEÓN, Ignacio E. Copper complexes as antitumor agents: *In vitro* and *in vivo* evidence. *Current medicinal chemistry*, v. 30,

n. 5, p. 510-557, 2023.

BELLE, J. I. *et al.* Repression of p53-target gene Bbc3/PUMA by MYSM1 is essential for the survival of hematopoietic multipotent progenitors and contributes to stem cell maintenance. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 5, p. 759-775, 2016.

BIELINSKY, Anja-Katrin *et al.* Responses to replication stress in human cells. **The FASEB Journal**, v. 33, n. S1, p. 345.1-345.1, 2019.

CHEN, Dongshi *et al.* PUMA amplifies necroptosis signaling by activating cytosolic DNA sensors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 15, p. 3930-3935, 2018.

CHEN, Dongshi *et al.* PUMA/RIP3 mediates chemotherapy response via necroptosis and local immune activation in colorectal cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 354-367, 2024.

CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY, Saranya; FISHER, Paul B.; SARKAR, Devanand. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. **Advances in cancer research**, v. 149, p. 1-61, 2021.

CHOI, Kyoungju; JOO, Hyun. Assessment of gold nanoparticles-inhibited cytochrome P450 3A4 activity and molecular mechanisms underlying its cellular toxicity in human hepatocellular carcinoma cell line C3A. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, p. 1-12, 2018.

COLTMAN, Nicholas J. *et al.* Application of HepG2/C3A liver spheroids as a model system for genotoxicity studies. **Toxicology letters**, v. 345, p. 34-45, 2021.

DA SILVA, Matheus Felipe *et al.* Diosgenin increases BBC3 expression in HepG2/C3A cells and alters cell communication in a 3D spheroid model. **Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 879, p. 503512, 2022.

DE OLIVEIRA, Admilton Goncalves *et al.* Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 113, 2016.

EGAWA, Yoshiyuki *et al.* Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. I. **The Journal of antibiotics**, v. 23, n. 6, p. 267-270, 1970.
DOI:<https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.267>

FULTON, Melody D.; NAJAH-MISSAOUI, Wided. Liposomes in cancer therapy: how did we start and where are we now. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6615, 2023.

GAÁL, Anikó *et al.* Development and in vivo application of a water-soluble anticancer copper ionophore system using a temperature-sensitive liposome formulation. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 466, 2020.

GARCIA-PARDO, M. E.; SIMPSON, J. C.; O'SULLIVAN, N. C. A novel automated image analysis pipeline for quantifying morphological changes to the endoplasmic reticulum in cultured human cells. *BMC Bioinformatics*, v. 22, n. 1, p. 427, 8 set. 2021.

GOMES, Nathan P. *et al.* A high throughput screen with a clonogenic endpoint to identify radiation modulators of cancer. *Radiation research*, v. 199, n. 2, p. 132-147, 2023.

HAN, Xiao *et al.* Mitochondria UPR stimulation by pelargonidin-3-glucoside contributes to ameliorating lipid accumulation under copper exposure. *Science of The Total Environment*, v. 942, p. 173603, 2024.

HANSEN, Anders E. *et al.* Positron emission tomography based elucidation of the enhanced permeability and retention effect in dogs with cancer using copper-64 liposomes. *ACS nano*, v. 9, n. 7, p. 6985-6995, 2015.

HE, Feng *et al.* ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis. *Journal of hepatology*, v. 79, n. 2, p. 362-377, 2023.

HICKEY, James L. *et al.* Intracellular distribution of fluorescent copper and zinc bis (thiosemicarbazonato) complexes measured with fluorescence lifetime spectroscopy. *Inorganic Chemistry*, v. 54, n. 19, p. 9556-9567, 2015.

HUCK, Ian *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 alpha activation is essential for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology*, v. 70, n. 2, p. 666-681, 2019.

KACAR, Sedat; UNVER, Hakan; SAHINTURK, Varol. A mononuclear copper (II) complex containing benzimidazole and pyridyl ligands: Synthesis, characterization, and antiproliferative activity against human cancer cells. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 4310-4323, 2020.

KALYANE, Dnyaneshwar *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Materials Science and Engineering: C*, v. 98, p. 1252-1276, 2019.

KANNO, Yuichiro *et al.* Differences in gene regulation by dual ligands of nuclear receptors constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) in HepG2 cells stably expressing CAR/PXR. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 44, n. 8, p. 1158-1163, 2016.

KE, N. *et al.* The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 33-43.

KHO, D. *et al.* Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*, v. 5, n. 2, p. 199-222, 16 abr. 2015.

KUBEŠOVÁ, Kateřina *et al.* Mixed-ligand copper (II) complexes activate aryl hydrocarbon receptor AhR and induce CYP1A genes expression in human hepatocytes and human cell lines. **Toxicology letters**, v. 255, p. 24-35, 2016.

LEUNG, Ada WY *et al.* DMPC/Chol liposomal copper CX5461 is therapeutically superior to a DSPC/Chol formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 345, p. 75-90, 2022.

LI, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. **European journal of medicinal chemistry**, v. 164, p. 640-653, 2019.

MAHENDIRAN, Dharmasivam *et al.* Copper complexes as prospective anticancer agents: *in vitro* and *in vivo* evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest. **RSC advances**, v. 8, n. 30, p. 16973-16990, 2018.

MANSILLA, Sabrina Florencia *et al.* CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication. **Genes**, v. 11, n. 6, p. 593, 2020.

MIYAMURA, Sadao *et al.* An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas* origin. **The Journal of antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 369-370, 1972. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.25.369>

MOHANTY, Suchitra *et al.* RETRA induces necroptosis in cervical cancer cells through RIPK1, RIPK3, MLKL and increased ROS production. **European journal of pharmacology**, v. 920, p. 174840, 2022.

MOLINARO, Caroline *et al.* Copper complexes as anticancer agents targeting topoisomerases I and II. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2863, 2020.

NAVARRO, Miguel Octavio Pérez *et al.* Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: *in vitro* activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2431, 2019.

NAZIO, Francesca *et al.* mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. **Nature cell biology**, v. 15, n. 4, p. 406-416, 2013.

NOH, Kyung Hee *et al.* Ubiquitination of PPAR-gamma by pVHL inhibits ACLY expression and lipid metabolism, is implicated in tumor progression. **Metabolism**, v. 110, p. 154302, 2020.

NUNES, Ana S. *et al.* 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2019.

O'BRIEN, Mary ER *et al.* Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Annals of oncology**, v. 15, n. 3, p. 440-449, 2004.

OLAISEN, Camilla *et al.* Multiple Myeloma Cells with Increased Proteasomal and ER Stress Are Hypersensitive to ATX-101, an Experimental Peptide Drug Targeting PCNA. **Cancers**, v. 16, n. 23, p. 3963, 2024.

PARVEEN, S. *et al.* Enantiomeric copper based anticancer agents promoting sequence-selective cleavage of G-quadruplex telomeric DNA and non-random cleavage of plasmid DNA. **Metallomics**, v. 12, n. 6, p. 988–999, 1 jun. 2020.

PECCHILLO CIMMINO, Tiziana *et al.* Formyl-Peptide Receptor 2 Signaling Modulates SLC7A11/xCT Expression and Activity in Tumor Cells. **Antioxidants**, v. 13, n. 5, p. 552, 2024.

PENDIN, D.; FILADI, R.; PIZZO, P. The Concerted Action of Mitochondrial Dynamics and Positioning: New Characters in Cancer Onset and Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 7, 22 maio 2017.

PINTO, Giulia *et al.* Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 1, p. 21-39, 2021.

RØST, Lisa M. *et al.* PCNA has specific functions in regulation of metabolism in haematological cells. **bioRxiv**, p. 2020.04. 29.067512, 2020.

ROY, Sayoni Maitra *et al.* 3D multicellular tumor spheroids used for *in vitro* preclinical therapeutic screening. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 86, p. 104636, 2023.

SANGEETHA, S.; MURALI, M. Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu(quamol)Cl]·H₂O. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2501–2511, fev. 2018.

SARKARI, Akshat; LOU, Emil. Do tunneling nanotubes drive chemoresistance in solid tumors and other malignancies?. **Biochemical Society Transactions**, v. 52, n. 4, p. 1757-1764, 2024.

SHEN, Wen-Ying *et al.* Copper (II) complex enhanced chemodynamic therapy through GSH depletion and autophagy flow blockade. **Dalton Transactions**, v. 52, n. 11, p. 3287-3294, 2023.

SIMONE, L. *et al.* GFAP serves as a structural element of tunneling nanotubes between glioblastoma cells and could play a role in the intercellular transfer of mitochondria. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1221671, 2023.

ŠTAMPAR, Martina *et al.* Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 143255, 2021.

SUN, Wen *et al.* Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human

colon cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 433-444, 2017.

TANG, Lichen *et al.* Cardiac safety and efficacy for patients with early-stage breast cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin (PLD) or doxorubicin. 2023.

TICLI, Giulio *et al.* Revisiting the function of p21CDKN1A in DNA repair: The influence of protein interactions and stability. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 13, p. 7058, 2022.

TSAI, Chia-Han *et al.* Docosahexaenoic acid promotes the formation of autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells through oxidative stress-induced growth inhibitor 1 mediated activation of AMPK/mTOR pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 154, p. 112318, 2021.

