



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

CAMPUS DARCY RIBEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL - PPGBioAni

TESE

CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PACLITAXEL EM
LIPOSSOMAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE OVÁRIO
METASTÁTICO

RAQUEL SANTOS FARIA

BRASÍLIA - DF

2020

RAQUEL SANTOS FARIA

**CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PACLITAXEL EM
LIPOSSOMAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE OVÁRIO
METASTÁTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília – Nível Doutorado.

Área de concentração: Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo.

BRASÍLIA - DF

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Central da Universidade de Brasília

CDU:

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO PACLITAXEL PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO METASTÁTICO

BANCA EXAMINADORA

A presente Tese submetida à Comissão Examinadora abaixo foi defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo.

Brasília- (DF), ____ de _____ 2020.

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann - UnB

Prof^a. Dr^a. Adriana Raffin Pohlmann - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca– USP

Prof^a. Dr^a. Anamélia Lorenzetti Bocca- UnB

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese às minhas avós Maria Raimunda (in memoriam) e Ildenê Paula.

Meus amores e minha inspiração de vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço a Deus, que sempre guiou meu caminho me levando a alcançar meus objetivos, iluminando meus passos para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais José Adriles e Marília que sempre me apoiaram, me guiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos de alegria e de tristeza.

A minha irmã Renata, obrigada por todo apoio, pelas risadas nos momentos mais difíceis e principalmente pela paciência! Tenho muito orgulho de você muito obrigada por ser tão presente na minha vida!

A minha avó Maria Raimunda, minha inspiração de vida, minha musa! Uma pessoa meiga e vencedora na vida, meu orgulho. Sempre estive ao meu lado, me apoiando em tudo, me amando e me achando sempre linda!

A minha avó de coração Ildenê, um exemplo de dedicação, companheirismo e força, um exemplo para todos!

Aos meus padrinhos, meus pais de coração. Obrigada por acompanharem a trajetória da minha vida, sempre me apoiando.

A todos os membros da família Albuquerque Santos e Ulhoa Faria, que de forma especial e carinhosa me deram força e coragem. Sempre conseguimos reunir e festejar, e assim todas às vezes relembramos que a vida não tem sentido sem a alegria de viver.

Aos meus amigos, em especial: Luiza Ianny, Júnior Coelho, Laís Fleury, Marina Borges e Amanda Amorim, muito obrigada pela paciência nos dias mais difíceis e pelo apoio! Obrigada pela amizade, companheirismo e dedicação durante todo esse tempo.

A Stella pelas alegrias de todos os dias e noites quentinhas, e não posso deixar de mencionar o Guga, meu “cãopanheiro” e guarda-costas. Essas criaturinhas que representam o amor mais puro que sempre estão ao meu lado me alegrando todos os dias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo que sempre estive de braços abertos para me auxiliar. Muito obrigada pela oportunidade de crescimento na carreira acadêmica. Sempre serei grata por tudo que me proporcionou, por todo carinho, dedicação e por ter acreditado no meu potencial.

A toda a equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia. Obrigada pelo auxílio e incentivo durante esse período, todos vocês tiveram uma contribuição importante nesses anos.

Obrigada a todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Biologia Animal, em especial à Dona Zélia, que com seu carinho e jeitinho de ser sempre soube lidar com todos os problemas com um cativante sorriso. A prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos por todo o apoio e suporte nessa reta final.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Eu não teria chegado até aqui sem o apoio de cada um dos que foram citados e tantos outros que não foi possível lembrar. Sempre serei grata por cada um, vocês são parte da minha história!

EPÍGRAFE

“Feliz aquele que transfere o que sabe,
e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

O câncer de ovário é considerado uma doença sensível à quimioterapia, sendo o tratamento sistêmico é o mais indicado para essa enfermidade. Porém, a recidiva ocorre em cerca de 80% das pacientes. A quimioterapia contra este tipo de câncer é utilizada principalmente compostos de platina e taxanos, e como segunda linha, são utilizados fármacos que não são baseados em platina, como a doxorrubicina lipossomal. Os lipossomas podem servir de carreadores para quimioterápicos, mantendo estáveis as concentrações plasmáticas e biodisponibilidade intratumorais. O objetivo do projeto foi avaliar a atividade antitumoral do fármaco paclitaxel (PTX) carreado por um nanossistema lipossomal (LFCP PTX) em modelo experimental de carcinomatose peritoneal de ovário em camundongos. Nos testes *in vitro*, os resultados de viabilidade celular da linhagem tumoral A2780 mostraram diminuição da concentração inibitória de 50% quando se utiliza o LFCP PTX em comparação com o fármaco na forma livre. As células A2780 tratadas com o fármaco na forma lipossomal (LFCP PTX) mostraram menor capacidade de formar colônias do que as tratadas com o fármaco livre (PTX). Os perfis de morte das células com o tratamento na forma lipossomal foi indicativo de apoptose, com a maioria das células em apoptose inicial. As células A2780 exibiram perfil inibitório de migração, quando analisados pelos métodos de Wound Healing e 3D (xCELLigence), após o tratamento com o LFCP PTX. Essa inibição foi relacionada com a diminuição da expressão dos genes ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox) e TGF- β 2 (Transforming Growth Factor 2). Nos testes *in vivo*, o tratamento com LFCP PTX inibiu fortemente a proliferação de células tumorais na carcinomatose peritoneal de ovário, indicando maior atividade antitumoral quando comparado com o PTX. O tratamento com o LFP PTX mostrou não ser tóxico para os camundongos. Os resultados deste estudo mostram que o paclitaxel nanocarreado no lipossoma LFCP é menos tóxico para os tecidos não tumorais do que o paclitaxel livre, mas mais eficaz no que diz respeito a inibição da proliferação e a inibição da migração das células tumorais e induzindo a expressão dos genes ZEB1 e TGF- β 2.

Palavras-Chave: Câncer, ovário, carcinomatose peritoneal, lipossoma, paclitaxel.

ABSTRACT

Ovarian cancer is considered a chemosensitive disease, so chemotherapy is very important when considering systemic treatment. However, recurrence occurs in about 80% of patients, thus requiring the development of more effective therapies. There are two main types of treatment for ovarian cancer: surgery and chemotherapy. The use of chemotherapy is based mainly on platinum and taxol compounds, and as a second line, non-platinum based drugs, such as liposomal doxorubicin, are used. Liposomes serve as nanocarriers for chemotherapy, maintaining the rate of the drug in the bloodstream and their targeted delivery. The aim of the project was to evaluate the *in vitro* effect of PTX carried by a liposomal nanosystem (LFCP PTX) on ovarian epithelial carcinoma cells (A2780), and *in vivo* antitumor activity and toxicity in an experimental study model of peritoneal ovarian carcinomatosis in mice. In *in vitro* tests, cell viability results against the A2780 tumor line showed a 50% decrease in inhibitory concentration when using LFCP PTX compared to free PTX. The percentage of growth of A2780 cell colonies when treated with liposomal PTX was statistically different than the treatment with free PTX. Cell death profiles of A2780 cells with liposomal treatments were indicative of apoptosis, with most cells in early apoptosis. A2780 cells treated with the LFCP PTX exhibited an inhibition in the migration profile by the Wound Healing and 3D (xCELLigence) methods. This inhibition was promoted by the decrease in the gene expression of ZEB1 and TGFB2. In *in vivo* testing, treatment with LFCP PTX strongly inhibited tumor cell development and proliferation in ovarian peritoneal carcinomatosis, indicating high antitumor activity when compared to PTX free form. Also, LFP PTX group had lower systemic toxicity much closer to healthy animals than the animals treated with free PTX. Our results showed that the use of nanocarrier PTX in the LFCP liposome leads to more effective control of tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, including inhibition of migration via the ZEB1 and TGFB2 pathways, as well as reducing the systemic toxicity of PTX.

Keywords: Cancer, ovary, peritoneal carcinomatosis, liposome, paclitaxel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema reprodutor feminino apresentando um ovário com células epiteliais normais e o outro com células epiteliais tumorais (autoria própria).	18
Figura 2: (a) Disseminação direta, e (b) Disseminação hematológica, das células tumorais do ovário para o peritônio (autoria própria).	23
Figura 3: Fármacos utilizados no tratamento do câncer de ovário (autoria própria).	25
Figura 4: Conformação esquemática de um lipossoma multilamelar (autoria própria).	29
Figura 5: Delineamento Experimental. Riscos pretos indicam início e fim do experimento; Riscos verdes indicam os dias de tratamento intravenoso; Riscos vermelhos indicam os dias das análises.	40
Figura 6: Análise morfológica do LFCP pela Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Formato esférico, monodispersos, homogêneos e tamanho de aproximadamente 180 nm. *lamelas, bicamadas do LFCP.	45
Figura 7: Dot plot da avaliação do tipo de morte celular em células tumorais de ovário A2780, após o tratamento com LFCP PTX e PTX. As células foram marcadas com Anexina-V e 7-AAD.	46
Figura 8: Porcentagem de células A2780 nos diferentes quadrantes analisados, após o tratamento com LFCP PTX. As células foram marcadas com Anexina-V e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo (Q4) corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial (Q3), o superior direito as células em apoptose tardia (Q2) e o superior esquerdo às células necróticas (Q1). Os dados de porcentagem de crescimento de colônias são apresentados como a média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$) (a) vs. controle negativo, (b) vs. LFCP PTX.	47
Figura 9: Imagem das colônias coradas com cristal violeta. As células A2780 foram tratadas com os valores de CI50 do fármaco livre e LFCP PTX por 24 horas. Após esse tempo, 2000 células que sobreviveram ao tratamento foram plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas por 5 dias. As imagens foram obtidas em lupa Leica EZ4 Stereo.	47
Figura 10: Efeito do tratamento com o PTX e os LFCP PTX na capacidade das células A2780 de formarem colônias. Os dados de porcentagem de crescimento de colônias são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços em relação ao grupo controle negativo (**** $p < 0,001$).	48
Figura 11: O teste de Wound Healing mostra a migração celular da linhagem A2780 após o tratamento por 24 horas, em contato com os tratamentos PTX ou LFCP PTX (Tratamento), e após 24 horas da retirada do tratamento com PTX ou LFCP PTX (pós Tratamento) com os valores de CI50 do fármaco livre e do fármaco na forma lipossomal. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços (a) vs. Controle negativo, (b) vs. PTX (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).	49
Figura 12: O sistema xCELLigence RTCA DP registrou e coletou dados de migração de células A2780 a cada 1 hora por 72 horas, após o tratamento com o fármaco na forma lipossomal. As diferenças nos índices de células entre os grupos tratados com o lipossoma e controle foram significativas. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços **** $p < 0,001$).	50
Figura 13: A expressão de ZEB1, TGF- β 1 e TGF- β 2, em A2780 sem tratamento e após tratamento com LFCP PTX. Analisado por qRT-PCR. Os dados foram normalizados pelo método $\Delta\Delta Ct$, utilizando como housekeeping a b-actina. Os dados são apresentados como média \pm DP. Três experimentos independentes, $n = 3$, cada amostra foi medida 3 vezes.	51
Figura 14: Imagem dos animais após 21 dias de inoculação das células tumorais A2780-luc. Localização da bioluminescência das células A2780-luc nos animais (a-d), indicando o desenvolvimento da carcinomatose peritoneal de ovário. Animais com exposição do peritônio (e-f). Órgãos excisados mostrando a presença de células A2780-luc contidas somente no peritônio (g, h).	52
Figura 15: Análise da bioluminescência das células viáveis A2780-luc na região abdominal em camundongos Balb/c nude portadores de carcinomatose peritoneal de ovário. Os grupos foram tratados com o fármaco livre PTX, e o lipossoma LFCP PTX. Os dados estão apresentados em porcentagem da média da radiância pelo tempo, e normalizados com a primeira medição. A diferença estatística está representada (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; T10 = 10º dia do início do tratamento, T15 = 15º dia do início do tratamento).	53
Figura 16: Hemograma no último dia do experimento. * $p < 0,05$. a - diferença estatística do grupo sadio; b - diferença estatística do grupo tumor sem tratamento; c - diferença estatística	

do grupo PTX; d – diferença estatística do grupo LFCP PTX.	54
Figura 17: Variação do peso corporal dos animais (%). Análise em média ± SEM. *T21 – diferença estatística encontrada entre os grupos PTX e LFCP PTX no 21º dia de análise.	56
Figura 18: Peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c nude com carcinomatose peritoneal de ovário. Diferença estatística representada (* p <0.05; T21 = 21º dia do início do tratamento; * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de animais utilizados no teste de Padronização do modelo tumoral.	41
Tabela 2: Grupos experimentais	41
Tabela 3: Valores de CI50 da linhagem A2780 tratada com o fármaco livre e na forma lipossomal por 24 horas.	45
Tabela 4: Ensaio de padronização do modelo tumoral. Escolha do tempo de 3 semanas após a inoculação das células tumorais devido à presença de metástases macroscópicas.	52
Tabela 5: Percentual da diferenciação das linhagens dos leucócitos: linfócitos; monócitos, basófilos, eosinófilos; neutrófilos. Diferença estatística significativa, $p \leq 0,05$; $n = 5$ animais por grupo. Dados em porcentagem e desvio padrão.	55
Tabela 6: Dados das formulações lipossomais recebidas.	96

Sumário

RESUMO	9
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	11
INTRODUÇÃO	14
REFERENCIAL TEÓRICO	17
Câncer de Ovário.....	17
Carcinomatose peritoneal.....	19
Quimioterapia no Tratamento da Carcinomatose Peritoneal de Ovário.....	24
Paclitaxel.....	26
Nanomedicina e entrega de fármacos.....	27
Liposomas.....	28
OBJETIVO.....	32
Objetivo Geral	32
Objetivos específicos.....	32
METODOLOGIA.....	33
Obtenção e Caracterização do nanossistema lipossomal	33
Testes <i>in vitro</i>	34
Linhagem celular.....	34
Manutenção da cultura celular	34
Análise da citotoxicidade do Paclitaxel no sistema lipossomal	34
Avaliação do tipo de morte celular induzida pelo Paclitaxel no sistema lipossomal	35
Análise de formação de colônias das células remanescentes pós tratamento com Paclitaxel no sistema lipossomal	36
Influência do Paclitaxel no sistema lipossomal sobre a capacidade de migração e invasão celular.....	36
<i>Teste de Migração celular pelo método Wound Healing</i>	37
Avaliação da expressão de genes envolvidos na migração celular por qRT-PCR.....	38
Testes <i>in vivo</i>	39
Modificação celular com luciferase	39
Delineamento do Procedimento Experimental.....	40
Modelo animal.....	40
Avaliação do crescimento tumoral	40
Avaliação da atividade antitumoral por meio de bioluminescência	41
Análise Hematológica e Bioquímica	42
Análise Estatística	43
RESULTADOS	44
Testes <i>in vitro</i>	44
Caracterização do Nanossistema lipossomal	44
Determinação de Viabilidade Celular.....	45

Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo	46
Análise da capacidade de formação de colônias	47
Avaliação da capacidade de migração celular pelo método Wound Healing	48
Análise da migração celular 3D	49
LFCP PTX diminui a expressão de ZEB1 e TGF- β 2	50
Testes <i>in vivo</i>	51
Padronização do modelo pré-clínico de tumor de ovário metastático	51
Avaliação da Atividade Antitumoral através da bioluminescência	52
Diminuição da Toxicidade utilizando o LFCP PTX	53
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Anexo 1. Certificado de autorização de Comissão de Ética no uso animal da Universidade de Brasília	91
Anexo 2. Publicações Bibliográfica relacionada ao trabalho	92
[1] Artigo submetido: Revisão sobre o uso de lipossomas no tratamento do câncer de ovário	92
[2] Artigo em processo de submissão:	94

INTRODUÇÃO

O câncer de ovário ocupa a 4^a posição no ranking de incidência e a 3^a posição no ranking de letalidade em cânceres no mundo entre mulheres (Devita Lawrence, Rosenberg, 2011; INCA, 2016; Ferlay et al., 2019). Cerca de 70% das pacientes com câncer de ovário epitelial (células de revestimento do ovário) apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico, com a presença de carcinomatose peritoneal (WHO, 2014).

A carcinomatose peritoneal ocorre como consequência da disseminação peritoneal de células do tumor primário. Neste processo, as células tumorais invadem o fluido peritoneal, e estabelecem depósitos metastáticos constituindo os implantes sobre o revestimento peritoneal visceral e parietal da cavidade abdominal (Jacquet et al., 1996; Verwaal et al., 2008; Goodman et al., 2016). Acredita-se que a metástase do câncer de ovário epitelial ocorra principalmente pela propagação direta das células do ovário para o peritônio (Pradeep et al., 2014), embora as células também possam seguir uma via de disseminação hematológica, se implantando preferencialmente no omentum (uma prega constituída por duas camadas de peritônio e que liga os órgãos da cavidade abdominal), e subsequentemente se espalhando por toda a superfície peritoneal (Pradeep et al., 2014).

Estudos demonstraram que a aquisição de propriedades invasivas das células epiteliais tumorais na promoção da metástase está relacionada com a transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Gupta et al., 2009; Polyak e Weinberg, 2009). A TEM é um processo biológico que leva uma célula epitelial a sofrer modificações moleculares e bioquímicas, adquirindo um fenótipo de célula mesenquimal, um tipo celular que possui capacidade de migração. A TEM é um processo que, além de ser essencial durante a embriogênese e no comportamento das células-tronco, contribui para a progressão do câncer (Lamouille & Derynck, 2014), pois facilita o processo de metástase.

Dentre os vários fatores que atuam como indutores de TEM, destaca-se a família do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), e o homeobox 1 de ligação à E-box do dedo de zinco (ZEB1/2). Esses fatores possuem importantes papel no desenvolvimento da metástase de tumores (Derynck e Akhurst, 2007; Pardali e Moustakas, 2007; Peinado et al., 2007; Kong; Wang; Sarkar, 2011).

A família TGF- β desempenha papel importante na embriogênese, no

reparo de tecidos, na formação de ossos e de cartilagens e no controle do sistema de resposta imune. Eles são conhecidos por estimular a proliferação de alguns tipos celulares, enquanto agem como inibidores de outros tipos de células, além de participar no processo de transição epitélio-mesenquimal e assim na migração e invasividade das células tumorais de muitos tipos de cânceres (Massague, 2012). Os fatores de transcrição ZEB1/2, estão envolvidos em processos moleculares para a diferenciação celular de epitelial para mesenquimal (Peinado et al., 2007). No câncer de ovário epitelial, ao adquirirem fenótipo mesenquimal, as células tumorais adquirem a capacidade de degradar a matriz extracelular e de migrar, formando nódulos na região peritoneal (Perlikos, et al., 2013). O crescimento dos nódulos na região peritoneal gera graves complicações, levando geralmente o paciente a óbito.

Durante a última década muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a terapia para a carcinomatose peritoneal de ovário. As terapias mais utilizadas no plano de tratamento para a carcinomatose peritoneal de ovário são: quimioterapia intravenosa, cirurgia citorrredutora, quimioterapia intraperitoneal e hipertermia intraperitoneal (Beck et al., 2015).

A quimioterapia é baseada em compostos de platina e taxanos como Paclitaxel (PTX). O PTX é um pseudoalcalóide diterpenóide que possui atividade antineoplásica para o câncer de ovário metastático e carcinomatose peritoneal (Jauhari et al., 2009). Porém, como o PTX é um fármaco hidrofóbico sua aplicação e biodisponibilidade nos sistemas biológicos se torna muito dificultada. Além disso, o PTX é um fármaco de rápida metabolização hepática e muito propenso a induzir as células tumorais a desenvolver resistência a drogas (Tew, 2016; Alves et al., 2018), levando a recidiva tumoral (Gordon et al., 2000; Campos et al., 2001; Cheng et al., 2018). Tudo isso leva à necessidade de desenvolvimento de novas abordagens na terapia contra a carcinomatose peritoneal de ovário.

Uma dessas abordagens envolve a nanobiotecnologia, que pode ser utilizada tanto na detecção mais precoce de tumores, quanto no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. A nanobiotecnologia pode ser utilizada para o desenvolvimento de transportadores de compostos bioativos, os denominados nanocarreadores (Siddiqui et al., 2012; Cheng ZL, et al., 2012; Etheridge et al., 2013; Wicki A, et al., 2015).

O uso de nanocarreadores de medicamentos já é adotado pela comunidade científica, numerosos estudos já foram realizados para desenvolver sistemas eficientes de administração de medicamentos utilizados na quimioterapia contra o câncer de ovário, incluindo sistemas lipossomais (Micha et al., 2006; Fader & Rose, 2009; Wicki A, et al., 2015; Cheng et al., 2018; Zhao, 2018).

Os lipossomas são vesículas cujas estruturas se assemelham às membranas lipídicas celulares, ou seja, são sistemas constituídos por bicamadas lipídicas, únicas ou múltiplas, encapsulando um compartimento aquoso (Bozzuto e Mollinari, 2015). Eles são utilizados como sistemas de entrega e liberação controlada de fármacos por apresentar maior seletividade, especificidade, eficácia, o que gera menos efeitos adversos, trazendo assim grande vantagem sobre os sistemas convencionais (Durán, N. et al 2006).

Muitos estudos já mostraram vantagens na utilização de lipossomas no tratamento do câncer de ovário (Caracciolo et al., 2018; Bhowmik et al., 2018; Tang et al., 2019; Khayrani et al., 2019). Desse modo, é plausível acreditar que a encapsulamento de um fármaco de primeira linha, como o PTX, em um sistema lipossomal pode melhorar a distribuição desse fármaco no tecido onde se encontra o tumor ou nas células tumorais, o que é bastante promissor para a melhoria da eficácia antitumoral.

REFERENCIAL TEÓRICO

Câncer de Ovário

O câncer de ovário é uma enfermidade que acomete mulheres em todo o mundo. Por mais que não seja o mais prevalente, ocupando a 4ª posição no ranking de incidência no mundo entre mulheres, é considerado o 3º câncer mais letal entre eles (Devita Lawrence, Rosenberg, 2011; INCA, 2019; Ferlay et al., 2019).

O principal fator de risco para o câncer de ovário é o histórico familiar, sendo que aproximadamente 20% dos casos estão relacionados com mutações nos genes BRCA1 (risco de 40-60%) e BRCA2 (risco de 10-30%), entre outros (Zhang et al., 2011; NCI, 2016). Outros fatores, como o envelhecimento (NCI, 2015), a não utilização de contraceptivos orais, a reposição hormonal pós-menopausa, a menarca precoce e a menopausa tardia, assim como a longa duração do ciclo menstrual, também aumentam o risco de desenvolvimento da doença (EPIDEMIOLO, 2012; Schüler et al., 2013).

O câncer de ovário compreende tumores de diferentes tipos histológicos, com características clínicas e moleculares distintas, e com perfis de mutações gênicas característicos (Bowtell, 2010; Smolle et al., 2013). Pode-se dividir os tumores ovarianos de acordo com o tipo celular de origem, podendo ser: (i) de células germinativas (células que originam oócitos); (ii) de células estromais (células de tecido conjuntivo, tais como fibroblastos, células do sistema imunológico e células endoteliais); e (iii) de células epiteliais (células que revestem a superfície externa do ovário) (Figura 1) (Algeciras-Schimnich, 2013; INCA 2019).

