



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

BARBARA YASMIN GARCIA ANDRADE

**Avaliação da capacidade antitumoral de
nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel em
células de carcinoma de ovário sensíveis e resistentes *in*
*vitro***

Brasília

2018

BARBARA YASMIN GARCIA ANDRADE

**Avaliação do efeito antitumoral de nanopartículas
lipídicas sólidas contendo docetaxel em células de
carcinoma de ovários sensíveis e resistentes *in vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília, 2018.

Dedico esse trabalho a minha mãe, que além de progenitora é meu maior exemplo, meu orgulho e minha força pra realizar meus sonhos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe Sônia Garcia, por ser a melhor mãe do mundo para mim e meu irmão. Obrigada por toda a educação que me proporcionou, as oportunidades que sempre se esforçou para dar aos seus filhos. Se chegamos onde estamos é devido a sua dedicação e amor. Você sempre será minha maior incentivadora e meu eterno porto seguro. Ao meu maninho Sérgio Bruno e meu sobrinho-afilhado João Guilherme agradeço por todos os momentos que me proporcionam, obrigada por todo o amor, dedicação, paciência e apoio! Vocês são o pilar da minha sanidade! Ao meu pai Acilon e aos meus irmãos Lorena, Amanda, Acilon Filho, Isabela e Davi ao apoio à distância, sou grata por todo amor e incentivo que sempre me dão. Sem vocês eu não seria quem eu sou e não conseguiria realizar meus planos. Eu amo todos vocês imensamente.

À professora Sônia Nair Bão pela orientação, oportunidade e confiança e apoio que possibilitaram a realização desse trabalho. Levo para minha vida não somente a orientação acadêmica que recebi, mas também os melhores exemplos de profissionalismo e de conduta humana. Meus sinceros agradecimentos!

À Bruna Guido por ter sido minha primeira mentora e por ter me ensinado a viver ciência de uma maneira única. Me espelho em você e espero que um dia você se enxergue pelos meus olhos e veja o exemplo de ser humano que eu vejo. Ao professor José Raimundo Corrêa que me abriu as portas para ingressar nesse laboratório fantástico.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e seus integrantes por terem me adotado e acolhido nesses cinco anos de convivência. Foram muitas pessoas e muitas histórias que tornaram meus dias mais leves e alegres. Um local que me deu amigos que levarei para o resto da vida. Um agradecimento especial aos amigos Natália Lemos, Karine, Shaiane, Natália, Núbia, Thayssa, Thatiane, Weskly, Mayara, Guilherme, José Henrique, Zé Assumpção, Daisy, Eloisio, Matheus.

À Márcia por ter dado apoio desde o início e por ter compartilhado comigo o material necessário para esse trabalho. À Marina pela síntese dos nanos.

À Nabyla (Fofinha) pela amizade, por todas as risadas, abraços, lanches e cuidados comigo e com minhas filhotas! Agradeço a Deus por ter me dado esse presente que foi essencial nesses dois anos! À Lorena por sempre estar disposta a ajudar e quebrar milhares de galhos nos momentos mais necessários. À Ingrid que mesmo com seu jeito turrão e desmemoriado foi uma das pessoas que mais cuidou de mim por todos esses anos. À Ana Brígida por todo o carinho singelo camuflado de mau humor. À Stefanny por confiar a mim a missão de ser sua tutora e por me encher de orgulho. Ao Diogo pela amizade e comentários super sinceros.

Ao professor Tatsuya Nagata e seus alunos Rosana, Layssa, Rachel, Leo, Moana, Nataly e João por sempre estarem dispostos a ajudar no que for necessário com toda a paciência do mundo, por me acolherem em seu laboratório com braços abertos.

Aos professores do bloco K Térro Renato Resende, Bergman Ribeiro, Eliane Noronha, Edivaldo Ximenes e Ricardo Kruger e aos seus respectivos grupos de pesquisa, pela colaboração e prestatividade. Pela companhia diária e pela disponibilidade.

À CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal pelo financiamento deste trabalho. Ao Instituto de Ciências Biológicas e a Universidade de Brasília pela estrutura e ambiente de trabalho.

Por fim, agradeço à Deus, que nunca falhou em minha vida, sempre me abençoando e dando forças para enfrentar todos os obstáculos que vivi e ainda viverei.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Maria Tereza de Calcutá)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2018.....	4
Figura 2 - Ilustração esquemática da anatomia do ovário e as várias etapas sequenciais do desenvolvimento folicular. Fonte: HOFFMAN <i>et al.</i> , 2014.....	5
Figura 3 - Origem dos três principais tipos de tumores de ovário. Fonte: HOFFMAN <i>et al.</i> , 2014.....	6
Figura 4 - Esquema comparativo da Incidência versus Mortalidade dos cânceres ginecológicos, dados da Organização Mundial da Saúde.....	7
Figura 5 - Modelo proposto para o surgimento do câncer de ovário epitelial (CEO) conduzido por células-tronco.....	10
Figura 6 - Esquema do funcionamento da P-glicoproteína no efluxo de substrato. (Adaptado de MARKMAN <i>et al.</i> , 2013).....	13
Figura 7 - Estrutura química do docetaxel. (Adaptado de Zhang & Zhang, 2013).....	14
Figura 8 - Esquema da composição e organização geral de nanopartículas lipídicas sólidas. (Adaptado de Lin e colaboradores, 2017)	19
Figura 9 - Diagrama esquemático do delineamento experimental com A2780.	27
Figura 10 - Vetor retroviral pHaMDR de Pastan e colaboradores (1988).....	28

Figure 11 - Gel de agarose 1% com pHaMDR obtido por midiprep, GaG-Pol e VSV-G.	30
Figura 12 - DNA plasmidial obtido por miniprep das colônias isoladas de <i>E. coli</i>	39
Figura 13 - Digestão do DNA plasmidial 2 e 19 com as enzimas de restrição SacII e XhoI.....	40
Figura 14- Morfologia das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 em diferentes confluências.	42
Figure 15 - Micrografia das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e #3 por microscopia eletrônica de varredura.	43
Figura 16 - Distribuição e organização de p-glicoproteína nas membranas celulares de A2780, A2780-MDR#2 e #3.	45
Figure 17 - Citotoxicidade de DTX e ETANOL nas células transformadas A2780-MDR#2.	47
Figura 18 – Absorbância das células A2780-MDR#2 tratadas com ETANOL e DTX.	49
Figura 19 - Citotoxicidade de DTX e ETANOL nas células transformadas A2780-MDR#3.	50
Figura 20 - Viabilidade de A2780 e A2780-MDR#2 e #3 após tratamento com docetaxel nos tempos de 24, 48 e 72 horas normalizados com o tratamento apenas com o solvente.....	52
Figura 21 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 24 horas de tratamento.	55

Figura 22 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 48 horas de tratamento.	57
Figura 23 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 72 horas de tratamento.	59
Figura 24 - Efeitos das NLS-BRANCA-1 e NLS-DTX-1 na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.	62
Figura 25 - Efeitos das NLS-BRANCA-2 e NLS-DTX-2 na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.	64
Figura 26 - Efeitos do ETANOL e DTX na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.	66
Figura 27 - Efeito citotóxico das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780-MDR#2 em 24, 48 e 72 horas de tratamento.	68
Figura 28 - Efeito citotóxico das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780-MDR#3 em 24, 48 e 72 horas de tratamento.	70
Figura 29 – Painel comparativo das viabilidades dos tratamentos com NLS-DTX-1, NLS DTX-2 e DTX nas linhagens de carcinoma de ovário sensíveis A2780 e resistentes A2780-MDR.	72

Figure 30 - Alterações morfológicas das células A2780 após 24h de tratamento. (A) Controle sem tratamento; (B) DTX 1µg/mL; (C) NLS-BRANCA volume equivalente; (D) NLS-DTX-1 1µg/mL e (E) NLS-DTX-2 1µg/mL.	74
Figura 31 – Organização do citoesqueleto das células A2780 controle não tratada e tratada com NLS-BRANCA.	76
Figura 32 – Efeitos do docetaxel presente nas NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 causam desorganização e ruptura dos microtúbulos das células A2780.	77
Figure 33 – Efeito do tratamento com as NLS-DTX e DTX na capacidade das células A2780 de formarem colônias.	79
Figura 34 – As NLS-DTX impedem a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais de ovário em G2/M – Histogramas das fases do ciclo celular.. .	81
Figura 35 - As NLS-DTX impedem a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais de ovário em G2/M – % de células em cada fase do ciclo.	82
Figura 36 - Tratamento com as NLS-DTX induz a morte por apoptose em células tumorais de ovário.	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2016.....	3
Tabela 2 - Fatores de risco para câncer epitelial de ovário. Fonte: HOFFMAN <i>et al.</i> , 2014.	8
Tabela 3 - Materiais utilizados nos experimentos.	24
Tabela 4 – Concentração inibitória de 50% de docetaxel das linhagens A2780 e A2780-MDR nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	53
Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% (IC ₅₀) da população de A2780	60

LISTA DE ABREVIATURAS

A2780: Linhagem de carcinoma de ováriosensível

A2780-MDR#2: Linhagem de carcinoma de ovário resistente à múltiplos fármacos transformada com o plasmídeo pHaMDR por 48 horas

A2780-MDR#3: Linhagem de carcinoma de ovário resistente à múltiplos fármacos transformada com o plasmídeo pHaMDR por 24 horas

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosina Trifosfato

BCRP/ABCG2: Proteína Associada com Resistência a Multidroga

BRAF: Proto-oncogene que expressa B-Raf

BRCA1: Oncogene que expressa BRCA1 (Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama)

BRCA2: Oncogene que expressa BRCA2 (Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama)

BSA: Albumina Sérica Bovina

CA-125: Marcador tumoral de câncer de ovário

CDK12: Gene que codifica a CDK12 (Cinase dependente de ciclina 12)

CEO: Câncer epitelial de ovário

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DTX: Docetaxel solubilizado em etanol absoluto

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FITC: Fluoresceína

GPA: Glicoproteína ácida alfa-1

P-GLICOPROTEÍNA: Proteína expressa na superfície celular

IC₅₀: Concentração Inibitória de 50%

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KRAS: Oncogene que codifica GTPase KRas

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

MRP2/ABCC2: Proteína Associada com Resistência a Multidroga

NF1: Gene codificante da Neurofibromina 1

NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas

NLS-DTX-1: Nanopartícula lipídica sólida associada com 1 mg/mL de docetaxel

NLS-DTX-2: Nanopartícula lipídica sólida associada com 2 mg/mL de docetaxel

OMS: Organização Mundial de Saúde

p53: Gene codificante da fosfoproteína p53

PTEN: Gene que expressa a proteína PTEN (Homologo da fosfatase e tensina)

PBS: Tampão Fosfato Salina (Phosphate buffered saline)

PI: Iodeto de Propídio (Propidium Iodide)

RNA: Ácido Ribonucleico

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium

SFB: Soro Fetal Bovino

Tween 80: Polissorbato 80

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Câncer de ovário.....	4
1.2.1. Câncer Epitelial de Ovário (CEO).....	8
1.2.2. Resistência à multifármacos em câncer de ovário.....	12
1.3. Docetaxel.....	14
1.4. Sistemas de Entrega de Fármacos – Nanopartículas	16
1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Reagentes e equipamentos	23
4.2. Nanopartículas lipídicas sólidas	25
4.3. Cultura celular.....	25
4.4. Delineamento experimental	26
4.5. Obtenção de linhagem de carcinoma de ovário resistente A2780-MDR	27
4.5.1 Plasmídeos pHaMDR, GaG-Pol e VSV-G.....	27

4.5.2 Transfecção de HEK-293T com os plasmídeos PVRGag-Pol, PLVSV-G e pHaMDR	30
4.5.3 Transdução de A2780 com VLP contendo pHaMDR	31
4.6. Análise da morfologia das células A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 por microscopia de luz	31
4.7 Análise da morfologia das células A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 por microscopia eletrônica de varredura	32
4.8. Ensaio de Imunomarcção de P-glicoproteína	32
4.9. Determinação da viabilidade celular após tratamento com as NLS-DTX nas linhagens A2780, fibroblasto, A2780-MDR#2 e #3 pelo método de MTT	33
4.10. Análise da morfologia das células A2780 após tratamento com NLS-DTX por microscopia de luz	34
4.11. Ensaio de Imunomarcção da α-tubulina	34
4.12. Ensaio de formação de colônia	35
4.13. Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)..	36
4.14. Caracterização da morte celular induzida pelas NLS-DTX.....	37
4.15 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	38
5.1. Seleção do plasmídeo pHaMDR para ser utilizado na obtenção das linhagens de A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3	38
5.2 Morfologia das células A2780-MDR #2 e A2780#3	40
5.3 Imunomarcção de P-glicoproteína em A2780 e A2780-MDR	44
5.4 Análise da toxicidade de docetaxel nas células A2780-MDR.....	46
5.5 Análise da citotoxicidade de NLS-BRANCA, NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 nas linhagens A2780, fibroblasto, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3	54

5.6 Atividade de NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 na estrutura do citoesqueleto.....	75
5.7 Avaliação da capacidade de formação de colônias das células tratadas com as NLS-DTX.....	78
5.8 Efeito das NLS-DTX no ciclo celular	80
5.9 Tipo de morte celular causada pelos tratamentos com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2	83
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO.....	90
8. PERSPECTIVAS.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMO

O câncer epitelial de ovário aparece como o tipo de câncer ginecológico com maior mortalidade em todo o mundo. Atualmente, o tratamento padrão é baseado na combinação de cisplatina com um taxano, porém tem como principal obstáculo para sua eficiência o desenvolvimento de resistência aos tratamentos pelas células tumorais. O docetaxel é um importante antineoplásico hidrofóbico amplamente utilizado na clínica no tratamento de tumores como mama, ovário, próstata e outros. Entretanto, sua toxicidade sistêmica é alta devido ao solvente utilizado na administração, o Tween 80, responsável por agravar os efeitos adversos e provocar reações alérgicas. A associação do docetaxel com nanopartículas lipídicas sólidas mostra-se como uma opção para diminuir os problemas relacionados à aplicação biológica do docetaxel, pois permite um maior nível de absorção pelas células tumorais, além de protegê-lo da degradação dentro do organismo antes que chegue ao alvo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral de duas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) associadas ao docetaxel (DTX) nas linhagens de carcinoma de ovário humano sensível A2780 e resistente ao docetaxel A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3. Para obtenção das linhagens resistentes A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 foi feita a transdução das células A2780 com VLP contendo o plasmídeo retroviral com gene MDR (pHaMDR). As linhagens obtidas possuem morfologia alterada, com células maiores e crescimento em colônias, características diferentes da linhagem parental e apresentam sensibilidade reduzida ao DTX. Foi avaliada a ação citotóxica de três nanoformulações: (1) NLS-BRANCA, para verificação da citotoxicidade do sistema; (2) NLS-DTX-1, formulação contendo 1 mg/mL de docetaxel; (3) NLS-DTX-2, formulação contendo 2 mg/mL de docetaxel. Como controle positivo foi utilizado o DTX livre. Com os resultados obtidos foi possível observar que as NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 possuem atividade citotóxica a partir de 10 ng/mL nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas e seu veículo, a NLS-BRANCA, não apresentou toxicidade significativa tanto na linhagem tumoral sensível (A2780) como nas resistentes à docetaxel (A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3). Por microscopia de luz foi possível visualizar que o tratamento com as NLS-DTX alterou a morfologia das células A2780, tornando-as arredondadas e menores, além de desorganizar o citoesqueleto das células, causando danos aos microtúbulos, fato esse observado por microscopia confocal a laser. Esses danos a morfologia e ao citoesqueleto se dá pela atividade estabilizadora de microtúbulos de docetaxel, o que promove a desorganização do citoesqueleto. Foi avaliada a capacidade clonogênica das células A2780 após 24 horas de tratamento com as NLS-DTX e foi visto que as células não foram capazes de se proliferar e formar colônias como ocorre naturalmente a essa linhagem. A atividade antimetabólica de DTX presente nas formulações foi observada pelo impedimento da progressão do ciclo celular em G2/M. A interrupção do ciclo celular levou as células A2780 a morte celular. Portanto, com esse trabalho foi possível concluir que a associação de DTX com o nanossistema NLS é eficiente pois mostrou ação citotóxica em células de carcinoma de ovário sensíveis e resistentes à docetaxel, além de preservar a atividade antimetabólica característica do fármaco.

Palavras-chave: câncer de ovário; resistência à multifármacos; nanopartículas lipídicas sólidas; docetaxel.

ABSTRACT

The epithelial ovarian cancer is the most common cause of women deaths among gynecological cancers worldwide. Currently, the standard treatment is based on the combination of cisplatin with a taxane, however the efficacy of this combination faces a main obstacle: the development of resistance to treatments by tumor cells. Docetaxel is an important hydrophobic antineoplastic applied in clinical treatment for breast, ovary, prostate and solid tumors in general, but it shows high systemic toxicity due to the utilization of Tween 80 as solvent. The use of Tween 80 is responsible to increase the side effects and to cause allergic reactions. The association of docetaxel with solid lipid nanoparticles is shown as an option to enhance biological application of docetaxel, because it provides a better absorption by the tumor cells besides preventing the drug degradation within the organism before it arrives at the target. The aim of this study was to evaluate the antitumor activity of two solid lipid nanoparticle (NLS) formulations associated with docetaxel (DTX) in sensitive human ovary carcinoma A2780 cell line and resistant to docetaxel A2780-MDR#2 and A2780-MDR#3 strains. A2780-MDR#2 and A2780-MDR#3 strains were generated by transduction of A2780 cells with VLP containing retroviral plasmid with MDR gene (pHaMDR). Transduced cell lines showed altered morphology presenting bigger cells growing in colonies, different from the parental cells and were less sensitive to DTX. Cytotoxicity assay for three nanoformulations was performed: (1) NLS-WHITE, to evaluate cytotoxicity caused by the system; (2) NLS-DTX1, formulation with 1mg/mL of docetaxel; (3) NLS-DTX-2, formulation with 2 mg/mL of docetaxel. Free docetaxel was used as a positive control. The results demonstrated that NLS-DTX-1 and NLS-DTX-2 have cytotoxic activity beginning from 10 ng/mL concentration within 24, 48 and 72 hours of treatment and their vehicle, NLS-WHITE showed no significant toxicity both in the sensitive (A2780) and in resistant cell lines (A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3). Also, the treatment with NLS-DTX altered the morphology of A2780 cells, making them rounded and smaller. This morphology damage is due to the stabilization of microtubules by the DTX, which promotes the cytoskeleton disorganization, observed by confocal microscopy. Clonogenic assay was performed with A2780 cell after 24h of treatment with NLS-DTX and it was seen that these cells were not able to proliferate and make colonies, as naturally occurs in this cell line. The antimetabolic activity of DTX present in the NLS-DTX formulations was observed by the prevention of cell cycle progression in G2/M leading cells to death. Finally, it was possible to conclude that the association of DTX with the NLS nanosystem is an efficient treatment since it shows cytotoxic activity in sensitive ovarian tumor cells as well as in docetaxel resistant cells and keeps the antimetabolic activity presented by free docetaxel.