VARADARAJAN, Shankara Narayanan *et al.* Real-time visualization and quantitation of cell death and cell cycle progression in 2D and 3D cultures utilizing genetically encoded probes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 123, n. 4, p. 782-797, 2022.

VOSS, Linn *et al.* Impact of iron oxide nanoparticles on xenobiotic metabolism in HepaRG cells. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 4023-4035, 2020.

WANG, Yonggang *et al.* PKM2 inhibitor shikonin overcomes the cisplatin resistance in bladder cancer by inducing necroptosis. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 13, p. 1883, 2018.

WILKENING, Stefan; STAHL, Frank; BADER, Augustinus. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. **Drug metabolism and disposition**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.

WU, Heng *et al.* A negative reciprocal regulatory axis between cyclin D1 and HNF4 α modulates cell cycle progression and metabolism in the liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 29, p. 17177-17186, 2020.

XIA, Ying *et al.* A lipid droplet-targeted fluorescence probe for visualizing exogenous copper (II) based on LLCT and LMCT. **Talanta**, v. 188, p. 178-182, 2018.

XIE, Liping *et al.* Expression and prognostic significance of the P53-related DNA damage repair proteins checkpoint kinase 1 (CHK1) and growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (GADD45A) in human oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Oral Sciences**, v. 128, n. 2, p. 128-135, 2020.

YE, Meiling *et al.* Size- and time-dependent alteration in metabolic activities of human hepatic cytochrome P450 isozymes by gold nanoparticles via microsomal incubations. **Nanoscale research letters**, v. 9, p. 1-16, 2014.

ZHANG, Hai-feng *et al.* Variation in the expression of cytochrome P450-related miRNAs and transcriptional factors in human livers: Correlation with cytochrome P450 gene phenotypes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 412, p. 115389, 2021.

ZHAO, Xu *et al.* RIP3 mediates TCN-induced necroptosis through activating mitochondrial metabolism and ROS production in chemotherapy-resistant cancers. **American journal of cancer research**, v. 11, n. 3, p. 729, 2021.

ZHENG, Fuli *et al.* Intercellular transfer of mitochondria via tunneling nanotubes protects against cobalt nanoparticle-induced neurotoxicity and mitochondrial damage. **Nanotoxicology**, v. 15, n. 10, p. 1358-1379, 2021.

ZHONG, Yi *et al.* Zinc finger protein 91 mediates necroptosis by initiating RIPK1-RIPK3-MLKL signal transduction in response to TNF receptor 1 ligation. **Toxicology Letters**, v. 356, p. 75-88, 2022.

6 CONCLUSÃO GERAL

A presente tese demonstrou que a nanoencapsulação da Fluopsina C (FlpC) em lipossomas PEGuilados (FlpC-PEG) constitui uma estratégia eficaz para potencializar a atividade citotóxica da molécula e modular vias moleculares relevantes em esferoides tumorais humanos. A formulação foi avaliada em dois modelos tridimensionais distintos: NCI-H460, representativo do carcinoma pulmonar de células não pequenas, e HepG2/C3A, modelo amplamente utilizado em estudos de metabolismo hepático e toxicologia.

Em ambos os modelos, a FlpC-PEG apresentou maior eficácia antiproliferativa em comparação à sua forma livre, com inibição da proliferação, indução de danos morfológicos e perda da viabilidade celular. Notavelmente, a formulação desencadeou mecanismos de morte celular não convencionais, com envolvimento de vias de necroptose, ferroptose e cuproptose, além da modulação de genes relacionados ao estresse celular, metabolismo de xenobióticos, autofagia e ciclo celular. Os achados obtidos em esferoides de HepG2/C3A destacam a capacidade da FlpC-PEG em alterar vias metabólicas hepáticas e sugerem um efeito sustentado, mesmo após a retirada do tratamento. Já nos esferoides de NCI-H460, a modulação mitocondrial e a indução de cuproptose e ferroptose reforçam a natureza multifatorial da ação da formulação.

Além disso, o uso de modelos 3D demonstrou ser um sistema mais robusto para a avaliação da eficácia terapêutica *in vitro*, por se aproximar do microambiente tumoral *in vivo*. As respostas observadas no modelo 3D reforçam a importância dos esferoides na predição de efeitos farmacológicos e toxicológicos, especialmente na triagem de novas metalodrogas.

Como recomendação para trabalhos futuros, sugere-se: (i) a investigação aprofundada da contribuição relativa de cada via de morte celular identificada, por meio de inibição farmacológica seletiva ou silenciamento gênico (knockdown); (ii) a realização de estudos em modelos animais com o objetivo de validar a eficácia *in vivo* da formulação; e (iii) a avaliação do perfil farmacocinético e da toxicidade sistêmica da FlpC-PEG, com especial atenção à biodistribuição e à possível biotransformação do composto em tecidos não tumorais.

Por fim, esta pesquisa amplia o conhecimento sobre o comportamento celular frente a compostos organocúpricos nanoencapsulados, evidenciando seu

potencial na indução de múltiplas vias de morte celular não apoptótica. Esses achados oferecem uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras contra tumores hepáticos e pulmonares. Nesse contexto, a FlpC-PEG se destaca como uma candidata promissora no cenário das terapias inovadoras, ao explorar vias alternativas de morte celular como alvos farmacológicos relevantes.

APÊNDICE

APÊNDICE A

MATERIAL SUPLEMENTAR – LINHAGEM NCI-H460

Tabela 1 - Viabilidade celular (ensaio de resazurina): porcentagem média relativa de viabilidade celular na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Tratamento	Viabilidade Celular (%)	
	<i>FpIC-PEG</i>	<i>FIpC livre</i>
CN	100	100
CV	99.76 ± 1.5	101.7 ± 0.9
0.4 µM	101.8 ± 5	101.8 ± 0.4
0.8 µM	91.87 ± 2.2 *	101 ± 2.9
1.0 µM	56.75 ± 1.8 *	97.41 ± 2.4
1.2 µM	29.78 ± 1.3 *	96.39 ± 0.4
1.4 µM	22.28 ± 1.3 *	96.14 ± 3.7
1.6 µM	17.18 ± 0.7 *	81.86 ± 7.8 *
1.8 µM	7.36 ± 0.6 *	80.44 ± 2.6 *
2.0 µM	6.37 ± 0.7 *	74.39 ± 3.8 *
CP	24.88 ± 2.2 *	28.59 ± 2.7 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo (para PL-FIpC: lipossoma vazio; para FIpC livre: DMSO 0,0066%); CP, Doxorubicina 2 µM).

Figura 1 - Microfotografias de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com Fluopsina C Lipossomal PEGuilada (FlpC). CN, controle negativo; CV, controle de veículo (Lipossoma vazio); CP, doxorubicina 2 μM ; B, branco.