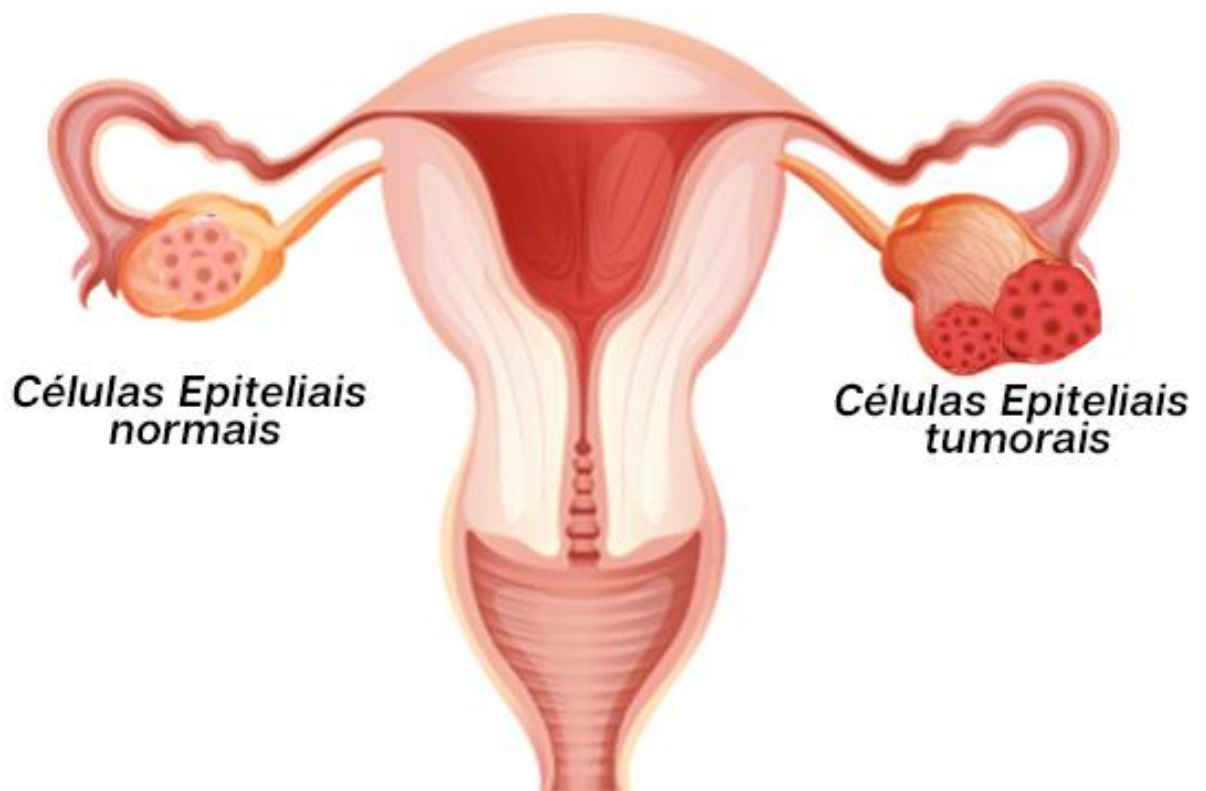


Figura 1: Sistema reprodutor feminino apresentando um ovário com células epiteliais normais e o outro com células epiteliais tumorais (autoria própria).

O câncer epitelial de ovário é o mais frequente, com cerca de 90% de prevalência entre os tumores ovarianos. Pela ausência de sintomas característicos, principalmente nos estágios iniciais, o diagnóstico ocorre normalmente em estágio avançado (Ferreira, 2012; Romero; Bast, 2012; Burchim et al., 2013), tornando este um câncer com baixa chance de cura (INCA, 2019).

A sobrevivência das pacientes com câncer de ovário está diretamente relacionada à idade da paciente e ao estágio em que a doença se encontra no momento do diagnóstico, sendo de 80-90% quando o diagnóstico é feito nos estágios iniciais, reduzindo para 25% quando o diagnóstico é feito nos estágios avançados e com metástase (Groen, Gershenson, Fader, 2015; Febbraro et al., 2015). O aparecimento de metástase peritoneal nos estágios avançados do câncer de ovário é denominado carcinomatose peritoneal, sendo uma característica típica da disseminação do câncer de ovário epitelial avançado (Goodman et al., 2016).

Carcinomatose peritoneal

A carcinomatose peritoneal ocorre em diferentes subtipos de câncer tais como: o colorretal, o gástrico, o pancreático, o mesotelioma peritoneal, o pseudomixoma peritoneal, a carcinomatose peritoneal primária e a ovariana, sendo este último o mais frequente da ocorrência da carcinomatose peritoneal (Ozols, 2005; Sehouli et al., 2009; Sehouli et al., 2009; Sadeghi et al., 2013). A carcinomatose peritoneal está associada com um mau prognóstico, e com sobrevida de aproximadamente 3 a 4 meses (Ozols, 2005; Sehouli et al., 2009; Sehouli et al., 2009; Sadeghi et al., 2013).

Em um estudo de caso, relatado por Sehouli e colaboradores (2009), onde foram analisados 214 pacientes com câncer de ovário, foram visualizadas as células tumorais na região peritoneal de 76% pacientes no momento da cirurgia, indicando que as células tumorais ovarianas possuem preferência para se implantarem nessa região.

De acordo com a hipótese de “sementes e solo” elaborada por Stephen Paget em 1889, o padrão de metástase não é um resultado aleatório. Algumas células tumorais (sementes) possuem afinidade específica para certas regiões (solo). Paget afirmou que mesmo as células sendo transportadas em todas as direções, só podem viver e proliferar se forem compatíveis com os órgãos (Paget., 1989). Depois disso, foram relatadas novas descobertas sobre as propriedades intrínsecas do microambiente tumoral metastático, a sinalização das células tumorais e os mecanismos celulares e moleculares, que contribuem para o padrão de metástase de órgãos específicos (Nishida et al., 2004; Leung et al., 2014; Yeung et al., 2015).

A implantação das células tumorais, bem como o sucesso no desenvolvimento da metástase ocorrem pela comunicação entre células do tumor primário e o microambiente metastático, onde as células que compõem o tumor primário e as células peritoneais produzem proteínas e peptídeos com o propósito de modificar o local de implantação e promover a metástase (Freedman et al. 2004, Ricciardelli & Rodgers 2006, Said et al. 2007, Heyman et al. 2008, Kenny et al. 2014; Ricciardelli et al., 2015).

Além disso, estudos já demonstraram que a disseminação de células

epiteliais do tumor primário ocorre após essas células adquirirem propriedades invasivas, que estão relacionadas com a TEM (Gupta et al., 2009; Polyak e Weinberg, 2009). Vários fatores atuam como indutores de TEM, sendo que o TGF- β , possui um importante papel no desenvolvimento da metástase de tumores epiteliais (Derynck e Akhurst, 2007; Pardali e Moustakas, 2007); No estágio de progressão tumoral, o processo de TEM está fortemente associado ao aumento na expressão de TGF- β , sendo esta alta regulação um processo reversível. Com isso a TEM promove a formação de novas células epiteliais (tecidos embrionários) e também é responsável pela geração de novas colônias metastáticas (metástases tumorais). A TEM regulada por TGF- β no desenvolvimento e metástase do câncer se assemelha à sinalização fisiológica durante o desenvolvimento embrionário, em que a TEM gera e forma novos tecidos (Muthusamy et al., 2015; Tan et al., 2015). Portanto, identificar as vias que controlam a plasticidade das células epiteliais pode contribuir muito para o desenvolvimento de novas terapias (Gregory et al., 2011).

A via de sinalização do TGF- β envolve a ativação de fatores de transcrição que auxiliam na expressão de genes envolvidos na proliferação de algumas células, especialmente em tecidos conjuntivos, enquanto agem como inibidores de outras células, tais como linfócitos e células epiteliais. Em mamíferos, o TGF- β consiste de três isoformas: TGF β -1, TGF β -2 e TGF β -3. Apesar de compartilharem homologia de cerca de 97% na sequência de aminoácidos, os genes de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 estão localizados em regiões distintas dos cromossomos 19, 1 e 14, respectivamente (Gao et al, 2014). Essas três isoformas ligam-se a dois pares de receptores de membranas do tipo I e do tipo II, TGF β liga-se ao seu receptor tipo II específico, T β RII, o qual fosforila e ativa o receptor tipo I, T β RI. O receptor tipo I fosforila proteínas citoplasmáticas da família de SMAD 2 e 3. A fosforilação das SMAD 2 e 3 permite que elas interajam com a proteína SMAD4, esse complexo se desloca para o núcleo onde ativa ou reprime a transcrição de genes-alvos, promovendo diferentes respostas biológicas, dependendo do tipo e contexto da célula (Dash, 2018).

Embora esteja envolvida em diferentes processos biológicos durante a embriogênese, no organismo adulto a sinalização TGF β exerce diversas funções na homeostase tecidual. O TGF- β 1 é um inibidor da proliferação de células epiteliais, pois promove a interrupção da progressão do ciclo celular, na fase G1,

pela indução das proteínas p15 e p21, proteínas conhecidas como inibidoras de ciclinas. Entretanto células epiteliais neoplásicas podem apresentar mutações que as tornam incapazes de responder ao TGF- β 1 (Yamada et al., 1999; Baldwin et al., 2003; Yeung et al., 2013). Nesse caso as células cancerosas proliferam descontroladamente. Além disso, as células neoplásicas podem expressar e secretar o TGF- β 1, fazendo com que os fibroblastos circundantes também proliferam, aumentando o TGF- β na região tumoral. Já o TGF- β 2 é um importante promotor da TEM, por causar perda de contato célula-célula e induzir tanto a migração celular quanto a invasão tecidual (Do et al., 2008), tendo papel importante na progressão do tumor. De acordo com Liu e colaboradores (2015), o aumento da expressão de TGF- β 2 está associado a proliferação celular e consequentemente ao crescimento tumoral do câncer de ovário. Já a diminuição dos níveis de TGF- β 2 pode estar relacionada à promoção da apoptose (Wang et al., 2014).

A transição epitélio-mesênquima induzida pelo TGF- β 2 está relacionada a indução dos fatores de transcrição ZEB1/2, repressores transcricionais de características epiteliais, mas envolvidos em processos moleculares para a iniciação da motilidade celular (Peinado et al., 2007), uma das características de células mesenquimais. Além disso, o aumento da expressão de ZEB1/2 está relacionado a diminuição das proteínas E-caderina, moléculas de adesão presentes em células epiteliais, e aumento de N-caderinas, também conhecidas como Cadherin-2 (CDH2) e vimentina, moléculas de adesão celular e proteína dos filamentos intermediários que compõe o citoesqueleto de células mesenquimais, respectivamente (Kong; Wang; Sarkar, 2011; Zhang et al., 2013). O fator de transcrição ZEB1 está associado à capacidade de formação de colônias e proliferação em câncer de ovário (Chen et al., 2013).

Nesse processo de diferenciação para o padrão mesenquimal, as células tumorais epiteliais se alongam, adquirem a capacidade de degradar a matriz extracelular, por meio de enzimas secretadas, e de migrarem, utilizando interações com ligantes específicos da matriz extracelular, e por fim se disseminar para a cavidade peritoneal e estabelecer nódulos na região peritoneal (Perlikos, et al., 2013).

As células tumorais se disseminam diretamente ao invadirem o fluido peritoneal, e estabelecerem depósitos metastáticos constituindo os implantes

sobre o revestimento peritoneal visceral e parietal da cavidade abdominal (Figura 2a) (Jacquet et al., 1996; Verwaal et al., 2008; Goodman et al., 2016). Embora a disseminação peritoneal direta seja o mecanismo dominante da metástase do câncer de ovário, as células desse tumor podem também seguir uma via de disseminação hematológica (Figura 2b), (Phillips et al., 2012), se implantando preferencialmente no omentum e subsequentemente se espalhando na superfície peritoneal (Pradeep et al., 2014).

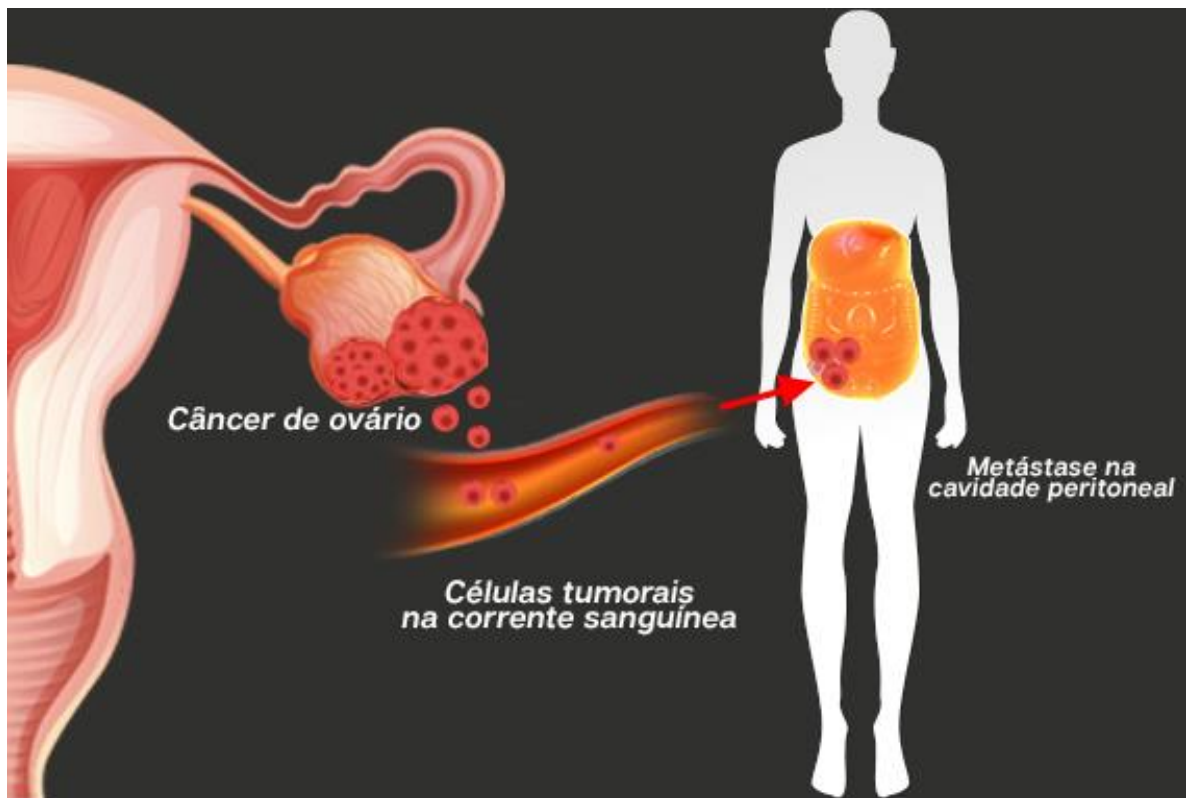
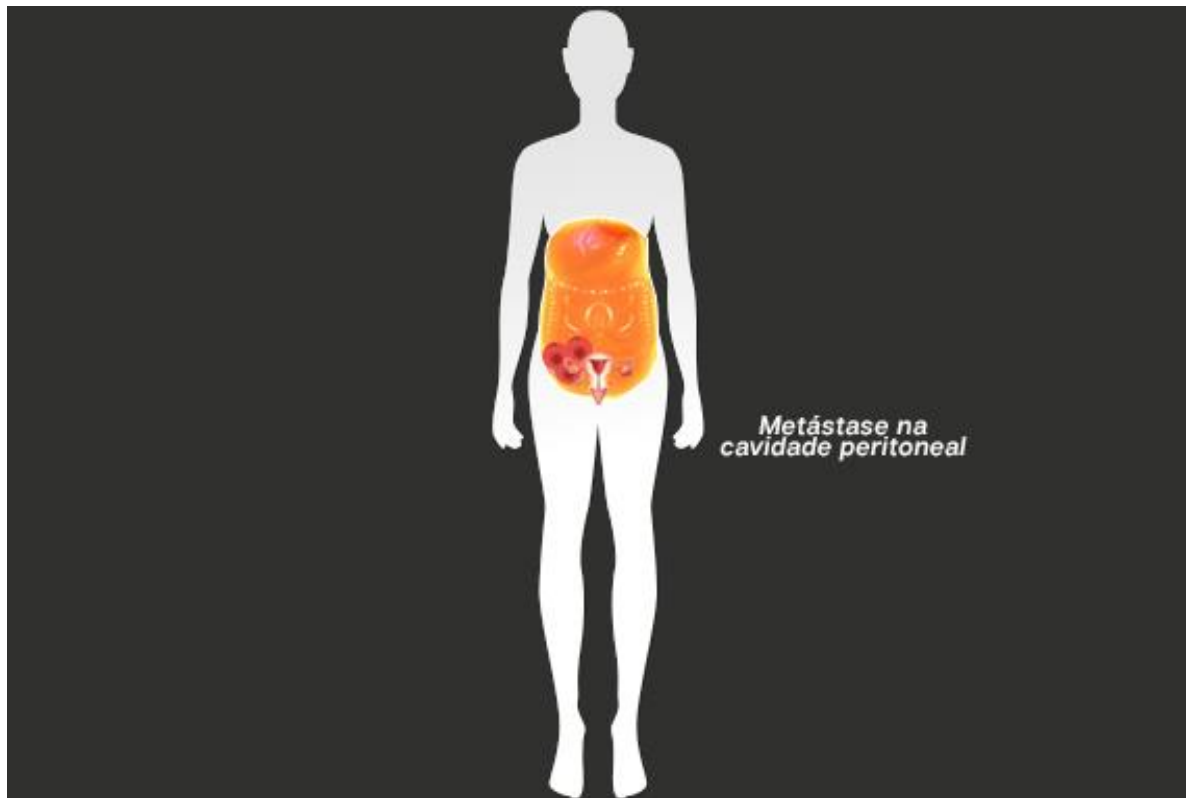


Figura 2: (a) Disseminação direta, e (b) Disseminação hematológica, das células tumorais do ovário para o peritônio (autoria própria).

O crescimento dos nódulos na região peritoneal gera graves complicações tais como: acúmulo anormal de líquido na cavidade abdominal perda de apetite, fadiga, dificuldades respiratórias, fraqueza e obstrução intestinal (Lu et al., 2014). Destas complicações, a mais presente na carcinomatose peritoneal é a acumulação anormal de líquido na cavidade abdominal. Este fato ocorre devido à baixa reabsorção linfática no local, e ao aumento da produção de líquido devido à alteração da permeabilidade capilar, provocada pela doença metastática (Tuttle, 2006; Canda, 2013).

Durante a última década muitos estudos tiveram o objetivo de melhorar a terapia para a carcinomatose peritoneal de ovário. O tratamento da carcinomatose peritoneal de ovário tem como finalidade diminuir ao mínimo a quantidade de células tumorais na região peritoneal, contribuindo para a sobrevida global livre da doença, além de melhorar a qualidade de vida das pacientes (Rueth et al., 2011; Michelle et al., 2013; Shen et al., 2013).

Uma das estratégias utilizadas contra a carcinomatose peritoneal de ovário é a quimioterapia intravenosa, um tratamento sistêmico. A cirurgia citorrredutora é uma abordagem terapêutica indicada para diminuir ao mínimo a carga tumoral, associada à quimioterapia adjuvante, com a finalidade de destruir qualquer vestígio ou sinal de um câncer que ainda resta após a cirurgia (Glehen et al., 2010; Gabra, 2014; Ye et al., 2014). A utilização da cirurgia citorrredutora combinada com a hipertermia intraperitoneal, também mostrou ser muito benéfica (Chua et al., 2009; Yan et al., 2009; Ahmed et al., 2014; Elias et al., 2014; Bakrin et al., 2014; Chiva et al., 2015). Além dessas, a quimioterapia intraperitoneal e a hipertermia intraperitoneal também foram amplamente testadas, avaliadas e implementadas (Beck et al., 2015).

Quimioterapia no Tratamento da Carcinomatose Peritoneal de Ovário

A aplicação da quimioterapia endovenosa no tratamento da carcinomatose peritoneal de ovário é baseada em compostos de platina associados com o PTX (Figura 3) (Du Bois et al., 2010; Bukowska; Galek; Marczak, 2015; Parayath et al., 2019; Brewer et al., 2020). Porém a associação desses compostos gera graves efeitos tóxicos, como: anemia, trombocitopenia, neutropenia, neutropenia febril, alopecia, ototoxicidade, e neuropatia periférica,

o que normalmente limita a dose dos agentes quimioterápicos (Ozols, et al., 2003; Du Bois et al., 2010).

Embora as pacientes apresentem alta taxa de resposta ao tratamento de primeira linha, cerca de 80% delas apresentam recidiva da doença 3-5 anos após o tratamento inicial (Burchim; Jarchowsky-Dolberg; Fishman, 2013; Cheng et al., 2018), necessitando de tratamentos quimioterápicos subsequentes (Friedlander et al., 2011; Hanker et al., 2012). Para que se inicie o tratamento com a segunda linha de quimioterápicos é necessário considerar: o intervalo livre de progressão, a “*performance status*” da paciente (um sistema de escore, em uma escala de 0 a 10, que classifica os pacientes, em que 10 corresponde à "saúde perfeita" e 0 à morte), sintomas aparentes, histórico de toxicidade do tratamento anterior e o custo do tratamento (Rakowski et al., 2012).

Fármacos que não são à base de platinas (Figura 3) como a doxorubicina lipossomal peguilada (*Doxil*[®]), o PTX, o topotecan, a gemcitabina (Shapiro *et al* 1996), a ciclofosfamida e o etoposídeo oral (Moosavi et al., 2004), usados isoladamente ou em combinação, são opções para o tratamento do câncer de ovário avançado recorrente e da carcinomatose peritoneal, e demonstraram aumentar a sobrevida das pacientes. Mesmo com os tratamentos acima citados, a taxa média de sobrevida após o diagnóstico do câncer de ovário avançado recorrente e carcinomatose peritoneal é somente de 4 a 10 meses (Hanker et al., 2012; Tempfer; et al., 2014).