Key words: ovarian cancer; multi drugs resistance; solid lipid nanoparticles; docetaxel.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é um termo genérico para um grupo de mais de duzentas doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. O surgimento e estabelecimento de um câncer têm várias etapas, onde as células passam por processos de transformação até se tornar uma célula tumoral (WHO, 2016). Das características que definem o câncer, a proliferação desenfreada das células tumorais é a principal, e uma das mais preocupantes é a capacidade que essas células possuem de invadir tecidos adjacentes e se estabelecer em novos órgãos, processo denominado de metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000; CAIRNS & MAK, 2016).

Essa desordem na fisiologia celular está relacionada à anomalias na expressão gênica básica das células e na resposta celular à estímulos internos ou externos ao organismo. Os fatores internos representam de 5 a 10% de todos os cânceres e se referem a predisposições genéticas (mutações danosas ao DNA que aumentam as chances do desenvolvimento do câncer), desarranjos hormonais, fatores imunes e epigenéticos (DESANTIS *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016; FLAVAHAN *et al.*, 2017). Os fatores externos são os relacionados com comportamentos individuais, como tabagismo, sedentarismo, alcoolismo, má alimentação e outros, ou por exposição à agentes mutagênicos, tais como luz ultravioleta ou compostos químicos (HANAHAN & WEINBERG, 2011; LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2016.; GHARIBVAND *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do câncer, na maioria dos casos, ocorre de maneira lenta e progressiva, devido à necessidade de várias mutações propícias no DNA das células para que se inicie todo o processo. Estudos recentes sugerem que é necessário de três a

dez eventos genéticos no surgimento e proliferação de células tumorais (MCCREERY & BALMAIN, 2017). As duas classes de genes mais envolvidos no processo de carcinogênese são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumores, onde os primeiros estão ativos como oncogenes e os segundos aparecem inativados. Porém, não é necessário só mecanismos mutagênicos intrínsecos para o desenvolvimento do câncer. Produtos químicos alteram mecanismos epigenéticos e podem aumentar a expansão clonal das células alteradas (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; OUYANG *et al.*, 2012; CAIRNS & MAK, 2016).

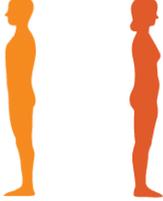
O aumento da incidência de casos de câncer está relacionado ao crescimento e ao envelhecimento da população, como também à crescente prevalência de fatores de risco, como tabagismo, excesso de peso, sedentarismo, alimentos industrializados, álcool entre outros (HEITZ *et al.*, 2017; ELLISON *et al.*, 2017). Atualmente o câncer é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo, contabilizando mais de 14 milhões de pessoas acometidas a cada ano. Os países em desenvolvimento são os mais afetados, representando 57% dos casos e 65% das mortes por câncer em todo o mundo (TORRE *et al.*, 2015; WHO, 2016). No Brasil, a estimativa para os anos de 2018-2019 indicou a ocorrência de 600 mil novos casos (Tabela 1).

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2018.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

*Números arredondados para múltiplos de 10.

O perfil epidemiológico atual do país mostra que os cânceres mais incidentes em homens são: próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral; e em mulheres são: mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago (Figura 1) (INCA, 2018). O câncer de ovário não figura como um dos tipos principais no Brasil, com a estimativa para biênio 2018-2019 de 6.150 novos casos (INCA, 2016). Porém, é o câncer ginecológico com maior incidência de morte (JAYSON *et al.*, 2014; VARSHOSAZ *et al.*, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Côlon e Reto	18.980	9,4%
Côlon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figure 1 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2018.

1.2. Câncer de ovário

O ovário é a glândula genital feminina localizada na parte inferior da cavidade pélvica, possui forma oval, com 2 a 5 cm de comprimento, 1,5 a 3 cm de largura e 0,5 a 1,5 cm de espessura e pesa entre 5 a 10 g durante os anos reprodutivos e possui organização morfológica semelhante ao esquema da Figura 2. O órgão é dividido em três partes: (I) região cortical externa, que contém o epitélio germinal e os folículos; (II) região medular, formada por tecido conjuntivo formado por células contráteis tipo mioide e células intersticiais e (III) hilo, região que contém os vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (HOFFMAN *et al.*, 2014; DECHERNEY *et al.*, 2016).

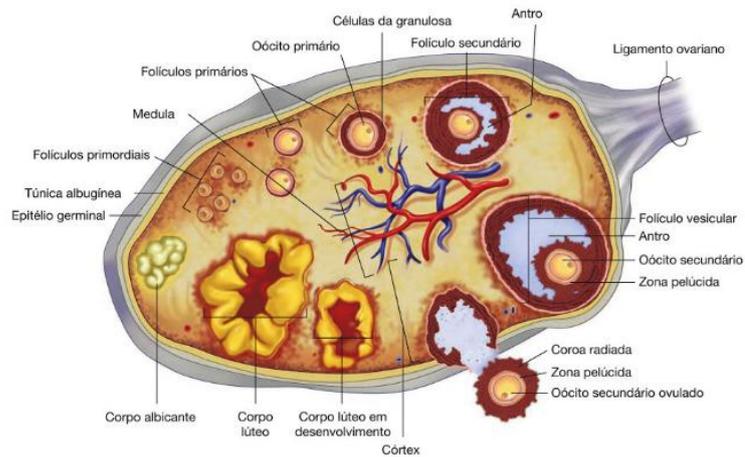


Figura 2 - Ilustração esquemática da anatomia do ovário e as várias etapas sequenciais do desenvolvimento folicular. Fonte: HOFFMAN *et al.*, 2014.

As duas funções dos ovários estão inter-relacionadas, sendo uma a geração de oócitos maduros e produção de hormônios esteroides e peptídeos que criam o ambiente ideal para a fertilização e subsequente implantação no endométrio. O ovário em funcionamento normal sintetiza e secreta os hormônios esteroides sexuais estrogênios, androgênios e progesterona. A dinâmica de síntese e secreção desses hormônios é determinada pelas gonadotrofinas hipofisárias, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). As funções endócrinas do ovário estão correlacionadas com o ciclo menstrual e na preparação do útero para implantação do óvulo fertilizado (HOFFMAN *et al.*, 2014).

As neoplasias que podem acometer o ovário são um grupo heterogêneo de tumores que possuem características clinicopatológicas e moleculares distintas (HOFFMAN *et al.*, 2014). Existem três principais classes de tumores malignos que podem surgir no ovário (Figura 3): os cânceres epiteliais ovarianos, os tumores ovarianos de células germinativas e do estroma do cordão sexual. Esses tipos de

tumores são divididos com base nas estruturas anatômicas das quais os tumores se originam (CHEN *et al.*, 2003; WEBB & JORDAN, 2017)

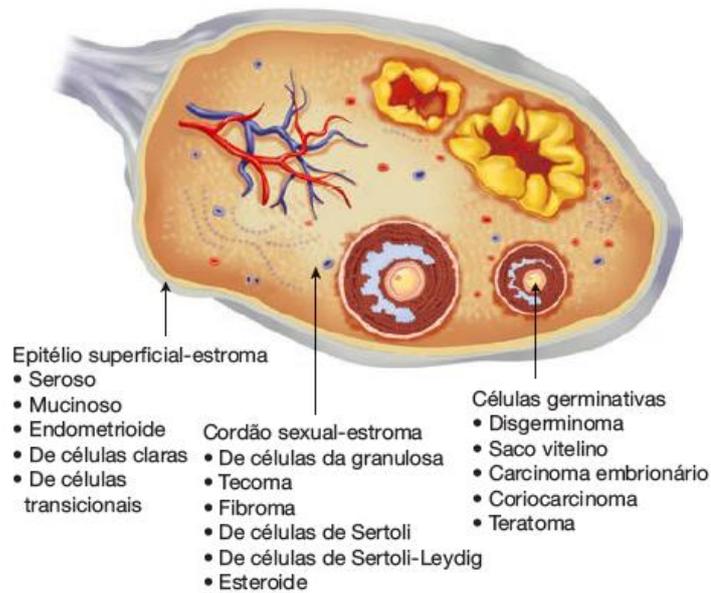


Figura 3 - Origem dos três principais tipos de tumores de ovário. Fonte: HOFFMAN *et al.*, 2014.

Os cânceres epiteliais de ovário correspondem a cerca de 90-95% dos casos de tumores malignos ovarianos, e os tumores de células germinativas e do estroma do cordão sexual juntos correspondem cerca de 5-10% dos casos, e possuem características singulares que exigem manejo específico (ROSEN *et al.*, 2009; STEWART *et al.*, 2017).

Os tumores ovarianos de células germinativas são diversos e derivados das células germinativas primitivas das gônadas embrionárias. Representam 20-25% dos casos de tumores de ovário, porém tumores malignos são raros, cerca de 2,6% dos casos de tumores malignos de ovário (SHAABAN *et al.*, 2014). São diagnosticados tipicamente na adolescência e seus principais sintomas são dores abdominais, surgimento de uma massa palpável e elevados níveis de marcador tumoral sérico. Os

tumores malignos de células germinativas engloba os disgerminomas, teratomas imaturos, tumores de saco vitelínico e tumores mistos de células germinativas (DECHERNEY *et al.*, 2016).

Os tipos de neoplasias malignas ovarianas com menor incidência são os tumores do estroma do cordão sexual (TECSs), cerca de 0,2 casos a cada 100.000 mulheres. São originados de células da matriz do ovário, e possuem potencial de produzir hormônios. Quase 90% dos casos de tumores que produzem hormônios são TECSs. Uma característica que portadores desse câncer possuem é sintomas de hiperestrogenismo e hiperandrogenismo (HOFFMAN *et al.*, 2014).

O câncer epitelial de ovário (CEO), ou carcinoma de ovário, é o sétimo tipo de câncer mais comum no mundo (OZA *et al.*, 2015). Ele aparece como o tipo de câncer ginecológico que mais causa morte de mulheres em todo o mundo (Figura 4), mesmo possuindo uma das menores taxas de incidência. Os CEOs são sub-divididos de acordo com suas características morfológicas e clínicas (MATZ *et al.*, 2017).

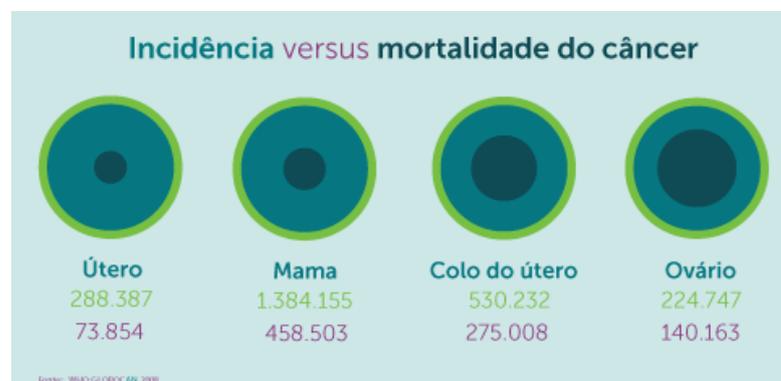


Figura 4 - Esquema comparativo da Incidência versus Mortalidade dos cânceres ginecológicos, dados da Organização Mundial da Saúde. Números em verde referentes à incidência e números em rosa referentes à mortalidade. Fonte: Site do Dia Mundial do Câncer de Ovário <<http://ovariancancerday.org/pt/>>, acesso fevereiro de 2018.

1.2.1. Câncer Epitelial de Ovário (CEO)

Atualmente, 240.000 mulheres são diagnosticadas com câncer epitelial de ovário no mundo todos os anos. É o sétimo tipo de câncer mais incidente em mulheres e o oitavo com maior taxa de mortalidade, causando mais de 140.000 mortes por ano (LA VECCHIA, 2017). Quando diagnosticadas nos primeiros estágios de CEO, as pacientes possuem cerca de 45% de chances de sobreviver enquanto que as mulheres que são diagnosticadas em estágios avançados possuem de 15-25% de chances de sobrevivência. Esse fato é um dos principais agravantes desse tipo de câncer (WEBB & JORDAN, 2017).

Diversos fatores de risco genéticos, ambientais e reprodutivos estão relacionados ao desenvolvimento de CEO (Tabela 2). A história familiar de câncer de mama ou de ovário da paciente é de extrema importância, pois de 5 a 10% dos casos estão relacionados com predisposição genética (HOFFMAN *et al.*, 2014). A idade média em que as mulheres são diagnosticadas com câncer de ovário é de 63 anos, porém as mulheres com predisposição genética são comumente diagnosticadas na faixa etária de 50 anos (JAYSON *et al.*, 2014; LA VECCHIA, 2017).

Tabela 2 - Fatores de risco para câncer epitelial de ovário. Fonte: HOFFMAN *et al.*, 2014.

Nuliparidade
Menarca precoce
Menopausa tardia
Raça branca
Idade crescente
Residência na América do Norte ou Europa setentrional
História familiar
Antecedente pessoal de câncer de mama
Etnia (judeu europeu, islandês, húngaro)

Aproximadamente 70% dos tumores de ovário são diagnosticados em estágio avançado e apenas 30% desses casos tem chances de sobreviver cinco anos (JAYSON *et al.*, 2014; AUNE *et al.*, 2015). Estudos epidemiológicos recentes demonstraram redução no risco de câncer de ovário em mulheres que tem a ovulação interrompida, como em casos de gravidez ou anticoncepcionais orais (TSILIDIS *et al.*, 2011).

A patogênese do CEO ainda não é totalmente elucidada. A teoria mais aceita atualmente é que o epitélio da superfície do ovário (ESO) ou o seu cisto de inclusão são considerados como as únicas fontes prováveis de CEO (Figura 5). A hipótese da ovulação incessante postula que o processo cíclico de ruptura e o reparo dos ovários durante a ovulação aumenta a proliferação celular e conseqüentemente o acúmulo de mutações somáticas deletérias. Como resultado, formam-se cistos de inclusão cortical no córtex superficial do ovário, e a exposição das células ESO retidas no cisto ao meio estromal ativado e o produto secretado por ESO dentro do lúmen cístico causa a sua transformação (NG & BARKER, 2015; MATZ *et al.*, 2017).

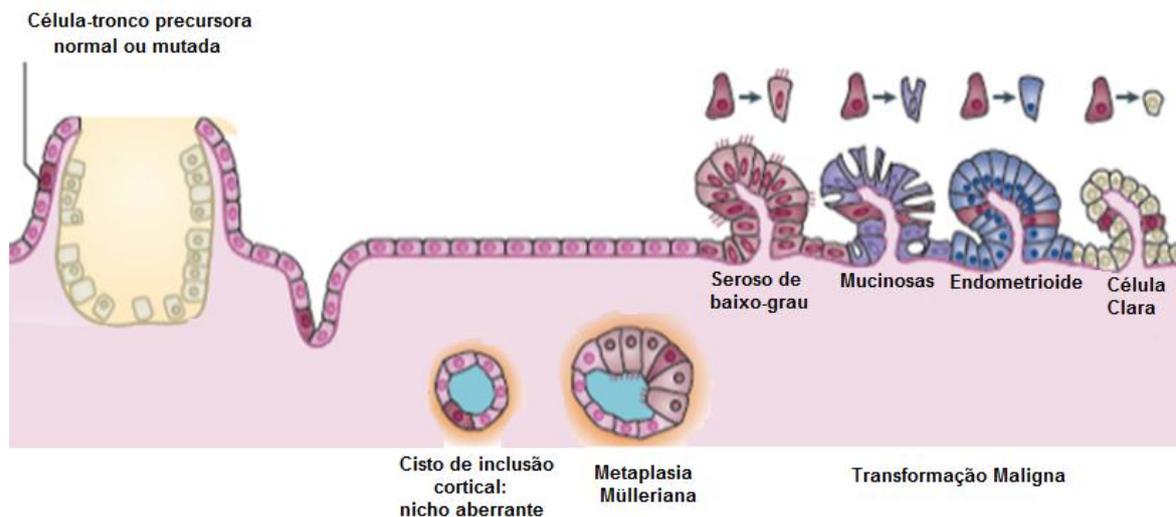


Figura 5 - Modelo proposto para o surgimento do câncer de ovário epitelial (CEO) conduzido por células-tronco. É mostrada uma célula-tronco de epitélio de superfície do ovário (ESO) como célula de origem CEO. Durante a ovulação incessante, uma célula-tronco ESO normal ou mutada (rosa escuro) nas margens da ferida ovulatória é aprisionada dentro do córtex do ovário para formar um cisto de inclusão cortical. A célula-tronco aprisionada é exposta à sinais parácrinos aberrantes do cisto estromal ativado (área laranja) e/ou sinais autócrinos dentro do lúmen cístico (área azul). Ao longo do tempo, a célula-tronco aprisionada sofre metaplasia Mülleriana, seguida de transformação maligna. Dependendo da natureza dos sinais de nicho e da aquisição de mutações críticas, a célula-tronco ESO transformada diferencia-se ao longo de diferentes linhagens Müllerianas para gerar os diferentes tipos de células CEO. (Adaptada de Ng & Backer, 2015).