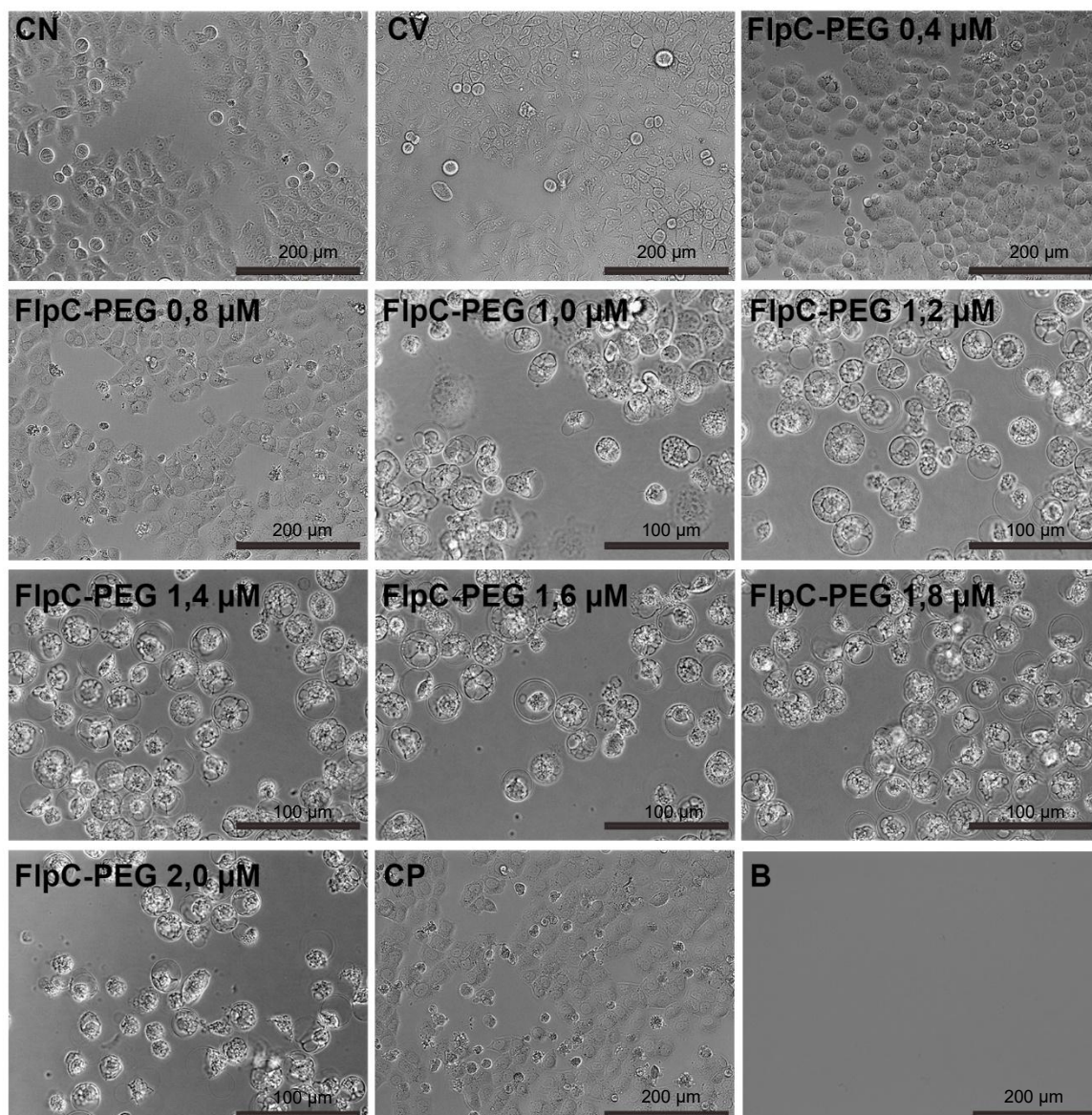


Figura 2 - Microfotografias de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com Fluopsina C livre. CN, controle negativo; CV, controle de veículo (DMSO 0,006%); CP, doxorubicina 2 μM ; B, branco.

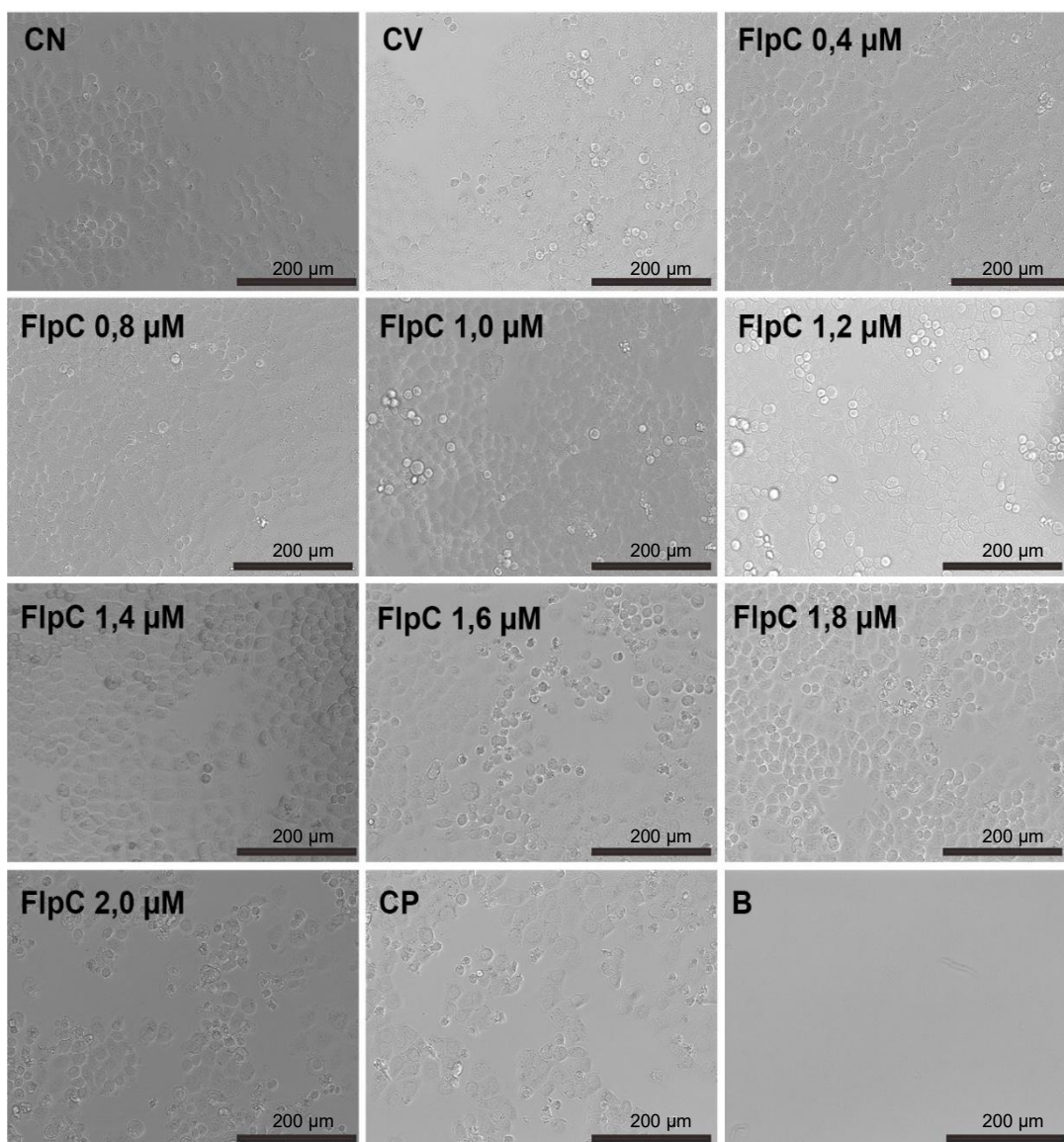


Tabela 2 – Índice Celular Normalizado de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) nos tempos 0, 3, 6, 16 e 24h de exposição a formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Tempo	Índice Celular Normalizado (NCIt)					
	Tratamentos					
	Lipossoma Vazio	FlpC 1,0 µM	PL-FlpC 0,75 µM	PL-FlpC 0,88 µM	PL-FlpC 1,0 µM	Doxorrubicina 2 µM
0 h	0,9751 ± 0,0057	0,9727 ± 0,0101	0,9735 ± 0,0099	0,9768 ± 0,0095	0,9819 ± 0,0092	0,9782 ± 0,0077
3 h	1,081 ± 0,02391	1,085 ± 0,00299	1,077 ± 0,02414	1,142 ± 0,01361*	1,192 ± 0,01996*	1,138 ± 0,00523*
6 h	1,216 ± 0,03401	1,205 ± 0,00319	1,226 ± 0,01490	1,210 ± 0,00801	1,186 ± 0,05232	1,209 ± 0,01658
12 h	1,508 ± 0,07518	1,513 ± 0,03117	1,504 ± 0,06097	1,410 ± 0,08749	0,9218 ± 0,1313*	1,310 ± 0,04196*
24 h	1,785 ± 0,08437	1,757 ± 0,10400	1,820 ± 0,13920	1,430 ± 0,16240*	0,5421 ± 0,0961*	1,139 ± 0,08077*

(*) $p < 0,05$ em relação ao controle do veículo (lipossoma vazio) no mesmo ponto de tempo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± desvio padrão.

Tabela 3 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em monocamada (2D). Porcentagem média relativa do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Distribuição do conteúdo de DNA (%)				
Tratamento	Fases do ciclo			
	<i>Sub-G1</i>	<i>G1</i>	<i>S</i>	<i>G2/M</i>
CV	0,65 ± 0,05	52,47 ± 0,84	16,35 ± 0,92	30,4 ± 0,71
FlpC Livre 1 µM	1,08 ± 0,14	54,17 ± 0,64	12,05 ± 0,46 *	31,92 ± 1,05
FlpC-PEG IC _{12,5}	0,74 ± 0,08	54,39 ± 0,57	12,21 ± 1,16 *	32,67 ± 0,85
FlpC-PEG IC ₂₅	1,33 ± 0,36	56,06 ± 0,59 *	11,24 ± 1,45 *	31,37 ± 0,70
FlpC-PEG IC ₅₀	3,18 ± 0,64 *	59,12 ± 1,19 *	6,96 ± 0,27 *	30,88 ± 1,6
CP	11,84 ± 1,67 *	62,01 ± 1,20 *	6,5 ± 0,69 *	18,31 ± 2,31 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0066%); CP, Camptotecina 10 µM).

Tabela 4 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em esferoides tumorais (3D). Porcentagem média relativa do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Tratamento	Distribuição do conteúdo de DNA (%)			
	Sub-G1	G1	S	G2/M
Lipossova Vazio	7,03 ± 1,00	59,73 ± 0,68	11,83 ± 0,90	21,37 ± 1,26
FlpC Livre 1 µM	6,63 ± 0,91	60,64 ± 0,75	9,83 ± 0,77	22,89 ± 1,65
FlpC-PEG 1/2 IC ₅₀	8,26 ± 1,24	61,03 ± 2,44	10,72 ± 1,13	20,06 ± 1,78
FlpC-PEG IC ₅₀	7,6 ± 1,14	62,29 ± 0,96	8,25 ± 0,46 *	21,66 ± 1,58
FlpC-PEG 2 x IC ₅₀	10,95 ± 1,61 *	64,21 ± 0,63 *	4,52 ± 0,90 *	19,95 ± 2,43
CP	13,23 ± 3,01 *	70,39 ± 2,57 *	3,30 ± 0,12 *	13,24 ± 0,64 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0066%); CP, Camptotecina 10 µM).