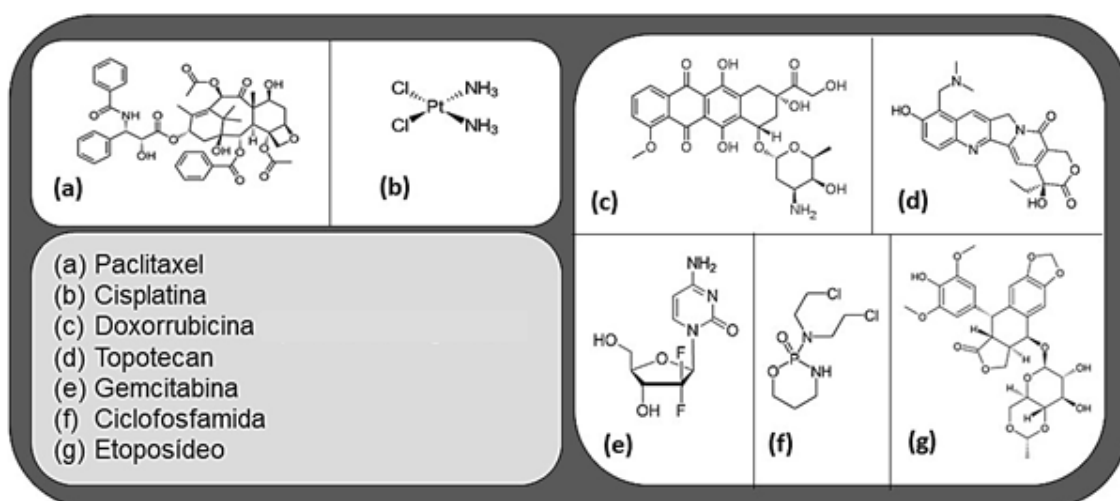


Figura 3: Fármacos utilizados no tratamento do câncer de ovário (autoria própria).

Paclitaxel

O PTX é um pseudoalcalóide diterpenóide, com a fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$, e foi o primeiro da classe de agentes estabilizadores de microtúbulos a ser descoberto. Este foi o resultado da investigação de mais de 12.000 compostos naturais para atividade anticâncer, e foi aclamado pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos como um dos avanços mais significativos em quimioterapia (Appendino, 1993; Wall e Wani, 1996).

O PTX foi isolado no início dos anos 1960 da casca do *Taxus brevifolia* (família Taxaceae), obtido em forma pura em 1969, e sua estrutura só foi publicada em 1971, devido à sua baixa concentração e complexidade estrutural (Wani et al., 1971; Bingham, 1994). Somente em 1979 se descobriu o mecanismo de ação e atividade na triagem de tumores (Schiff e Horwitz, 1981; Rowinsky et al., 1990; Parayath et al., 2019; Brewer et al., 2020).

O PTX se liga à tubulina e estabiliza o microtúbulo, ou seja, os microtúbulos se tornam bastante estáveis, porém disfuncionais devido ao impedimento da despolimerização, diferentemente dos alcaloides da Vinca, que induzem a desmontagem de microtúbulos (Ten Tije et al 2003; Zasadil et al 2014). A consequência da interrupção da dinâmica normal dos microtúbulos acarreta a inibição da mitose e consequente morte celular.

Devido ao seu mecanismo de ação, o PTX tem sido utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias, inclusive no tratamento do câncer de ovário metastático e na carcinomatose peritoneal (Jauhari et al., 2009). Porém devido à sua hidrofobicidade, a aplicação e a biodisponibilidade do PTX são muito dificultadas, além disso ele é um fármaco de rápida metabolização hepática e muito propenso a selecionar células tumorais resistentes (Harris et al., 1994; Kampan et al., 2015; Tew, 2016; Alves et al., 2018).

Existem muitas tentativas de melhorar a baixa solubilidade e a biodisponibilidade do PTX, e, conseqüentemente, aumentar a sua atividade anticâncer (Dorr, 1994; Bernabeu et al., 2017; Zou et al., 2017; Risnayanti et al., 2018). A primeira formulação de PTX comercializada foi o Taxol®, este liberado para o tratamento do câncer de ovário epitelial. Essa formulação é preparada com a solubilização 1:1 do PTX no cremophor EL (óleo de rícino polietoxilado),

com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade (Bernabeu et al., 2017). No entanto, foram reportadas toxicidades relacionadas a esse tipo de solubilização, incluindo hipersensibilidade, nefro e neurotoxicidade, (Dorr, 1994; Gelderblom et al., 2001; Ojima et al., 2016), sendo o prolongamento da infusão intravenosa uma estratégia para diminuir esses efeitos colaterais (Brown et al., 1991).

Portanto, há a necessidade de desenvolver novos tipos de formulações para melhorar as dificuldades encontradas no uso do PTX. E uma das estratégias mais amplamente aceitas na literatura é a formulação de nanocarreadores que permitam a boa administração do composto hidrofóbico sem acarretar toxicidade ao organismo.

Nanomedicina e entrega de fármacos

Os nanossistemas possuem propriedades únicas e, por conseguinte, a aplicação da nanotecnologia na oncologia possui um grande potencial tanto na detecção mais precoce dos tumores, quanto no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes (Siddiqui et al., 2012). A nanomedicina pode então ajudar a solucionar problemas como a ordem e a necessidade de utilizar terapias coadjuvantes, e os meios de direcionar os agentes ativos para seus alvos.

Os sistemas na escala nanométrica podem ser utilizados como ferramenta de intervenção terapêutica na oncologia clínica como transportadores de fármacos e/ou agentes bioativos. As modificações promovidas nos nanocarreadores permitem a entrega direcionada de moléculas farmacologicamente ativas, liberação sustentada dos fármacos, escolha de diferentes vias de administração (Cheng ZL, et al., 2012; Etheridge et al., 2013; Wicki A, et al., 2015).

A utilização de nanocarreadores pode proteger o organismo do agente ativo no momento do transporte até o local destinado, aumentar a biodisponibilidade do fármaco, superar a resistência a fármacos, bem como diminuir a rápida degradação metabólica e sua excreção pelos rins (Friberg & Nyström, 2016). Sendo assim, os nanocarreadores podem melhorar a atividade antitumoral dos fármacos por aumentar a sua biodisponibilidade e diminuir a toxicidade sistêmica dos mesmos.

Diversos trabalhos têm demonstrado o sucesso da utilização de

nanocarreadores para o PTX no tratamento do câncer de ovário. Zhang e colaboradores (2013) desenvolveram uma nanopartícula direcionada para FSHR (receptor do hormônio folículo-estimulante), o peptídeo FSH β 81–95 mostrou uma melhora do efeito citotóxico do PTX *in vitro*, além de atividade antitumoral muito eficaz e diminuição dos efeitos colaterais relacionados ao PTX *in vivo* (Zhang et al., 2013). Na mesma linha, Fan e colaboradores (2014) avaliaram o tratamento com o FSHP-NP-PTX (PTX carregado dentro de uma nanopartícula polipeptídica do hormônio estimulador folículo estimulante). Foi observado que esse tratamento apresentou um direcionamento para as células superexpressaram o FHSR, além de auxiliar no controle da metástase linfática (Fan et al., 2014).

Uma outra estratégia foi a nanoformulação de PTX revestido com ácido hialirônico carregado em nanopartículas lipídicas catiônicas (HA-PTX-NLCs), este foi desenvolvido por Wang e Jia (2016) e avaliados quanto a sua eficácia antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Neste trabalho, foi observado que houve um perfil de liberação sustentada do PTX, melhorando sua atividade e contornando a resistência das células ao PTX. Observou-se também a diminuição da toxicidade em comparação com outras formulações, devido ao fato de que o HA-PTX-NLCs é considerado biodegradável e biocompatível (Wang & Jia, 2016).

O progresso científico na área de materiais e na área farmacêutica permite o projeto de uma ampla gama de nanocarreadores, como por exemplo: nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros, nanopartículas inorgânicas, e lipossomas, com diversos tamanhos, arquiteturas e propriedades de superfícies diferentes.

Lipossomas

Os lipossomas são sistemas que se assemelham às membranas lipídicas celulares, visto que são compostas por bicamadas concêntricas, únicas ou múltiplas, encapsulando um compartimento aquoso (Figura 4) (Bozzuto e Mollinari, 2015).

Em 1960, Alec D. Bangham realizou experimentos para determinar o comportamento de lipídeos imersos em água, e observou a formação de vesículas (Monteiro et al., 2014; Bozzuto e Mollinari, 2015). Gregoriadis e

colaboradores, em 1971, propuseram que os lipossomas poderiam ser utilizados como sistemas transportadores de fármacos.

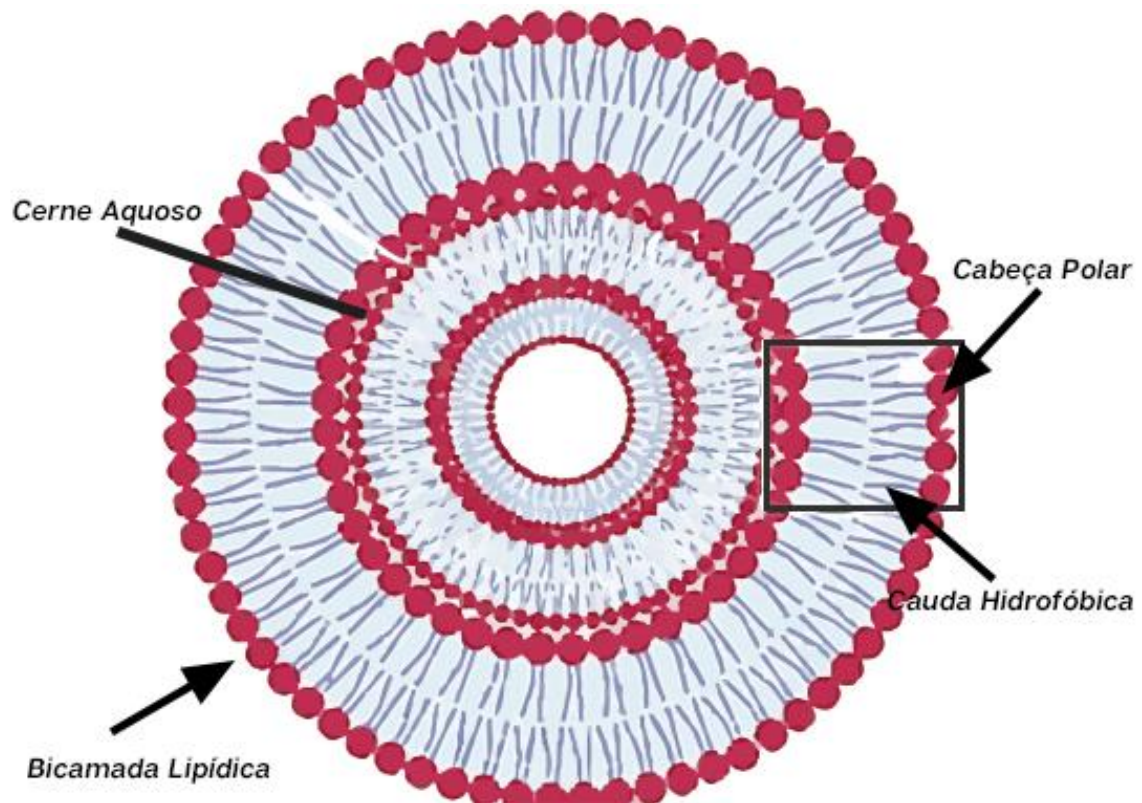


Figura 4: Conformação esquemática de um lipossoma multilamelar (autoria própria).

De fato, devido à sua polivalência estrutural no tamanho, na versatilidade da composição lipídica, na diferenciação da carga superficial, na possibilidade de ajustar a fluidez da membrana, na capacidade de incorporar fármacos com diferentes hidrofilicidades, e na sua capacidade de encapsular mais de um fármaco, os lipossomas possuem grande potencial terapêutico (Monteiro et al., 2014; Bozzuto e Mollinari, 2015).

Inicialmente, o desenvolvimento de sistemas vesiculares encontrou muitas limitações farmacotécnicas, relacionadas à instabilidade físico-química e biológica dos lipossomas, juntamente à baixa eficiência de encapsulação dos fármacos, e limitações farmacológicas que são associadas à rápida captura do sistema lipossomal pelas células do sistema fagocitário mononuclear, quando administrado de maneira sistêmica. Esses lipossomas convencionais

prontamente eram eliminados da circulação sanguínea e se acumulavam no fígado, no baço e na medula óssea, o que tornava a sua utilização limitada (Allen & Hansen, 1991).

Isto posto, com o objetivo de preparar lipossomas que são capazes de escapar do sistema fagocitário mononuclear, dispondo assim de maior tempo na circulação sanguínea, glicolípídeos foram associados na membrana lipídica e modificações químicas foram feitas na superfície dos lipossomas (Allen e Chonn, 1987; Gabizon A, Papahadjopoulos, 1992). Klibanov e colaboradores (1990) incorporaram na bicamada lipídica o polietilenoglicol (PEG), um derivado lipídico de polímeros hidrofílicos, ampliando expressivamente o tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea.

O Doxil[®] (Janssen Biotech, Inc. - EUA) é uma formulação lipossomal composta por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), colesterol (CHOL) e DSPE-PEG 2000. Aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1995, foi a primeira formulação aprovada para uso clínico no tratamento do câncer, e trouxe ganhos para a clínica médica por aumentar o tempo de meia vida da doxorubicina e reduzir a cardiotoxicidade. (Gabizon & Martin, 1997; Safra et al., 2000; Zhao, 2018). Esta é muito utilizada no tratamento do câncer de ovário avançado, em casos de recorrência tumoral e nos casos de carcinomatose peritoneal, com taxas de resposta de aproximadamente 15% quando utilizada como agente único (Gordon et al., 2000; Campos et al., 2001).

Também foram desenvolvidos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, e com isso, foi possível aumentar o tempo da veiculação do sistema lipossomal no meio biológico, aumentar a especificidade da interação com as células tumorais alvo e controlar a liberação dos fármacos. Estes lipossomas são compostos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina, organizados em meio aquoso, à temperatura ambiente, na forma hexagonal, juntamente com a adição de agentes estabilizantes (lípidos carboxilados, como o hemissuccinato de colesterila - CHEMS). Quando expostos a um pH ácido, como nos tecidos tumorais, ocorre a protonação destes agentes, e assim uma perturbação e desarranjo das vesículas, com conseqüente exposição do fármaco (De Oliveira et al., 1998; De Oliveira et al., 2000; Simões et al., 2004).

Muitos pesquisadores têm trabalhado com lipossomas para serem aplicados no tratamento de câncer de ovário e estes já mostraram muitas

vantagens nessa utilização (Franco et al., 2018; Caracciolo et al., 2018; Bhowmik et al., 2018; Tang et al., 2019; Khayrani et al., 2019).

Qi e colaboradores (2018) avaliaram a eficácia do PTX carregado por um lipossoma peglado (PL-PTX) em células tumorais de ovário *in vitro* e em modelo animal. Neste estudo foi observado que o PL-PTX induziu a apoptose nas células tumorais por via dependente de TNF *in vitro*. Além disso, o tratamento inibiu o crescimento tumoral, prolongou a sobrevivência dos animais, e diminuiu a agressividade do tumor (Qi et al., 2018).

Huang e colaboradores (2018) desenvolveram um novo lipossoma com longa estabilidade como carreador para o PTX, lipo-PTX. Este tratamento mostrou que não houve diferença na atividade antitumoral *in vivo* do lipo-PTX em comparação com o Taxol, porém, houve uma diminuição significativa nos efeitos colaterais sistêmicos nos animais tratados com o lipo-PTX, sendo observado pela toxicidade hematopoiética, reações de hipersensibilidade e irregularidades cardíacas (Huang et al., 2018).

Jin e colaboradores (2020) avaliaram a indução de neuropatia periférica induzida por quimioterapia em pacientes com câncer de ovário, que receberam como tratamento algum tipo de taxano. O estudo observou que uma significativa proporção destes pacientes sofre de neurofagia residual por um período longo de tempo, além disso, o uso do docetaxel ou do PTX lipossomal mostrou risco de neurofagia periférica sensorial. Este estudo apresentou também que o PTX lipossomal era mais seguro do que o docetaxel e o PTX em termos de neurotoxicidade (Jin, Zhang & Yang, 2020).

Portanto, a utilização de um fármaco de primeira linha, como o PTX, em um sistema lipossomal pode trazer resultados bastante promissores para a melhoria da eficácia antitumoral contra câncer de ovário.

OBJETIVO

Objetivo Geral

O objetivo deste projeto consistiu em avaliar a atividade antitumoral e a toxicidade do paclitaxel contido em um sistema lipossomal denominado de LFCP PTX em modelo experimental de carcinomatose epitelial de ovário.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos consistiram em avaliar:

- A citotoxicidade *in vitro* do LFCP PTX em células de carcinoma epitelial de ovário pelo ensaio colorimétrico de MTT;
- O tipo de morte celular induzida pelo LFCP PTX em células de carcinoma epitelial de ovário por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito do LFCP PTX na proliferação de células de carcinoma epitelial de ovário e na capacidade das células de formarem colônias por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica;
- O efeito do LFCP PTX sobre a capacidade de migração de células de linhagem tumoral de ovário por meio do ensaio de migração bi e tridimensional, além da expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização induzidas pelo TGF- β ;
- A eficácia antitumoral do LFCP PTX no tratamento da carcinomatose peritoneal de ovário em camundongos;
- A toxicidade do LFCP PTX quando utilizado no tratamento da carcinomatose peritoneal de ovário em camundongos.

METODOLOGIA

Obtenção e Caracterização do nanossistema lipossomal

O nanossistema Lipossoma Fusogênico de Circulação Prolongada (LFCP), foi produzido e caracterizado de acordo com os trabalhos de Franco et al., 2019, e Roque et al., 2019. O LFCP PTX foi gentilmente cedido para o desenvolvimento deste projeto pelo grupo de pesquisa da Professora Dr^a Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Para produção do nanossistema lipossomal foram utilizados os lipídeos sintéticos: Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) e distearoylphosphatidylethanolaminepolyethyleneglycol 2000 (DSPE –PEG2000) adquiridos de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Além disso, foi utilizado o colesterol Hemisuccinato de colesterilo (CHEMS) Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Este nanossistema foi produzido pelo método de hidratação do filme lipídico para formação de vesículas multilamelares (MLV). Os LFCP contêm o quimioterápico PTX (fármaco hidrofóbico), da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil).

O LFCP foi avaliado quanto a estabilidade nanoscópica pelo método espalhamento dinâmico da luz – EDL, utilizando equipamento Zetasizer com ângulo de 90 graus em cubetas de poliestireno. Para esta avaliação, as amostras foram diluídas 10 vezes, 100 µL formulação lipossomal para 900 µL tampão HERPES. O dado obtido representa a média de três leituras de cada amostra, frequência da dispersão por intensidade de luz espalhada.

A análise morfológica do sistema lipossomal foi avaliada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para tal, a amostra foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em água destilada, colocada em tela de cobre de 300 mesh, fixada e contrastada com vapor de ósmio. Após 24 horas de secagem o material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão operando a 80 kV (Jeol® 1011C Japão). Outras características do sistema lipossomal LFCP foram determinadas pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Mônica Cristina de Oliveira (Barbosa et al., 2015; Ferreira et al., 2016).

Testes *in vitro*

Linhagem celular

Neste estudo foram utilizadas células de carcinoma epitelial de ovário, da linhagem A2780 (BCRJ Code: 0031) estabelecida a partir de tecido tumoral de um paciente não tratado e obtida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro e gentilmente cedida pela Professora Dr^a. Sônia Nair Bão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília – UnB.

Manutenção da cultura celular

As células da linhagem A2780 (BCRJ code: 0031) foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido no estoque de células do Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília – UnB.

Para a realização dos experimentos, alíquotas de células foram descongeladas, à temperatura ambiente, e transferidas para garrafa de cultivo celular. As células foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA) a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 80% de umidade. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementadas com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). O meio de cultivo foi tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO₃), sendo o pH ajustado para 7,3-7,4 com adição de ácido clorídrico (HCl). As células foram monitoradas em microscópio de luz invertido para acompanhar o crescimento, e identificar possíveis mudanças morfológicas e contaminações.

Análise da citotoxicidade do Paclitaxel no sistema lipossomal

A citotoxicidade do LFCP PTX foi determinada por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo). A redução do MTT é proporcional à atividade principalmente das desidrogenases mitocondriais e, em

última análise à viabilidade celular (Mosmann 1983). Para esse teste as células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços, 10^4 células/poço e, em seguida, expostas por 24 horas, ao LFCP PTX ou ao PTX, sendo que as amostras LFCP PTX e PTX foram diluídas em meio de cultivo, e Cremophor® e posteriormente em meio de cultivo, respectivamente. Como controle foram utilizadas células sem qualquer tratamento. Foram realizados três experimentos independentes, cada um deles em triplicata e em seis concentrações diferentes: 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ng . mL⁻¹.

Depois de 24 horas, os fármacos foram removidos e as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultivo à 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Depois de três horas, a solução de MTT foi descartada e o formazan foi diluído com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. As células foram então analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi utilizada como índice de viabilidade celular e os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao grupo controle. Os dados obtidos foram utilizados para determinar a CI50.

Avaliação do tipo de morte celular induzida pelo paclitaxel no sistema lipossomal

Quando as células iniciam o processo de morte celular por apoptose, o primeiro passo é a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática. Este evento contribui para facilitar o reconhecimento celular por proteínas como a Anexina V (Galluzzi et al., 2012). A 7-aminoactinomicina D (7AAD) é um composto químico fluorescente que possui forte afinidade pelo DNA de células em processo de morte por necrose, sendo excluído quando em células vivas (Wadkins; Jovin, 1991). Portanto, este procedimento utiliza a diferenciação de células marcadas com Anexina V e 7AAD para designar o tipo de morte celular que está ocorrendo.

Assim para avaliar o tipo de morte celular induzida pelo Paclitaxel em um sistema lipossomal, células da linhagem A2780 foram semeadas em concentração de 6×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos: 1) *LFCP PTX*, 2) meio de cultivo (controle) e 3) H₂O₂. Utilizou-se as concentrações obtidas de CI50 para cada

tratamento. Após o tempo de tratamento de 24 horas, as células foram desaderidas com tripsina, lavadas e incubadas com tampão de ligação (0,1 M de HEPES pH 7,4; 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂). Posteriormente, adicionou-se 5 µL de Anexina V e 10 µL de 7AAD e incubou-se por cinco minutos, em temperatura ambiente e no escuro. As células foram então analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA) e de cada amostra foram contados 10.000 eventos. Os resultados foram analisados com o *software* FlowJo® vX 0.7.

Análise de formação de colônias das células remanescentes pós tratamento com Paclitaxel no sistema lipossomal

O ensaio de formação de colônia, ensaio clonogênico, é um teste de sobrevivência celular que permite analisar a capacidade de as células proliferarem e de formarem colônias após algum tipo de tratamento. Para este teste, as células A2780 foram semeadas (10⁵ por poço) em placas de seis poços e após sua adesão foram tratadas com: 1) *PTX*; 2) *LFCP PTX*; e 3) meio de cultivo (controle), por 24 horas. As concentrações dos fármacos eram iguais ao CI50 de cada um dos tratamentos. Passado o tempo de tratamento, o sobrenadante foi retirado e as células sobreviventes foram lavadas duas vezes com PBS 1x e depois desaderidas com tripsina. As células foram contadas utilizando-se o corante azul de tripan 0,4%, depois 2x10³ células foram semeadas em placas de 6 poços com meio RPMI sem SFB. As células ficaram em cultivo por cinco dias, sendo o meio de cultivo trocado no terceiro dia.