Ao contrário de muitos cânceres epiteliais, nos quais a carcinogênese é acompanhada por um bloqueio na diferenciação, o epitélio do ovário sofre metaplasia, ou seja, essas células alteram seu tipo celular e adquirem características histológicas de outros tipos de tecidos provenientes da mesma linhagem germinativa, como a trompa de Falópio para adquirir histologia altamente complexa que se assemelha à trompas de Falópio derivada do ducto de Müller (tumor seroso), ao endométrio (tumor mucinoso), endocervix (endometrióide) ou vagina (CEO de célula transparente) (DUBEAU, 2008; CHO & SHIH, 2009; NG & BARKER, 2015).

CEO é uma doença heterogênea, apresenta diferentes subtipos histológicos como comportamento biológico e perfis genéticos diferentes (NIK *et al.*, 2014). Os tumores de ovários são divididos em Tipo I e Tipo II. Os tumores Tipo I têm os genes *BRAF*,

KRAS e *PTEN* frequentemente mutados, e geralmente são do tipo serosos de baixo grau, endometrióides e mucinosos; os tumores do Tipo II são os serosos de alto grau e os carcinosarcomas, com frequente mutação nos genes *p53*, *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações nos genes *NF1* e *CDK12* também estão presentes na grande maioria dos tumores de ovário (BARRETT, 1993; JAYSON *et al.*, 2014).

A maioria dos diagnósticos de câncer de ovário é feita quando o tumor já está em estágios avançados, isso porque os estágios iniciais da neoplasia, geralmente não apresentam sintomas. As pacientes sintomáticas apresentam de 3-4 meses de dores ou distensões abdominais, entretanto os sintomas são comumente confundidos com síndrome de intestino irritável (JAYSON *et al.*, 2014). Atualmente, as metodologias mais usadas para a detecção são a dosagem de CA-125 (principal marcador tumoral para câncer de ovário) e o exame de imagem ecografia endovaginal.

A cirurgia para a retirada do tumor seguida por quimioterapia com uma platina (carboplatina ou cisplatina) e um taxano (paclitaxel ou docetaxel) é o padrão internacional de atendimento para mulheres com câncer de ovário (OZA *et al.*, 2015). A quimioterapia de primeira linha utilizando platina e seus derivados no tratamento de CEO tem sido padrão por quase 40 anos, porém estudos comprovaram que a combinação de cisplatina com um taxano (paclitaxel ou docetaxel) melhora a sobrevivência das pacientes. Esse padrão de tratamento se tornou global e vem sendo utilizado nos últimos 20 anos (JAYSON *et al.*, 2014). Essa estratégia de tratamento possui alta eficácia, com cerca de 80% das pacientes tendo remissão completa após tratamento primário, porém a maioria desses casos reiniciará e quando tratados novamente com a combinação platina-taxano irá desenvolver resistência à quimioterapia (HEMBRUFF *et al.*, 2008; COSTI *et al.*, 2011).

1.2.2. Resistência à multifármacos em câncer de ovário

A resistência à múltiplos fármacos é a capacidade de tumores exibirem resistência simultânea à vários agentes quimioterapêuticos estruturais e funcionalmente não relacionados (ABDALLAH, 2015). É um processo complexo que modifica completamente o comportamento das células tumorais, gerando alterações nos alvos do fármaco, desenvolvimento de caminhos alternativos para ativação das vias de crescimento celular, alteração da dinâmica farmacológica celular como, por exemplo, aumento do efluxo dos quimioterápicos, mudanças regulatórias nas vias de diferenciação e alteração na dinâmica do microambiente tumoral (GOTTESMAN *et al.*, 2016).

Esse comportamento é resultado de uma variedade de fatores incluindo variações individuais, diferenças genéticas de células tumorais e microambiente tumoral. Vários mecanismos moleculares vêm sendo associados ao aumento de multirresistência em modelos celulares de câncer de ovário, como mutações em genes responsáveis por reparos no material genético, como *BRCA1/BRCA2*, *MLH1/3* e *ERCC1* e superexpressão de genes de transportadores de efluxo (SORRENTINO *et al.*, 2008; COSTI *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de resistência à quimioterápicos em tumores de ovário é tardia, pois inicialmente o câncer responde à diversos tipos de fármacos, porém todos os tratamentos perdem eficiência no decorrer da doença (COSTI *et al.*, 2011). O mecanismo mais comum para a multirresistência adquirida em câncer de ovário é a superexpressão de transportadores de efluxo ATP-dependente (transportadores da família ABC). Esses transportadores são proteínas transmembranares que utilizam a energia da hidrólise de ATP para transferir vários substratos através da membrana

celular. Os membros mais comuns são P-glicoproteína, MRP2/ABCC2 e BCRP/ABCG2, que expõem fármacos e xenobióticos para a parte externa das células (DONG & MUMPER, 2010; KATHAWALA, 2015; PATCH *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

A P-glicoproteína (glicoproteína de permeabilidade – P-gp) ou ABCB1 é uma das proteínas de efluxo mais estudada em câncer de ovário. Essa proteína é resultado da expressão do gene MDR1, e sua atividade transportadora (Figura 6) é dependente de energia, ATP, e o efluxo de substratos para o meioextracelular (MARKMAN *et al.*, 2013). Essa glicoproteína é naturalmente encontrada em células do epitélio intestinal, nos hepatócitos, células tubulares proximais renais, glândula adrenal e células endoteliais da barreira hematoencefálica. Quando expressa em tumores, a P-gp afeta vários parâmetros farmacocinéticos dos medicamentos como absorção, distribuição e excreção, o que pode levar à mudanças na biodisponibilidade desses fármacos (TIPS & PHARMA, 2011).

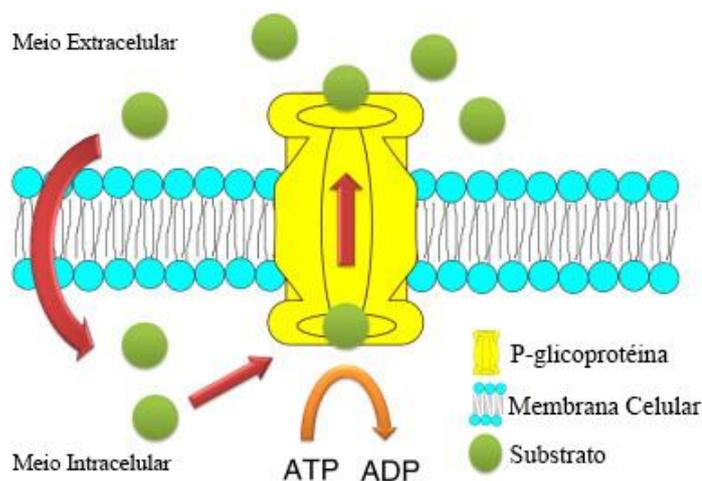


Figura 6 - Esquema do funcionamento da P-glicoproteína no efluxo de substrato. (Adaptado de MARKMAN *et al.*, 2013).

1.3. Docetaxel

O agente antineoplásico docetaxel, comercialmente chamado de Taxotere® (Sanofi Aventis, Bridgewater, NJ, USA), é um taxano semissintético com a fórmula química $C_{43}H_{53}NO_{14}$ e peso molecular de 807,9 g/mol (Figura 7) derivado de um precursor não tóxico isolado do teixo europeu *Taxus Baccata* (CLARKE & RIVORY, 1999; CHOUDHURY *et al.*, 2017). Sua ação é antimetabólica, promovendo a hiperestabilização dos microtúbulos, interrompendo a dinâmica dos mesmos (MONTERO *et al.*, 2005; CHO *et al.*, 2014). A molécula de docetaxel se liga preferencialmente ao monômero β -tubulina nos microtúbulos, o que causa a estabilização dos mesmos enquanto simultaneamente inibe sua despolimerização. A formação de feixes estáveis de microtúbulos perturba o equilíbrio dinâmico de polimerização e despolimerização dentro do sistema, e isso ocasiona parada do ciclo celular na fase G2/M acarretando na morte celular (ZHANG & ZHANG, 2013).

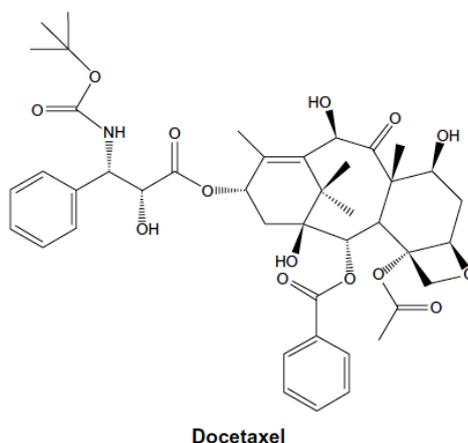


Figura 7 - Estrutura química do docetaxel. (Adaptado de Zhang & Zhang, 2013)

Já foi comprovada a atividade antitumoral do docetaxel em diversos tipos de câncer, incluindo os de mama, pulmão, cabeça e pescoço, ovário e próstata (HENDRIKX *et al.*, 2016; OH *et al.*, 2016). Esse medicamento é aprovado como único agente terapêutico no tratamento de pacientes com tumores locais avançados de mama ou metastáticos depois de falha de quimioterapia prévia, porém a forma mais comum de utilização é associada com outro agente quimioterápico (NABHOLTZ *et al.*, 1999; CHOUDHURY *et al.*, 2017).

A posologia utilizada para tratamento com docetaxel acarreta em diversos efeitos adversos, sendo a neutropenia (redução do nível de neutrófilos) o efeito mais prevalente. Outros incômodos relatados são alopecia (queda de cabelo), astenia (falta de energia e força), reações dermatológicas, retenção de líquido, neuropatias motoras e sensoriais, problemas estomacais e diarreia (CLARKE & RIVORY, 1999; ZHAO & ASTRUC, 2012).

A molécula de docetaxel possui baixa solubilidade em meio aquoso (4,93 µg/mL), e devido a isso a versão comercial desse medicamento é solubilizada no surfactante não-iônico polissorbato 80 (Tween 80), na quantidade de 26 miligramas por miligrama de docetaxel e requer diluição adicional de etanol a 13% antes da adição em uma solução de infusão intravenosa (CHO *et al.*, 2014; CHOUDHURY *et al.*, 2017). A ocorrência de reações de hipersensibilidade foi atribuída, em parte, aos efeitos tóxicos característicos do Tween 80, e mais precisamente, aos produtos da oxidação do ácido oleico presentes nas moléculas de polissorbato 80 que são conhecidos por causar reações alérgicas (BERGH *et al.*, 1997; AHMAD *et al.*, 2017).

Estudos *in vitro* demonstraram que docetaxel tem afinidade e se liga à albumina e à glicoproteína ácida alfa-1 (GPA). A GPA é uma proteína que tem seu nível

plasmático aumentado em decorrência de uma variedade de condições patológicas, tais como inflamação crônica, infarto do miocárdio e câncer em estágios avançados. A interação do docetaxel com a GPA é o principal determinante na variação da concentração de fármaco no plasma sanguíneo (URIEN *et al.*, 1996). Em pacientes com câncer, os níveis séricos de GPA variam de caso para caso, o que pode contribuir para as diferenças individuais na depuração sistêmica do fármaco (CLARKE & RIVORY, 1999).

Há alguns anos a nanobiotecnologia vem sendo estudada para minimizar os problemas que diversos fármacos possuem entre eles insolubilidade em meio aquoso, toxicidade do solvente utilizado, baixa concentração na corrente sanguínea e outros (SAFARI & ZARNEGAR, 2014; SUN *et al.*, 2016; CHOUDHURY *et al.*, 2017). O docetaxel por ser um fármaco eficiente, porém com baixa especificidade e vários efeitos adversos é um candidato promissor no uso de nanopartículas associadas à quimioterápicos.

1.4. Sistemas de Entrega de Fármacos – Nanopartículas

Desde o início dos anos de 1970, os sistemas controlados de administração de medicamentos vêm atraindo bastante interesse dos pesquisadores. Esses sistemas têm como objetivo entregar moléculas de tratamento com concentração predeterminada e período de tempo predefinidos (SAFARI & ZARNEGAR, 2014). Nas últimas duas décadas houve um aumento nos estudos de sistemas coloidais, resultando em mais de 32.000 artigos sobre o tema (GORAIN *et al.*, 2016). Entre os sistemas de entrega de fármacos, as nanopartículas vem se destacando tanto pela variedade de partículas possíveis como a eficiência que vários modelos demonstram (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017).

Nanopartículas possuem o tamanho de 1-1000 nm dependendo do tipo de partícula, possuem química e arquitetura variável e vem sendo estudadas não somente como sistemas de entrega de fármacos, mas também como agentes diagnósticos, na bioengenharia e na ótica. Várias nanopartículas com relevância biomédica estão disponíveis, incluindo nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas, pontos quânticos, dendrímeros (DARAEI *et al.*, 2016). O uso de nanopartículas no câncer tem duas aplicações: diagnóstico e/ou terapia. Quando possui finalidade de diagnóstico, as nanopartículas são elaboradas para identificar células tumorais e assim possibilitar a visualização da neoplasia. Elas são associadas à agentes de contrastes que auxiliam no diagnóstico funcional e molecular por diversas técnicas de exames de imagem, como ressonância magnética, tomografia computadorizada, ultrassom, tomografia por emissão de pósitrons (PET – *Positron Emission Tomography*) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography*) (BRIGGER *et al.*, 2012; MISHRA *et al.*, 2017).

A primeira nanopartícula terapêutica aprovada pelo FDA (EUA) no ano de 1983 foi o lipossoma, nanoestruturado constituído de uma bicamada lipídica que envolve um núcleo aquoso onde se encontra diluído a molécula de interesse, que no caso desse nanossistema foi a antraciclina doxorubicina - Doxil® (BARENHOLZ, 2012). Desde então vários nanocarreadores têm sido desenvolvidos e testados na clínica com bons resultados, como aumento da eficiência da molécula associada e redução dos efeitos adversos (MISHRA *et al.*, 2017).

As nanopartículas são projetadas para se associar de maneira eficaz com fármacos ou outras moléculas, atingirem seu alvo com segurança e liberar sua carga no

local da doença, aumentando assim a biodisponibilidade do fármaco. Essa atividade permite que o tratamento seja localizado, diminuindo assim os efeitos colaterais (WANG & THANOU, 2010). As nanopartículas possuem a vantagem de entrar e se acumular no microambiente tumoral por difusão simples através nas fenestras dos capilares sanguíneos que nutrem o tumor, fenômeno conhecido por efeito de permeação e retenção aumentado (EPR). Isso ocorre pois os vasos sanguíneos que surgem da angiogênese promovida pelo tumor possuem fenestras anormais, além de vazamento e drenagem linfática pobre, o que propicia a passagem de macromoléculas e nanopartículas para a região tumoral, aumentando a concentração em tumores em comparação com os tecidos normais (PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

O uso das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vem sendo estudado como um sistema de entrega de fármaco eficiente na quimioterapia do câncer desde o início dos anos de 1990, por ser um sistema que mescla características positivas de emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (ABBASALIPOURKABIRREH *et al.*, 2011; BAHARI& HAMISHEHKAR, 2016). As NLS são nanoestruturas coloidais nanométricas (50-1000 nm) constituída por uma matriz lipídica composta de lipídios fisiologicamente tolerados e de baixa toxicidade que permanecem no estado sólido à temperatura ambiente e estabilizados por um surfactante (Figura 8)(CHO *et al.*, 2014; DOLATABADI *et al.*, 2015).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

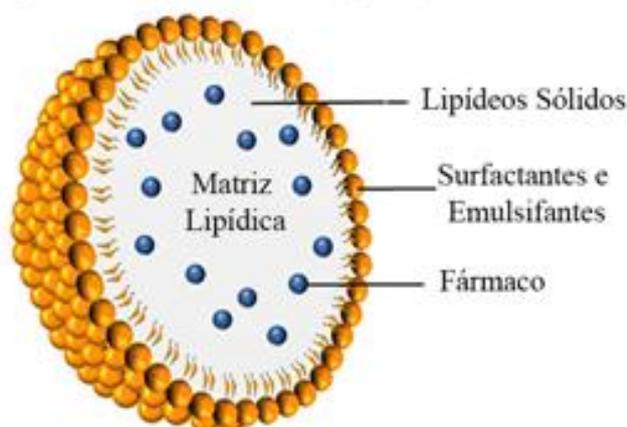


Figura 8 - Esquema da composição e organização geral de nanopartículas lipídicas sólidas. (Adaptado de Lin e colaboradores, 2017)

Dentre as características interessantes para medicina, as principais são: a capacidade de sistemas NLS de serem associadas à fármacos hidrofílicos e lipofílicos, o que possibilita o uso de fármacos pouco solúveis em água; e a capacidade de promover o acúmulo no tecido tumoral e proporcionar uma liberação controlada dos fármacos incorporados na matriz (NARVEKAR *et al.*, 2014; BAHARI&HAMISHEHKAR, 2016). Outra característica que vêm despertando interesse é o uso de NLS via administração oral, pois além das vantagens já descritas, os fármacos hidrofóbicos quando associados a esse nanossistema possuem maior estabilidade no ambiente gastrointestinal, melhor permeabilidade no epitélio gastrointestinal e aumenta a biodisponibilidade. Além de ser uma via de administração menos invasiva e mais barata economicamente, facilitando a aderência dos pacientes ao tratamento (CHO *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2017).

Na formulação de nanoestruturas lipídicas podem ser utilizados lipídios biocompatíveis de origem natural ou sintéticos e podem ser sólidos ou líquidos. Lipídios sólidos contém glicerídeos (por exemplo: ácido palmítico e monoestearato de glicerila),

ácidos graxos (ácido esteárico), esteroides (colesterol) e ceras (cera microcristalina). Os lipídios líquidos mais comumente usados são triglicerídeos de cadeia média, ácido oleico, óleo de soja e óleo de oliva (ZHANG & ZHANG, 2013; DOLATABADI *et al.*, 2015).