Tabela 5 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em monocamada (2D). Porcentagem média relativa do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Ensaio de morte celular por citometria de fluxo			
Tratamento	Vivas	Apoptose Total	Morte Não Apoptótica
Lipossoma Vazio	91,98 ± 1,31	5,93 ± 0,76	2,09 ± 0,66
DMSO	91,16 ± 0,98	6,36 ± 0,51	2,48 ± 0,60
FlpC-PEG IC _{12,5}	90,56 ± 0,45	6,74 ± 0,23	2,70 ± 0,37
FlpC-PEG IC ₂₅	87,19 ± 0,97 *	7,28 ± 0,39	5,53 ± 0,58 *
FlpC-PEG IC ₅₀	77,35 ± 1,81 *	7,38 ± 0,44	14,92 ± 2,59 *
FlpC Livre	86,21 ± 1,72 *	6,89 ± 0,61	6,90 ± 1,22 *
CPT (10 µM)	56,76 ± 3,80 *	25,03 ± 1,99 *	18,08 ± 1,70 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo lipossoma livre, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0066%); CP, Camptotecina 10 µM).

Tabela 6 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em esferoides tumorais (3D). Porcentagem média relativa do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Ensaio de morte celular por citometria de fluxo			
Tratamento	Vivas	Apoptose Total	Morte Não Apoptótica
Lipossoma Vazio	53,64 ± 0,21	4,91 ± 0,38	41,46 ± 0,54
DMSO	53,03 ± 0,66	4,48 ± 0,19	42,49 ± 0,85
FlpC-PEG 1/2 IC ₅₀	48,37 ± 1,23 *	3,94 ± 0,16	46,94 ± 0,11 *
FlpC-PEG IC ₅₀	44,34 ± 1,48 *	5,65 ± 0,82	49,85 ± 0,83 *
FlpC-PEG 2 x IC ₅₀	41,43 ± 0,52 *	6,64 ± 0,11	51,92 ± 0,42 *
FlpC Livre 1 µM	46,53 ± 1,02 *	4,82 ± 0,36	48,65 ± 0,66 *
CPT (10 µM)	49,81 ± 1,28 *	19,54 ± 1,90 *	30,64 ± 0,93 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo lipossoma livre, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0066%); CP, Camptotecina 10 µM).

Figura 3 - Microfotografias de esferoides tumorais de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento com as formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada (FlpC) e fluopsina livre. DMSO 0,0066%; FlpC livre 1 μ M; CP, doxorubicina 8 μ M; B, branco.

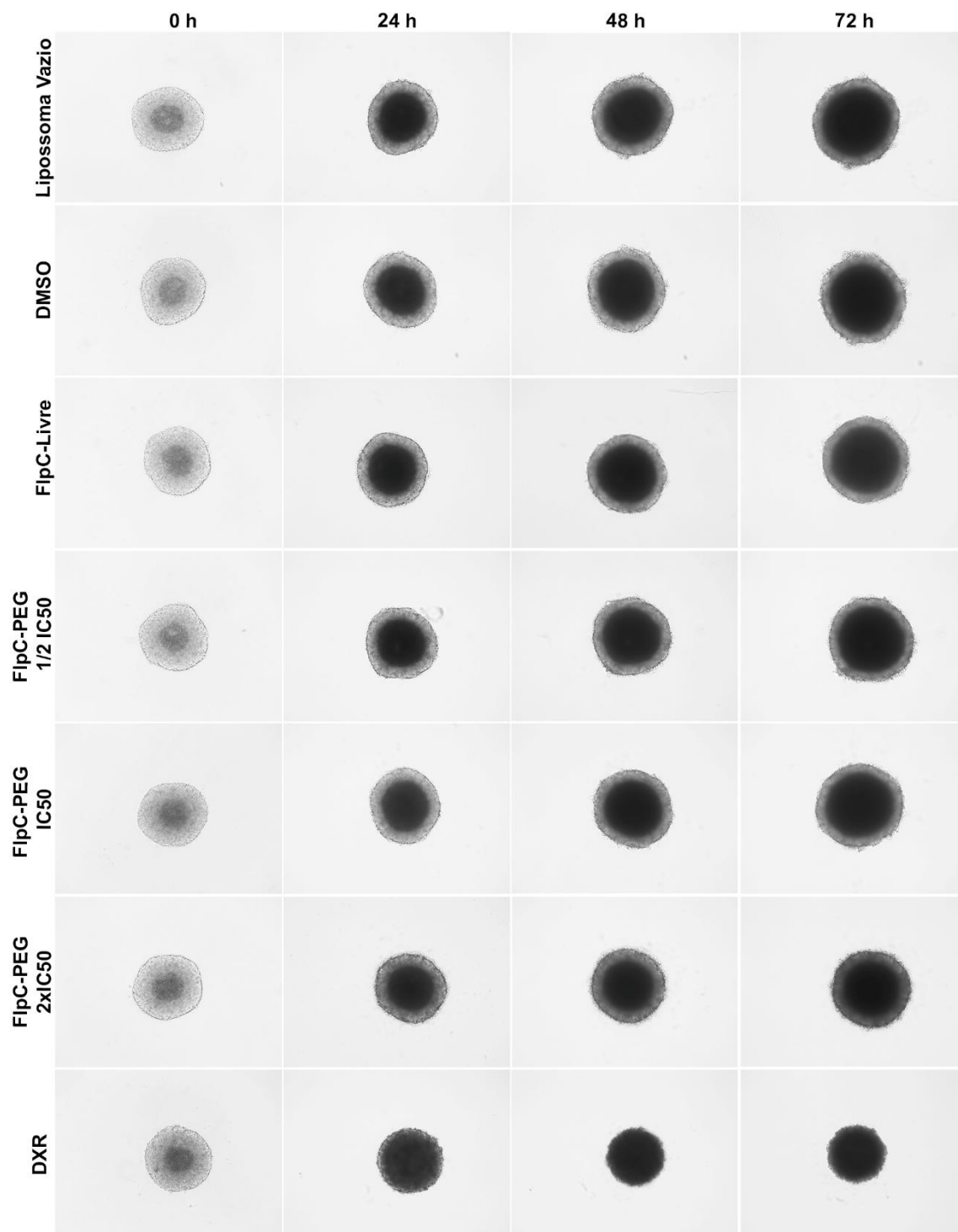


Tabela 7 – Sequências iniciadoras dos genes avaliados em RT-qPCR

Categoria	Gene	Forward	Reverse
Regulação do ciclo celular	<i>TP53</i>	5' ACCTATGGAAACTACTTCTCG 3'	5' ACCATTGTTCAATATCGTCC 3'
	<i>TP73</i>	5'-CATGGAGACGAGGACACGTAAC-3'	5'-CTCCATCAGCTCCAGGCTCT-3'
	<i>CMYC</i>	5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3'	5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'
	<i>CDKN1A</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 5'	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'
	<i>BIRC5</i>	5' CATCTCTACATTCAAGAACTGG 3'	5' CCTTGAAGCAGAAGAAACAC 3'
Cuproptose	<i>FDX1</i>	5'-AGATATTGATGGGCTTTGGTG-3'	5'-CAGTGATTGCATCAACTCTC-3'
	<i>SLC31A1</i>	5'-TGATGCCTAGTCACCTTCTC-3'	5'-GAATGCTGACTTGTGACTTAC-3'
	<i>MTF1</i>	5'-CACCTTTGTGTAACCAAGG-3'	5'-CCTGTACAGTGTGTTGAATG-3'
	<i>DLAT</i>	5'-GGTTTTGAGTACAGAGAAG-3'	5'-TACAATGATACAGAGTGGGG-3'
	<i>LIPT1</i>	5'-GATTCTGAAGTCAACTCGC-3'	5'-CTGTAATCTCAGCTACTCGG-3'
	<i>ATP7B</i>	5'-AAAGAGCAAACCTCAGAAG-3'	5'-CCCTGATGATTAATTGTCTC-3'
	<i>BBC3</i>	5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G 3'	5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'
	<i>CDKN2A</i>	5'-ACATGGAGCCCTTCG-3'	5'-ATCATGACCTGGATCGG-3'
	<i>SOD1</i>	5' CTAGCGACTTATGGCGAC 3'	5' GAATGTTTATTGGGCGATC 3'
Ferroptose	<i>GPX4</i>	5'-GAGGTAACACTCACTCAGCTC-3'	5'-CTCTTTGACTCTTCGTACTC-3'
	<i>GPX1</i>	5' CTC CCC TTA CAG TGC TTG TTC G 3'	5' CGA TGT CAA TGG TCT GGA AG 3'
	<i>SLC7A11</i>	5' TTTGCACCCCTTTGACAATGA 3'	5' GGAAAACAAAGCTGGGATGA 3'
	<i>SLC3A2</i>	5'-CCAGGAAGGGATGATGTCGCTCAG-3'	5'-GAGTAAGGTCCAGAAGTGACAGG-3'
	<i>ACSL4</i>	5' ATAAAGCAGAGTACCCTGAAG 3'	5' CAAGTTTTCTGGTTAGATCC 3'
	<i>NRF2</i>	5' GAGAGCCCAGTCTTCATTGC 3'	5' GTTTGGCTTCTGGACTTGA 3'
	<i>NQO1</i>	5' AGCCAGATATTGTGGCTGA 3'	5' CGGAAGGGTCTTTGTGATA 3'
	<i>ATF4</i>	5'-TCAAACCTCATGGTCTCTCC-3'	5'-GCATGGTTTTCCAGGTCATCT-3'
	<i>TFRC</i>	5' AAGATTCAGGTCAAAGACAG 3'	5' CTTACTATACGCCACATAACC 3'
	<i>GCLM</i>	5'-TGTGTGATGCCACCAGATT-3'	5'-TTCACAATGACCGAATACCG-3'
	<i>GSR</i>	5' TTCCAGAATACCAACGTCAAAGG 3'	5' GTTTTCGGCCAGCAGCTATTG 3'
Necroptose	<i>RIPK1</i>	5' TGATAATACCACTAGTCTGACG 3'	5' ACAGTTTTTCCAGTCTTTC 3'
	<i>RIPK3</i>	5' AACTTTCAGAAACCAGATGC 3'	5' GTTGTATATGTTAACGAGCGG 3'
	<i>MLKL</i>	5' GTGAAGAATGTGAAGACTGG 3'	5' AAGATTTTCATCCACAGAGGG 3'
Autofagia	<i>SQSTM1</i>	5' TCCGAGTGTGAATTTCTCG 3'	5' AGCTGCCCACTCTCCC 3'
	<i>BECN1</i>	5' CAG TAT CAG AGA GAA TAC AGT G 3'	5' TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC 3'
	<i>MTOR</i>	5' TTG CTT GAG GTG CTA CTG 3'	5' CTG ACT TGA CTT GGA TTC TG 3'
Estresse do retículo endoplasmático	<i>ERN1</i>	5' ACG GAC GTC AAG TTT GAT CC 3'	5' TTG GTA GAC GCA GAC AGT GG 3'
	<i>TRAF2</i>	5' GCCCAAGTTCCCTTAAC 3'	5' GAATCTGCAAGGGACTCGAC 3'
	<i>HSPA5</i>	5' GTGGAATGACCCGTCTGTG 3'	5' TGCCACCTCCAATATCAAC 3'
Danos ao DNA	<i>GADD45A</i>	5' TCA GCG CAC GAA GAC TGT C 3'	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'
	<i>PARP1</i>	5' AAAAGGAGGTGGAAAAGATG 3'	5' GCTAAGAACAACCTCTGAAG 3'
Genes constitutivos	<i>GAPDH</i>	5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'	5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'
	<i>ACTB</i>	5' GAC GAC ATG GAG AAA ATC TG 3'	5' ATG ATC TGG GTC ATC TTC TC 3'