As colônias formadas foram processadas para a visualização em estereoscópio. O meio de cultivo foi retirado, e as células foram lavadas cuidadosamente duas vezes com PBS. As colônias foram fixadas com metanol, e depois coradas com cristal violeta 0,5% por dez minutos. O excesso de corante foi removido com água destilada. As imagens das colônias foram analisadas e fotografadas em lupa Leica EZ4 Stereo (Leica – Alemanha).

Influência do Paclitaxel no sistema lipossomal sobre a capacidade de migração e invasão celular

Para determinar se células da linhagem A2780 sobreviventes ao tratamento com o *LFCP PTX* mantêm a capacidade de proliferar e de formarem

colônias foram realizados dois ensaios de migração celular. O teste *wound healing*, um teste de migração celular bidimensional e o teste de medição em tempo real com base na impedância celular, além da expressão de genes da família TGF- β , conhecidos por estarem envolvidos vias na migração celular.

Teste de Migração celular pelo método Wound Healing

Para o estudo da migração celular bidimensional células da linhagem A2780, 2×10^5 células/poço foram colocadas em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foi feito um risco no fundo dos poços com a ponta de uma pipeta de 10 μ L, e adicionado os tratamentos: 1) *PTX*; 2) *LFCP PTX*; e 3) meio de cultivo (controle), todos com 1% SFB. Utilizou-se as concentrações obtidas de CI50 para cada tratamento. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, os tratamentos foram retirados com o auxílio de uma pipeta e os poços foram lavados 1 vez com PBS 1X, em seguida colocou-se meio de cultivo RPMI 1640 com somente 1% de SFB e as células foram incubadas por mais 24 h. Foram obtidas imagens ao longo do risco nos poços de cada grupo com o microscópio EVOS FL em contraste de fase nos 3 tempos analisados (tempo 0 – no momento em que foi feito o risco, tempo 1 após 24 h de tratamento, e tempo 3 – 24 h após a retirada do tratamento). As áreas foram mensuradas usando o plugin MRI Wound Healing Tool para a o software Image J 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). E o percentual de cicatrização foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de cicatrização} = \frac{\text{Área do risco} \times 100}{\text{Área do risco no tempo 0}}$$

Teste de Migração celular medido em tempo real com base na impedância celular

Para medição da migração e invasão de células em tempo real utilizou-se o sistema de xCELLigence RTCA DP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Para tal, utilizou-se uma placa CIM16, formada por um acoplamento

de duas câmaras, separadas por uma membrana porosa. A migração celular é medida diretamente através dos poros da câmara superior para a superfície inferior da membrana, nesta estão ligados os eletrodos. O SFB foi utilizado como um atrativo para que as células passassem de uma câmara para a outra. Portanto, houve adição de 10 % de SFB somente na câmara inferior.

Células A2780 foram semeadas em concentração de 6×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas LFPC PTX (na concentração de CI50) ou não (grupo controle). Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas com meio de cultivo sem SFB. Em seguida as mesmas foram contadas utilizando-se a câmara de Neubauer e foi retirado o volume suficiente para 3×10^4 de células por poço. Para este ensaio utilizou-se o protocolo do fabricante xCELLigence® Real-Time Cell Analysis - *CIM Protocol* (ACEA Biosciences, Inc.). As células foram deixadas no equipamento por 72 h. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0.

Avaliação por qRT-PCR da expressão de genes envolvidos na migração celular

Células da linhagem A2780 foram plaqueadas na concentração $1,0 \times 10^5$ células/poço em placa de 12 poços e tratadas ou não com LFPC PTX. Após 24 horas, as células foram lavadas uma vez com PBS, ressuspensas e plaqueadas na câmara superior de uma placa Transwell (membrana 8 μm) de 24 poços (Corning) com meio de cultura sem SFB, e na câmara inferior foi colocado meio com 10 % de SFB. Após 48 horas, as células foram coletadas para a extração do RNA. O RNA total foi extraído usando o Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado com NanoDrop2000 (ThermoFisher Scientific).

A integridade do mRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. O cDNA foi obtido com o kit de alta capacidade de RNA para cDNA™ (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas com o Master Mix rápido avançado TaqMan™ (Applied Biosystems) em um sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems).

As reações de amplificação de 10 µl foram realizadas em placas de matriz Taqman™ personalizadas de 96 poços (ThermoFisher - Custom/Flexible TaqMan™ Array Plates - TAP) e consistiam em 5 µl do TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, 1 µl do cDNA e 4 µl de água livre de nucleases. Os genes analisados foram: ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1), TWIST1 (twist family bHLH transcription factor 1), VIM (vimetin), NOTCH1 (notch 1), CDH1 (cadherin 1), CDH2 (cadherin 2), TGF-β1 (transforming growth factor beta 1), TGF-β2 (transforming growth factor beta 2), TGF-β3 (transforming growth factor beta 3), SNAI1 (snail family transcriptional repressor 1), LAMA5 (laminin subunit alpha 5), BACH1 (BTB domain and CNC homolog 1). Programa de amplificação: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 20 s, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 minutos e 60 °C por 20 s.

A quantificação relativa foi alcançada pelo método 2-ΔΔct, usando os valores médios de 4 controles endógenos (18S, GUSB, ACTB e PGK1). Os dados foram expressos como média ± DP e analisados com o GraphPad Prism versão 7.0. As comparações foram feitas por ANOVA com o teste post-hoc de Tukey.

Testes *in vivo*

Modificação celular com luciferase

Para rastreamento da migração e proliferação das células A2780 implantadas em camundongos Balb/c *nude*, foi feita a transdução lentiviral conjugada de luciferase e GFP (proteína fluorescente verde) (Firefly luciferase + eGFP Lentifect™ Lentiviral Particles - GeneCopoeia™).

Para esse ensaio, células A2780 foram cultivadas em duas garrafas de 25 cm² com 2 mL de meio de cultivo RPMI-1640 completo. Sendo que uma foi utilizada como controle negativo (ausência de lentivírus) e outra sendo o grupo de transdução (positivo para lentivírus). As duas receberam o tratamento com 2 µL do agente de transdução polybrene (Sigma-Aldrich®), e somente na última foram adicionados 100 µL da solução lentiviral conjugada.

Após três dias adicionou-se puromicina (Gibco®) na concentração de 0,8 µg/mL em ambos os grupos, para selecionar as células que foram invadidas pelo lentivírus (população de interesse). Estas células foram mantidas em cultivo até

atingirem um nível de 80% de confluência, e em seguida foram criopreservadas para posteriormente serem subcultivadas.

Delineamento do Procedimento Experimental

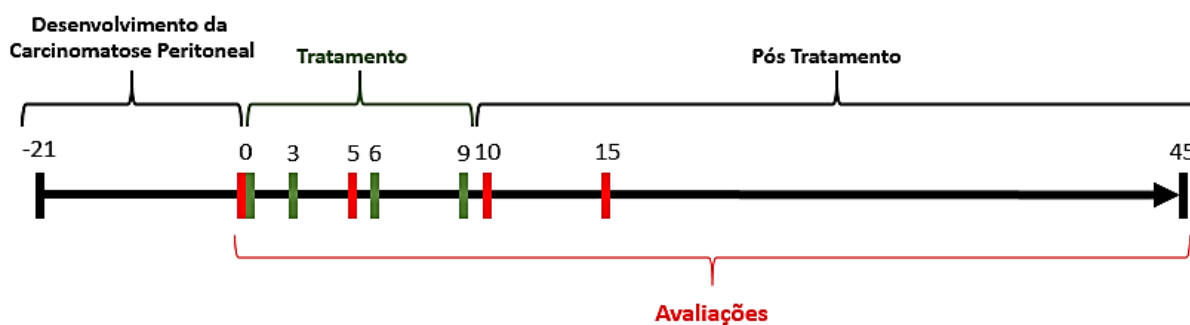


Figura 5: Delineamento Experimental. Riscos pretos indicam início e fim do experimento; Riscos verdes indicam os dias de tratamento intravenoso; Riscos vermelhos indicam os dias das análises.

Modelo animal

Neste estudo foram utilizados 28 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c nude, com 12 semanas de idade, pesando aproximadamente 20 g; esses animais foram adquiridos do biotério da Universidade de Católica Brasília – UCB. Todos eles foram mantidos no alojamento de animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB. A acomodação deles ocorreu em fotoperíodo de igual duração do dia e da noite, com temperatura controlada, 23 °C, filtragem de ar nas caixas e livre acesso à água e à ração, conforme guia de cuidados e utilização de animais de laboratório. Os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB Doc nº UnBDoC60/2017, ver Anexo 1).

Avaliação do crescimento tumoral

Para acompanhar o crescimento tumoral e melhor visualizar macroscopicamente as metástases, de modo a estabelecer o delineamento experimental para avaliar *in vivo* a atividade antitumoral LFCP –PTX, foram utilizados 12 animais.

Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme mostrado na Tabela 1. Cada animal recebeu inoculação intraperitoneal de 100 µL contendo 10⁶ de células A2780-luc, (dia 0). Os animais foram observados no equipamento IVIS® Lumina XR para a análise do crescimento tumoral e eutanasiados em diferentes tempos (dias: 1, 7, 14, 21 e 28).

Tabela 1: Grupos de animais utilizados no teste de Padronização do modelo tumoral.

Grupos	Número de animais	Volume Inoculado (µL)	Eutanásia (dias)
1	3	100	7
2	3	100	14
3	3	100	21
4	3	100	28

Avaliação da atividade antitumoral por meio de bioluminescência

Esta etapa do estudo consistiu na avaliação da atividade do LFCP -PTX sobre os tumores peritoneais. Para tal foram utilizados 16 animais, sendo que 12 deles receberam intraperitonealmente 100 µL de meio contendo 10⁶ células A2780-luc (dia 0), quatro animais não tiveram células tumorais inoculadas, constituindo assim o grupo controle negativo.

Após três semanas de inoculação das células A2780, os animais com tumor (Tabela 2) receberam a administração intravenosa do fármaco ou do LFCP PTX. Outros quatro animais com tumor não receberam tratamento algum, constituindo assim o controle positivo (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos experimentais

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume Injetado (µL)
--------	--------------	----------------------

Animais sem tumor	-	-
Animais com tumor sem tratamento	-	-
Animais com tumor e tratados com PTX livre	3,0	100
Animais com tumor e tratados com LFPC-PTX	3,0	100

As imagens foram adquiridas com intervalo de 7 dias, no equipamento IVIS® Lumina Serie III (PerkinElmer Inc.) após a administração via intraperitoneal de 100 µL de D-luciferina (Sigma) na concentração de 150 mg/kg, e mantendo os animais anestesiados com 2% isoflurano sob oxigênio na câmara de imagem. Para imagens de bioluminescência das células A2780-luc foi feito o ajuste do filtro de emissão aberto, e as imagens foram coletadas com 60 segundos de exposição, por um período de 20 minutos. Os dados foram coletados pelo programa Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Os animais foram pesados semanalmente e os dados foram comparados entre os grupos.

No 45º dia após a inoculação das células tumorais os animais tiveram o sangue coletado, por punção cardíaca para ensaios hematológicos e bioquímico. Depois disso, foi realizado o procedimento de eutanásia por meio de dose letal de Propofol, 60 mg/Kg.

Em seguida, os camundongos foram colocados sobre um campo operatório e utilizando-se um bisturi, foi realizada a incisão frontal, reta, para a retirada e coleta dos órgãos: pulmão, fígado e baço. Estes foram observados quanto a largura, comprimento e espessura.

Análise Hematológica e Bioquímica

As amostras de sangue coletadas foram avaliadas no hematómetro (LabTest, Brasil), a fim de verificar as possíveis alterações hematológicas causadas pelo tratamento. Para isso, 300 µL de sangue foram colocados em um tubo para leitura no equipamento e analisado pelos seguintes parâmetros: hemoglobina (HGB), hematócrito total (HCT), eritrograma (RBC), leucograma

(WBC), plaquetograma (PLT) contagem total e diferencial de linfócitos (WBC). Para contagem diferencial de leucócitos foi avaliado: percentual de células brancas pequenas (linfócitos - W-SCR), percentual de células brancas grandes (monócitos/ basófilos/eosinófilos - W-LCR) e porcentagem contagem de grandes (neutrófilos - WLCR).

Para a análise bioquímica parte do sangue foi colocado em tubos com gel separador para obtenção do soro e armazenado a -20 °C até o momento da análise. O soro foi utilizado para verificar os níveis de concentração das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH), além dos níveis de creatinina K e ureia. As análises foram executadas no analisador automático ChemWell T, LabTest, Brasil) conforme as orientações do fabricante.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo *software Graphpad Prism 7.0* tendo a diferença significativa considerada com 5 %, $p < 0,05$. A análise dos dados foi apresentada por gráficos também desenvolvidos pelo software. Cada dado foi analisado de acordo com a sua necessidade estatística. Assim, os testes foram analisados da seguinte forma:

- para os ensaios *in vitro*, foi utilizado o teste “One-Way ANOVA”, com pós-teste de Bonferroni.
- para os ensaios *in vivo* foram realizados os testes “One-Way ANOVA”, com pós-teste de Bonferroni, e teste T não pareado.

RESULTADOS

Testes *in vitro*

Caracterização do Nanossistema lipossomal

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas encontrado foi de 208 nm. O valor do potencial zeta (- 5,18 mV) conferindo próximo a neutralidade pela presença de fosfolípidos derivados do PEG na superfície dos lipossomas. O diâmetro das vesículas carregadas com o fármaco PTX foi semelhante ao das vesículas sem fármaco (brancas). Esses dados foram os mesmos obtidos no relatório de preparo dos lipossomas pelo grupo de pesquisa Dra Mônica de Oliveira (Franco et al., 2019).

Os lipossomas possuem morfologia com formato arredondado, monomodais, homogêneos. Foi possível determinar pela técnica de contraste negativo que as lamelas (bicamadas) dos lipossomas se apresentam em mais de seis bicamadas (Figura 6).

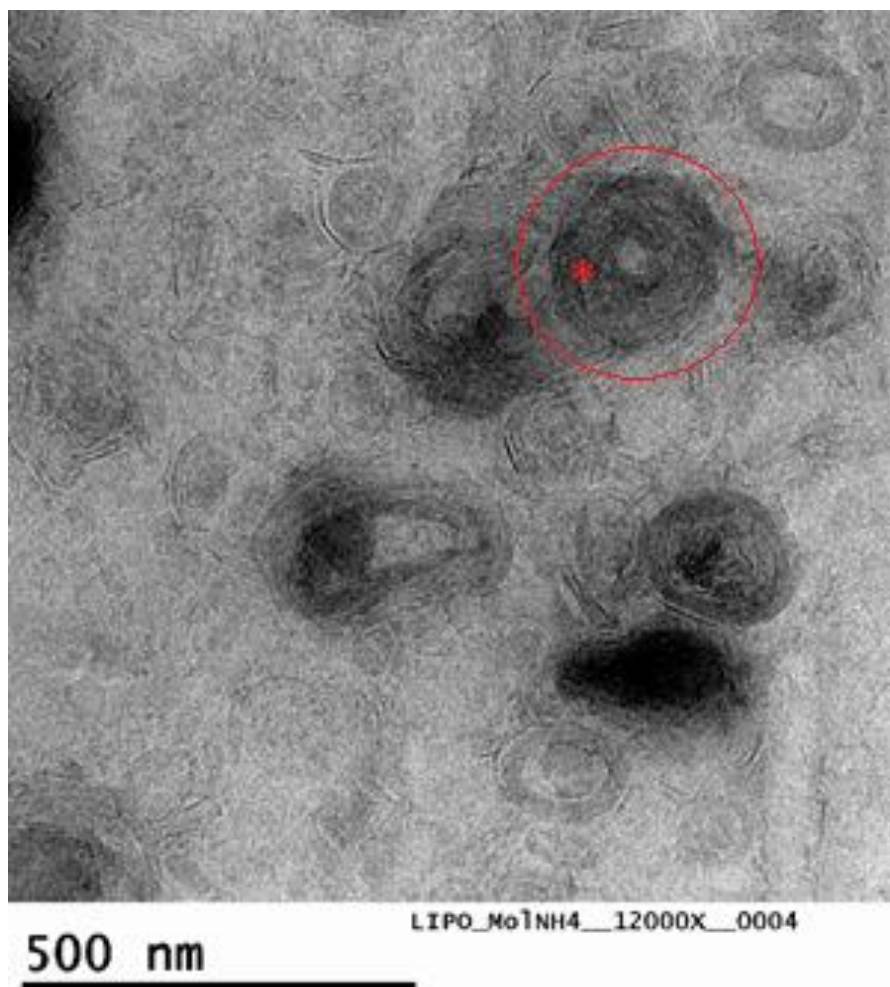


Figura 6: Análise morfológica do LFCP pela Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Formato esférico, monodispersos, homogêneos e tamanho de aproximadamente 180 nm. *lamelas, bicamadas do LFCP.

Determinação de Viabilidade Celular

Como mostrado na Tabela 3, o LFCP PTX apresentou CI50 igual a 19.51 ± 6.1 ng/mL sobre o crescimento de células da linhagem A2780, enquanto que o PTX mostrou CI50 de $24,69 \pm 5,25$ ng/mL. Anteriormente, foi feito um teste piloto de tratamento das células com o lipossoma sem o fármaco PTX, e este tratamento indicou que não houve citotoxicidade relacionada ao lipossoma.

Nos testes subsequentes utilizaram-se os fármacos em concentrações nos valores de CI50 determinados nesta etapa.

Tabela 3: Valores de CI50 da linhagem A2780 tratada com o fármaco livre e na forma lipossomal por 24 horas.

A2780 CI50 (ng . mL ⁻¹)	
LFCP PTX	19,51 ± 6,1
PTX	24,69 ± 5,25

Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Para analisar o perfil de morte celular induzido pelos LFCP PTX, células da linhagem A2780 tratadas com fármacos em concentrações nos valores de CI50 por 24 horas e após esse período foram marcadas com Anexina-V e 7AAD. É possível notar que a exposição das células A2780 ao fármaco na forma lipossomal, LFCP PTX, apresentou aumento significativo (22,1 %) na quantidade de células marcadas com Anexina (Q3) ($p < 0,0001$) (Figura 7), indicando um perfil de morte celular por apoptose (Figura 8).

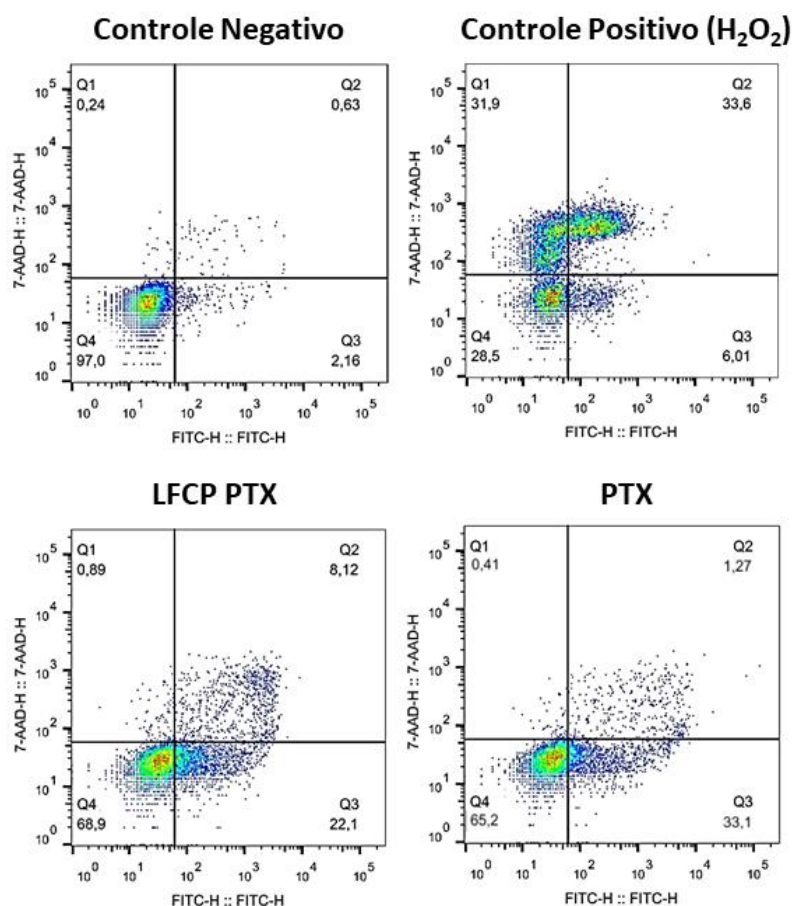


Figura 7:Dot plot da avaliação do tipo de morte celular em células tumorais de ovário A2780, após o tratamento com LFCP PTX e PTX. As células foram marcadas com Anexina-V e 7-AAD.

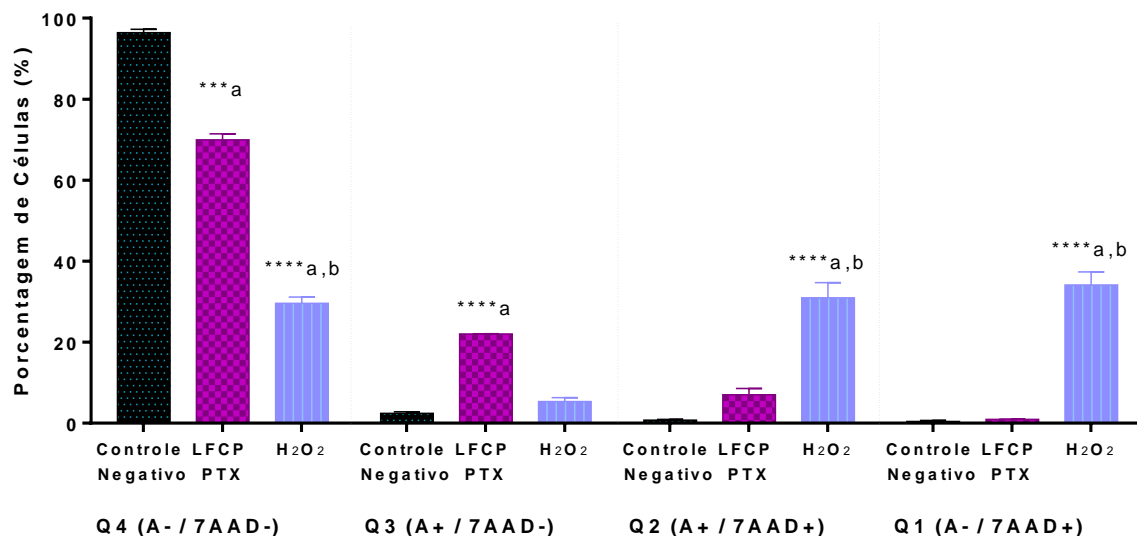


Figura 8: Porcentagem de células A2780 nos diferentes quadrantes analisados, após o tratamento com LFCP PTX. As células foram marcadas com Anexina-V e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo (Q4) corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial (Q3), o superior direito as células em apoptose tardia (Q2) e o superior esquerdo às células necróticas (Q1). Os dados de porcentagem de crescimento de colônias são apresentados como a média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$) (a) vs. controle negativo, (b) vs. LFCP PTX.