O uso desse sistema de nanocarreadores como veículo de fármacos que possuem lipofilicidade alta e baixa solubilidade em água vem sendo amplamente estudado (ANNOVAZZI *et al.*, 2017; DESHPANDE *et al.*, 2017). As nanopartículas lipídicas sólidas vêm sendo estudadas como uma alternativa ao uso de tensoativos e solventes tóxicos usados como diluentes desses tipos de fármacos. Devido aos materiais lipídicos e à estrutura biomimética, as NLS têm sido amplamente utilizadas para o transporte de docetaxel, uma vez que oferecem compatibilidade com sistemas biológicos, aumentando de forma eficiente a solubilidade do fármaco em água, melhorando significativamente a permeabilidade da membrana celular à entrada dos quimioterápicos e permitindo uma liberação prolongada do tratamento (ZHANG & ZHANG, 2013; PAWAR *et al.*, 2016)

A associação de docetaxel com NLS tem sido descrita com sucesso em diversos trabalhos (SHI *et al.*, 2016; ANWAR *et al.*, 2017). Mosallaei e colaboradores (2013) descreveu o preparo e caracterização de NLS com estrutura básica de compritol e precirol associada ao docetaxel e sua eficiência nas linhagens de câncer colo retal e melanomas. Zhang *et al.* (2010) descreve a farmacocinética e eficácia *in vivo* do docetaxel associado a NLS (lecitina de soja/ triestearato de glicerol) em ratos Sprague-Dawley.

Estudos já relataram que as NLS por conterem surfactantes lipofílicos ou hidrofílicos como estabilizadores têm sido capazes de inibir o efluxo mediado por P-

glicoproteína (DONG *et al.*, 2009; CHOWDHURY *et al.*, 2017). As NLS possuem o potencial de melhorar o índice terapêutico, pois promovem o desvio do mecanismo de efluxo de fármacos mediado por transportadores ABC além de promover direcionamento seletivo para células tumorais, células de câncer estaminais, células iniciadoras de câncer ou para o microambiente tumoral (KAPSE-MISTRY *et al.*, 2014). Os mecanismos descritos para superar a ação de P-gp incluem o aumento de captação celular do fármaco através da endocitose e formação de pares de íons, depleção de ATP, influência na função e expressão de P-gp ou mudança nas vias de sinalização (DONG & MUMPER, 2010). Devido as suas propriedades, esse sistema já vem sendo utilizado com sucesso como veículo de alguns tratamentos utilizados por via oral, como ciclosporina A, nitrendipina, testosterona e outros (ALEX *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A incidência de carcinoma de ovário é inferior à de outros cânceres, porém esse tipo de câncer possui grande importância na oncologia e se destaca no âmbito de novas pesquisas e tratamentos. Isso ocorre pela agressividade característica desse tumor, responsável pela maior taxa de mortalidade na categoria de cânceres ginecológicos (JAYSON *et al.*, 2014; OZA *et al.*, 2015).

As estratégias quimioterápicas usadas atualmente no tratamento desses tumores, dentre elas o uso do docetaxel, apresentam várias reações adversas, tais como: neutropenia, alopecia, astenia, reações dermatológicas, retenção de líquido, neuropatias motoras e sensoriais, problemas estomacais e diarreia (CLARKE & RIVORY, 1999; CHO *et al.*, 2014). Outra barreira enfrentada pelos tratamentos atuais é o aparecimento

de resistência das células tumorais aos fármacos (HEMBRUFF *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2013).

O docetaxel é um importante antineoplásico hidrofóbico com bons resultados em tumores sólidos, porém sua toxicidade sistêmica é alta devido ao Tween 80, principal solvente utilizado para diluição do fármaco (BERGH *et al.*, 1997; CHO *et al.*, 2014). Sistemas nanoestruturados vêm sendo desenvolvidos com objetivo de diminuir os pontos negativos de vários quimioterápicos usados atualmente (SHI *et al.*, 2016; ANWAR *et al.*, 2017).

As nanopartículas lipídicas sólidas mostram-se como uma opção para melhorar os problemas relacionados à aplicação biológica do docetaxel, pois permitem um maior nível de absorção pelas células tumorais, além de protegê-lo contra a degradação dentro do organismo antes que chegue no alvo (WISSING *et al.*, 2004; CHU *et al.*, 2013).

Outro aspecto interessante do uso de nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao docetaxel é a capacidade de serem usadas em tumores que apresentam resistência à múltiplos fármacos. O fármaco quando associado a esse nanossistema passa a não ser mais substrato para P-glicoproteína, protegendo o docetaxel do efluxo promovido pela mesma (MARKMAN *et al.*, 2013).

Tendo em vista o melhoramento dos medicamentos já existentes, a associação do docetaxel com o nanossistema de nanopartículas lipídicas sólidas é de sumo interesse para a área. Com o uso do docetaxel como fármaco padrão no tratamento do câncer de ovário, é importante uma avaliação da capacidade antitumoral do sistema de nanopartículas lipídica sólida associada ao docetaxel (NLS-DTX) nos modelos celulares *in vitro* de câncer epitelial de ovário sensível e resistente ao docetaxel, além de caracterizar a ação citotóxica da formulação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) associadas ao docetaxel (DTX) nas linhagens de carcinoma de ovário humano normal (A2780) e resistente ao docetaxel (A2780-MDR) *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a linhagem de A2780-MDR através da transformação de A2780 com plasmídeo contendo o gene MDR e caracterizar sua morfologia celular;
- Avaliar os índices de viabilidade das células A2780, de células não tumorais e das células A2780-MDR *in vitro* em decorrência dos tratamentos com as NLS-DTX;
- Descrever as alterações morfológicas e modificações no citoesqueleto após o tratamento com as NLS-DTX nas células A2780;
- Investigar os efeitos das NLS-DTX sobre a capacidade de formar colônias, o ciclo celular e tipo de morte nas células A2780.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes (Tabela 3) utilizados para a realização desse projeto seguem listados abaixo.

Tabela 3 - Materiais utilizados nos experimentos.

Fabricante	Materiais
Abcam, EUA	Anticorpo anti-glicoproteína-P (ab3038)
Addgene, EUA	Plasmídeo pHaMDR (#10957)
Diagnostic Biosystem, EUA	Kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection
Dinâmica, Brasil	Etanol Absoluto >99,9%
GIBCO, EUA	DMEM; RPMI; Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA
Invitrogen, EUA	Anexina-V cja Alexa 680; Anticorpo anti- β -actina; Anticorpo anti-GAPDH; Anticorpo anti-mouse cja Alexa-546; Anticorpo anti-tubulina; DAPI; Kit CellTrace™ CFSE Cell Proliferation; Lipofectamine 2000; Opti-MEM; PLUS Reagent; RNase livre de DNase
Laborclin, Brasil	Tampão fosfato salino (PBS)
Macherey-Nagel, EUA	NucleoBond® Xtra Nucleic Acid Purification
Molecular Probes, EUA	MTT; Iodeto de Propídeo
Promega	Enzimas de restrição SacII e XhoI Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System,
Sigma-Aldrich, EUA	Azul de tripan; Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit; Colchicina; DMSO; Docetaxel Triidratado; Solução Antibiótica (penicilina e estreptomicina)
Vetec, Brasil	Paraformaldeído 37%

Para análise da morfologia celular foi utilizado o Microscópio de luz Axiovert e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100 – ambos da Zeiss, Alemanha. Para leitura de absorbâncias e fluorescência foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 6.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi FACSCalibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA e a análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.9.9.4, Tree Star, Inc. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc. A análise da imunomarcagem foi realizada em Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS SP5 (Leica, Wetzlar, HE, Alemanha). As colônias foram analisadas no Estereoscópio LEICA M205 C (Leica –

Alemanha) e as imagens foram obtidas pela câmera LEICA DFC295 (Leica – Alemanha) com auxílio do software Leica Application Suite (Leica – Alemanha). A morfologia detalhada das células foi analisada no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (Jeol – Japão).

4.2. Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizadas foram desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB) pela doutoranda Márcia Cristina Rocha sob a orientação dos professores Sônia Nair Bão e João Paulo Longo. Foram utilizadas três formulações diferentes: (1) NLS branca (NLS-BRANCA) com tamanho médio de 141 nm, (2) NLS associada com 1mg/mL de docetaxel (NLS-DTX-1) com tamanho médio 124 nm e (3) NLS associada com 2mg/mL de docetaxel (NLS-DTX-2) com tamanho médio de 120 nm. As três formulações possuem o índice de polidispersão (PDI) semelhantes e em torno de $0,338 \pm 0,04$. A quantidade realmente internalizada pelas formulações NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 é objetivo de estudo da aluna responsável pelas formulações e estão sendo confirmadas. A matriz das NLS é composta pelo lipídio sólido behenato de glicerila (Compritol® 888. ATO) e como surfactantes foram utilizados sorbitano 80 (Span®80) e poloxâmico (Pluronic P127®). Foi feito um estoque de docetaxel na concentração de 8 mg/mL diluído em etanol puro (DTX). Para os ensaios realizados, as formulações e o estoque de docetaxel foram diluídos em meio de cultura nas concentrações utilizadas para a realização dos experimentos.

4.3. Cultura celular

A linhagem A2780 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro e cultivada no meio RPMI suplementado com 1% de solução antibiótica e 10% de SFB. As células de

cultivo primário de tecido conjuntivo composta prioritariamente de fibroblastos foram extraídas de polpa dentária no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e cultivada em meio DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica, 10% de SFB. As linhagens de carcinoma de ovário resistente à multifármacos (A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3) foram obtidas por meio de transdução com plasmídeo retroviral contendo o gene MDR no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e cultivadas em meio RPMI suplementado com 1% de solução antibiótica, 10% de SFB. A linhagem de rim embrionário contendo antígeno T de SV40 HEK-293T foi cedida pela Dra. Karoline dos Anjos, do Laboratório de Virologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e cultivada em meio RPMI suplementado com 1% de solução antibiótica, 10% de SFB. Todas as células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO₂.

4.4. Delineamento experimental

Os experimentos com a linhagem A2780 são descritos resumidamente no diagrama da Figura 9.

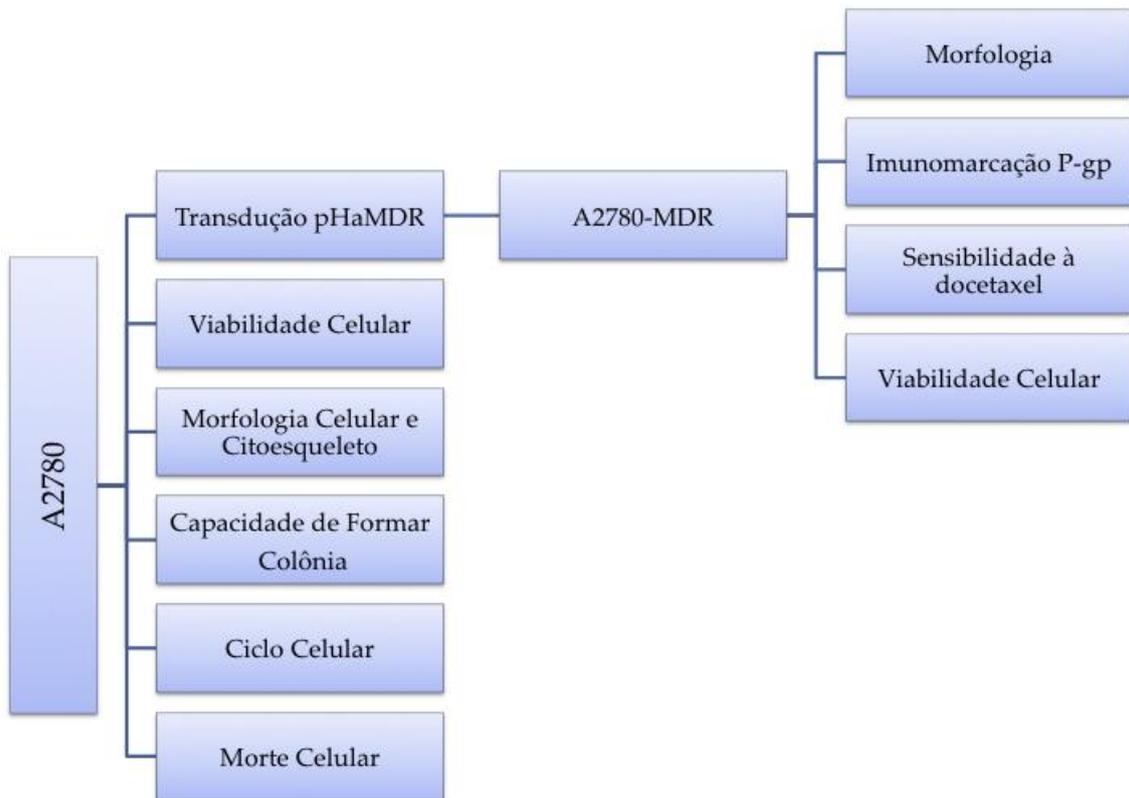


Figura 9 - Diagrama esquemático do delineamento experimental com A2780.

4.5. Obtenção de linhagem de carcinoma de ovário resistente A2780-MDR

A linhagem de carcinoma de ovário resistente ao docetaxel foi obtida pela transdução de vetor retroviral contendo o gene MDR (pHaMDRwt Plasmídeo Addgene #10957). A metodologia foi baseada em Pastan *et al.* (1988), onde primeiro é necessário que o plasmídeo seja empacotado em uma partícula semelhante a vírus (VLP), contendo um capsídeo infectivo para poder infectar a célula de interesse.

4.5.1 Plasmídeos pHaMDR, GaG-Pol e VSV-G

O plasmídeo pHaMDRwt foi construído por Pastan e colaboradores (1988) e contém o gene de multirresistência MDR1, e já vem sendo usado em outros estudos para causar a superexpressão de P-glicoproteína e por consequência uma resistência a

múltiplos fármacos (LI *et al.*, 2014; TURAKOVA *et al.*, 2015). O cDNA de MDR1 foi inserido em um vetor retroviral pCO1 contendo dois LTRs (*Long Terminal Repeats*) de Ha-MuSV (Vírus de sarcoma murinho) como descrito em Pastan *et al.*, 1988. O esquema do plasmídeo utilizado pode ser visto na Figura 10. O pHaMDR foi obtido do repositório internacional de plasmídeos Addgene em bactéria *E. colicepaDH5α* em meio LB (Luria-Bertani) ágar.

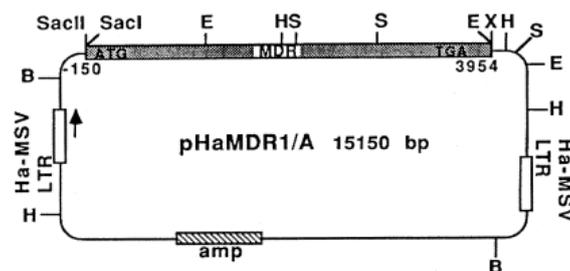


Figura 10 - Vetor retroviral pHaMDR de Pastan e colaboradores (1988)

As bactérias foram semeadas em placa de petri contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 mg/mL) e incubada *overnight* em estufa à 37°C. Foram selecionadas 24 colônias ao longo da placa de forma aleatória, inoculadas em meio LB líquido suplementado com antibiótico para posterior extração de DNA plasmidial e incubadas em shaker à 37°C e 130 rpm *overnight*. Antes de extrair o DNA plasmidial das colônias selecionadas, 500 µL das culturas foram crioconservadas em glicerol. Para a purificação de pHaMDR das colônias selecionadas foi utilizado o Kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi corrido em gel de agarose 1% para ver o tamanho padrão e integridade.

As amostras que obtiveram o tamanho próximo ao padrão esperado foram digeridas com enzimas de restrição SacII e XhoI para a separação do gene MDR do

vetor pHa, conforme sugerido pelo fornecedor. Após confirmação, a colônia selecionada foi crescida em 100 mL de meio líquido LB com ampicilina (100 mg/mL) deixadas em incubadora shaker à 37°C e 130 rpm *overnight*. Para obtenção de grande quantidade de DNA plasmidial, foi utilizado o Kit *NucleoBond® Xtra Nucleic Acid Purification* (Macherey-Nagel) e posteriormente foi corrido um gel de agarose 1%. O DNA foi quantificado por espectrofotometria no equipamento NANOVUE PLUS (GE Healthcare) e depois armazenado à -20°C.

Os plasmídeos PVRGag-Pol (contendo o gene gag-pol de HIV) e PLVSV-G (contendo o gene G de VSV) foram utilizados para expressão de proteínas do capsídeo da VLP e proteína indutora de endocitose clatrina-dependente, respectivamente. Ambos os plasmídeos foram doados pela Prof^a Dr^a Thatiane Sampaio do Instituto Federal de Brasília. Os DNAs foram corridos em gel de agarose 1% para verificar a integridade afim de serem utilizados na transfecção (Figura 11), depois foram quantificados por espectrofotometria no equipamento NANOVUE PLUS (GE Healthcare) e armazenado à -20°C.

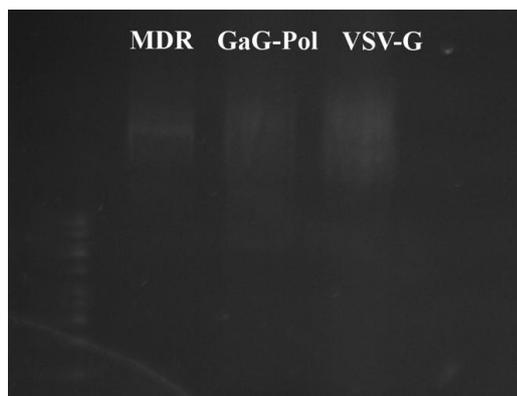


Figure 11 - Gel de agarose 1% com pHaMDR obtido por midiprep, GaG-Pol e VSV-G.

4.5.2 Transfecção de HEK-293T com os plasmídeos PVRGag-Pol, PLVSV-G e pHaMDR

Para a obtenção das VLP contendo pHaMDR foi feita a co-transfecção dos plasmídeos PVRGag-Pol (Gag-Pol), PLVSV-G (VSV-G) e pHaMDR (MDR) nas células HEK-293T. A co-transfecção foi feita com *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* e *PLUS™ Reagent* (Thermo Fisher) seguindo as instruções do fabricante.