Tabela 8 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR

GENE	Fold-Change	Log2 Fold-change	Teste-t p-valor	Valores de CT's					
				CV1	CV2	CV3	T1	T2	T3
House-Keeping									
<i>GAPDH</i>	-	-	-	14,08	14,55	14,10	14,71	14,16	14,14
<i>ACTNB</i>	-	-	-	14,53	14,05	14,87	14,37	14,06	14,47
Genes-alvo									
<i>TP53</i>	-6,7	-2,75	0,008*	24,39	25,15	26,17	27,51	27,95	28,37
<i>TP73</i>	10,1	3,34	0,006*	35,40	33,72	35,05	32,27	30,92	30,83
<i>CMYC</i>	-2,3	-1,19	0,018*	22,85	22,03	22,44	23,51	23,32	23,92
<i>CDKN1A</i>	-1,4	-0,5	0,333	24,16	23,72	23,30	23,80	24,00	24,75
<i>BIRC5</i>	-1,1	-0,14	0,609	24,26	23,69	23,64	24,04	23,97	23,88
<i>FDX1</i>	1,4	0,47	0,197	27,97	27,50	27,28	27,53	26,95	26,74
<i>SLC31A1</i>	1,6	0,66	0,127	27,60	27,92	27,00	26,90	26,80	26,70
<i>MTF1</i>	3,1	1,62	0,017*	35,96	36,15	35,13	34,52	33,99	33,74
<i>DLAT</i>	2,3	1,22	0,049*	26,40	26,75	26,21	25,50	25,60	24,48
<i>LIPT1</i>	1,2	0,28	0,578	38,78	38,88	38,13	38,33	38,75	37,73
<i>ATP7B</i>	-2,5	-1,34	0,036*	30,49	30,76	30,08	31,41	31,43	32,36
<i>BBC3</i>	-3,7	-1,88	0,004*	32,08	32,70	32,93	34,23	34,24	34,74
<i>SOD1</i>	-1	-0,01	0,971	20,99	20,55	20,14	20,76	20,34	20,48
<i>GPX4</i>	-11,1	-3,48	0,000138*	25,06	24,94	25,88	28,87	28,47	28,83
<i>GPX1</i>	-1	-0,05	0,85	20,91	21,00	20,48	20,86	20,75	20,79
<i>SLC7A11</i>	-3,8	-1,92	0,004*	26,46	25,80	26,45	27,81	28,06	28,47
<i>SLC3A2</i>	1,4	0,45	0,092	22,20	21,94	21,72	21,54	21,30	21,53
<i>ACLS4</i>	1,1	0,13	0,525	27,13	26,86	26,83	26,77	26,54	26,98
<i>NRF2</i>	-1,5	-0,59	0,372	20,62	20,12	20,26	20,06	20,83	21,73
<i>NQO1</i>	-1,4	-0,47	0,417	19,97	19,97	19,43	19,67	20,84	20,14
<i>ATF4</i>	-1,5	-0,56	0,211	20,37	20,39	19,82	20,37	20,88	20,89
<i>RIPK3</i>	4,9	2,28	0,000317*	36,48	36,04	36,30	33,94	33,70	34,20
<i>SQSTM1</i>	3,4	1,78	0,027*	37,69	38,14	36,86	35,41	35,98	35,84
<i>BECN1</i>	-3,5	-1,79	0,032*	36,79	36,27	36,59	38,31	37,28	39,29
<i>MTOR</i>	1,2	0,21	0,567	20,55	20,17	19,72	19,97	20,00	19,71
<i>ERN1</i>	2,2	1,11	0,0028*	31,61	31,79	31,71	30,61	30,64	30,40
<i>HSPA5</i>	1,1	0,09	0,836	30,72	29,79	29,47	29,95	29,84	29,77
<i>GADD45A</i>	2,1	1,1	0,036*	28,80	28,40	27,80	27,30	27,03	27,25
<i>PARP1</i>	1,1	0,09	0,778	27,91	27,54	27,17	27,41	27,34	27,47

(*) indicam diferenças significativas nos valores médios de expressão relativa de mRNA Poli-A dos esferoides tratados em comparação com os do controle de veículo, conforme determinado usando o teste t de Student (log2 fold-change) e valores de fold-change de ≥ 2 ou ≤ -2 .

APÊNDICE B

MATERIAL SUPLEMENTAR HEPG2/C3A

Tabela 1 - Viabilidade celular (ensaio de resazurina): porcentagem média relativa de viabilidade celular na linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Tratamento	Viabilidade Celular (%)	
	<i>FlpC-PEG</i>	<i>FlpC livre</i>
CN	100,0	100,0
CV	98,02 ± 1,6	100,2 ± 2,6
0.05 µM	94,1 ± 0,6	99,38 ± 3,9
0.1 µM	89,31 ± 1,9 *	99,77 ± 2,3
0.2 µM	83,01 ± 0,2 *	98,4 ± 1,18
0.4 µM	62,99 ± 4,1 *	93,42 ± 2,9
0.8 µM	24,38 ± 3,6 *	63,21 ± 2,6 *
CP	46,11 ± 0,36 *	48,49 ± 2,6 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo (para PL-FlpC: lipossoma vazio; para FlpC livre: DMSO 0,0033%); CP, Doxorubicina 2 µM).

Figura 1 - Microfotografias de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 24 h de tratamento com Fluopsina C Lipossomal PEGuilada (FlpC-PEG). CN, controle negativo; CV, controle de veículo (Lipossoma vazio); CP, doxorrubicina 2 μM .