Análise da capacidade de formação de colônias

Esta análise foi realizada com o intuito de avaliar a recuperação celular, ou seja, se as células sobreviventes ao tratamento com o LFCP PTX mantêm a capacidade de proliferar e de formarem colônias.

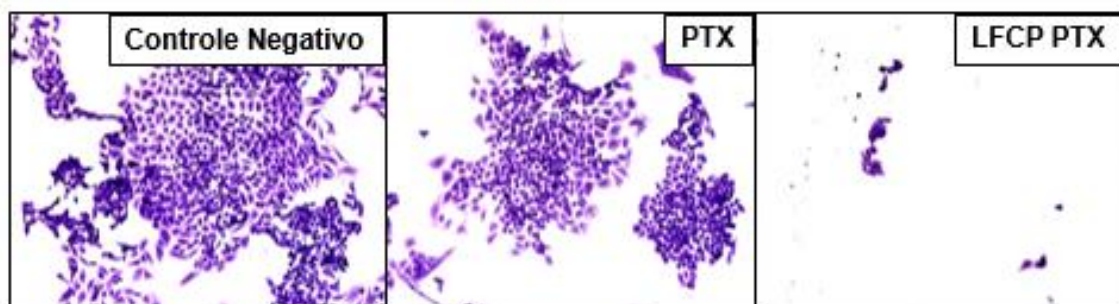


Figura 9: Imagem das colônias coradas com cristal violeta. As células A2780 foram tratadas com os valores de CI50 do fármaco livre e LFCP PTX por 24 horas. Após esse tempo, 2000 células que sobreviveram ao tratamento foram plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas por 5 dias. As imagens foram obtidas em lupa Leica EZ4 Stereo.

Na Figura 9 é possível observar que as células que não receberam

tratamento (controle negativo) proliferaram e formaram colônias de diversos tamanhos, sendo que em alguns casos não foi possível diferenciar os limites das colônias. O tratamento com o PTX livre induziu um padrão de crescimento das colônias semelhante ao do controle negativo. A porcentagem de colônias do controle negativo e do tratamento com o PTX (100 %) foram estatisticamente diferentes quando comparados à porcentagem de colônias do grupo tratado com o LFCP PTX (4,46 % \pm 0,5), ($p < 0,001$) (Figura 10).

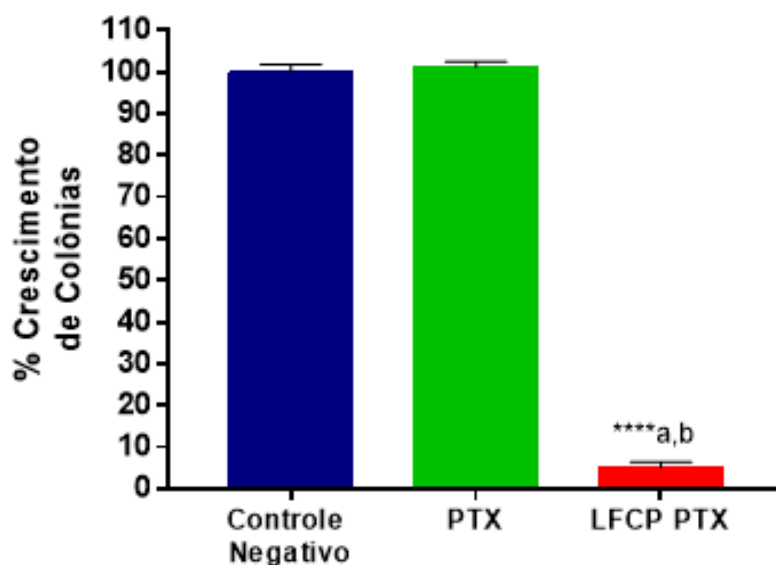


Figura 10: Efeito do tratamento com o PTX e os LFCP PTX na capacidade das células A2780 de formarem colônias. Os dados de porcentagem de crescimento de colônias são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços em relação ao grupo controle negativo (**** $p < 0,001$).

Avaliação da capacidade de migração celular pelo método Wound Healing

O presente estudo também investigou se o tratamento com o fármaco na forma lipossomal, LFCP PTX, poderia inibir a capacidade migratória das células A2780 usando a detecção de migração pelo método de Wound Healing. A porcentagem de migração das células tratadas está representada na Figura 11. Após 24 horas de tratamento, as células tratadas tanto com o PTX quanto com o LFCP PTX apresentaram uma menor capacidade de migração, em comparação com o grupo controle negativo ($p < 0,01$). Em seguida, na avaliação pós tratamento, foi visto que o grupo tratado com o LFCP PTX manteve a inibição da migração em comparação com o controle negativo ($p < 0,01$), o que não pode

ser observado com o grupo tratado com o PTX.

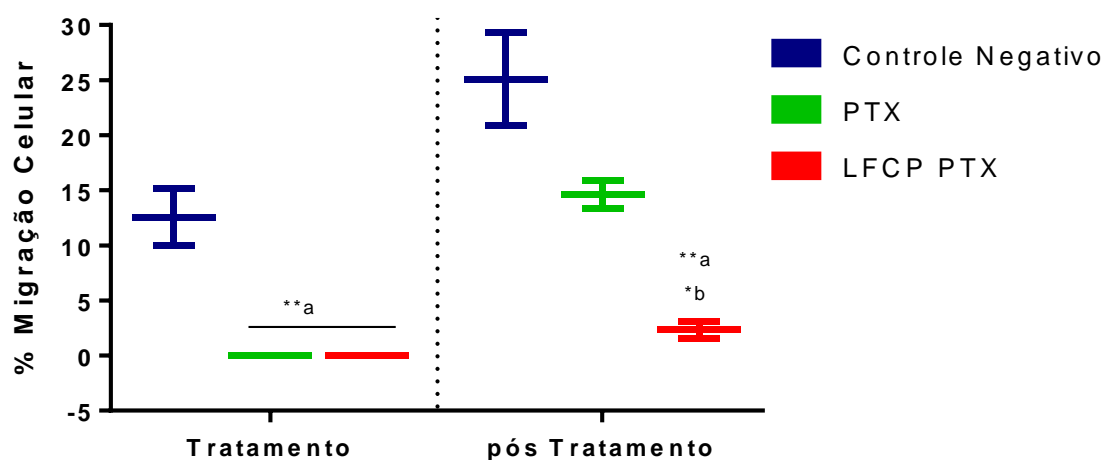


Figura 11: O teste de Wound Healing mostra a migração celular da linhagem A2780 após o tratamento por 24 horas, em contato com os tratamentos PTX ou LFCP PTX (Tratamento), e após 24 horas da retirada do tratamento com PTX ou LFCP PTX (pós Tratamento) com os valores de CI50 do fármaco livre e do fármaco na forma lipossomal. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços (a) vs. Controle negativo, (b) vs. PTX (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Análise da migração celular 3D

O dispositivo xCELLigence registrou as informações migratórias das células A2780 por 72 horas. Esse dispositivo é composto por duas câmaras (superior e inferior) integradas eletronicamente e avaliam em tempo real os dados quantitativos da cinética de migração quando as células se movem da câmara superior para a inferior.

O índice celular representa a capacidade de migração das células A2780 antes e após o tratamento com os fármacos (Figura 12

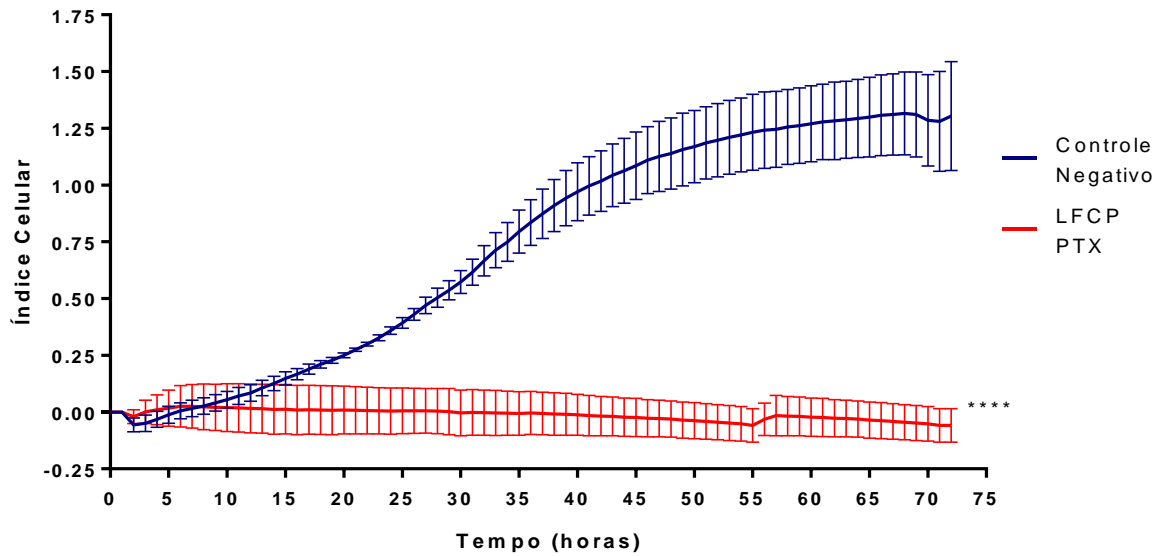


Figura 12). A habilidade de migração das células do grupo tratado com LFCP PTX foi reduzida em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), mantendo o índice celular em torno de zero por todo o experimento.

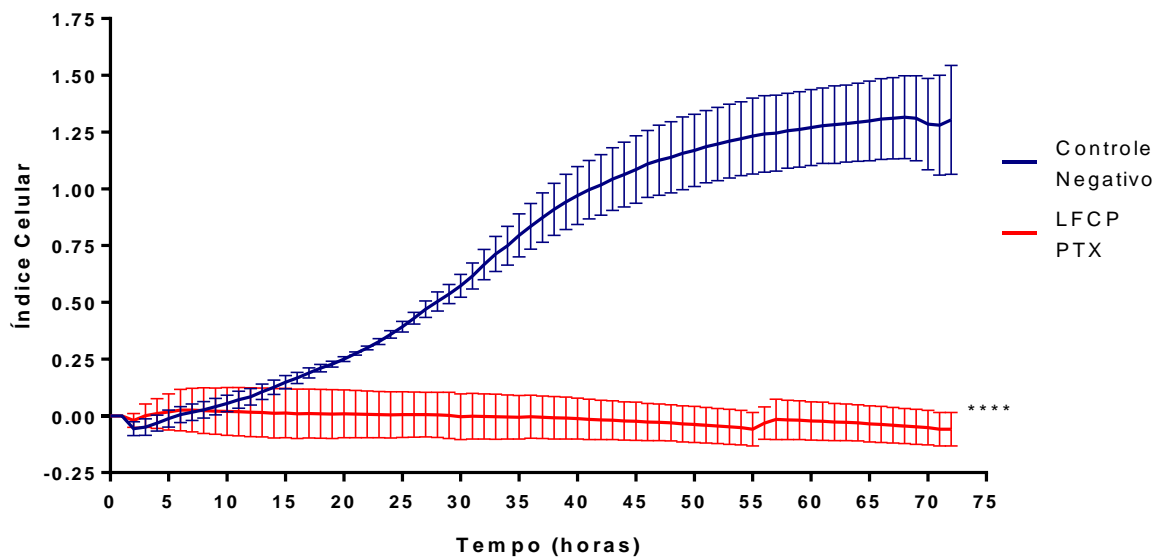


Figura 12: O sistema xCELLigence RTCA DP registrou e coletou dados de migração de células A2780 a cada 1 hora por 72 horas, após o tratamento com o fármaco na forma lipossomal. As diferenças nos índices de células entre os grupos tratados com o lipossoma e controle foram significativas. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três poços **** $p < 0,001$).

LFCP PTX diminui a expressão de ZEB1 e TGF- β 2

Com a finalidade de entender as modificações ocorridas nas vias

relacionadas à migração das células de câncer de ovário, foi feita a análise da expressão dos genes relacionados à migração. Para análise dos dados, foi utilizado o método $\Delta\Delta C$. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo nos genes. Os dados são apresentados como níveis de expressão de mRNA na Figura 13. Considerando os resultados, houve diminuição da expressão de dois genes (ZEB1 e TGF- β 2) e aumento da expressão de um gene (TGF- β 1). Os níveis de expressão de todos os outros genes estudados (TWIST1, VIM, NOTCH1, CDH1, CDH2, TGF- β 3, SNAI1, LAMA5, BACH1) não diferiram do controle (dados não mostrados).

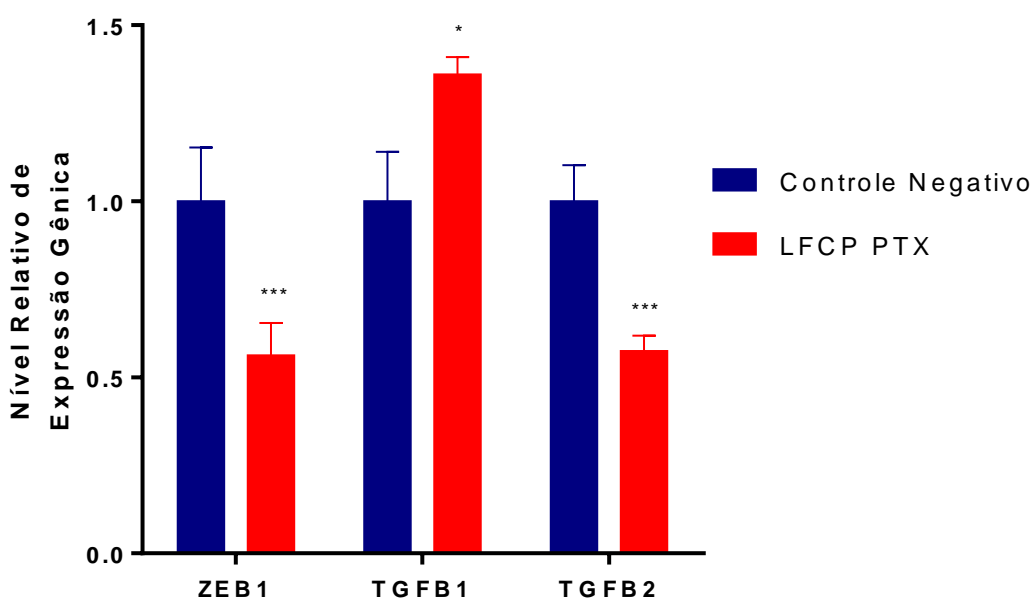


Figura 13: A expressão de ZEB1, TGF- β 1 e TGF- β 2, em A2780 sem tratamento e após tratamento com LFCP PTX. Analisado por qRT-PCR. Os dados foram normalizados pelo método $\Delta\Delta C_t$, utilizando como housekeeping a b-actina. Os dados são apresentados como média \pm DP. Três experimentos independentes, $n = 3$, cada amostra foi medida 3 vezes.

Testes *in vivo*

Padronização do modelo pré-clínico de tumor de ovário metastático

Para a avaliação da presença e tamanho dos nódulos peritoneais (Tabela 4), os animais foram eutanasiados com 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação das células A2780. Com isso, foi determinado que o melhor tempo para se iniciar

o tratamento seria o de 21 dias após a inoculação das células tumorais, devido ao fato de que houve a presença de nódulos característicos e delimitados somente na região peritoneal, não havendo presença de células em outros órgãos (Figura 14).

Tabela 4: Ensaio de padronização do modelo tumoral. Escolha do tempo de 3 semanas após a inoculação das células tumorais devido à presença de metástases macroscópicas.

Grupos (n = 3)	Eutanásia (dias)	Presença de metástases macroscópicas
1	7	-
2	14	-
3	21	+
4	28	+

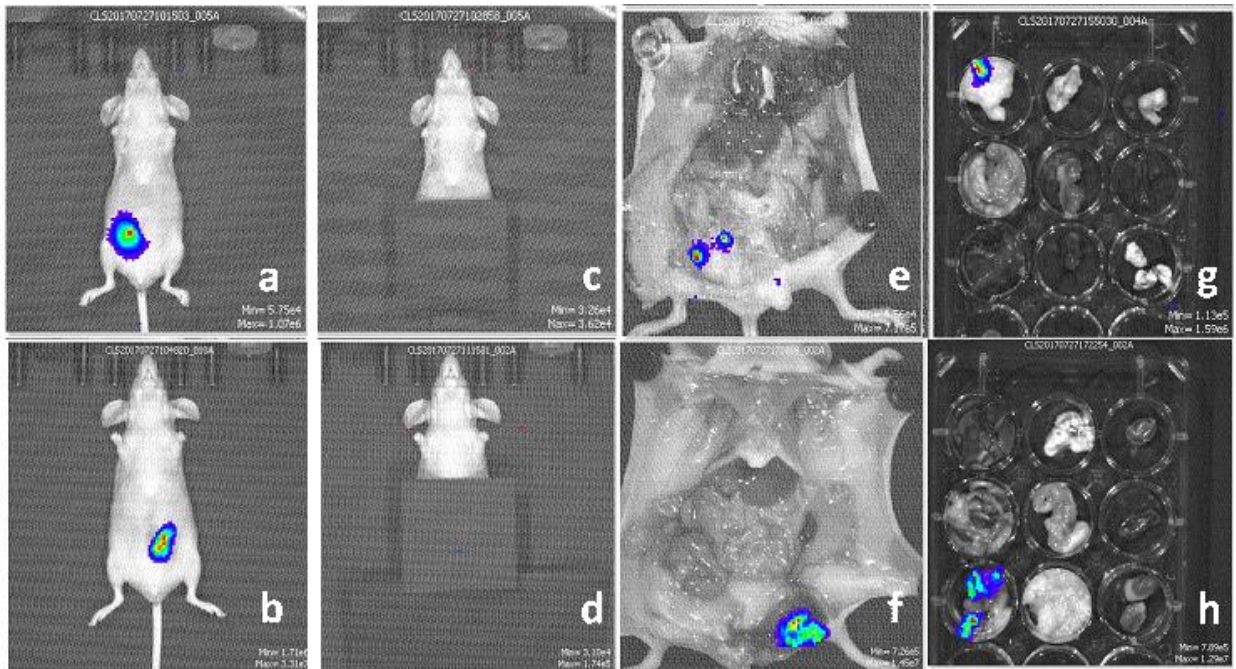


Figura 14: Imagem dos animais após 21 dias de inoculação das células tumorais A2780-luc. Localização da bioluminescência das células A2780-luc nos animais (a-d), indicando o desenvolvimento da carcinomatose peritoneal de ovário. Animais com exposição do peritônio (e-f). Órgãos excisados mostrando a presença de células A2780-luc contidas somente no peritônio (g, h).

Avaliação da Atividade Antitumoral através da bioluminescência.

A bioluminescência indica a presença de células tumorais em uma determinada região, devido à reação de oxidação da luciferina catalisada pela luciferase na linhagem celular A2780-luc e a luciferina que foi inoculada intraperitonealmente, esta reação permite quantificar a intensidade da bioluminescência, e com isso mensurar as células vivas na região estabelecida (Figura 15).

A radiância da bioluminescência foi medida quatro vezes em todos os grupos. Assim, foi possível observar que no 5º dia após o início do tratamento (T5) não houve diferença na bioluminescência emitida pelos diferentes grupos.

Já no 10º e no 15º dia após o tratamento (T10 e T15) é possível observar diferença entre os grupos tratados: PTX e LFCP PTX, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente, indicando que os animais tratados com LFCP PTX tiveram inibição na proliferação celular maior do que o grupo tratado com PTX.

Bioluminescência

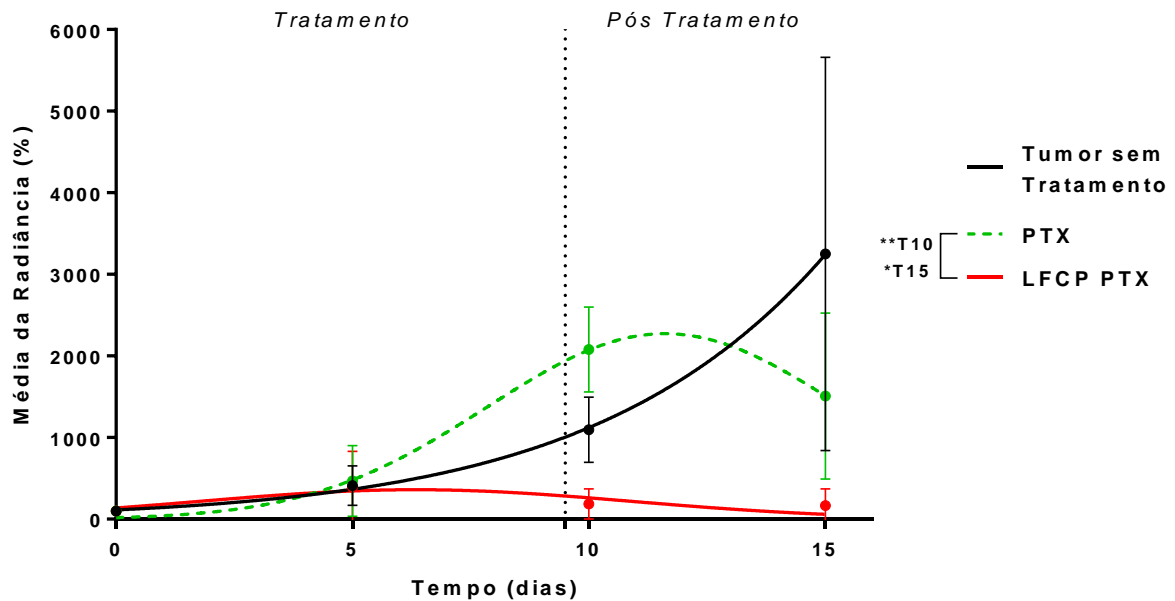


Figura 15: Análise da bioluminescência das células viáveis A2780-luc na região abdominal em camundongos Balb/c nude portadores de carcinomatose peritoneal de ovário. Os grupos foram tratados com o fármaco livre PTX, e o lipossoma LFCP PTX. Os dados estão apresentados em porcentagem da média da radiância pelo tempo, e normalizados com a primeira medição. A diferença estatística está representada (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; T10 = 10º dia do início do tratamento, T15 = 15º dia do início do tratamento).

Diminuição da Toxicidade utilizando o LFCP PTX

O hemograma dos animais foi avaliado no final do experimento (Figura 16). O total de leucócitos diminuiu significativamente em animais tratados com LFCP PTX em comparação com animais com tumor sem tratamento, a contagem de leucócitos ficou mais próxima da apresentada pelos animais saudáveis. Em animais tratados com PTX a contagem de leucócitos não diferiu da apresentada pelo grupo tumoral sem tratamento.

Na avaliação da contagem de plaquetas, o grupo LFCP PTX se manteve mais próximo ao grupo saudável. E os grupos PTX e tumoral sem tratamento se diferiram estatisticamente do grupo saudável ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente). Não houve diferença estatística na contagem de hemácias e hemoglobina entre os grupos.