No primeiro dia, foram semeadas 1×10^6 células HEK-293T em garrafas de cultivo de 50 mL. No dia seguinte foi realizada a co-transfecção. Foram usadas proporções de 1:2 e 1:3 de DNA e Lipofectamina 2000 para a co-transfecção. Inicialmente foram misturados 2 μ g de cada plasmídeo com 6 μ L, respectivamente, de PLUS Reagente e depois foram acrescentados 12 μ L (1:2) ou 18 μ L (1:3) de Lipofectamina 2000. O meio das células foi retirado e as garrafas foram lavadas uma vez com PBS 1X e depois colocados 5mL de meio *Opti-MEM I Reduced Serum Media* (Thermo Fisher) e acrescentado 1mL da solução de transfecção e depois incubados por 6 horas. O meio foi substituído por 5mL de RPMI suplementado sem antibiótico e

retornou para a estufa por 24 horas e 48 horas. Dado o tempo, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de seringa com poro de 0,45µm e armazenado à -80°C.

4.5.3 Transdução de A2780 com VLP contendo pHaMDR

Para a infecção de A2780 com a VLP obtida, foi feita a transdução utilizando o sobrenadante obtido das duas transfecções. Foram feitas duas garradas para cada proporção testada, sendo MDR#1 e MDR#3 referentes a proporção 1:2 e MDR#2 e MDR#4 para a 1:3. $2,5 \times 10^5$ células foram semeadas em garrafas de cultivo de 50 mL. No dia seguinte, o meio das garrafas foi retirado e cada garrafa foi lavada uma vez com PBS 1X e depois foram colocados 2,5 mL de meio RPMI suplementado sem antibiótico. Foram adicionados 20 µg/mL de polibreno aos sobrenadantes e depois 2,5mL foram adicionados na garrafa. Após 24 horas, foi retirado o meio da transdução e foi acrescentado meio seletivo (RPMI suplementado com 10% SFB + 1% solução antibiótica + 60 ng/mL de colchicina) nas garrafas de MDR#1 e MDR#2. As garrafas MDR#3 e MDR#4 tiveram o meio da transdução trocado após 48 horas. O meio seletivo era renovado a cada 48 horas e as células foram mantidas em cultivo com esse meio por 20 dias. Durante esse período as células das garrafas MDR#1 e MDR#4 morreram e foram descartadas. As células de MDR#2 e MDR#3 que sobreviveram a esse processo foram mantidas em meio RPMI normal após esse período para que elas proliferassem. Após cerca de 20 dias de recuperação, as células voltaram a crescer na taxa semelhante a normal, porém com a morfologia alterada.

4.6. Análise da morfologia das células A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 por microscopia de luz

Para analisar a morfologia das A2780 e as A2780-MDR #2 e #3 em diferentes confluências, foram plaqueadas 1×10^5 ou 3×10^5 células de cada linhagem em placas de

12 poços e após 24 horas foram obtidas imagens com o auxílio do software AxioVision (Zeiss) no Microscópio de luz Axiovert.

4.7 Análise da morfologia das células A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 por microscopia eletrônica de varredura

Para visualizar as diferenças na morfologia da membrana celular das células transformada, as células A2780-MDR e A2780 foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). 5×10^5 células das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 foram semeadas sobre lamínulas 18x18 mm colocadas no fundo da placa de 6 poços. Após 24 horas, as células aderidas na lamínula foram processadas para análise em MEV. O meio de cultivo foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com PSB 1X, e depois fixadas com a solução fixadora Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2) *overnight* à 4°C. No dia seguinte, o fixador foi descartado e as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M. As células foram fixadas por 30 minutos no vapor de tetróxido de ósmio 2%. Depois as células foram lavadas com água destilada, e desidratadas em série com acetona (50-100%). As células passaram por secagem a ponto crítico e depois foram metalizadas para serem analisadas no MEV (Jeol – Japão).

4.8. Ensaio de Imunomarcção de P-glicoproteína

Para visualizar a organização e distribuição de P-glicoproteína na membrana celular de A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 em comparação às células A2780 foi realizado a imunomarcção da P-gp. 1×10^5 células das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com formaldeído

3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Depois foi adicionado a solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS – pH 7,4) por 20 min e logo após, as células foram incubadas à 4°C *overnight* com o anticorpo primário anti-glicoproteína (1:100) produzido em camundongo. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG Alexa-546 (5 µg/mL) e incubado por 1 h, depois as lâminas foram incubadas por 7 minutos com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems).

4.9. Determinação da viabilidade celular após tratamento com as NLS-DTX nas linhagens A2780, fibroblasto, A2780-MDR#2 e #3 pelo método de MTT

A viabilidade das células A2780, fibroblastos, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 tratadas com (1) NLS-BRANCA, (2) NLS-DTX-1, (3) NLS-DTX-2 e (4) DTX (5) Etanol Absoluto foi determinada através do ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. A toxicidade do docetaxel livre na linhagem A2780 já é relatada na literatura e mostra uma variação de valores, porém há uma predominância de concentrações que ficam na faixa de 1 ng/mL até 1 µg/mL (CHEN *et al.*, 2014; CHOUDHURY *et al.*, 2017). Com base nessa faixa de variação, as concentrações testadas para as formulações de NLS-DTX e DTX foram estabelecidas. 3×10^3 células das três linhagens foram semeadas em placas de 96 poços. Após aderidas, foram tratadas com DTX, NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 nas concentrações 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL de fármaco presente na formulação completa e com os veículos NLS-BRANCA e Etanol Absoluto nos volumes equivalentes a cada concentração utilizada. Passadas 24, 48 ou 72 horas, o tratamento foi retirado e foi

acrescentado 150 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e incubado por três horas. Após incubação, esta solução foi retirada e foi adicionado 200 μ L DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices). O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada tratamento e concentração utilizada, e ainda, três experimentos independentes foram realizados.

4.10. Análise da morfologia das células A2780 após tratamento com NLS-DTX por microscopia de luz

As análises das alterações morfológicas nas células A2780 ocasionadas em decorrência do tratamento com a NLS-BRANCA, NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX, como diminuição do tamanho das células e redução da densidade celular, foram avaliadas por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 32x e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision (Zeiss). Para isso, 10^5 células foram semeadas em placas de 12 poços e após sua adesão, foram tratadas com 1 μ g/mL de docetaxel com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX por 24 horas e por fim foram obtidas as imagens.

4.11. Ensaio de Imunomarcaçãoda α -tubulina

Para visualizar os efeitos das NLS-DTX nos microtúbulos, foi realizada a imunomarcaçãoda células com o anticorpo anti- α -tubulina. As células A2780 (1×10^5) foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX na concentração 1 μ g/mL de docetaxel e NLS-BRANCA no volume equivalente a NLS-DTX-1 ou receberam apenas meio de cultivo (controle) por 24 horas. Após o tempo de tratamento, o meio de

cultura e meio com tratamento foram retirados e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 min e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 20 min. Depois foi adicionado a solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS – pH 7,4) por 20 min e logo após, as células foram incubadas à 4°C *overnight* com o anticorpo primário anti- α -tubulina (1:500) produzido em camundongo. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG Alexa-546 (5 μ g/mL) e incubado por 1 h, depois as lamínulas foram incubadas por 7 minutos com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Por fim, as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems).

4.12. Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônia é um teste de sobrevivência celular onde é possível analisar a capacidade das células em se proliferarem e de formarem colônias após algum tipo de tratamento. Para esse teste, primeiro as células A2780 (1×10^5 por poço) foram semeadas em placas de 24 poços e após sua adesão foram tratadas com 1 μ g/mL de docetaxel presente nas formulações NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2, DTX e com NLS-BRANCA no volume equivalente as NLS-DTX, por 24 horas. Passado o tempo de tratamento, a solução foi retirada dos poços e as células sobreviventes foram lavadas duas vezes com PBS 1X e depois desaderidas com auxílio de tripsina-EDTA. Cada grupo experimental foi contado e conferida a viabilidade das células com o corante azul de tripan 0,4%, depois 1×10^3 foram semeadas em placas de 6 poços com meio RPMI comum. As células ficaram em cultivo por 12 dias, com o meio de cultivo sendo renovado a cada quatro dias.

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

As imagens das colônias foram observadas no estereoscópio LEICA M205 C (Leica – Alemanha) no aumento de 8x e as imagens foram obtidas pela câmera LEICA DFC295 (Leica – Alemanha) com auxílio do software Leica Application Suite (Leica – Alemanha).

4.13. Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)

Foi feita a análise do conteúdo de DNA através da marcação intracelular com Iodeto de Propídio (PI), afim de quantificar as populações que estão em G0/G1 (2N de DNA); em G2/M (4N de DNA); e as que estão na fase S (quantidades intermediárias de DNA). PI é usado como marcador por ser um intercalante de DNA, e com isso a marcação presente na célula é diretamente proporcional à quantidade de DNA que essa célula possui. As células A2780 (3×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços. Depois de sua adesão, as células foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX na concentração 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de docetaxel e NLS-BRANCA no volume equivalente a NLS-DTX-1 ou receberam apenas meio de cultivo (controle). Após 24, 48 ou 72h, as células foram desaderidas e recolhidas em tubos de 15 mL e centrifugadas à 300g por 5 min para a retirada do meio. O pellet foi resuspenso em 500 μL de PBS 1X, acrescentado 4,5 mL de etanol 70% e mantido por 2 h no gelo para fixação. Passadas as 2h, as

células foram centrifugadas, o pellet foi lavado com PBS e novamente centrifugado. As células foram ressuspensas em solução de iodeto de propídio (0,1% de Triton X-100, 10 µg/mL de PI e 100 µg/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS, por 10 min a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em PBS e 8.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinado utilizando-se a plataforma de ciclo celular do software FlowJo. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes.

4.14. Caracterização da morte celular induzida pelas NLS-DTX

A análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos após 72 horas com as NLS-DTX foi feita pela marcação das células tumorais A2780 com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose e também as células viáveis. 5×10^5 células de A2780 foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h, as células foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX na concentração 1µg/mL de docetaxel e NLS-BRANCA no volume equivalente a NLS-DTX-1 ou receberam apenas meio de cultivo (controle). 30 minutos antes de completar as 72 horas de tratamento com as NLS-DTX e o DTX, o grupo controle de apoptose foi tratado com 10 mM de peróxido de hidrogênio. Após isso, tanto as células aderentes como as flutuantes foram recolhidas e centrifugadas a 500g por 5 min para a retirada do meio. O pellet foi lavado com PBS e as células foram centrifugadas. Os pellets foram ressuspensos em 100µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) e o grupo controle de necrose foi aquecido à 60°C. Foram adicionados 3 µL de anexina-V nas amostras e depois incubadas por 15 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de

ligação da Anexina V foram adicionados e os tubos a partir desse momento foram mantidos no gelo, seguido da adição de 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 µg/mL). O grupo controle de apoptose foi marcado somente com anexina-V e o grupo controle de necrose somente com PI. As células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo, lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) com o auxílio do software CellQuest-Pro. As análises foram realizadas a partir de 2 experimentos independentes.

4.15 Análise estatística

Os resultados experimentais obtidos estão expressos em valores médios com desvios-padrão. As análises foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) e o pós teste Dunnet pelo software Graph Pad Prism®. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Seleção do plasmídeo pHaMDR para ser utilizado na obtenção das linhagens de A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3

Após o crescimento de colônias isoladas a partir da amostra enviada pela Addgene, foram selecionadas 24 colônias ao longo da placa de forma aleatória e delas extraído o DNA plasmídial (Figura 12). As amostras das colônias 2, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 tiveram o tamanho esperado da construção do plasmídeo (Figura 13A e B destacadas em amarelo). Para a confirmação como sugerido pelo fabricante foi utilizados o DNA 2 (Figura 12A seta branca) que apesar de ter o tamanho esperado, não

segiu o padrão dos outros, e o DNA 19 (Figura 12B seta branca) e depois digeridas com enzimas de restrição SacII e XhoI para a separação do gene MDR do vetor pHa.

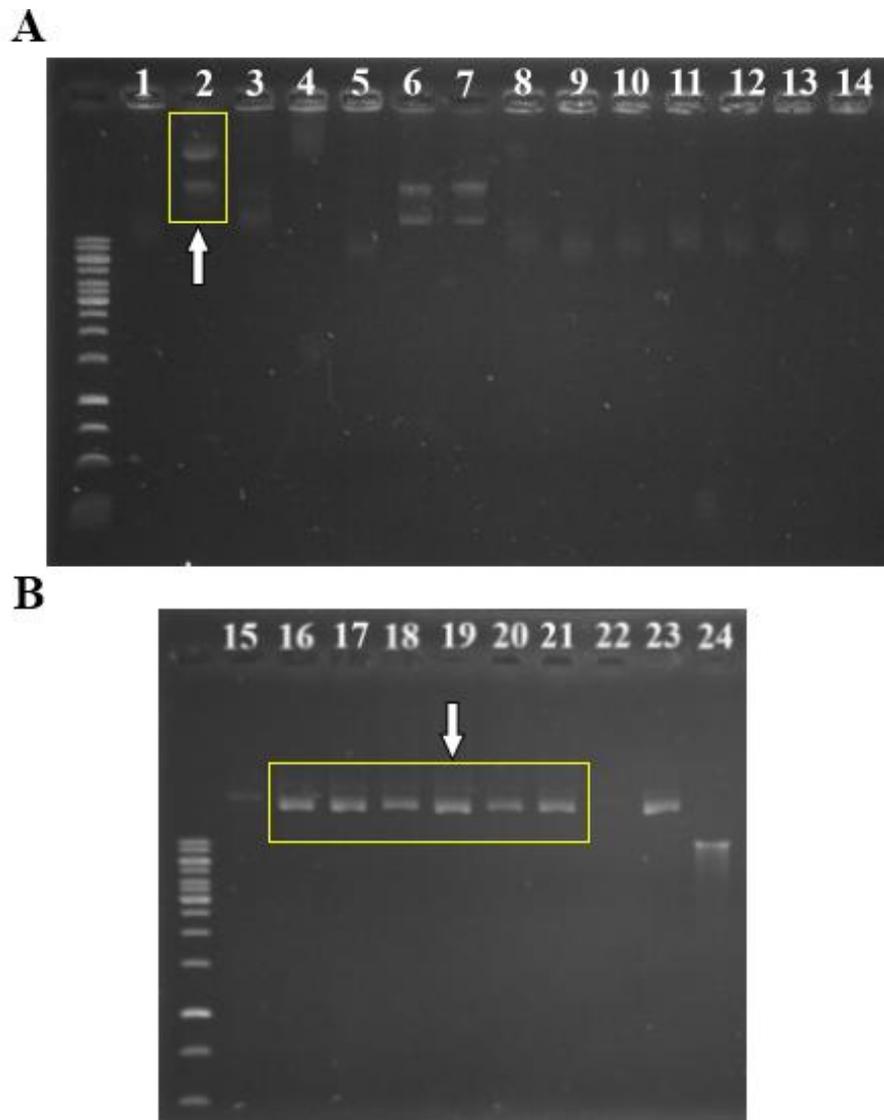


Figura 12 - DNA plasmidial obtido por miniprep das colônias isoladas de *E. coli*. 24 colônias de *E. coli* cepa DH5 α foram selecionadas aleatoriamente e lisadas para obtenção do DNA plasmidial e depois corrido em gel de agarose 1% para determinar o tamanho.

Após a digestão, na amostra 19 foi visto duas bandas do tamanho aproximado 11.000 pb do vetor plasmidial e outra com aproximadamente 4.000 do gene MDR (Figura 13 destacado em amarelo). Após confirmação, a colônia 19 foi utilizada para obtenção do DNA utilizado para os experimentos de transfecção.

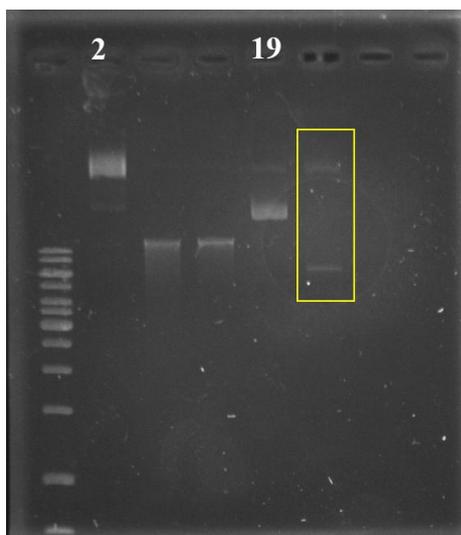


Figura 13 - Digestão do DNA plasmidial 2 e 19 com as enzimas de restrição SacII e XhoI.

5.2 Morfologia das células A2780-MDR #2 e A2780#3

Após o processo de transdução e seleção com meio de cultura contendo colchicina, as células sobreviventes mudaram completamente sua morfologia (Figura 15 e 16). Tanto as células A2780-MDR#2 quanto as A2780-MDR#3 aumentaram de tamanho e passaram a crescer em colônia, comportamento não observado nas células A2780 (Figura 14 setas pretas). As células A2780 possuem uma morfologia mais alongada quando a confluência é mais baixa e ela se torna menor quando a confluência aumenta, porém as células não se tornam unidas com aspecto de colônia (Figura 14). As A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 quando em menor confluência não se espalham pelo poço, como a A2780, e quando em maior confluência preenchem todo o fundo da placa, unindo todas as colônias (Figura 14 coluna de maior confluência). Por microscopia de luz, não é possível delimitar facilmente as células A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 na massa em que elas estão localizadas.

Para melhor visualizar as diferenças morfológicas entre as linhagens, foram feitas micrografias com microscópio eletrônico de varredura (Figura 15). No aumento de 1000 vezes é possível ver o crescimento em colônia nas células A2780-MDR observado por microscopia de luz (Figura 14 setas). As células A2780 crescem dispersas sobre a lamínula e possuem diferentes morfologias dependendo do espaço em que se encontram. Em A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 é possível ver um grupo de células bem organizadas e de tamanho maior que as A2780. Foi realizado um maior aumento (4.500 vezes) em cada amostra afim de observar as diferenças na superfície celular. Todas as linhagens possuem a superfície celular com a presença de prolongamentos, e nas duas A2780-MDR é possível ver uma quantidade maior de detalhes na superfície celular do que na célula A2780 (Figura 15 setas amarelas).