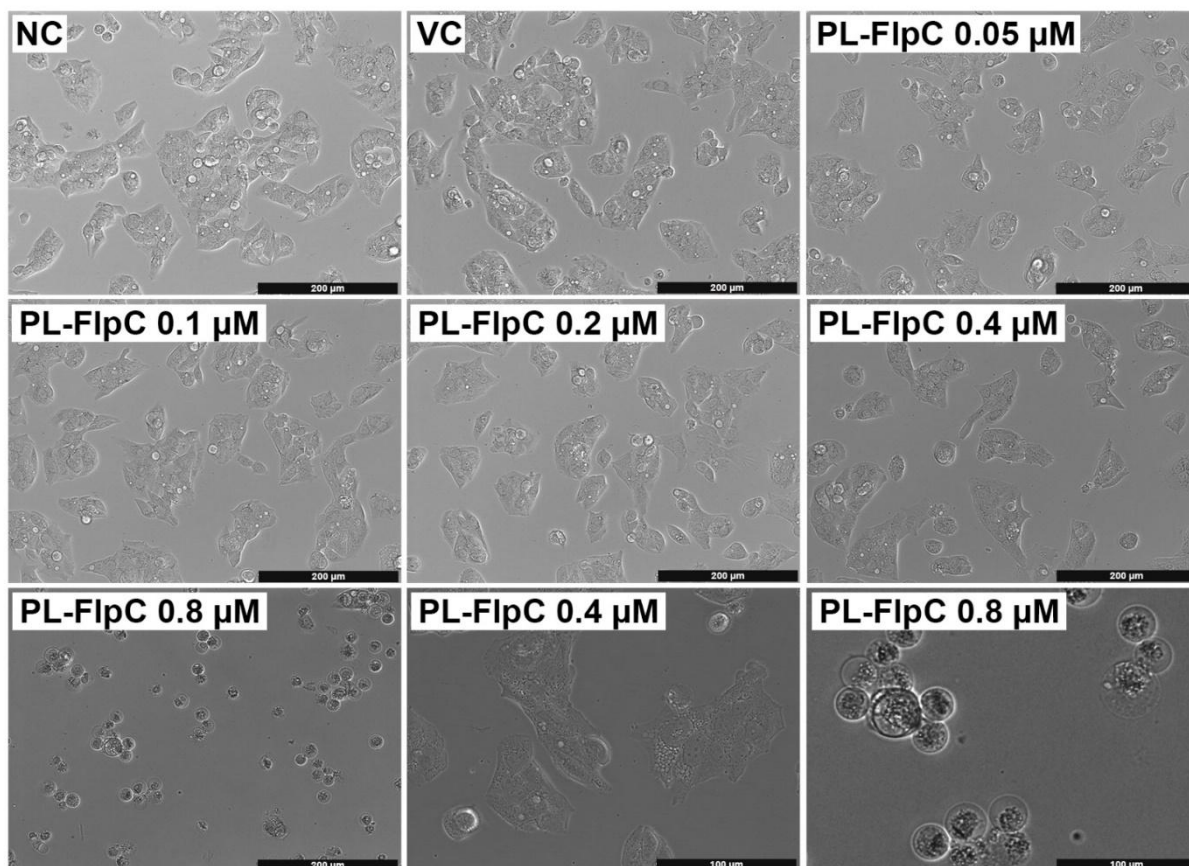


Figura 2 - Microfotografias de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 24 h de tratamento com Fluopsina C livre. CN, controle negativo; CV, controle de veículo (DMSO 0,003%); CP, doxorubicina 2 μ M.

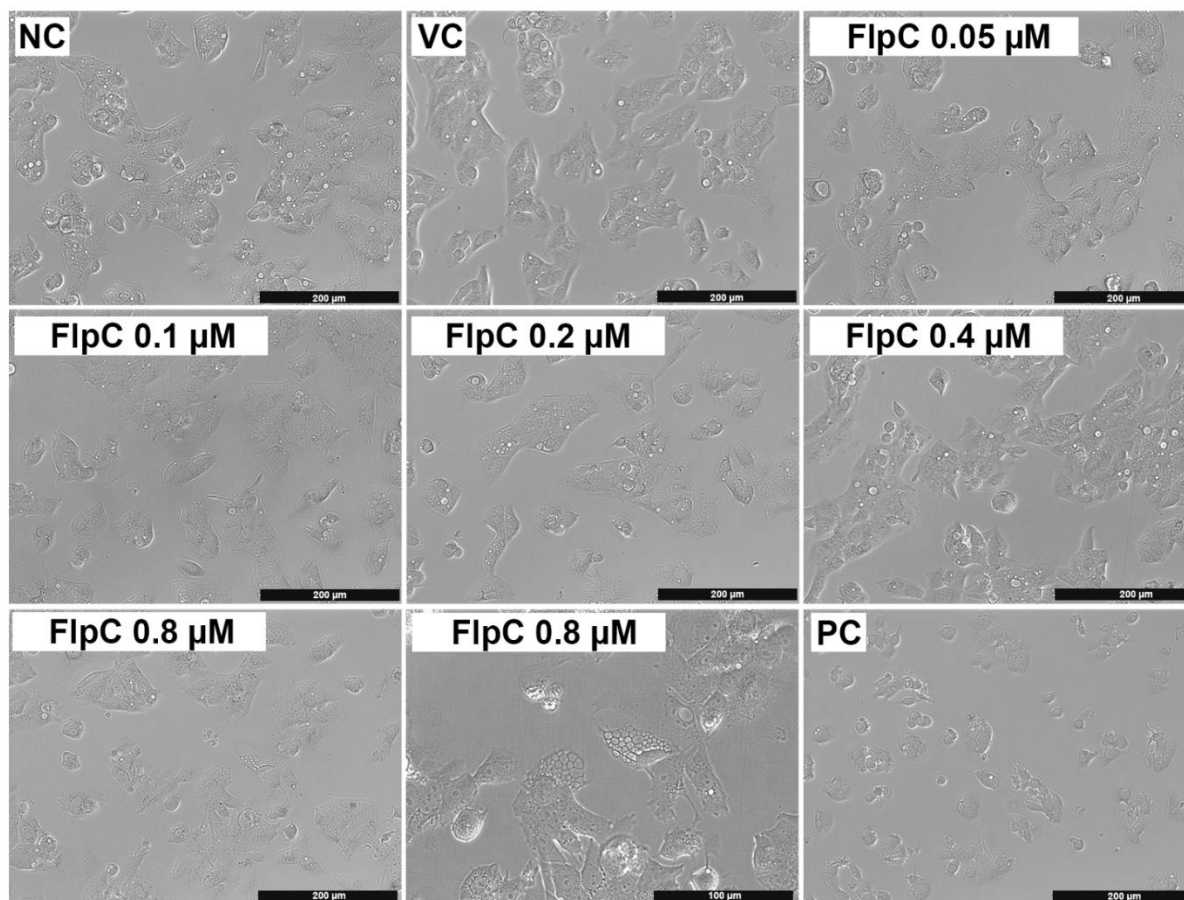


Tabela 2 – **Índice Celular Normalizado** de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48h de exposição a formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

<i>Time point</i>	Normalized Cellular Index (NCIt)					
	<i>Treatments</i>					
	Empty liposome	DMSO 0.003%	FlpC 0.5 μ M	PL-FlpC 0.17 μ M	PL-FlpC 0.26 μ M	PL-FlpC 0.48 μ M
0 h	1 \pm 0.002113	1.001 \pm 0.00091	0.9994 \pm 0.00229	1.001 \pm 0.00103	1 \pm 0.00286	0.99940 \pm 0.00117
6 h	1.177 \pm 0.00388	1.149 \pm 0.01975	1.181 \pm 0.0142	1.158 \pm 0.01679	1.197 \pm 0.00555	1.341 \pm 0.02633 *
12 h	1.383 \pm 0.02654	1.36 \pm 0.02127	1.369 \pm 0.02255	1.353 \pm 0.02849	1.377 \pm 0.02825	1.571 \pm 0.04408 *
24 h	1.836 \pm 0.01861	1.836 \pm 0.06197	1.788 \pm 0.06308	1.772 \pm 0.05231	1.683 \pm 0.0954 *	1.656 \pm 0.03005 *
48 h	2.996 \pm 0.08937	3.059 \pm 0.1908	2.801 \pm 0.2613	2.821 \pm 0.1108	2.444 \pm 0.2348 *	2.077 \pm 0.07508 *

(*) *p*-value \leq 0.05 in relation to the vehicle control (empty liposome) at the same time point, as determined using analysis of variance followed by Dunnett's test. Values expressed as mean \pm S.D.

Figura 3 - Microfotografias de esferoides tumorais de células da linhagem HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento com as formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada (FlpC) e fluopsina livre. DMSO 0,0033%; FlpC livre 0,5 μ M; CP, doxorubicina 2 μ M; B, branco.