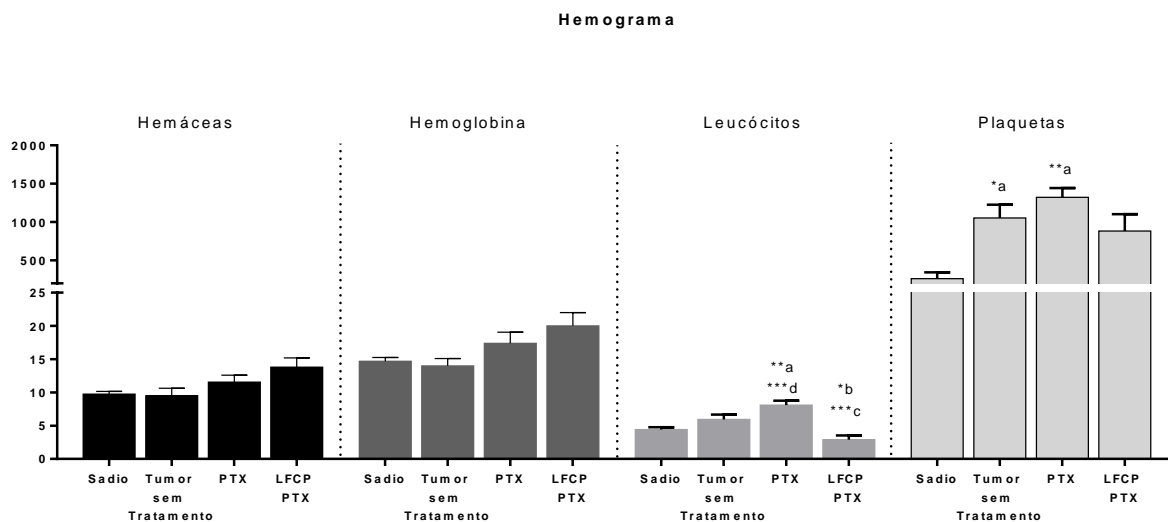


Figura 16: Hemograma no último dia do experimento. * $p < 0,05$. a - diferença estatística do grupo sadio; b – diferença estatística do grupo tumor sem tratamento; c – diferença estatística do grupo PTX; d – diferença estatística do grupo LFPC PTX.

Sobre os parâmetros da diferenciação dos leucócitos, descritos na Tabela 5, o valor referente a porcentagem de linfócitos observa-se uma baixa para os animais do grupo de tratamento PTX (20,5%), comparando com todos os outros grupos (61,9%, 45,2% e 42,7 %, saudável, controle tumoral e LFPC PTX, respectivamente), sendo diferentes estatisticamente. Nos dados da contagem de monócitos, basófilos e eosinófilos foi visto um aumento na porcentagem para o grupo tratado com PTX (68,6 %), em comparação com os outros grupos (34,6%, 50,9% e 53,0%). Na avaliação dos valores de neutrófilos, não foi observado diferença estatística na porcentagem entre os grupos.

Tabela 5: Percentual da diferenciação das linhagens dos leucócitos: linfócitos; monócitos, basófilos, eosinófilos; neutrófilos. Diferença estatística significativa, $p \leq 0,05$; $n = 5$ animais por grupo. Dados em porcentagem e desvio padrão.

Grupos	Leucócitos (%)		
	Linfócitos	Monócitos Basófilos Eosinófilos	Neutrófilos
Animais sem tumor	61,9 ± 4,5 ^{***c}	34,6 ± 2,5 ^{***c}	6,6 ± 2,7

Animais c/ tumor sem tratamento	45,2 ± 12,4 ^{**c}	50,9 ± 12,9 ^{**c}	4,7 ± 1,6
Animais c/tumor tratados com PTX	20,5 ± 10,3	77,0 ± 10,7	3,6 ± 1,0
Animais c/ tumor tratados com LFCP-PTX	42,7 ± 8,0 ^c	53,0 ± 9,2 ^c	2,7 ± 1,1

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. A letra sobrescrita indica diferenças significativas detectadas entre o grupo PTX. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

A partir dos dados de peso do animal, foi obtida a variação do peso corporal (Figura 17). No 21^o dia, os animais com tumor tratados com LFCP PTX mostram peso menor do que os tratados com PTX livre e dos com tumor sem tratamento p < 0,05).

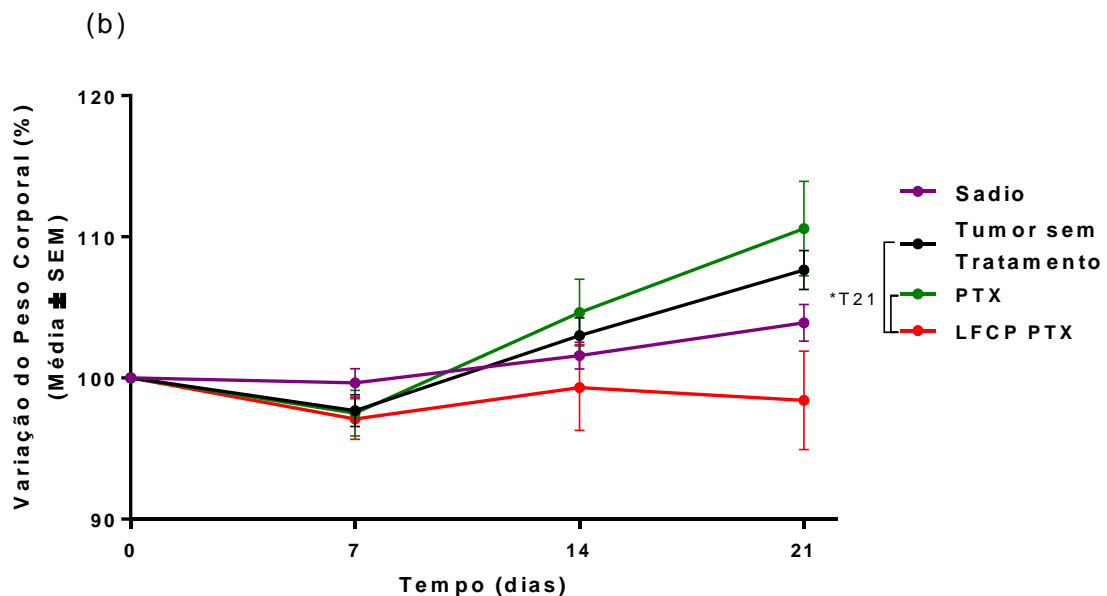


Figura 17: Variação do peso corporal dos animais (%). Análise em média ± SEM. *T21 – diferença estatística encontrada entre os grupos PTX e LFCP PTX no 21^o dia de análise.

Após a eutanásia, também foi avaliado o peso relativo dos órgãos (fígado, pulmão e baço) (Figura 18). Observou-se que somente o tratamento com PTX aumentou o peso do fígado e do pulmão quando comparado ao grupo sem tumor.

(c)

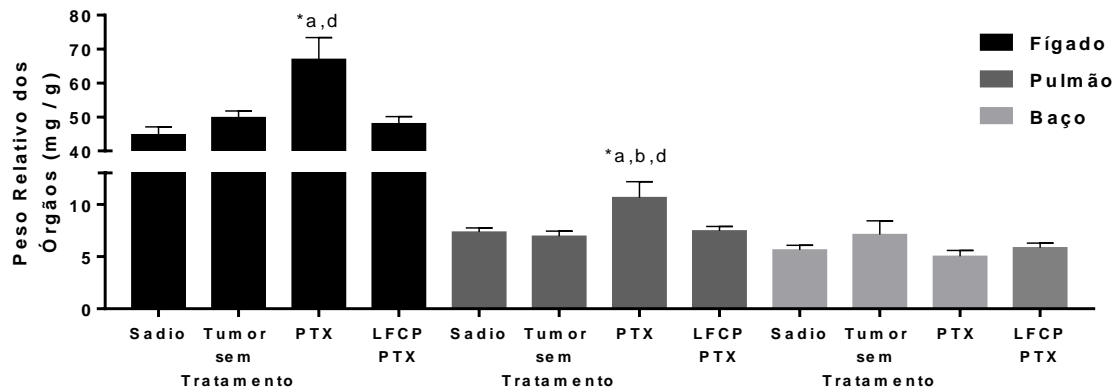


Figura 18: Peso relativo dos órgãos dos camundongos Balb/c nude com carcinomatose peritoneal de ovário. Diferença estatística representada (* $p < 0.05$; T21 = 21º dia do início do tratamento; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Na avaliação das análises bioquímicas a partir do soro sanguíneo, não foi observada diferença entre os grupos nos níveis de concentração das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH), creatinina e na concentração de ureia.

DISCUSSÃO

O câncer de ovário ocupa a quarta posição em incidência e a terceira posição em letalidade no mundo entre mulheres (Devita Lawrence, Rosenberg, 2011; INCA, 2019; Ferlay et al., 2019). O câncer epitelial de ovário é o mais frequente, com 90% de prevalência entre os tumores ovarianos. A sobrevida está diretamente relacionada com o estágio em que a doença se encontra no momento do diagnóstico, sendo de 80-90% quando o diagnóstico é feito nos estágios iniciais, e reduzindo para 25% quando o diagnóstico é feito nos estágios avançados e com metástase (Groen, Gershenson, Fader, 2015; Febbraro et al., 2015; INCA 2019).

O câncer de ovário é uma enfermidade complexa, caracterizada por um alto grau de proliferação e metástase, que ocorre principalmente na região peritoneal (Groen, Gershenson, Fader, 2015; Febbraro et al., 2015). Isso se dá em maior parte ao diagnóstico tardio, no momento em que as pacientes já estão com carcinomatose peritoneal. Apesar dos esforços para se desenvolver uma estratégia efetiva no tratamento do câncer de ovário metastático, a sobrevida global ainda se mantém em aproximadamente 30 % (Goff et al., 2000; Smith et al., 2005).

O tratamento da carcinomatose peritoneal de ovário tem como finalidade reduzir a quantidade de células tumorais na região peritoneal, contribuindo para a sobrevida global livre da doença, e/ou melhorar a qualidade de vida de pacientes (Rueth et al., 2011; Michelle et al., 2013; Shen et al., 2013). Por ser considerada uma doença quimiossensível, a quimioterapia é muito importante quando se analisa o tratamento sistêmico (Du Bois et al., 2010; Bukowska; Galek; Marczak, 2015).

O PTX é um quimioterápico que possui atividade antineoplásica e é utilizado como fármaco de primeira linha no tratamento do câncer de ovário metastático e da carcinomatose peritoneal (Jauhari et al., 2009). Porém, existem algumas dificuldades na utilização desse fármaco como: sua natureza hidrofóbica, baixa biodisponibilidade, alta metabolização hepática e estar associado ao mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Kampan et al., 2015; Tew, 2016; Alves et al., 2018). Além disso, em 80% das pacientes que apresentam alta taxa de resposta ao tratamento de primeira linha ocorre recidiva da doença entre 3 e 5 anos, necessitando assim de uma nova abordagem

terapêutica (Bruchim; Jarchowsky-Dolberg; Fishman, 2013; Cheng et al., 2018; Alves et al., 2018).

Alguns estudos foram realizados para desenvolver nanosistemas eficientes de administração de fármacos para quimioterapia no câncer de ovário metastáticos, sendo que muitos foram produzidos para administrar fármacos, como o PTX (Micha et al., 2006; Fader & Rose, 2009; Wicki A, et al., 2015; Cheng et al., 2018; Zhao, 2018), sendo o sistema lipossomal um dos mais estudados (Franco et al., 2018; Caracciolo et al., 2018; Bhowmik et al., 2018; Tang et al., 2019; Khayrani et al., 2019). Acredita-se que utilização do PTX em um sistema lipossomal possa trazer resultados bastante promissores para a melhoria da eficácia antitumoral contra câncer de ovário.

Por isso, neste trabalho, avaliou-se a citotoxicidade, os efeitos antitumorais e a toxicidade *in vivo* de um nanocarreador lipossomal (LFCP) contendo PTX em um modelo experimental de câncer de ovário metastático, bem como da carcinomatose peritoneal de ovário. Os resultados mostram que a concentração de PTX contida no nanossistema necessária para eliminar 50% das células de uma população da linhagem A2780 é menor do que quando o PTX está livre, mostrando que o nanocarreador LFCP aumenta o efeito citotóxico do PTX. Estes resultados também estão correlacionados com a redução da viabilidade celular e da formação de colônias no teste de recuperação por 5 dias, após 24 horas de tratamento, onde foi visto que as células tratadas com LFCP PTX não foram capazes de proliferar. Diferentemente do que foi visto no tratamento com o PTX livre, em que as células rapidamente retornam à condição inicial e foram capazes de formar colônias.

A capacidade de as células formarem colônias após tratamento com PTX também foi mostrada por Gamarra-Luques e colaboradores em 2012. Os autores demonstraram que células OV2008, IGROV-1 e SK-OV-3 (linhagens tumorais de ovário) tratadas com cisplatina e PTX livre, permaneceram viáveis 21 dias para serem avaliadas no ensaio clonogênico; a terapia com o PTX e/ou a cisplatina não diminuiu a proliferação celular. De acordo com Gamarra-Luques e colaboradores (2012) a sobrevivência das células após o tratamento com quimioterápicos pode ser considerada uma falha terapêutica, sendo constatada em um teste *in vitro* relativamente simples. Neste as células remanescentes são escassas, porém preocupantes, e como ocorre normalmente na clínica com as

pacientes que se submetem ao tratamento de primeira linha, as células são capazes de sobreviver e proliferar, e em muitos casos com capacidades superiores às células nunca tratadas (Gamarra-Luques et al., 2012).

Os resultados deste estudo corroboram os demonstrados por Franco e colaboradores (2019) que ao avaliarem a capacidade de formação de colônias e a taxa de proliferação de células da linhagem MCF-7 (linhagem celular de câncer de mama) mostraram que quando essas células eram previamente expostas ao LFCP PTX mostravam capacidade de formação de colônias reduzida, já as células tratadas com o PTX livre foram capazes de formar colônias (Franco et al., 2019). Isso mostra que em diferentes tipos celulares o LFCP desempenha papel importante na disponibilização o PTX para a célula tumoral impedindo que essas sejam capazes de proliferar, ou seja, sem a falha terapêutica que é possível observar no tratamento somente com o PTX.

Foi possível observar também neste estudo, que o tratamento com LFCP PTX reduziu significativamente a capacidade de migração celular, avaliada por 72 horas. Indicando que o LFCP PTX foi capaz de inibir a migração celular das células de linhagem ovariana durante e após o tratamento, tanto no ensaio bidimensional, quanto no ensaio tridimensional. É importante ressaltar que, no tratamento das células A2780 somente com o PTX, após a remoção do fármaco não foi possível observar o efeito antimigratório continuado, ou seja, as células voltaram a ter a capacidade de migrar.

Como citado anteriormente, a metástase é o principal problema relacionado ao câncer, 90% das mortes são causadas pela metástase (Weinberg, 2013). No câncer de ovário epitelial, a metástase leva ao aparecimento da carcinomatose peritoneal, que está associada ao mau prognóstico da doença (Goodman et al., 2016). Assim, a capacidade de migração pelas células epiteliais tumorais é o fator inicial para que ocorra a implantação metastática (Kramer et al., 2013), por isso neste estudo também foi avaliado se o PTX em um sistema lipossomal reverteria essa capacidade migratória das células da linhagem A2780. Os resultados mostraram que o tratamento com LFCP PTX reduziu significativamente a capacidade de migração das células tumorais, avaliada por 72 horas, durante e após o tratamento, tanto no ensaio bidimensional, quanto no ensaio tridimensional. É importante ressaltar que, nas células A2780 tratadas com o PTX livre, não foi possível observar o

efeito antimigratório continuado, ou seja, as células voltaram a ter a capacidade de migrar, após a remoção do fármaco.

Os resultados deste estudo corroboram os observados no estudo conduzido por Franco e colaboradores (2019). Nele os autores mostram que as células MDA-MB-213 e MCF-7 (linhagens tumorais de mama) tratadas com o LFCP PTX também apresentaram redução significativa na porcentagem de migração celular em comparação ao grupo controle, para ambas as linhagens celulares (Franco et al., 2019). Evidenciando assim a importância do nanocarreador LFCP com o PTX.

A aquisição da capacidade de migração pelas células epiteliais envolve alteração da sua morfologia para um formato fibroblastoide, para tal deve ocorrer perda da expressão dos marcadores epiteliais e ganho da expressão dos marcadores mesenquimais. Essa conversão fenotípica é um dos eventos que permitem que células epiteliais possam a partir de tumores primários migrar e gerar metástases em tecidos ou órgãos distantes. Um dos mecanismos moleculares envolvido nesse processo inclui vias de sinalização mediadas por membros da família TGF- β (Derynck e Akhurst, 2007; Pardali e Moustakas, 2007; Gao et al, 2014; Ricciardelli et al., 2015). Levando isso em consideração, neste estudo avaliou-se a expressão de moléculas envolvidas na TEM via sinalização citoplasmática ativada por TGF- β . Os resultados mostram que o tratamento com o LFCP PTX diminui a expressão dos genes *TGF- β 2* e *ZEB1* e aumento do *TGF- β 1*.

Com base nesses dados acredita-se que a inibição da migração celular após o tratamento com o LFCP PTX observada neste estudo possa estar relacionada à diminuição da expressão dos genes *TGF- β 2* () e *ZEB1*. Essa modificação na expressão de *TGF- β* no desenvolvimento e metástase do câncer se assemelha à sinalização fisiológica durante o desenvolvimento embrionário, em que a TEM (transição epitélio-mesenquimal) gera e forma novos tecidos (Muthusamy et al., 2015; Tan et al., 2015). Essa via participa do processo de patogênese de muitos tipos de cânceres, contribuindo para induzir a proliferação, a migração, a invasividade e a sobrevivência das células tumorais (Fink et al., 2001; Hagimoto et al., 2002; Massague, 2012). Além de que, a literatura mostra que o TGF- β desempenha um papel na progressão do câncer de ovário epitelial por ser superexpresso no tecido tumoral e no fluido peritoneal de pacientes com

câncer de ovário (Dunfield & Nachtigal 2003).

Wang e colaboradores (2014) avaliaram a expressão do gene *TGF-β2* após o aumento na quantidade da proteinase PCSK6, na linhagem celular KGN (linhagem tumoral de ovário). Esta proteinase possui papel fundamental na promoção da progressão de alguns tumores para um estágio mais agressivo, inclusive o câncer de ovário. Além disso, Wang e colaboradores (2014) observaram também que a diminuição na quantidade de TGF-β2 pode estar relacionada com a promoção de apoptose (Wang et al., 2014).

Liu e colaboradores (2015) observaram que o aumento na proliferação e crescimento tumoral do câncer de ovário em camundongos nude está associado ao aumento na expressão de TGF-β2 (Liu et al., 2015). Particularmente no câncer de ovário, o TGF-β2 contribui para a progressão do tumor, pois está envolvido na TEM ao promover a perda de contato célula-célula e estimular tanto a migração quanto a invasão (Do et al., 2008).

Entretanto, é importante ressaltar que, em um tumor o TGF-β é produzido e excretado por células mesenquimais presentes no estroma tumoral. Sendo assim, a expressão de TGF-β1 e 2 pelas células tumorais não tratadas pode evidenciar sinalizações autócrina e parácrina. Se assim for, é plausível acreditar que a diminuição de ZEB1 poderia ser consequência da diminuição do TGF-β2, pois o ZEB1 é um dos fatores de transcrição ativado por via de sinalização mediada por TGF-β. Igualmente, o aumento de TGF-β1 poderia ter como consequência o aumento de ZEB1, mas isso não foi observado, provavelmente devido ao fato de que as células epiteliais tumorais ovarianas possam perder a capacidade de resposta aos sinais induzidos por TGF-β1 (Yeung et al., 2013).

Yeung e colaboradores afirmaram que o TGF-β1 é um importante inibidor do crescimento de células epiteliais na superfície ovariana normal, e tem efeitos limitados nas células cancerosas do ovário, indicando que seu papel no crescimento do tumor é dependente de mutações genéticas das células tumorais e do microambiente do tumor (Yeung et al., 2013). Portanto, o aumento de TGF-β1 observado neste estudo não está relacionado à atividade migratória previamente vista nas análises de migração bi e tridimensional. A TEM também é caracterizada pelo aumento da expressão de repressores transcricionais de CDH1, como ZEB1 e ZEB2, e consequente aumento da expressão de marcadores de células mesenquimais, como CDH2 e vimentina (Kong; Wang;

Sarkar, 2011). Nos resultados apresentados neste estudo, pode-se ver que houve regulação negativa do repressor transcricional ZEB 1. De acordo com Chen e colaboradores (2013), a diminuição na expressão de *ZEB1* está associada à diminuição da capacidade de formação de colônias e migração celular nas linhagens de câncer de ovário, visto pelos pesquisadores nas linhagens SKOV-3 e H08910 (Chen et al., 2013). Da mesma forma, Sakata e colaboradores (2017) ao avaliaram se o silenciamento de *ZEB1* levaria a reversão de potencial metastático e reversão de quimiorresistência, mostraram que o silenciamento de ZEB1 diminuiu significativamente a migração e invasão de células sensíveis a PTX e resistentes a PTX (Sakata et al., 2017).

Diante disso, pode-se inferir que a diminuição da capacidade de formação de colônia e migração celular em linhagem A2780 encontrada neste estudo possa estar relacionada a regulação negativa de ZEB1 promovida pela diminuição de TGF- β 2. Entretanto, deve-se considerar que o fator de transcrição ZEB1 é um repressor da expressão do gene da E-caderina (Prislei et al., 2015; Park et al., 2008), essencial para a aquisição do fenótipo mesenquimal. Assim era esperado que a diminuição de ZEB1 refletiria no aumento da expressão do gene *CDH1*, gene da E-caderina, e diminuição do gene *CDH2*, que codifica a N-caderina, uma proteína de células mesenquimais. Porém, isso não foi observado, provavelmente, a diminuição da migração celular induzida pelo PTX em sistema lipossomal observada neste estudo possa ser também devido a outros fatores, como a interação do PTX com os microtúbulos.

Outro processo importante na regulação da migração celular é a interação na dinâmica dos microtúbulos, presentes no citoesqueleto celular (Komlodi-Pasztor, 2011; Čermák et al., 2020). O principal componente estrutural dos microtúbulos é a tubulina, proteína globular de ligação a GTP, e encontrada em todas as células eucarióticas (classificadas nas famílias α , β , γ , δ e ϵ). É sabido que moléculas estabilizadoras de microtúbulos, como é o caso do PTX, inibem a migração celular se ligando a β -tubulina no lúmen dos microtúbulos (Bouchet e Akhmanova, 2017; Field et al., 2017). Sendo assim, todo processo migratório requerer o bom funcionamento dos microtúbulos e, portanto, o PTX pode ter tido também como alvo da inibição da migração celular a β -tubulina.