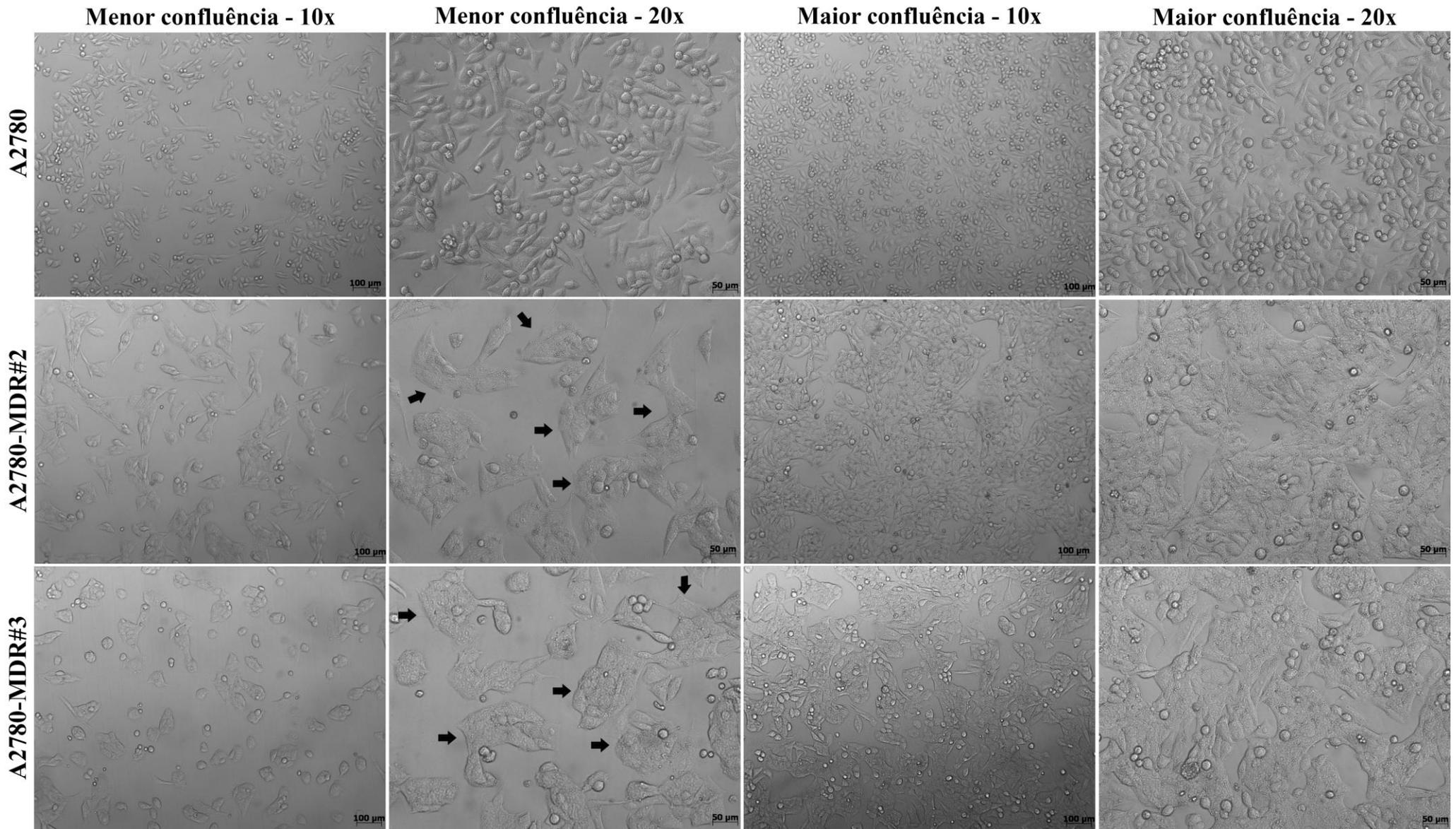
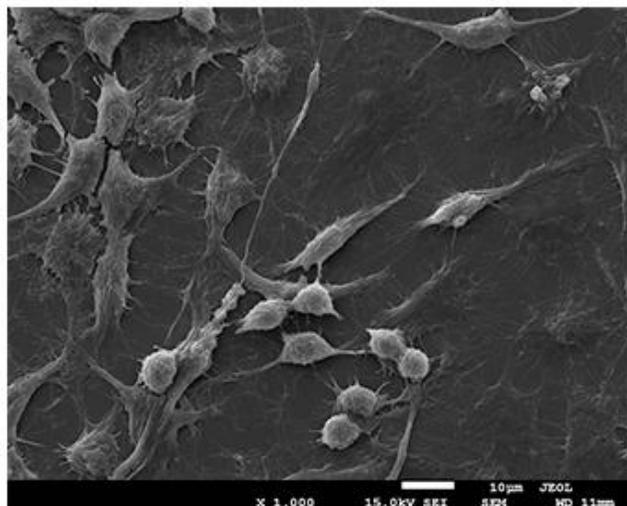
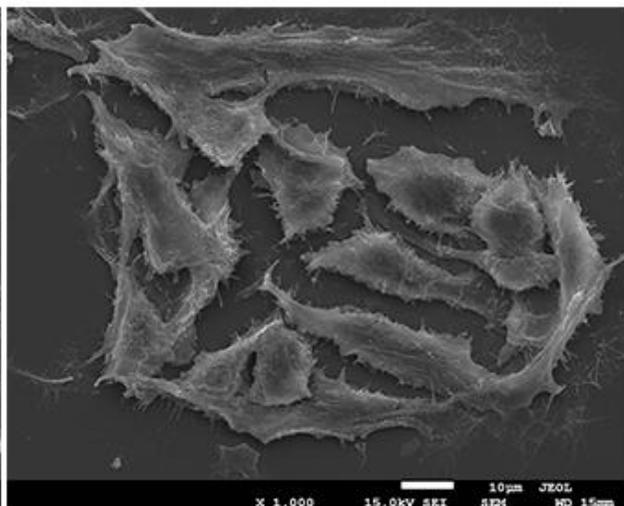


Figura 14- Morfologia das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 em diferentes confluências. Foram semeadas 1×10^5 ou 3×10^5 células das diferentes linhagens em placas de 12 poços e após 24 horas a morfologia foi analisada por microscopia de luz. As imagens foram obtidas no aumento de 10x e 20x, barras de 100 μm e 50 μm , respectivamente. As setas pretas indicam a organização de colônia das células.

A2780



A2780-MDR-#2



A2780-MDR#3

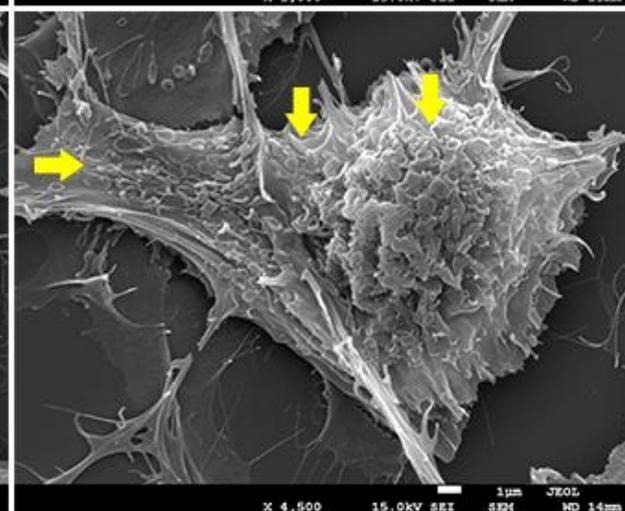
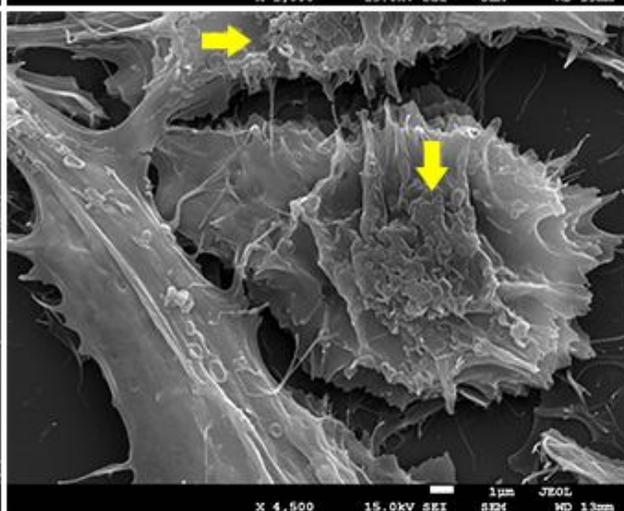
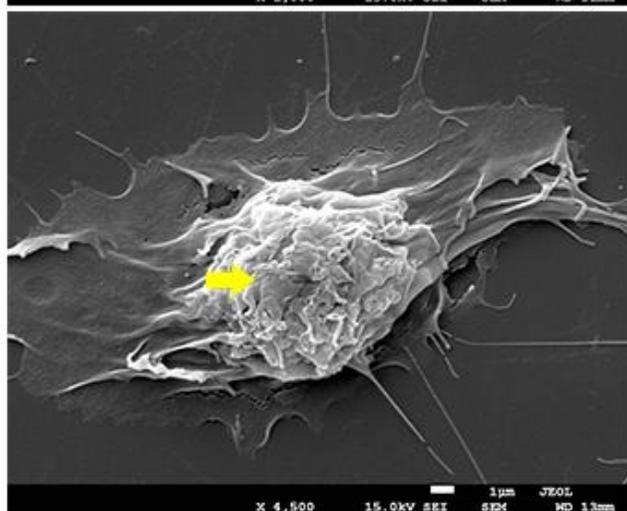
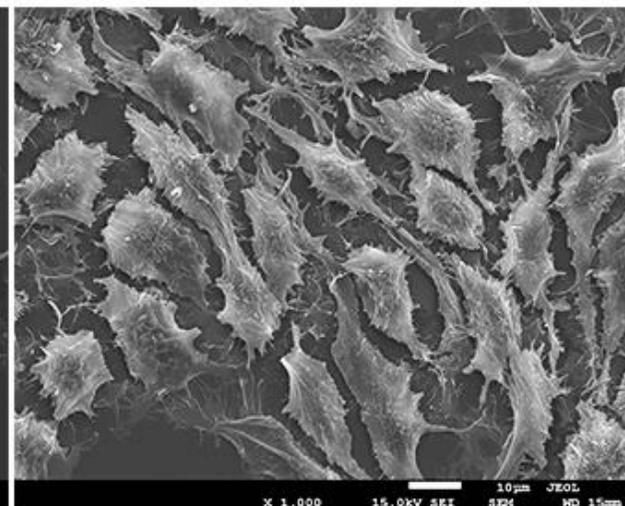


Figure 15 - Micrografia das linhagens A2780, A2780-MDR#2 e #3 por microscopia eletrônica de varredura. A morfologia das linhagens estudadas foi analisada por MEV nos aumentos de 1.000 e 4.500 vezes para observação de detalhes na morfologia e na membrana celular. Barra de 100 e 1 μm. Setas amarelas indicam os detalhes da membrana celular.

5.3 Imunomarcção de P-glicoproteína em A2780 e A2780-MDR

A fim de visualizar p-glicoproteína (P-gp) na membrana das células e checar sua organização, foi realizada a imunomarcção dessa proteína de membrana nas células A2780, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 e depois a análise feita em microscópio confocal de varredura a laser. As células A2780 naturalmente possuem essa proteína (Figura 16 setas brancas) concentrada em região bem delimitada sugerindo a formação de domínios citoplasmáticos. Em A2780-MDR#2 é possível ver que P-gp está mais espalhada pela membrana da célula, tendo poucas regiões de concentração como em A2780 (Figura 16 setas amarelas). A distribuição de P-gp na membrana de A2780-MDR#3 é semelhante a vista em A2780 (Figura 16 setas brancas).

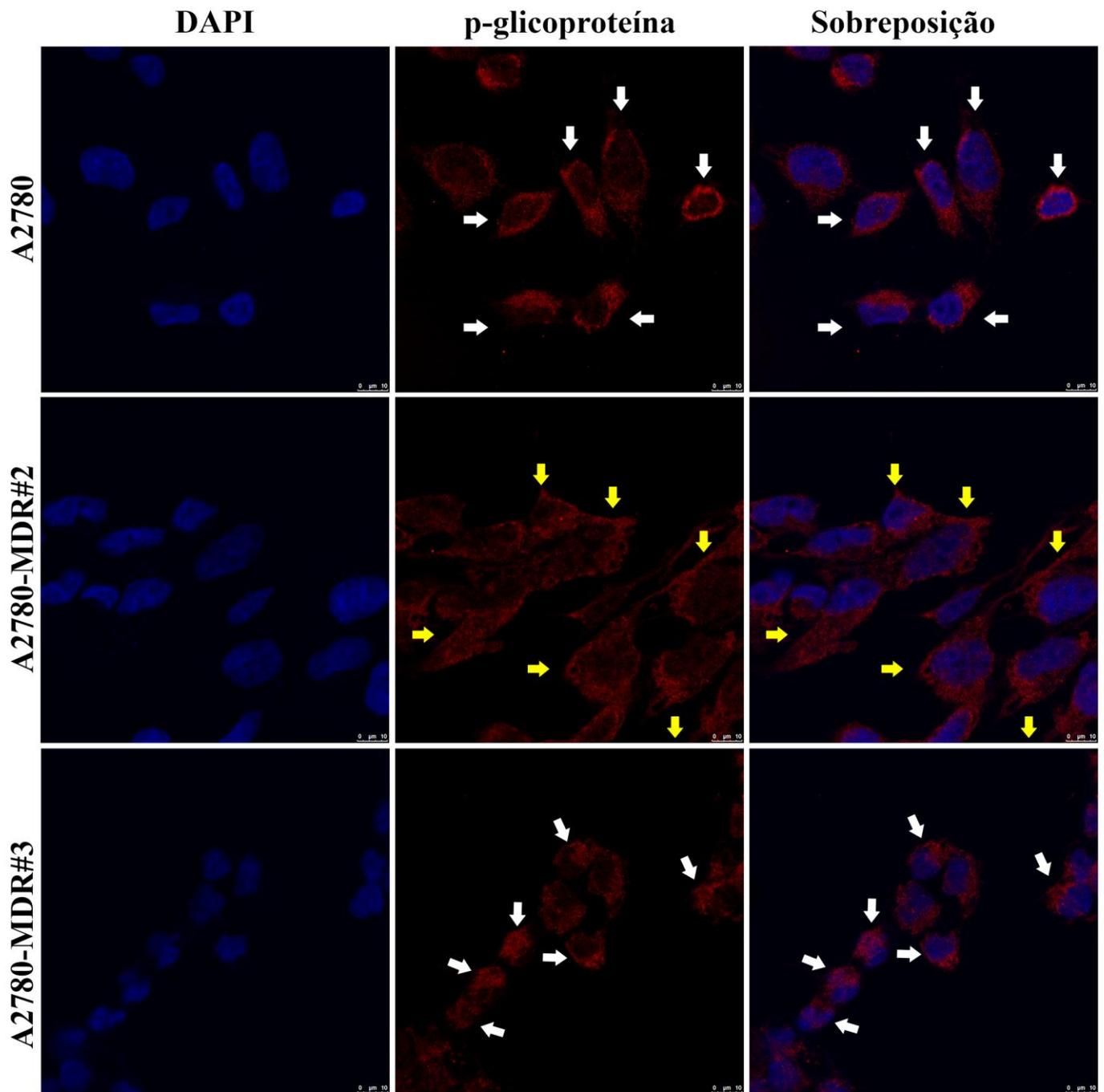


Figura 16 - Distribuição e organização de p-glicoproteína nas membranas celulares de A2780, A2780-MDR#2 e #3. As células A2780, A2780-MDR#2 e #3 foram imunomarcadas com anticorpo anti-p-glicoproteína (vermelho) e o DNA das células foram corados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser. Barra de 10 μ m. Setas brancas indicam p-gp concentrada na região perinuclear da membrana celular e setas amarelas indicam p-gp espalhada por pela membrana celular.

5.4 Análise da toxicidade de docetaxel nas células A2780-MDR

O aumento da expressão de P-gp está relacionado com a multirresistência à fármacos. Já é descrito que células resistentes pelo aumento dessa proteína diminuem sua sensibilidade ao docetaxel. Para verificar a toxicidade de DTX foram testadas as concentrações usadas anteriormente em A2780 nas células transformadas A2780-MDR.

A linhagem A2780-MDR#2 foi sensível ao solvente utilizado para solubilizar o fármaco docetaxel. No tempo de 24 horas (Figura 17A) é possível observar toxicidade do etanol superior a 25% nessa linhagem, o que não aconteceu com a MDR#3 (Figura 19). O DTX causou mortalidade semelhante ao etanol, não sendo possível assim distinguir o que realmente foi tóxico para as células. Em 48 horas (Figura 17B) a viabilidade das células MDR#2 tratadas com DTX é inferior ao solvente nas concentrações de 1-100 ng/mL, porém nas demais doses a mortalidade induzida pelo fármaco é semelhante a induzida pelo etanol. Em 72 horas (Figura 17C) há o aumento da viabilidade nas concentrações de 1 ng/mL - 1 µg/mL dos tratamentos com etanol e DTX, sugerindo que as células que resistiram ao tratamento até o tempo de 48 horas voltaram a se proliferar aumentando assim a viabilidade mensurada no tempo de 72 horas.