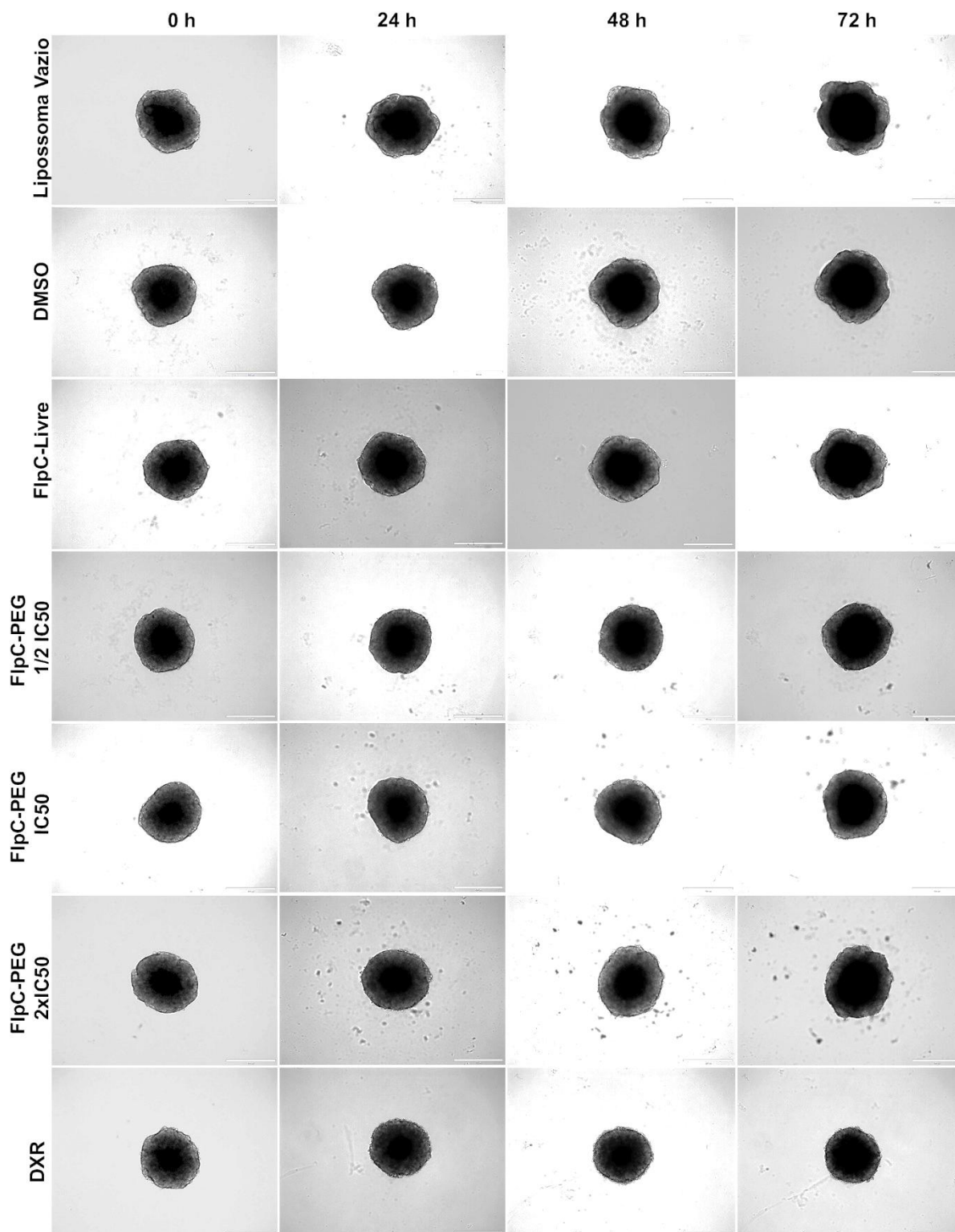


Tabela 3 – Número de colônias formadas a partir de células de esferoides de HepG2/C3A (carcinoma hepatocelular) após 7 dias de cultivo sem tratamento, provenientes de esferoides previamente tratados por 72 horas com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Número de colônias	
Tratamentos	(Média ± D.P.)
Lipossoma Vazio	58,8 ± 3,3
DMSO	60,11 ± 3,1
FlpC Livre	58,2 ± 1,0
FlpC-PEG 1/2 IC50	57,22 ± 4,3
FlpC-PEG IC50	44,4 ± 1,1 *
FlpC-PEG 2xIC50	31,3 ± 5,4 *
DXR	3,7 ± 1,5 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle negativo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. DMSO 0,0033%; DXR, Doxorubicina 2 μ M.

Tabela 4 - Distribuição do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular em esferoides tumorais (3D). Porcentagem média relativa do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Tratamento	Distribuição do conteúdo de DNA (%)			
	Fases do ciclo			
	Sub-G1	G1	S	G2/M
Lipossova Vazio	13,60 ± 0,72	56,17 ± 0,80	5,87 ± 0,47	24,37 ± 1,15
DMSO	14,00 ± 0,61	55,93 ± 0,70	5,87 ± 0,25	24,17 ± 0,67
FlpC Livre 1 µM	13,73 ± 2,23	56,00 ± 1,97	5,73 ± 0,25	24,50 ± 0,44
FlpC-PEG 1/2 IC ₅₀	15,60 ± 0,66	55,07 ± 1,95	5,23 ± 0,31	24,07 ± 1,78
FlpC-PEG IC ₅₀	15,80 ± 1,61	55,60 ± 0,44	7,23 ± 0,21 *	21,37 ± 1,19 *
FlpC-PEG 2 x IC ₅₀	17,60 ± 0,70 *	54,37 ± 0,83	6,97 ± 0,25 *	21,07 ± 0,99 *
CP	21,43 ± 2,48 *	57,57 ± 1,47	4,67 ± 1,15	16,37 ± 2,42 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0033%; CP, Camptotecina 10 µM).

Tabela 5 - Distribuição do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD em monocamada (2D). Porcentagem média relativa do perfil de marcação com Anexina V e 7-AAD na linhagem NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas humanas) após 24 h de tratamento com formulações de Fluopsina C Lipossomal PEGuilada e Fluopsina C livre.

Ensaio de morte celular por citometria de fluxo			
Tratamento	Vivas	Apoptose Total	Morte Não Apoptótica
Lipossova Vazio	43,36 ± 2,12	8,16 ± 0,63	48,48 ± 1,82
DMSO	42,45 ± 0,63	8,78 ± 0,27	48,77 ± 0,76
FlpC Livre 1 µM	39,28 ± 1,85	8,42 ± 0,29	52,30 ± 1,75
FlpC-PEG 1/2 IC ₅₀	40,85 ± 1,58	7,51 ± 0,89	51,65 ± 1,69
FlpC-PEG IC ₅₀	35,68 ± 0,35 *	9,08 ± 1,78	55,24 ± 2,12 *
FlpC-PEG 2 x IC ₅₀	32,42 ± 0,90 *	10,21 ± 1,24	57,38 ± 2,14 *
CP	42,74 ± 4,10	21,01 ± 1,10 *	36,25 ± 5,15 *

(*) valor de $p < 0,05$ em relação ao controle de veículo lipossoma livre, conforme determinado usando análise de variância seguida pelo teste de Dunnett. Valores expressos como média ± DP. (CN, controle negativo; CV, controle de veículo DMSO 0,0033%); CP, Camptotecina 10 µM).

Tabela 6 – Sequências iniciadoras dos genes avaliados em RT-qPCR

Categoria	Gene	Forward	Reverse
Metabolismo de xenobióticos	<i>CYP1A1</i>	5' CCAGGCTCCAAGATCCA 3'	5' GATCTTGGAGGTGGCTGCT 3'
	<i>CYP1A2</i>	5' CACTATCAGGACTTTGACAAG 3'	5' AGGTTGACAATCTTCTCCTG 3'
	<i>CYP2B6</i>	5' CCTCAGTGCTCAGAGGTTCA 3'	5' TTTGGGTCGGTATCTGGTCA 3'
	<i>CYP2C19</i>	5' CATGGATATGAAGTGGTGAAG 3'	5' TCCATTGCTGAAAACGATTC 3'
	<i>CYP2D6</i>	5' CCTATGAGCTTTGTGCTG 3'	5' TTTGGAACACCACATTGC 3'
	<i>CYP2E1</i>	5' GACACCATTTTCAGAGGATAC 3'	5' TTCATTAGGAAGTGTCTG 3'
	<i>CYP3A4</i>	5' AGTCTTTCCATTCTCATCC 3'	5' TGCTTTTGTGTATCTTCGAG 3'
	<i>CYP2C9</i>	5' GAAGCACCCAGAGGTCACAG 3'	5' CTCGTGCCACCACAGCATC 3'
	<i>HNF4A</i>	5' AGTACATCCAGCTTTCTG 3'	5' AATGTAGTCATTGCCTAGGAG 3'
	<i>PPARG</i>	5'-CGACCAAGTAAGTCTCTCA-3'	5'-GTTCCGTGACAAATCTGTCTG-3'
	<i>GSTP</i>	5' CAA TAC CAT CCT GCG TCA CC 3'	5' GGA GAT GTA TTT GCA GCG GA 3'
	<i>UGT1A</i>	5' GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC 3'	5' CAC AAA CTC CAC CCA GAA CA 3'
Regulação do ciclo celular	<i>CMYC</i>	5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3'	5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'
	<i>CDKN1A</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 5'	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'
	<i>PCNA</i>	5'AGGCACTCAAGAGACCATCA3'	5'GAGTCCATGCTCGGCAGGTTT3'
Estresse do retículo endoplasmático	<i>ERN1</i>	5' ACG GAC GTC AAG TTT GAT CC 3'	5' TTG GTA GAC GCA GAC AGT GG 3'
Danos ao DNA	<i>GADD45A</i>	5' TCA GCG CAC GAA GAC TGT C 3'	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'
	<i>GADD153</i>	5' AGCAGATGTGCTTTCCAGAC 3'	5' GTCCTCATACCAGGCTTCCA 3'
Estresse celular	<i>GPX1</i>	5' CTC CCC TTA CAG TGC TTG TTC G 3'	5' CGA TGT CAA TGG TCT GGA AG 3'
	<i>SLC7A11</i>	5' TTTGCACCCTTTGACAATGA 3'	5' GGAAAACAAGCTGGGATGA 3'
	<i>NRF2</i>	5' GAGAGCCCAGTCTTCATTGC 3'	5' GTTTGGCTTCTGGACTTGA 3'
	<i>NQO1</i>	5' AGCCCAGATATTGTGGCTGA 3'	5' CGGAAGGGTCTTTGTCATA 3'
	<i>SQSTM1</i>	5' TCCGAGTGTGAATTCCTG 3'	5' AGCTGCCACACTCTCCC 3'
	<i>BECN1</i>	5' CAG TAT CAG AGA GAA TAC AGT G 3'	5' TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC 3'
Morte Celular	<i>MTOR</i>	5' TTG CTT GAG GTG CTA CTG 3'	5' CTG ACT TGA CTT GGA TTC TG 3'
	<i>RIPK1</i>	5' TGATAATACCACTAGTCTGACG 3'	5' ACAGTTTTTCCAGTGCTTTC 3'
	<i>RIPK3</i>	5' AACTTTCAGAAACCAGATGC 3'	5' GTTGTATATGTTAACGAGCGG 3'
	<i>MLKL</i>	5' GTGAAGAATGTGAAGACTGG 3'	5' AAGATTTTCATCCACAGAGGG 3'
	<i>BBC3</i>	5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G 3'	5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'
Genes constitutivos	<i>GAPDH</i>	5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'	5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'
	<i>ACTB</i>	5' GAC GAC ATG GAG AAA ATC TG 3'	5' ATG ATC TGG GTC ATC TTC TC 3'