Em consonância com os resultados *in vitro*, o LFCP PTX também inibiu a proliferação de células tumorais na carcinomatose peritoneal de ovário *in vivo*

após o final de quatro doses do tratamento intravenoso, indicando que houve um aumento na atividade antitumoral usando a formulação LFCP PTX quando comparado com o tratamento com PTX. Nesse caso, é importante observar que o uso do nanocarreador também foi crucial para a administração e eficaz no controle da progressão da proliferação celular do PTX no tratamento intravenoso da carcinomatose peritoneal de ovário.

De acordo com Khalifa e colaboradores (2019), o uso de um nanocarreador para a entrega de PTX representa um tratamento muito mais eficaz do que a utilização do fármaco livre na corrente sanguínea, pois o nanocarreador é capaz de direcionar com eficiência a entrega do PTX, melhorar a dispersibilidade devido à hidrofobicidade, melhorar seu perfil farmacocinético, evitar a rápida excreção do mesmo ao usar administração sistêmica, reduzir a toxicidade sistêmica e também aumentar o acúmulo de fármaco no tumor (Khalifa et al., 2019).

É sabido que a ação combinada de várias vias de sinalização é responsável pelo início do processo de TEM (Colas et al., 2012; Teeuwssen & Fodde 2019). Como tal, os reguladores da TEM tornaram-se alvos atrativos para o desenvolvimento de terapias antimetastáticas, causando comprometimento da motilidade celular e conseqüentemente da migração e invasão. Portanto, ao analisar-se os resultados de migração celular no pós-tratamento com o LFCP PTX, juntamente com o resultado de formação de colônias na recuperação da proliferação, e atividade antitumoral *in vivo*, pode-se inferir que o lipossoma provavelmente está se acumulando no interior das células e promovendo uma liberação controlada de PTX, responsável não apenas pela atividade antiproliferativa e antitumoral, mas também pela inibição da atividade migratória após a remoção do fármaco.

Lee e colaboradores (2007) estudaram os efeitos de uma formulação contendo PTX, TM SLN, em comparação com o Taxol[®], um fármaco aprovado clinicamente, no tratamento de células OVCAR-3 e MCF-7 (câncer de ovário e mama, respectivamente). Os resultados mostraram que a formulação TM SLN tem um comportamento de liberação lenta e sustentada, e essa característica pôde ser observada na análise em que o TM SLN e o Taxol[®] apresentaram citotoxicidade semelhante, porém, somente 25% do PTX encapsulado apresentou atividade citotóxica dentro das 24 horas analisadas. É importante

ressaltar que os autores afirmaram que 75 % do PTX que estava encapsulado não foi liberado dentro dessas 24 horas. Lee enfatiza que é necessário avaliar essa liberação controlada em outros testes, além de elucidar os mecanismos envolvidos (Lee et al., 2007).

É importante ressaltar que o PTX carregado pelo LFCP além de apresentar ação antiproliferativa e antimigratória melhorada, foi menos tóxico do que o PTX livre. A baixa variação do peso corporal em comparação com animais saudáveis, a comparação entre o peso dos órgãos e a análise de hematotoxicidade, mostraram que o tratamento com o LCFL PTX apresentou resultados mais próximos aos encontrados em animais saudáveis. Ao contrário do que foi visto no tratamento com o LFCP PTX, o tratamento com PTX foi muito mais tóxico, pois levou a um aumento no peso corporal, aumento no peso hepático e pulmonar, e a um aumento no número de leucócitos e de plaquetas, muito próximo aos resultados encontrados no grupo com tumor sem tratamento.

A avaliação da resposta do sistema imunológico ao tumor pode desempenhar um papel de progressão ou supressão da doença. Os leucócitos são utilizados como marcadores hematológicos de prognóstico em diversos tipos de tumores (Ueno et al., 2007; Zhang et al., 2019). Muitos estudos demonstraram que os linfócitos auxiliam na prevenção do desenvolvimento do câncer de ovário (Hamanishi, et al., 2007; Abiko et al., 2015). Portanto a diminuição da quantidade de linfócitos, linfocitopenia devido a toxicidade do fármaco, no sangue resulta na baixa de linfócitos na região tumoral, o que indica uma resposta imune antitumoral fraca (Zhang et al., 2014). Além disso, a razão entre neutrófilo / linfócito pode ser utilizada como um índice de resposta inflamatória sistêmica. A baixa de linfócitos acarreta no aumento da razão, o que representa um prognóstico ruim e baixo potencial de tratamento (Cho et al., 2009; Zhang et al., 2019).

Por outro lado, pode-se observar que os monócitos, basófilos e eosinófilos estão relacionados com a produção de citocinas, estando relacionadas com a proliferação celular exagerada, angiogênese da região tumoral e metástase das células tumorais, o que contribui para um prognóstico ruim (Ishii et al., 2012; Condeelis & Pollard, 2013; Lu et al., 2019).

Os efeitos tóxicos causados pela quimioterapia, durante e após o tratamento, são um fator limitante que afeta significativamente a qualidade de

vida do paciente (Franco et al., 2019). Estudos demonstram que o uso de um nanocarreador de fármacos pode proteger o corpo da droga, evitando assim efeitos tóxicos sistêmicos (Friberg & Nyström, 2016), conforme observado aqui quando se utilizou o LFCP PTX. Esses resultados podem ser atribuídos à entrega de alta concentração de PTX às células tumorais com eficácia muito mais aprimorada e também perfil de toxicidade sistêmica reduzido em comparação com o PTX.

Outros estudos também investigaram a incorporação de PTX em diversos tipos de nanocarreadores para melhorar seu perfil farmacocinético e entrega para células tumorais (Perkins et al., 2000; Liu et al., 2015; Shen et al., 2015; Yao et al., 2018). Kim e Park desenvolveram o nanossistema PTX-HSN e avaliaram a entrega do PTX, atividade antitumoral e além disso os possíveis efeitos tóxicos. Os estudos de toxicidade *in vivo* e atividade antitumoral indicaram que o tratamento com PTX-HSN suprimiu o crescimento do tumor pelo acúmulo de fármaco na região tumoral, porém não descartaram que as quantidades de fármaco encontradas nos outros órgãos (sangue, fígado, rins e pulmão) pudessem resultar em uma toxicidade sistêmica (Kim & Park, 2017).

O estudo de Yin e colaboradores (2016), teve como objetivo principal evitar a toxicidade e otimizar o comportamento farmacocinético e a biodistribuição do PTX pela formulação de albumina com polímero polietilenoglicol, PTX-PEG-HSA. Este estudo de Yin e colaboradores (2016) demonstrou que o PTX-PEG-HSA apresentou capacidade de contornar possíveis toxicidades da terapia com PTX, em comparação com as formulações comerciais Abraxane™ e Taxol®, além de promover a melhora da eficácia antitumoral e a segurança da administração (Yin et al., 2016).

A metástase do câncer de ovário é o principal problema do câncer de ovário e também representa um indicativo de mau prognóstico. Os resultados deste estudo mostram que o uso de PTX nanocarreado no lipossoma LFCP leva a um controle mais eficaz da proliferação das células tumorais *in vitro* e *in vivo*, incluindo a inibição da migração além de não induzir toxicidade sistêmica.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo reforçam que a utilização de um nanocarreador para entrega de paclitaxel melhora ação antitumoral desse fármaco. O PTX nanocarreado em no lipossoma LFCP apresentou melhora na atividade citotóxica, por diminuir o valor da CI_{50} em comparação com o PTX. Além disso foi possível observar uma resposta antimigratória acentuada, promovida pelas vias TGF- β 2 e ZEB1, sendo responsáveis pela disseminação das células tumorais. A inibição da proliferação das células A2780 na região abdominal dos animais foi observada, além da segura e diminuição dos efeitos adversos da quimioterapia, em comparação com uso de PTX não encapsulado. Em conjunto esses resultados indicam que, nessa abordagem, o PTX encapsulado no nanosistema LFCP pode ser uma estratégia a ser utilizada no tratamento do câncer de ovário metastático melhor do que a administração somente do fármaco PTX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, et al. IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1501–9.

Ahmed S, Stewart JH, Shen P, Votanopoulos KI, Levine EA. Outcomes with cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal metastasis. *J Surg Oncol*. 2014;110(5):575–84.

Algeciras-Schimnich A. Ovarian Cancer-A Review of Current Serum Markers and Their Clinical Applications. *Clinical Laboratory News*. 2013.

Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett*. 1987;223(1):42–6.

Allen TM, Hansen C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1068:133–41.

Almeida VL, Leitão A, Reina LDCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclocelular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. 2005;28(1):118-129.

Bakrin N, Classe JM, Pomel C, Gouy S, Chene G, Glehen O. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer. *J Visc Surg*. 2014;151(5):347–53.

Baldwin RL, Tran H, Karlan BY. Loss of c-myc repression coincides with ovarian cancer resistance to transforming growth factor beta growth arrest independent of transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res* 2003;63:1413–9.

Banerjee S and Kaye SB: New strategies in the treatment of ovarian cancer: Current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res* 19: 961-968, 2013.

Barbosa MV, Monteiro LO, Malagutti AR, Oliveira MC, Carvalho-Junior AD, Leite EA. Comparative study of first-derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods for quantification of paclitaxel in liposomal formulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015

Jul;26(7):1338-43.

Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 9: 415–428, 2009.

Bhowmik S, Bhowmick S, Maiti K, Chakra A, Shahi P, Jain D, Rajamannar T. Two multicenter Phase I randomized trials to compare the bioequivalence and safety of a generic doxorubicin hydrochloride liposome injection with Doxil® or Caelyx® in advanced ovarian cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2018 Sep 1;82(3):521-32.

Bishop JF, Dewar J, Toner GC, Smith J, Tattersall MH, Olver IN, Ackland S, Kennedy I, Goldstein D, Gurney H, Walpole E. Initial paclitaxel improves outcome compared with CMFP combination chemotherapy as front-line therapy in untreated metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1999 Aug;17(8):2355-.

Bouchet, B. P., & Akhmanova, A. (2017). Microtubules in 3D cell motility. *J Cell Sci*, 130(1), 39-50.

Bowtell DD. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010 Nov;10(11):803.

Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10:975-999.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008;68:7846Y7854.

Brewer M, Angioli R, Scambia G, Lorusso D, Terranova C, Panici PB, Raspagliesi F, Scollo P, Plotti F, Ferrandina G, Salutati V. Front-line chemo-immunotherapy with carboplatin-paclitaxel using oregovomab indirect immunization in advanced ovarian cancer: A randomized phase II study. *Gynecologic Oncology*. 2020 Jan 6.

Bruchim I, Jarchowsky-Dolberg O, Fishman A (2013) Advanced (> second) line chemotherapy in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian

cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 166:94-98.

Bukowska B, Gajek A, Marczak A. Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer. *Contemporary Oncology*. 2015;19(5):350.

C. Risnayanti, Y.-S. Jang, J. Lee, H.J. Ahn, PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 7498.

Campos SM, Penson RT, Mays AR, Berkowitz RS, Fuller AF, Goodman A, Matulonis UA, Muzikansky A, Seiden MV. The clinical utility of liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2001 May 1;81(2):206-12.

Canda AE, Sokmen S, Terzi C, Arslan C, Oztop I, Karabulut B, Ozzeybek D, Sarioglu S, Fuzun M. Complications and Toxicities After Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20:1082-1087.

Caracciolo G, Palchetti S, Digiaco L, Chiozzi RZ, Capriotti AL, Amenitsch H, Tentori PM, Palmieri V, Papi M, Cardarelli F, Pozzi D. Human Biomolecular Corona of Liposomal Doxorubicin: The Overlooked Factor in Anticancer Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10:22951- 22962.

Čermák, V., Dostál, V., Jelínek, M., Libusová, L., Kovář, J., Rösel, D., & Brábek, J. (2020). Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European Journal of Cell Biology*, 151075.

Chen D, Wang J, Zhang Y, Chen J, Yang C, Cao W, Zhang H, Liu Y, Dou J. Effect of down-regulated transcriptional repressor ZEB1 on the epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2013 Oct 1;23(8):1357-66.

Cheng Y, Zhang J, Geng H, Qin S, Hua H. Multiline treatment combining apatinib with toptecan for platinum-resistant recurrent ovarian cancer patients: a report of three cases. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:1989.

Chiva LM, Gonzalez-Martin A. A critical appraisal of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in the treatment of advanced and recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2015;136(1):130–5.

Cho, H., Hur, H. W., Kim, S. W., Kim, S. H., Kim, J. H., Kim, Y. T., & Lee, K. (2009). Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer immunology, immunotherapy*, 58(1), 15-23.

Chua TC, Robertson G, Liauw W, Farrell R, Yan TD, Morris DL. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(12):1637–45.

Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, et al. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(41):6979–94.

Colas, E., Pedrola, N., Devis, L., Ertekin, T., Campoy, I., Martínez, E., ... & Cabrera, S. (2012). The TEM signaling pathways in endometrial carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*, 14(10), 715-720.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124:263–6. [37] Wang X, Zhao X, Wang K, et al. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. *Cancer Sci* 2013;104:516–23.

Covens A, Carey M, Bryson P, Verma S, Fung MF, Johnston M. Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology.* 2002 Apr 1;85(1):71-80.

Dash, S., Sarashetti, P. M., Rajashekar, B., Chowdhury, R., & Mukherjee, S. (2018). TGF- β 2-induced EMT is dampened by inhibition of autophagy and TNF- α treatment. *Oncotarget*, 9(5), 6433.

De Oliveira M, Boutet V, Fattal E, Boquet D, Grognet J, Couvreur P et al. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sci.* 2000;67:1625-37.

De Oliveira M, Fattal E, Couvreur P, Lesieur P, Bourgaux C, Ollivon M, et al.,. pHsensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1372:301-10.

DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

Dias MA, Santana AE, Sobreira MRF, Filho EC. Study of an animal model of blood hypoplasia induced by the antineoplastic agent doxorubicin (Adriplastina). *Ars Veterinaria Jaboticabal*. 2003;19(3):246-253.

Do TV, Kubba LA, Du H, Sturgis CD, Woodruff TK. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3 dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res*. 2008;6:695–705

Dou J, Gu N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. *Tumor Biol*. 2010;31:243Y254.

Du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003 Sep 3;95(17):1320-9.

Dunfield, L. D., & Nachtigal, M. W. Inhibition of the antiproliferative effect of TGF β by EGF in primary human ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2003. 22(30), 4745-4751.

Durán N, Mattoso LHC, Morais PC. Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. *Nanotecnologia*. 2006;15.

E. Bernabeu, M. Cagel, E. Lagomarsino, M. Moretton, D.A. Chiappetta, Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead, *Int. J. Pharm.* 526 (1–2) (2017) 474–495.

E. Bernabeu, M. Cagel, E. Lagomarsino, M. Moretton, D.A. Chiappetta,

Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead, *Int. J. Pharm.* 526 (1–2) (2017) 474–495.

Elias D, Goere D, Dumont F, Honore C, Dartigues P, Stoclin A, et al. Role of hyperthermic intraoperative peritoneal chemotherapy in the management of peritoneal metastases. *Eur J Cancer.* 2014;50(2):332–40.

Elsenhauer EL, Salani R, Copeland LJ. Epithelial ovarian cancer. Di Saia PJ. *Clinical gynecologic oncology.* 8th. Elsevier/Saunders. Philadelphia. 2012;285-328.

Etheridge M, Campbell S, Erdman A, Haynes C, Wolf S, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products.[E-pub ahead of print] *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2012.

Fader AN, Rose PG. Abraxane for the treatment of gynecologic cancer patients with severe hypersensitivity reactions to paclitaxel. *International Journal of Gynecologic Cancer.* 2009 Oct 1;19(7):1281-3.

Fan, L., Chen, J., Zhang, X., Liu, Y., & Xu, C. (2014). Follicle-stimulating hormone polypeptide modified nanoparticle drug delivery system in the treatment of lymphatic metastasis during ovarian carcinoma therapy. *Gynecologic oncology*, 135(1), 125-132.

FDA 2017a.
[<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm569883.htm>.]

FDA 2017b.
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209401s000lbl.pdf].

Febbraro T, Robison K, Wilbur JS, Laprise J, Bregar A, Lopes V, Legare R, Stuckey A. Adherence patterns to National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines for referral to cancer genetic professionals. *Gynecologic oncology.* 2015 Jul 1;138(1):109-14.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor

A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*. 2019;144(8):1941-1953.

Ferreira SD, Faria SD, de Araújo Lopes SC, Teixeira CS, Malachias A, Magalhães-Paniago R, de Souza Filho JD, Oliveira BL, Guimarães AR, Caravan P, Ferreira LA. Development of a bone-targeted pH-sensitive liposomal formulation containing doxorubicin: physicochemical characterization, cytotoxicity, and biodistribution evaluation in a mouse model of bone metastasis. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:3737.

Field, J. J., Northcote, P. T., Paterson, I., Altmann, K. H., Díaz, J. F., & Miller, J. H. (2017). Zampanolide, a microtubule-stabilizing agent, is active in resistant cancer cells and inhibits cell migration. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 971.

Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, et al: Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 61:256-260, 2001

Franco MS, Roque MC, Oliveira MC. Short and Long-Term Effects of the Exposure of Breast Cancer Cell Lines to Different Ratios of Free or Co-Encapsulated Liposomal Paclitaxel and Doxorubicin. *Pharmaceutics*. 2019 Apr;11(4):178.

Freedman RS, Deavers M, Liu J & Wang E 2004 Peritoneal inflammation – a microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *Journal of Translational Medicine* 2 23.

Friberg S, Nyström AM. NANOMEDICINA: isso oferecerá possibilidades para superar a resistência múltipla aos medicamentos no cancer?. *Jornal da nanobiotecnologia*. 2016;14(1):17.

Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M, Harter P, Pignata S, Pujade-Lauraine E, Sehouli J, Vergote I. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2011 Apr

1;21(4):771-5.

Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs*. 1997;54(Suppl 4):15-21.

Gabizon A, Papahadjopoulos D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:94-100

Gabra H. Introduction to managing patients with recurrent ovarian cancer. *European Journal of Cancer Supplements*. 2014 Dec 1;12(2):2-6.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012 Jan;19(1):107.

Gamarra-Luques, C. D., Goyeneche, A. A., Hapon, M. B., & Telleria, C. M. (2012). Mifepristone prevents repopulation of ovarian cancer cells escaping cisplatin-paclitaxel therapy. *BMC cancer*, 12(1), 200.

Gao, Y., Wen, H., Wang, C., & Li, Q. (2013). SMAD7 antagonizes key TGF β superfamily signaling in mouse granulosa cells in vitro. *Reproduction*, 146, 1-11.

Glehen O, Gilly FN, Boutitie F, Bereder JM, Quenet F, Sideris L, Mansvelt B, Lorimier G, Msika S, Elias D and the French Surgical Association. Toward Curative Treatment of Peritoneal Carcinomatosis From Nonovarian Origin by Cytoreductive Surgery Combined With Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy. A Multi-Institutional Study of 1290 Patients. *Cancer* 2010; 116:5608-18.

Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: Implications of the differences. *Oncologist*. 2004;9:3-8.

Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 89: 2068–2075, 2000.

Goodman MD, McPartland S, Detelich D, Saif MW. Chemotherapy for intraperitoneal use: a review of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and early post-operative intraperitoneal chemotherapy. *Journal of gastrointestinal*

oncology. 2016 Feb;7(1):45.

Gordon AN, Granai CO, Rose PG, Hainsworth J, Lopez A, Weissman C, Rosales R, Sharpington T. Phase II study of liposomal doxorubicin in platinum-and paclitaxel-refractory epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2000 Sep 17;18(17):3093-100.

Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa M. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford. 2010;48:1425-1438.

Gregoriadis G, Leathwood P. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1971;14(2):95-9.

Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, Morris M, Wyatt L, Farshid G, Lim YY, Lindeman GJ. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell*. 2011 May 15;22(10):1686-98.

Groen RS, Gershenson DM, Fader AN. Updates and emerging therapies for rare epithelial ovarian cancers: one size no longer fits all. *Gynecologic oncology*. 2015 Feb 1;136(2):373-83.

Grzankowski KS, Carney M. Quality of life in ovarian cancer. *Cancer Control*. 2011 Jan;18(1):52-8.

H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer* 37 (13) (2001) 1590–1598.

Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, et al: TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 168:6470-6478, 2002

Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *In Urologic Oncology: Seminars and original investigations* 2008 Jan 1 (Vol. 26, No. 1, pp. 57-64). Elsevier.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and

tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3360–5.

Handley KF, Sood AK. A solution to the dilution: The role for biomarkers in advanced ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020 Jan 1;26(1):9-10.

Hanker LC, Loibl S, Burchardi N, Pfisterer J, Meier W, Pujade-Lauraine E, Ray-Coquard I, Sehouli J, Harter P, du Bois A. The impact of second to sixth line therapy on survival of relapsed ovarian cancer after primary taxane/platinum-based therapy. *Annals of oncology*. 2012 Aug 21;23(10):2605-12.

He XF, Wang J, Zhao FS, et al. Antitumor efficacy of viable tumor vaccine modified by heterogenous ESAT-6 antigen and cytokine IL-21 in melanomatous mouse. *Immunol Res*. 2012;52:240Y249.

Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L & Carreiras F 2008 Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumor Biology* 29 231–244.

Ho CM, Chang SF, Hsiao CC, et al. Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma. *J Biomed Sci*. 2012;19:23

Huang, S. T., Wang, Y. P., Chen, Y. H., Lin, C. T., Li, W. S., & Wu, H. C. (2018). Liposomal paclitaxel induces fewer hematopoietic and cardiovascular complications than bioequivalent doses of Taxol. *International journal of oncology*, 53(3), 1105-1117.

Huizing MT, Misser VS, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Veenhof CH, Vermorken JB, Pinedo HM, Beijnen JH. Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer investigation*. 1995 Jan 1;13(4):381-404.

I. Ojima, B. Lichtenthal, S. Lee, C. Wang, X. Wang, Taxane anticancer agents: a patent perspective, *Expert Opinion On Therapeutic Patents* 26 (1) (2016) 1–20.

INCA 2016. Instituto Nacional do Câncer. O que causa o câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>

Injac R, Radic N, Govedarica B, Perse M, Cerar A, Djordjevic A, Strukelj B. Acute

doxorubicin pulmotoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullerol C60 (OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress. *Pharmacological reports*. 2009 Mar 1;61(2):335-42.

Injac R, Strukelj B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technology in cancer research & treatment*. 2008 Dec;7(6):497-516.

Ishii H, Takahara M, Nagato T, et al. Monocytes enhance cell proliferation and LMP1 expression of nasal natural killer/T-cell lymphoma cells by cell contact-dependent interaction through membrane-bound IL-15. *Int J Cancer* 2012;130:48–58.

J.W. Harris, A. Rahman, B.-R. Kim, F.P. Guengerich, J.M. Collins, Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme, *Cancer Res*. 54 (15) (1994) 4026–4035.

Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. In *Peritoneal carcinomatosis: principles of management* 1996 (pp. 359-374). Springer, Boston, MA.

Jauhari S., Singh S., A. K. Dash. Paclitaxel, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Academic Press, 2009, ch. 7, vol. 34, pp. 299–344.

Jin, L., Zhang, Y., & Yang, W. (2020). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy among patients with ovarian cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 149(3), 303-308.