A2780-MDR#2

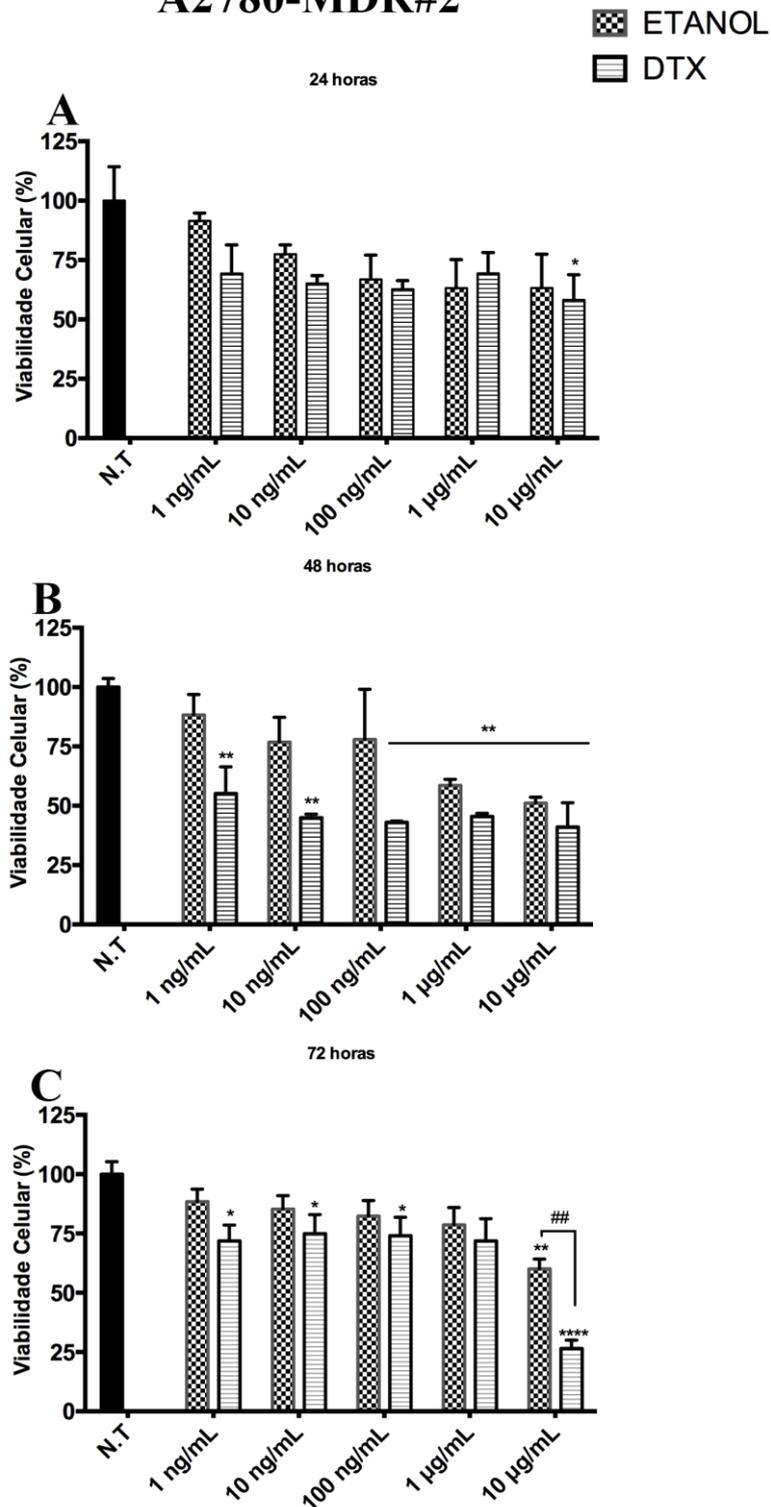


Figure 17 - Citotoxicidade de DTX e ETANOL nas células transformadas A2780-MDR#2. A célula A2780-MDR#2 foram tratadas com DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL e com etanol no volume correspondente a DTX por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e **** $P < 0,0001$. *tratamentos comparados ao controle NT e # tratamentos comparados entre si.

Para verificar se as células A2780-MDR#2 estavam ou voltando a proliferar ou não respondendo mais ao tratamento com DTX, foram comparadas as absorvâncias dos experimentos realizados (Figura 18). Foi possível ver que as células quando tratadas com Etanol foram sensíveis em 24 horas demonstrando redução da viabilidade porém depois desse tempo há um aumento na mesma (Figura 17), e analisando a absorvância dos experimentos foi constatado que após 48 horas a população de células expostas ao etanol volta a crescer em todos os volumes testados (Figura 18). Quando tratadas com DTX, as células mostraram redução da viabilidade no tempo de 24 horas menor do que em 48 horas (Figura 17A e B) e depois um aumento da viabilidade em 72 horas (Figura 17C), ao analisar as absorvância foi visto que as células tratadas com concentrações a partir de 10 ng/mL de DTX no tempo de 48 horas não tiveram redução da sua população bruta quando comparada ao tempo de 24 horas e sim se mantiveram iguais. Em 72 horas essas mesmas populações tem absorvâncias maiores que nos demais tempos, indicando assim uma recuperação e proliferação dessas células (Figura 18).

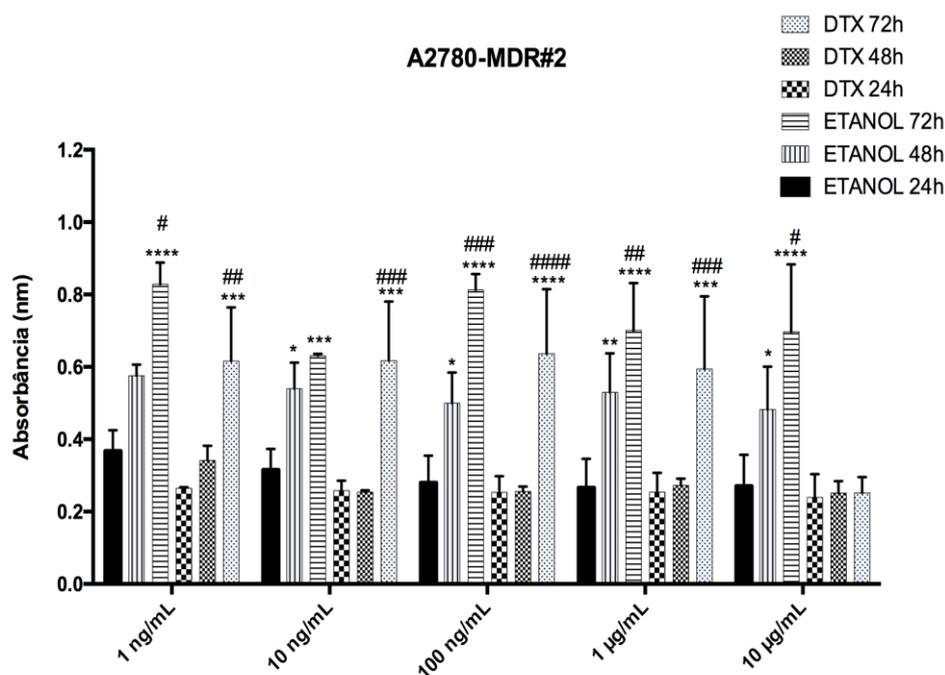


Figura 18 – Absorbância das células A2780-MDR#2 tratadas com ETANOL e DTX. As células A2780-MDR#2 foram tratadas com DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL e com etanol no volume correspondente a DTX por 24, 48 e 72 horas e absorbância foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM das absorbâncias de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, e **** $P < 0,0001$. *absorbâncias comparadas ao tempo de 24 horas e #absorbâncias comparadas ao tempo de 48 horas do tratamento correspondente.

A linhagem A2780-MDR#3 não mostrou sensibilidade ao etanol como a outra célula transformada (A2780-MDR#2) (Figura 19). Em 24 horas as viabilidades de todos os tratamentos foram superiores a 60% (Figura 19A). No tempo de 48 horas, houve redução de aproximadamente 50% na viabilidade induzidas pelos tratamentos a partir da concentração de 10 ng/mL, porém não houve redução superior a 60% como é possível ver nas células A2780 nesse tempo (Figura 19B). Em 72 horas, a viabilidade das células dos grupos tratados diminui até cerca de 20% (Figura 19C).

A2780-MDR#3

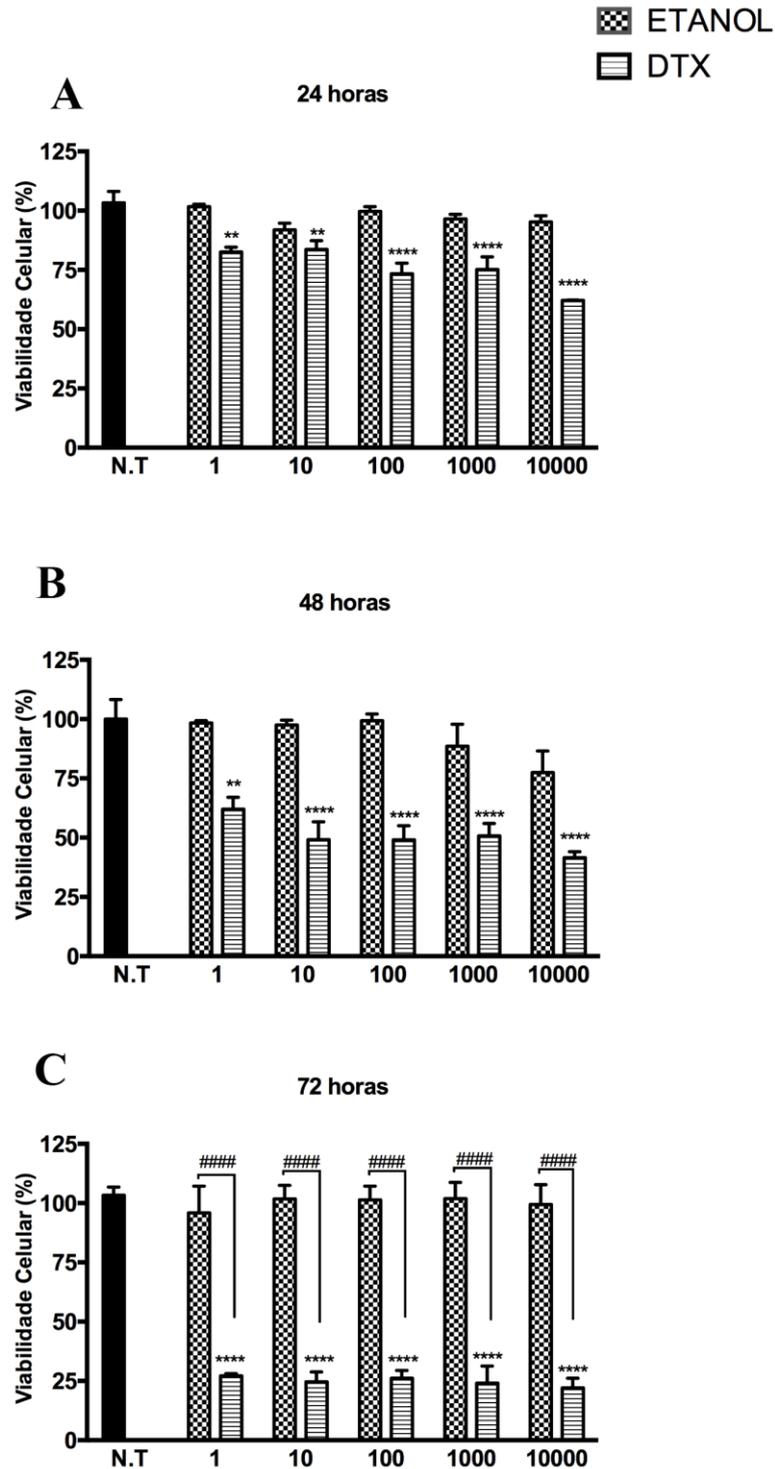


Figura 19 - Citotoxicidade de DTX e ETANOL nas células transformadas A2780-MDR#3. As células A2780-MDR#3 foram tratadas com DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL e com etanol no volume correspondente a DTX por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. ** $P < 0.01$ e **** $P < 0.0001$. * tratamentos comparados ao controle NT e # tratamentos comparados entre si.

Como foi observada citotoxicidade de etanol nas células A2780-MDR#2, as viabilidades dos tratamentos com DTX foram recalculadas descontando a toxicidade de etanol para podermos comparar o efeito somente do fármaco nas linhagens transformadas e A2780. Na figura 20 é possível ver as viabilidades das três linhagens nos diferentes tempos estudados. Em 24 horas de tratamento (Figura 20A), a linhagem A2780 teve a viabilidade reduzida em aproximadamente 40% em todas as concentrações, e as células transformadas A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3 tiveram aproximadamente 25% e 20% de redução, respectivamente, sendo a viabilidade da A2780-MDR#3 significativamente maior que a parental. Em 48 horas (Figura 20B), os tratamentos a partir de 10 ng/mL causaram redução de mais de 50% nas linhagens A2780 e A2780-MDA#2, a viabilidade da linhagem A2780-MDR#3 não atingiu 50% em nenhuma concentração testada. Na A2780, a viabilidade foi inferior as demais células em todas as concentrações a partir de 10 ng/mL. Quando comparadas entre si, a linhagem A2780-MDR#3 foi menos sensível aos tratamentos em todas as concentrações testadas. Em 72 horas (Figura 20C) é possível ver o aumento da viabilidade de A2780-MDR#2 nas quatro primeiras concentrações, esse aumento chegando até aproximadamente 40% em relação ao tempo anterior nas concentrações de 10 ng/mL – 1 µg/mL. Em comparação a A2780, a viabilidade de MDR#2 nessas concentrações é cerca de oito vezes maior. O tratamento na linhagem A2780-MDR#3 causou mortalidade de 80% nas concentrações testadas, porém a viabilidade dessa célula é significativamente maior do que a de A2780.

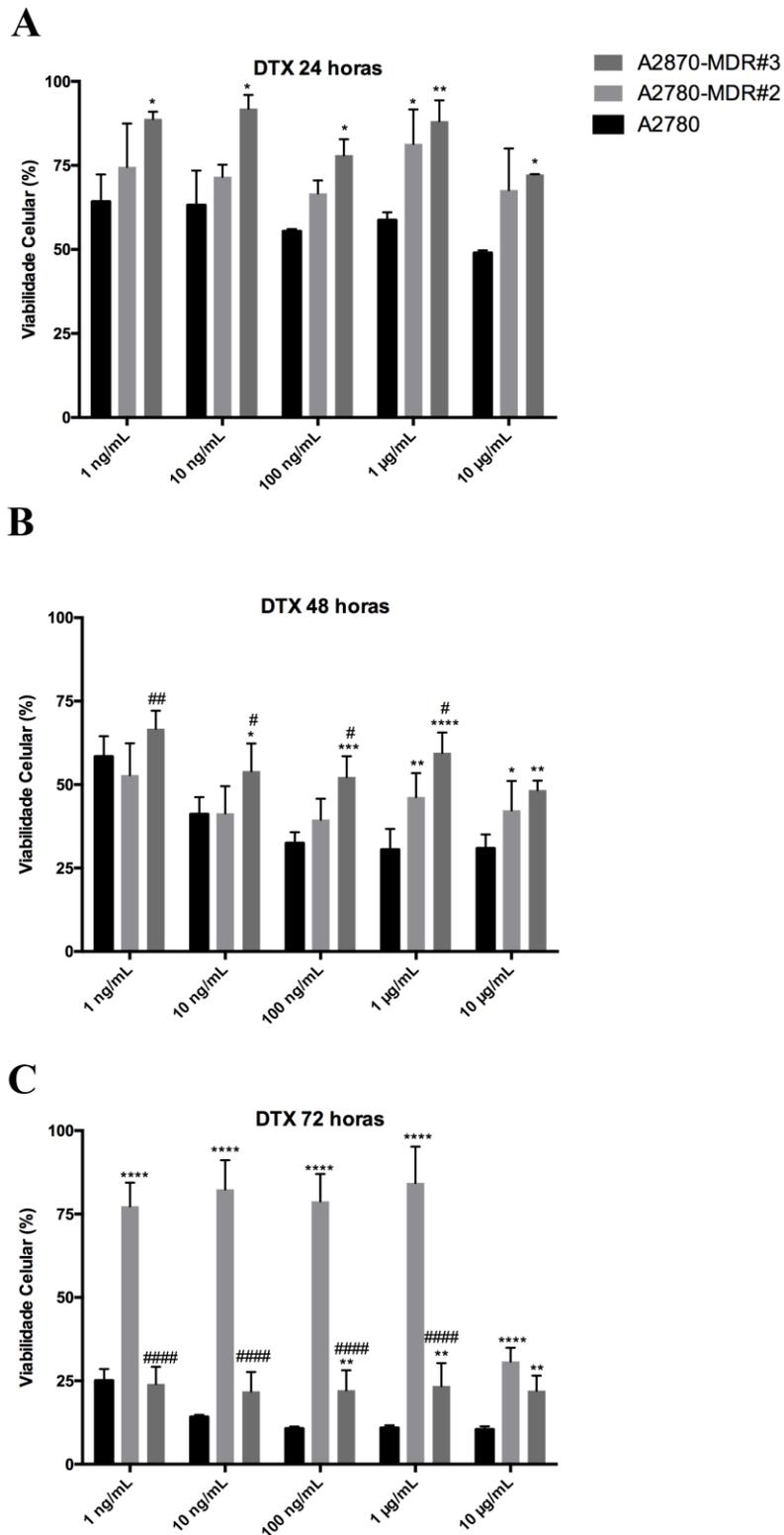


Figura 20 - Viabilidade de A2780 e A2780-MDR#2 e #3 após tratamento com docetaxel nos tempos de 24, 48 e 72 horas normalizados com o tratamento apenas com o solvente. As viabilidades dos tratamentos com DTX foram recalculadas para desconto da toxicidade do etanol e mostradas nos gráficos separados por tempo e comparativo entre as três linhagens. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$ e **** $P < 0,0001$. *comparado a A2780 e #comparado a A2780-MDR#2.