Tabela 7 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR após 6 horas de tratamento com Flpc-PG IC50

GENE	Fold-Change	Log2 Fold-change	Teste-t p-valor	Valores de CT's					
				CV1	CV2	CV3	T1	T2	T3
House-Keeping									
<i>GAPDH</i>	-	-	-	15,41	15,32	15,24	15,61	15,05	15,25
<i>ACTNB</i>	-	-	-	15,95	15,56	15,73	15,65	15,51	15,86
Genes-alvo									
<i>CYP1A1</i>	1,06	0,083	0,689	27,38	27,29	27,75	27,42	27,32	27,29
<i>CYP1A2</i>	1,02	0,03	0,96	29,86	29,57	30,6	29,46	30,42	29,93
<i>CYP2B6</i>	-1,46	-0,55	0,071	29,91	29,43	29,97	30,07	30,27	30,47
<i>CYP2C19</i>	-2,05	-1,03	0,007 *	37,26	37,06	37,67	38,52	38,16	38,27
<i>CYP2D6</i>	-3,23	-1,69	0,004 *	35,18	34,36	34,05	36,33	36,06	36,14
<i>CYP2E1</i>	-5,46	-2,45	0,001 *	34,87	34,65	34,08	37,47	36,71	36,63
<i>CYP3A4</i>	-1,04	-0,05	0,878	31,39	31,98	31,49	31,47	31,76	31,64
<i>CYP2C9</i>	-1,91	-0,93	0,011	34,7	34,13	34,55	35,76	35,18	35,09
<i>GADD45A</i>	1,22	0,29	0,018	26,37	26,08	26,03	25,9	25,74	25,84
<i>GPX1</i>	-1,2	-0,27	0,339	22,35	22,22	22,13	22,64	22,64	22,08
<i>HNF4-α</i>	-2,08	-1,06	0,021 *	26,01	25,59	26,47	27,01	27,09	27
<i>PPAR-γ</i>	-2,17	-1,12	0,015	24,31	24,27	24,38	25,51	25,65	25,02
<i>NQO1</i>	-1,75	-0,81	0,002	21,78	21,36	21,69	22,36	22,21	22,55
<i>CDKN1A</i>	-1,34	-0,42	0,23	23,62	23,42	23,6	24,13	24,18	23,45
<i>NRF2</i>	-1,54	-0,62	0,012	22,79	22,91	23,05	23,69	23,23	23,55
<i>GST</i>	-1,32	-0,4	0,279	30,93	30,79	30,98	31,34	31,61	30,81
<i>GADD153</i>	-1,26	-0,33	0,281	26,52	26,76	26,64	27,17	27,04	26,56
<i>UGT</i>	-1,27	-0,34	0,164	29,11	28,78	29,1	29,68	29,19	29
<i>ERN1</i>	-1,31	-0,39	0,028	28,08	27,72	28,1	28,48	28,2	28,26
<i>SLC711A</i>	2,36	1,24	0,021 *	30,48	30,1	30,43	29,36	29,3	28,49
<i>RIPK1</i>	5,84	2,55	0,028 *	34,36	35,39	34,4	33,15	32,29	30,93
<i>C-MYC</i>	-1,21	-0,28	0,54	22,02	21,6	21,51	22,86	21,57	21,4
<i>BBC3</i>	2	1	0,027 *	36,71	35,76	36,42	35,33	35,4	35,02
<i>m-TOR</i>	1,26	0,33	0,346	32,06	31,4	31,59	31,01	31,63	31,28
<i>PCNA</i>	2,31	1,21	0,048 *	33,44	32,68	33,88	32,71	31,81	31,72
<i>SQSTM1</i>	1,52	0,61	0,066	26,51	26,57	26,05	25,51	25,72	25,94
<i>BECN1</i>	1,24	0,31	0,324	24,86	24,14	24,57	23,91	24,38	24,2
<i>MLKL</i>	2,42	1,28	0,037	42,44	41,13	41,91	40,44	39,97	41,1
<i>RIPK3</i>	5,12	2,36	0,023	38,27	38,97	37,99	37,13	35,81	35,08

(*) indicam diferenças significativas nos valores médios de expressão relativa de mRNA Poli-A dos esferoides tratados em comparação com os do controle de veículo, conforme determinado usando o teste t de Student (log2 fold-change) e valores de fold-change de ≥ 2 ou ≤ -2 .

Tabela 8 - Análise da expressão de mRNA de genes-alvo por meio de RT-qPCR após 12 horas de tratamento com Flpc-PG IC50

GENE	Fold-Change	Log2 Fold-change	Teste-t p-valor	Valores de CT's					
				CV1	CV2	CV3	T1	T2	T3
House-Keeping									
<i>GAPDH</i>	-	-	-	15,39	15,56	15,75	15,97	15,81	15,75
<i>ACTNB</i>	-	-	-	16,14	16,20	16,25	16,23	16,35	16,31
Genes-alvo									
<i>CYP1A1</i>	2,15	1,11	0,007 *	26,45	26,12	26,52	25,23	25,36	25,75
<i>CYP1A2</i>	1,11	0,15	0,782	31,37	30,4	30,82	30,7	31,66	30,35
<i>CYP2B6</i>	2,13	1,09	0,009 *	31,71	31,86	31,96	30,69	30,78	31,36
<i>CYP2C19</i>	1,08	0,11	0,697	36,92	36,65	37,56	37,42	37,11	36,82
<i>CYP2D6</i>	-1,54	-0,63	0,001	33,77	33,82	33,83	34,58	34,68	34,6
<i>CYP2E1</i>	-1,13	-0,18	0,722	33,73	33,23	34,71	34,18	33,92	34,66
<i>CYP3A4</i>	1,28	0,36	0,392	32,17	31,46	31,9	31,45	31,35	32,21
<i>CYP2C9</i>	3,51	1,81	0,004 *	32,77	32,48	33,54	31,19	31,57	31,16
<i>GADD45A</i>	2,06	1,05	0,024 *	25,9	25,74	26,4	25,02	24,84	25,61
<i>GPX1</i>	1,5	0,58	0,012	22,29	22,12	22,35	21,79	22,08	21,71
<i>HNF4-α</i>	2,33	1,22	0,005 *	27,41	27,95	27,45	26,82	26,44	26,46
<i>PPAR-γ</i>	1,6	0,68	0,014	26,31	26,16	26,34	25,64	26,07	25,62
<i>NQO1</i>	1,2	0,26	0,382	20,64	20,06	20,71	20,12	20,63	20,45
<i>CDKN1A</i>	2,18	1,13	0,002 *	22,55	22,6	22,31	21,51	21,61	21,53
<i>NRF2</i>	1,68	0,75	0,015	24,45	24,12	24,22	23,66	23,92	23,52
<i>GST</i>	2,14	1,1	0,005 *	31	30,71	31,13	29,78	30,29	30,05
<i>GADD153</i>	1,24	0,3	0,184	26,3	26,2	26,41	25,86	26,34	26,36
<i>UGT</i>	1,57	0,65	0,011	29,06	28,73	29,15	28,42	28,6	28,52
<i>ERN1</i>	1,51	0,59	0,003	26	26,12	26,3	25,6	25,9	25,7
<i>SLC711A</i>	2,04	1,03	0,048 *	28,89	30,19	29,49	28,53	28,85	28,67
<i>RIPK1</i>	2,7	1,43	0,049 *	28,78	27,31	27,81	26,9	26,36	26,91
<i>C-MYC</i>	1,82	0,86	0,01	20,83	21,35	20,86	20,3	20,31	20,4
<i>BBC3</i>	14,17	3,83	0,000081 *	38,4	39,11	38,67	35,37	35,05	34,85
<i>m-TOR</i>	2,89	1,53	0,000051 *	30,13	30,48	30,58	29,07	29,01	29,08
<i>PCNA</i>	-2	-0,97	0,024 *	33,1	32,9	33,1	34,6	34,3	33,66
<i>SQSTM1</i>	2,1	1,08	0,001 *	26,2	26,02	26,45	25,5	25,2	25,3
<i>BECN1</i>	1,7	0,76	0,138	21,76	22,14	23,28	22,1	21,66	21,7
<i>MLKL</i>	1,88	0,91	0,009	39,26	39,08	39,06	38,67	38,46	38,11
<i>RIPK3</i>	1,63	0,7	0,383	39,81	38,84	37,67	38,32	37,9	38,56

(*) indicam diferenças significativas nos valores médios de expressão relativa de mRNA Poli-A dos esferoides tratados em comparação com os do controle de veículo, conforme determinado usando o teste t de Student (log2 fold-change) e valores de fold-change de ≥ 2 ou ≤ -2 .