K.D. Tew, Paclitaxel, *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2016.

Kampan, N.C.; Madondo, M.T.; McNally, O.M.; Quinn, M. M. Plebanski, Paclitaxel and its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer, *BioMed Research International* 2015, (2015).

Kenny HA, Chiang CY, White EA, Schryver EM, Habis M, Romero IL, Ladanyi A, Penicka CV, George J, Matlin K, et al. 2014 Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *Journal of Clinical*

Investigation 124 4614–4628.

Khalifa A, Elsheikh MA, Khalifa A, Elnaggar YS. Current strategies for different paclitaxel-loaded Nano-delivery Systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: A review article. *Journal of Controlled Release*. 2019 Aug 30.

Khayrani AC, Mahmud H, Oo AK, Zahra MH, Oze M, Du J, Alam MJ, Afify SM, Quora HA, Shigehiro T, Calle AS. Targeting Ovarian Cancer Cells Overexpressing CD44 with Immunoliposomes Encapsulating Glycosylated Paclitaxel. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jan;20(5):1042.

Kim JE, Park YJ. Paclitaxel-loaded hyaluronan solid nanoemulsions for enhanced treatment efficacy in ovarian cancer. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:645.

Komlodi-Pasztor, E., Sackett, D., Wilkerson, J. et al. Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 244–250 (2011).

Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH (2011) Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (TEM)-phenotypic cells: are they cousins or twins? *Cancers* 3:716–729

Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013;752(1):10-24.

Kundranda MN, Niu J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:3767.

L. Zou, D. Wang, Y. Hu, C. Fu, W. Li, L. Dai, L. Yang, J. Zhang, Drug resistance reversal in ovarian cancer cells of paclitaxel and borneol combination therapy mediated by PEG-PAMAM nanoparticles, *Oncotarget* 8 (36) (2017) 60453.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Mar;15(3):178.

Lee, M. K., Lim, S. J., & Kim, C. K. (2007). Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials*, 28(12), 2137-2146.

Leung CS, Yeung TL, Yip KP, Pradeep S, Balasubramanian L, Liu J, Wong KK, Mangala LS, Armaiz-Pena GN, Lopez-Berestein G, Sood AK, Birrer MJ, Mok SC. Calcium-dependent FAK/CREB/TNNC1 signalling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer metastatic potential. *Nat Commun* 5: 5092, 2014.

Liu Y, Ng Y, Toh MR, Chiu GN. Lipid-dendrimer hybrid nanosystem as a novel delivery system for paclitaxel to treat ovarian cancer. *Journal of Controlled Release*. 2015 Dec 28;220:438-46.

Liu Y, Zheng D, Liu M, Bai J, Zhou X, Gong B, Lü J, Zhang Y, Huang H, Luo W, Huang G. Downregulation of glypican-3 expression increases migration, invasion, and tumorigenicity of human ovarian cancer cells. *Tumor Biology*. 2015 Oct 1;36(10):7997-8006.

Lu X, Zhao L, Xue T, Zhang H. Design of novel focal adhesion kinase inhibitors using 3D-QSAR and molecular docking. *Medicinal Chemistry Research*. 2014 Apr 1;23(4):1976-97.

Lu, C., Zhou, L., Ouyang, J., & Yang, H. (2019). Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine*, 98(24).

Mani SA, Guo WJ, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133:704Y715

Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:616–630. doi:10.1038/nrm3434. PMID:22992590

McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 1996 Jan 4;334(1):1-6.

McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC (1989). Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 111, 273–279.

Micha JP, Goldstein BH, Birk CL, Rettenmaier MA, Brown III JV. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions. *Gynecologic oncology*. 2006 Feb 1;100(2):437-8.

Michelle H, Francescutti V, Attwood K, McCart JÁ, Fakhri M, Kane III JM, Skitzki JJ. A contemporary analysis of morbidity and outcomes in cytoreduction / hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion. *Cancer Medicine*. 2013;2(3):334-342.

Monteiro N, Martins A, Reis RI, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the royal society Interface*. 2014;11.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Muthusamy BP, Budi EH, Katsuno Y, Lee MK, Smith SM, Mirza AM, Akhurst RJ and Derynck R: ShcA protects against epithelial-mesenchymal transition through compartmentalized inhibition of TGF- β -Induced Smad activation. *PLoS Biol* 13: e1002325, 2015.

Nascimento MCMO, Martins AS. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências e Saúde São José do Rio Preto*. 2005;12(2):111-115.

NCI. National Cancer Institute. A Snapshot of Ovarian Cancer. Incidence and Mortality. National Institute of Health: 2014. Available from: "<http://www.cancer.gov/research/progress/snapshots/ovarian>"

Nieto MA: Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342: 1234850, 2013.

Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 101: 1364–1374, 2004.

Nowicka A, Marini FC, Solley TN, Elizondo PB, Zhang Y, Sharp HJ, Broaddus R, Kolonin M, Mok SC, Thompson MS, Woodward WA, Lu K, Salimian B, Nagrath D, Klopp AH. Human omental-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PLoS One* 8: e81859, 2013.

Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*. 2003 Sep 1;21(17):3194-200.

Ozols RF. Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Canc*. 2005;15 Suppl 1:3–11

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* 8: 98–101, 1989

Parayath NN, Gandham SK, Leslie F, Amiji MM. Improved anti-tumor efficacy of paclitaxel in combination with MicroRNA-125b-based tumor-associated macrophage repolarization in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*. 2019 Oct 1;461:1-9.

Park SM, Gaur AB, Lengyel E and Peter ME: The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22: 894-907, 2008.

Perkins WR, Ahmad I, Li X, Hirsh DJ, Masters GR, Fecko CJ, Lee J, Ali S, Nguyen J, Schupsky J, Herbert C. Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *International journal of pharmaceutics*. 2000 Apr 25;200(1):27-39.

Phillips KG, Velasco CR, Li J, Kolatkar A, Luttgen M, Bethel K, Duggan B, Kuhn P, McCarty OJ. Optical quantification of cellular mass, volume, and density of circulating tumor cells identified in an ovarian cancer patient. *Front Oncol* 2: 72, 2012.

Pradeep S, Kim SW, Wu SY, Nishimura M, Chaluvally-Raghavan P, Miyake T,

Pecot CV, Kim S, Choi HJ, Bischoff FZ, Mayer JA, Huang L, Nick AM, Hall CS, Rodriguez-Aguayo C, Zand B, Dalton HJ, Arumugam T, Lee HJ, Han HD, Cho MS, Rupaimoole R, Mangala LS, Sehgal V, Oh SC, Liu J, Lee J, Coleman RL, Ram P, Lopez-Berestein G, Fidler IJ, Sood AK. Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread. *Cancer Cell*. 2014;26:77–91.

Prislei S, Martinelli E, Zannoni GF, Petrillo M, Filippetti F, Mariani M, Mozzetti S, Raspaglio G, Scambia G and Ferlini C: Role and prognostic significance of the epithelial-mesenchymal transition factor ZEB2 in ovarian cancer. *Oncotarget* 6: 18966-18979, 2015.

Qi, Z., Yin, L., Xu, Y., & Wang, F. (2018). Pegylated liposomal-paclitaxel induces ovarian cancer cell apoptosis via TNF-induced ERK/AKT signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 7497-7504.

R.C. Alves, R.P. Fernandes, J.O. Eloy, H.R.N. Salgado, M. Chorilli, Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48 (2) (2018) 110–118

R.T. Dorr, Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent, *Ann. Pharmacother.* 28 (5_suppl) (1994) S11–S14.

Rakowski JA, Ahmad S, Holloway RW. Use of pegylated liposomal doxorubicin in the management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: current concepts. *Expert review of anticancer therapy*. 2012 Jan 1;12(1):31-40.

Ricciardelli C & Rodgers RJ 2006 Extracellular matrix of ovarian tumors. *Seminars in Reproductive Medicine* 24 270–282. (doi:10.1055/s-2006-948556).

Ricciardelli C, Lokman NA, Cheruvu S, Tan IA, Ween MP, Pyragius CE, Ruszkiewicz A, Hoffmann P & Oehler MK 2015 Transketolase is upregulated in metastatic peritoneal implants and promotes ovarian cancer cell proliferation. *Clinical and Experimental Metastasis* 32 441–455.

Riggs MJ, Pandalai PK, Kim J, Dietrich CS. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Diagnostics*. 2020 Jan;10(1):43.

Roque MC, Franco MS, Vilela JMC, Andrade MS, de Barros ALB, Leite EA, et al.

Development of Long-Circulating and Fusogenic Liposomes Co-encapsulating Paclitaxel and Doxorubicin in Synergistic Ratio for the Treatment of Breast Cancer. *Curr Drug Deliv.* 2019;16(9):829–38.

Rueth NM, Murray SE, Huddleston SJ, Abbott AM, Greeno EW, Kirstein MN, PharmD and Tuttle TM. Severe Electrolyte Disturbances After Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: Oxaliplatin Versus Mitomycin C. *Annals of Surgical Oncology.* 2011;18:174-180.

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer.* 2000;88(2):358–63.

Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, Henderson R, Berry G, Gabizon A. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Annals of Oncology.* 2000 Aug 1;11(8):1029-33.

Said NA, Najwer I, Socha MJ, Fulton DJ, Mok SC & Motamed K 2007 SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk. *Neoplasia* 9 23–35.

Sakata J, Utsumi F, Suzuki S, Niimi K, Yamamoto E, Shibata K, Senga T, Kikkawa F, Kajiyama H. Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget.* 2017 Nov 21;8(59):99482.

Schüler S, Ponnath M, Engel J, Ortmann O. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2013 Jun 1;287(6):1187-204.

Sehouli J, Senyuva F, Fotopoulou C, Neumann U, Denkert C, Werner L, et al. Intra-abdominal tumor dissemination pattern and surgical outcome in 214 patients with primary ovarian cancer. *J Surg Oncol.* 2009;99(7):424–7.

Shapiro JD, Millward MJ, Rischin D, Michael M, Walcher V, Francis PA, Toner GC. Activity of gemcitabine in patients with advanced ovarian cancer: responses seen following platinum and paclitaxel. *Gynecologic oncology.* 1996 Oct

1;63(1):89-93.

Shen P, Levine EA, Hall J, Case D, Russell G, Fleming R, PharmD, McQuellon R, Geisinger KR, Loggie BW. Factors Predicting Survival After Intraperitoneal Hyperthermic Chemotherapy With Mitomycin C After Cytoreductive Surgery for Patients With Peritoneal Carcinomatosis. *Archives of Surgery* 2013;138:26-33.

Shen YA, Li WH, Chen PH, He CL, Chang YH, Chuang CM. Intraperitoneal delivery of a novel liposome-encapsulated paclitaxel redirects metabolic reprogramming and effectively inhibits cancer stem cells in Taxol®-resistant ovarian cancer. *American journal of translational research*. 2015;7(5):841.

Siddiqui IA, Adhami VM, Christopher J, Chamche, Mukhtar H. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:591-605.

Simeoni R. Efeitos do transplante autólogo de células-tronco mononucleares da medula óssea na miocardiopatia induzida pela doxorubicina em ratos Wistar. 2006. 78 f (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)– Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba).

Simões S, Moreira JN, Fonseca C, Düzgüneş N, de Lima MCP. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:947-65.

Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological reports*. 2009 Jan 1;61(1):154-71.

Smith LH, Morris CR, Yasmeen S, Parikh-Patel A, Cress RD, Romano PS. Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier? *Cancer* 104: 1398–1407, 2005.

Smolle E, Taucher V, Pichler M, Petru E, Lax S, Haybaeck J. Targeting signaling pathways in epithelial ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013 May;14(5):9536-55.

Socinski MA. Cytotoxic chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a review of standard treatment paradigms. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4210s-4s.

Staicu CE, Predescu DV, Rusu CM, Radu BM, Cretoiu D, Suciu N, Crețoiu SM, Voinea SC. Role of microRNAs as Clinical Cancer Biomarkers for Ovarian Cancer: A Short Overview. *Cells.* 2020 Jan;9(1):169.

T. Brown, K. Havlin, G. Weiss, J. Cagnola, J. Koeller, J. Kuhn, J. Rizzo, J. Craig, J. Phillips, D. Von Hoff, A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion, *J. Clin. Oncol.* 9 (7) (1991) 1261–1267.

Tan, E. J., Olsson, A. K., & Moustakas, A. (2015). Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGF β . *Cell adhesion & migration*, 9(3), 233-246.

Tang Z, Feng W, Yang Y, Wang Q. Gemcitabine-loaded RGD modified liposome for ovarian cancer: preparation, characterization and pharmacodynamic studies. *Drug Design, Development and Therapy.* 2019;13:3281.

Teeuwssen, M., & Fodde, R. (2019). Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, TEM, and Therapy Resistance. *Journal of clinical medicine*, 8(10), 1658.

Tempfer CB, Celik I, Solass W, Buerkle B, Pabst UG, Zieren J, Strumberg D, Reymond MA. Activity of pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) with cisplatin and doxorubicin in women with recurrent, platinum-resistant ovarian cancer: preliminary clinical experience. *Gynecologic Oncology.* 2014 Feb 1;132(2):307-11.

Ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet.* 2003 Jan 1;42(7):665-85.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871Y890.

Tong J, Ganguly PK, Singal PK. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol.* 1991;260(3Pt 2):H909–16.

Tuttle TM, Zhang Y, Greeno E and Knutsen A. Toxicity and Quality of Life after Cytoreductive Surgery plus Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology*. 2006;13(12):1627-1632.

Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, Slooten G and Tinteren H. 8-Year Follow-up of Randomized Trial: Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy versus Systemic Chemotherapy in Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2008;15(9):2426-32.

Wadkins RM, Jovin TM. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*. 1991 Oct 1;30(39):9469-78.

Walker FE. Paclitaxel (TAXOL®): side effects and patient education issues. *In Seminars in oncology nursing* 1993 Nov 1 (Vol. 9, No. 4, pp. 6-10). WB Saunders.

Wang Y, Wang XH, Fan DX, Zhang Y, Li MQ, Wu HX, Jin LP. PCSK6 regulated by LH inhibits the apoptosis of human granulosa cells via activin A and TGF β 2. *Journal of Endocrinology*. 2014;222:151-60.

Wang, L., & Jia, E. (2016). Ovarian cancer targeted hyaluronic acid-based nanoparticle system for paclitaxel delivery to overcome drug resistance. *Drug Delivery*, 23(5), 1810-1817.

Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*. 2014 Sep 15;25(18):2677-81.

Weinberg, R. A., & Weinberg, R. A. (2013). *The biology of cancer*. Garland science.

Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The TEM-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2009;11:1487Y1495

WHO, World Health Organization. Epithelial Ovarian Cancer. Union for International Cancer Control. 2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines.

WHO, World Health Organization. World Cancer Report 2016.

Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release*. 2015 Feb 28;200:138-57.

Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2007 Jul 10;59(6):491-504.

World Health Organization. Epithelial Ovarian Cancer. Union for International Cancer Control. 2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines.

Yamada SD, Baldwin RL, Karlan BY. Ovarian carcinoma cell cultures are resistant to TGF-beta1-mediated growth inhibition despite expression of functional receptors. *Gynecol Oncol* 1999;75:72–7.

Yan TD, Deraco M, Baratti D, Kusamura S, Elias D, Glehen O, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6237–42.

Yao S, Li L, Su XT, Wang K, Lu ZJ, Yuan CZ, Feng JB, Yan S, Kong BH, Song K. Development and evaluation of novel tumor-targeting paclitaxel-loaded nano-carriers for ovarian cancer treatment: in vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018 Dec;37(1):29.

Ye H, Karim AA, Loh XJ. Current treatment options and drug delivery systems as potential therapeutic agents for ovarian cancer: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2014 Dec 1;45:609-19.

Yeung TL, Leung CS, Wong KK, Samimi G, Thompson MS, Liu J, Zaid TM, Ghosh S, Birrer MJ, Mok SC (2013) TGF-beta modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 73:5016–5028.

Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. Cellular and

molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2015 Oct 1;309(7):C444-56.

Yin, T., Cai, H., Liu, J., Cui, B., Wang, L., Yin, L., ... & Huo, M. (2016). Biological evaluation of PEG modified nanosuspensions based on human serum albumin for tumor targeted delivery of paclitaxel. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 83, 79-87.

Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. Science translational medicine. 2014 Mar 26;6(229):229ra43-.

Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, Fan I, Bradley L, Shaw PA, Narod SA. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. Gynecologic oncology. 2011 May 1;121(2):353-7.

Zhang Y, Wang L, Liu Y, et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio before platelet-lymphocyte ratio predicts clinical outcome in patients with cervical cancer treated with initial radical surgery. Int J Gynecol Cancer 2014;24:1319–25.

Zhang, H., Huo, Q., Huang, L., Cheng, Y., Liu, Y., & Bao, H. (2019). Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Ovarian Cancer Patients with Low CA125 Concentration. BioMed research international, 2019.

Zhang, X., Chen, J., Kang, Y., Hong, S., Zheng, Y., Sun, H., & Xu, C. (2013). Targeted paclitaxel nanoparticles modified with follicle-stimulating hormone β 81–95 peptide show effective antitumor activity against ovarian carcinoma. International journal of pharmaceutics, 453(2), 498-505.

Zhao CY, Cheng R, Yang Z, Tian Z M. Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. Molecules. 2018;23(4):826.

Zhu Y, Hanna N, Boutros C, Alexander HR Jr. Assessment of clinical benefit and quality of life in patients undergoing cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for management of peritoneal

metástases. Journal of Gastrointestinal Oncology. 2013;4(1):62-71.

Anexo 1. Certificado de autorização de Comissão de Ética no uso animal da Universidade de Brasília



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 25 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS CONTENDO DOXORRUBICINA E PACLITA XEL SEGUIDO POR TERAPIA FOTODINÂMICA SISTÊMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE OVÁRIO METASTÁTICO.**", Protocolo n.º 60/2017, sob responsabilidade do Professor Ricardo Bentes de Azevedo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Mus musculus (85 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 31/05/2021.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo 2. Publicações Bibliográfica relacionada ao trabalho

[1] Artigo submetido: Revisão sobre o uso de lipossomas no tratamento do câncer de ovário

Ovarian cancer challenges and the use of nanotechnology as a promising strategy: an updated review (2008-2019)

Raquel Santos Faria ^a, Amanda Alencar Cabral ^a, Patrícia Bento da Silva ^a, João Nunes Mattos Neto ^b, Ricardo Bentes de Azevedo ^{a*}

^a Department of Genetics and Morphology, Biological Sciences Institute, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil;

^b Breast Oncology Service Cettro (Brasilia Cancer Center), Brasília DF, 70710-146, Brazil;

Address correspondence to Ricardo Bentes de Azevedo, Department of Genetics and Morphology, Biological Sciences Institute, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil. E-mail: razevedo@unb.br

Abstract:

Ovarian cancer is the 5th most lethal among gynecological cancers, because it is difficult to diagnose, and for this reason, many women are diagnosed in advanced stages of the disease. The treatment of ovarian cancer typically involves, cytoreductive surgery associated with adjuvant chemotherapy, based on paclitaxel and platinum compounds, and this combination can cause serious toxic effects. Over 90% of metastatic cancers do not respond to chemotherapy due to resistance mechanisms resulting in primary therapy failure, this is one of the reasons for the high mortality rate of patients with ovarian cancer. The use of nanotechnology, such as liposomes as a drug delivery system in cancer therapy, can offer several advantages. The purpose of this study was to compile a systematic review (2008-2019) of nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of ovarian cancer, Liposomes. There are 38 studies reported in the literature of liposomes for the treatment of ovarian cancer in the last 11 years (2008-2019). Many researchers studied liposomes with the most varied

compositions, as well as several drugs loaded into the liposomes and to this day scientists to improve the effectiveness of treatment as well as to reduce the adverse effects enhance these nanosystems. Liposomes are showing particular promises such as increased delivery of intracellular delivery systems to specific sites, the ability of long-term residence times and reduced toxicities.

Keywords: Ovarian cancer, nanotechnology, nanomedicine, and liposome.

[2] Artigo em processo de submissão:

LCFL PTX induces apoptosis cell death, inhibition of migration capacity, antitumoral activity and reduction in toxicity in ovarian cancer

Raquel Santos Faria^a, Luiza Ianny de Lima^a, Raphael Bonadio^a, João Paulo Figueiró Longo^a, João Nunes Mattos Neto^c, Sergio Moya, Marjorie Coimbra, Mônica Cristina de Oliveira^b, Ricardo Bentes de Azevedo^a.

a Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

c Breast Oncology Service Cettro (Brasilia Cancer Center), Brasília DF, 70710-146, Brazil;

d Centre for Cooperative Research in Biomaterials - CIC biomaGUNE, San Sebastian, Spain.

Abstract:

Ovarian cancer is considered a chemosensitive disease, so chemotherapy is very important when considering systemic treatment. However, recurrence occurs in about 80% of patients, thus requiring the development of more effective therapies. There are two main types of treatment for ovarian cancer: surgery and chemotherapy. The use of chemotherapy is based mainly on platinum and taxol compounds, and as a second line, non-platinum based drugs, such as liposomal doxorubicin, are used. Liposomes serve as nanocarriers for chemotherapy, maintaining the rate of the drug in the bloodstream and their targeted delivery. The aim of the project was to evaluate the *in vitro* effect of PTX carried by a liposomal nanosystem (LFCP PTX) on ovarian epithelial carcinoma cells (A2780), and *in vivo* antitumor activity and toxicity in an experimental study model of peritoneal ovarian carcinomatosis in mice. In *in vitro* tests, cell viability results against the A2780 tumor line showed a 50% decrease in inhibitory concentration when using LFCP PTX compared to free PTX. The percentage of growth of

A2780 cell colonies when treated with liposomal PTX was statistically different than the treatment with free PTX. Cell death profiles of A2780 cells with liposomal treatments were indicative of apoptosis, with most cells in early apoptosis. A2780 cells treated with the LFCP PTX exhibited a inhibition in the migration profile by the Wound Healing and 3D (xCELLigence) methods. This inhibition was promoted by the decrease in the gene expression of ZEB1 and TGFB2. In *in vivo* testing, treatment with LFCP PTX strongly inhibited tumor cell development and proliferation in ovarian peritoneal carcinomatosis, indicating high antitumor activity when compared to PTX free form. Also, LFP PTX group had lower systemic toxicity much closer to healthy animals than the animals treated with free PTX. Our results showed that the use of nanocarrier PTX in the LFCP liposome leads to more effective control of tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, including inhibition of migration via the ZEB1 and TGFB2 pathways, as well as reducing the systemic toxicity of PTX.

Keywords: ovarian cancer, liposome, paclitaxel

Anexo 3

Tabela 6: Dados das formulações lipossomais recebidas.

Formulação Lipossomal - LFCP PTX				
Data do envio	Diâmetro (nM)	Índice de Polidispersão	Zeta	Concentração de Fármaco encapsulado (%)
07.2017 Amostra liofilizada	196	0,28	-0,88	61,55
08.2018 Amostra líquida	240	0,31	-4,93	65,0
06.2019 Amostra líquida	241	0,37	-4,9	65,0