Foram calculados os IC₅₀ de DTX nos três tempos estudados nas três linhagens A2780 (Tabela 4), porém em alguns tempos não foi possível ter uma concentração determinada porque ou o IC₅₀ ficou fora do intervalo de concentrações testadas. Em 24 horas não foi possível calcular o IC₅₀ de DTX nas linhagens transformadas pois nesse tempo não houve dose capaz de causar redução próximo a 50%, o que indica um IC₅₀ superior a 10 µg/mL. Mesmo não tendo a concentração determinada, o fato de ser necessária uma dose maior que 10 µg/mL indica que o IC₅₀ nesse tempo é no mínimo 25 vezes maior que o IC₅₀ de DTX em A2780. No tempo de 48 horas foi possível calcular a concentração somente nas células A2780-MDR, pois em A2780 a dose necessária é menor que 1 ng/mL, o que significa que o IC₅₀ de MDR#2 é no mínimo três vezes maior que de A2780 e o de MDR#3 é superior a 100 vezes maior. Em 72 horas somente a dose de MDR#2 foi calculada, e como houve o comportamento de recuperação na população de células tratadas, o IC₅₀ foi superior de todos os outros tempos e de todas as linhagens.

Tabela 4 – Concentração inibitória de 50% de docetaxel das linhagens A2780 e A2780-MDR nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Tempos	IC ₅₀		
	A2780	A2780-MDR#2	A2780-MDR#3
24 horas	350 ng/mL	>10 µg/mL	>10 µg/mL
48 horas	< 1ng/mL	3,6 ng/mL	135 ng/mL
72 horas	< 1ng/mL	2,4 µg/mL	< 1ng/mL

5.5 Análise da citotoxicidade de NLS-BRANCA, NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 nas linhagens A2780, fibroblasto, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3

Um dos primeiros parâmetros biológicos a ser analisado em uma formulação de nanopartículas é o seu potencial citotóxico. Para isso, doses de 1 ng/mL a 10 µg/mL foram testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas estudadas nas linhagens A2780, fibroblastos, A2780-MDR#2 e A2780-MDR#3.

Ao analisar os resultados obtidos na linhagem A2780 foi possível observar que as duas NLS-DTX (Figura 21A e B) e o DTX (Figura 21C) tiveram citotoxicidade \geq 50% nas concentrações a partir de 100 ng/mL. Nas células tratadas com NLS-BRANCA (Figura 21A e B) ocorreu variação de viabilidade, onde esta diminuiu com o aumento da dose. Nas concentrações 1 e 10 µg/mL, a citotoxicidade das NLS-DTX e de NLS-BRANCA são semelhantes, não podendo ser possível concluir se a redução das células ocorreu devido ao fármaco da formulação ou aos componentes surfactantes.

24 horas

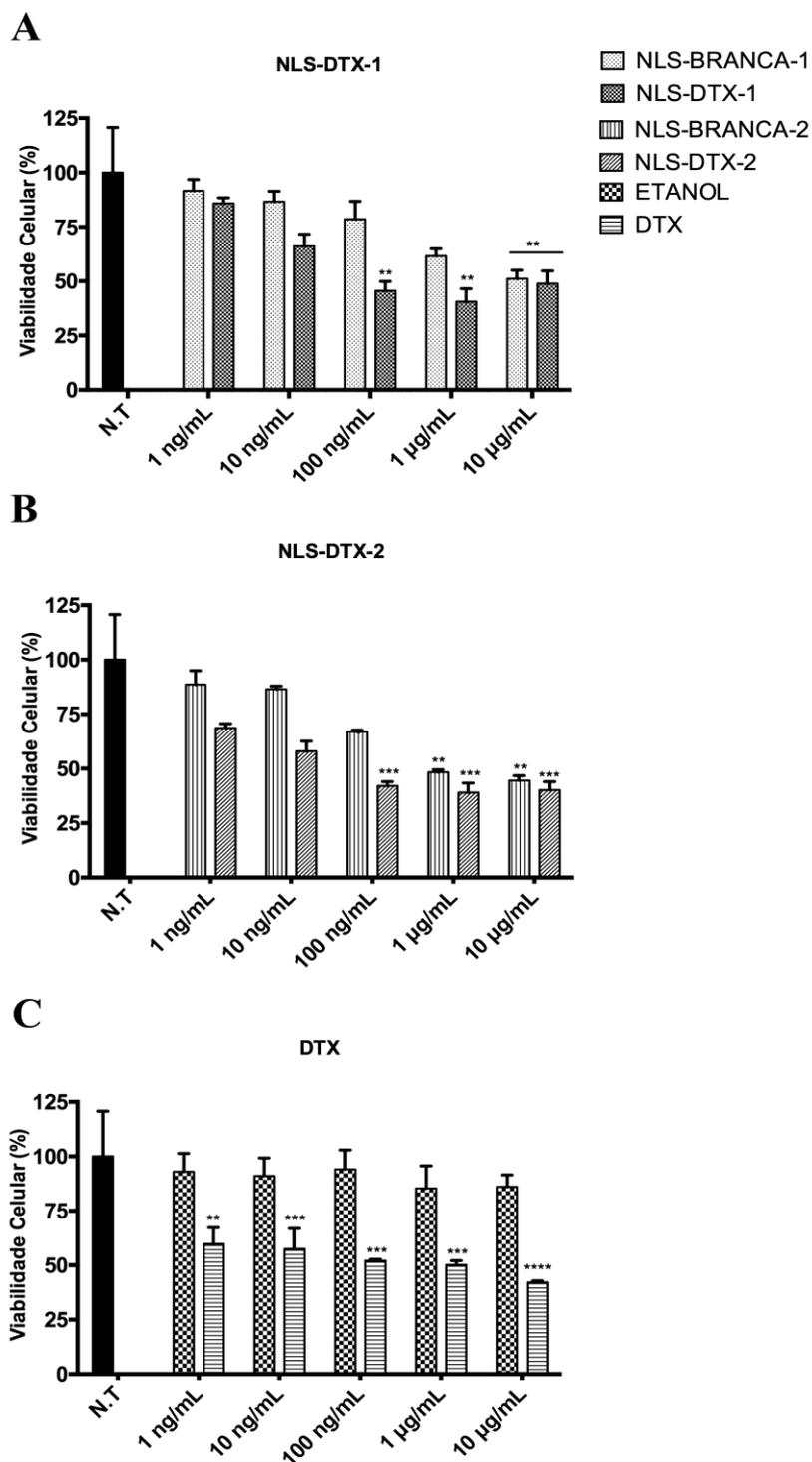


Figura 21 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 24 horas de tratamento. As células A2780 foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$. * comparados ao controle e # comparados aos solubilizantes correspondente.

No tempo de 48 horas (Figura 22), a redução da viabilidade é mais acentuada, de aproximadamente 70% a partir de 10 ng/mL em NLS-DTX-1 (Figura 22A) e NLS-DTX-2 (Figura 22B). Nas concentrações de 10 ng/mL e 100 ng/mL, a mortalidade causada pela NLS-DTX-1 foi significativamente superior que a causada por NLS-BRANCA, enquanto que em NLS-DTX-2 esse fato ocorreu nas concentrações de 1 ng/mL e 10 ng/mL. O perfil de mortalidade de DTX (Figura 22C) se assemelhou com o da NLS-DTX-2, com a primeira concentração matando 50% da população e as demais mais de 70%.

48 horas

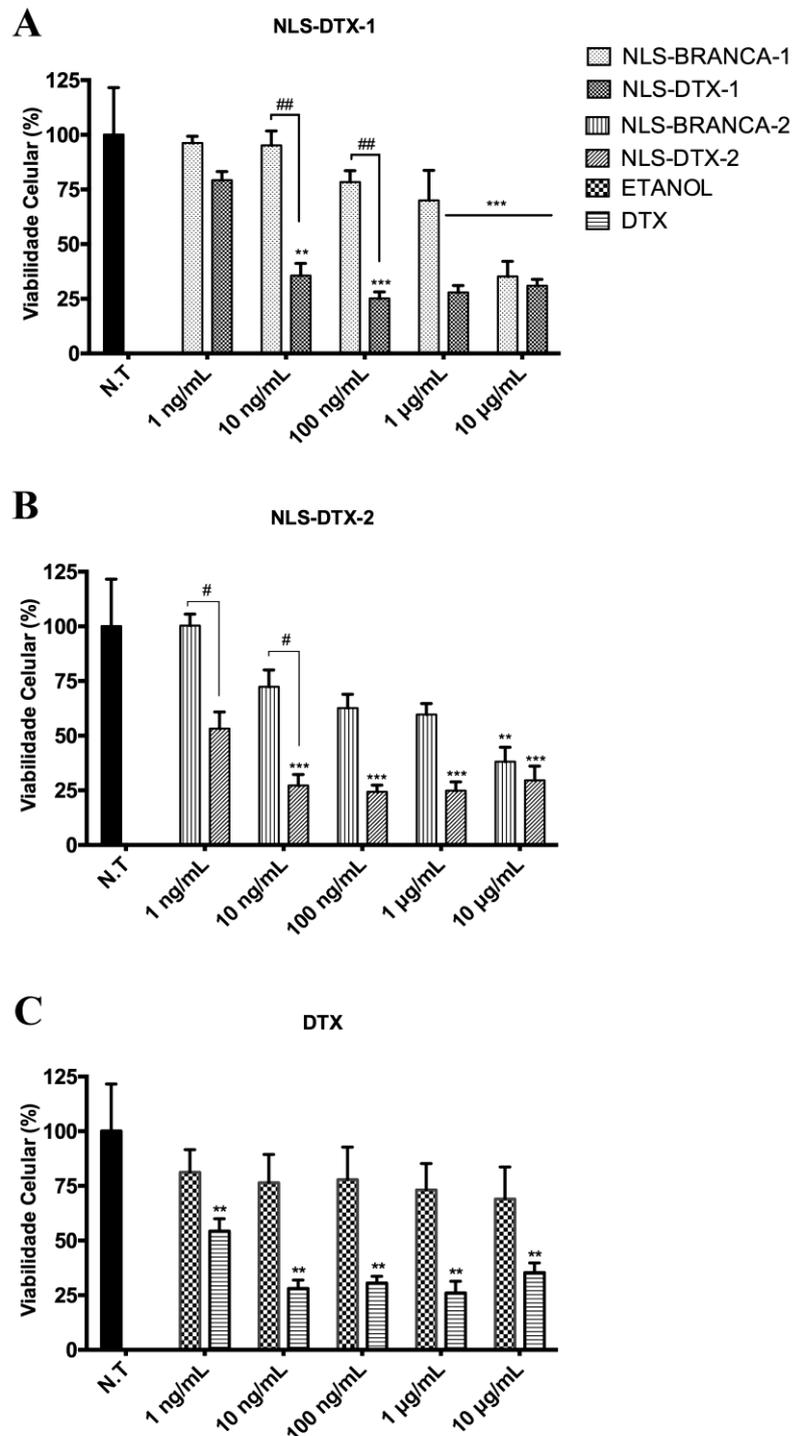


Figura 22 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 48 horas de tratamento. As células A2780 foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 48 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e $P < 0.0001$. * comparados ao controle e # comparados aos solubilizantes correspondente.

Em 72 horas (Figura 23), ocorreu uma redução de 90% em todos os tratamentos contendo docetaxel a partir de 10 ng/mL. A NLS-BRANCA (Figura 24A e B) causou 70-75% de mortalidade na maior concentração e 15% na menor. Quando comparada a viabilidade de NLS-BRANCA, houve uma redução significativa nas concentrações de 1ng/mL até 1 µg/mL nas duas NLS-DTX (Figura 23A e B). Nesse tempo todos os tratamentos com as NLS-DTX e DTX (Figura 23C) nas concentrações a partir de 10 ng/mL causaram toxicidade $\geq 90\%$.

A toxicidade do solvente etanol não ultrapassou 25% nas concentrações e tempo testados. Em todos os tempos estudados, as viabilidades dos tratamentos contendo docetaxel atingem um platô a partir das concentrações de 10 ou 100 ng/mL, variando somente a morte causada pelos veículos na proporção das concentrações. Comparando as viabilidades das duas NLS-DTX com o fármaco livre, não houve diferença significativa. Com esses resultados foi possível concluir que as formulações testadas foram tempo dependente e tiveram o perfil de citotoxicidade semelhante ao controle com DTX.

72 horas

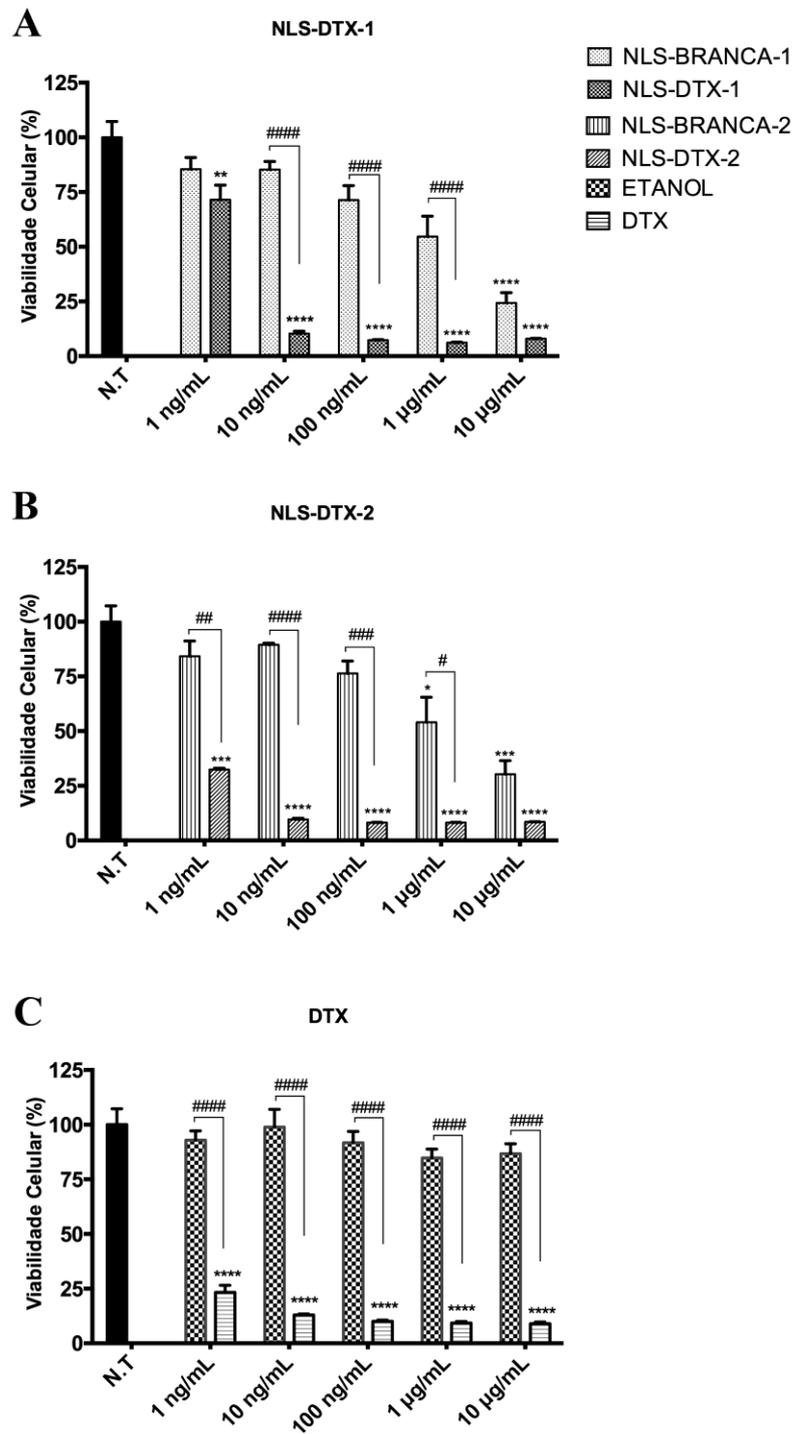


Figura 23 - Efeitos das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780 em 72 horas de tratamento. As células A2780 foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$. * comparados ao controle e # comparados aos solubilizantes correspondente.

Com as viabilidades obtidas, foi calculado o IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da população) dos tratamentos testados na linhagem A2780 (Tabela 5). Para NLS-DTX-2 e DTX só foi possível calcular o IC₅₀ para o tempo de 24 horas, pois a concentração inibitória é menor que 1 ng/mL o que inviabiliza o cálculo pelo programa. Para a NLS-BRANCA foi calculada a porcentagem do volume de formulação para que fosse possível comparar com as duas NLS-DTX, sendo que o valor máximo utilizado de NLS-BRANCA nos tratamentos foi 1%. Os valores correspondem: 0,35% = 3,5 µg/mL de NLS-DTX-1 e 7 µg/mL de NLS-DTX-2; 0,25% = 2,5 µg/mL de NLS-DTX-1 e 5 µg/mL de NLS-DTX-2; 0,08% = 800 ng/mL de NLS-DTX-1 e 1,6 µg/mL de NLS-DTX-2. Essas concentrações são expressivamente superiores aos IC₅₀ encontrados para as NLS-DTX.

Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da população de A2780 .

Tratamento	IC ₅₀ (ng/mL)		
	24 horas	48 horas	72 horas
NLS-BRANCA	0,35%	0,25%	0,08%
NLS-DTX-1	129,1	9,58	2,02
NLS-DXT-2	82,91	<1ng/mL	<1ng/mL
DTX	350,3	<1ng/mL	<1ng/mL

Outro parâmetro importante para avaliar de um nanossistema é toxicidade em células não tumorais. Para isso, o mesmo padrão de tratamento e de tempos foi utilizado em células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituída de fibroblastos.

A nanopartícula vazia NLS-BRANCA nos volumes correspondentes a NLS-DTX-1 (Figura 24A) no tempo de 24 horas não apresentou diferença na redução da viabilidade entre fibroblasto e A2780, porém nos tempos de 48 e 72 horas a

citotoxicidade foi superior em fibroblasto do que em A2780, demonstrando que as células não tumorais são mais sensíveis ao veículo no sistema estudado. Quando tratadas com NLS-DTX-1 as células apresentaram outro padrão (Figura 24B), com a viabilidade do fibroblasto maior que da A2780 na maioria dos tratamentos, com exceção da concentração 1 ng/mL nos tempos de 48 e 72 horas.

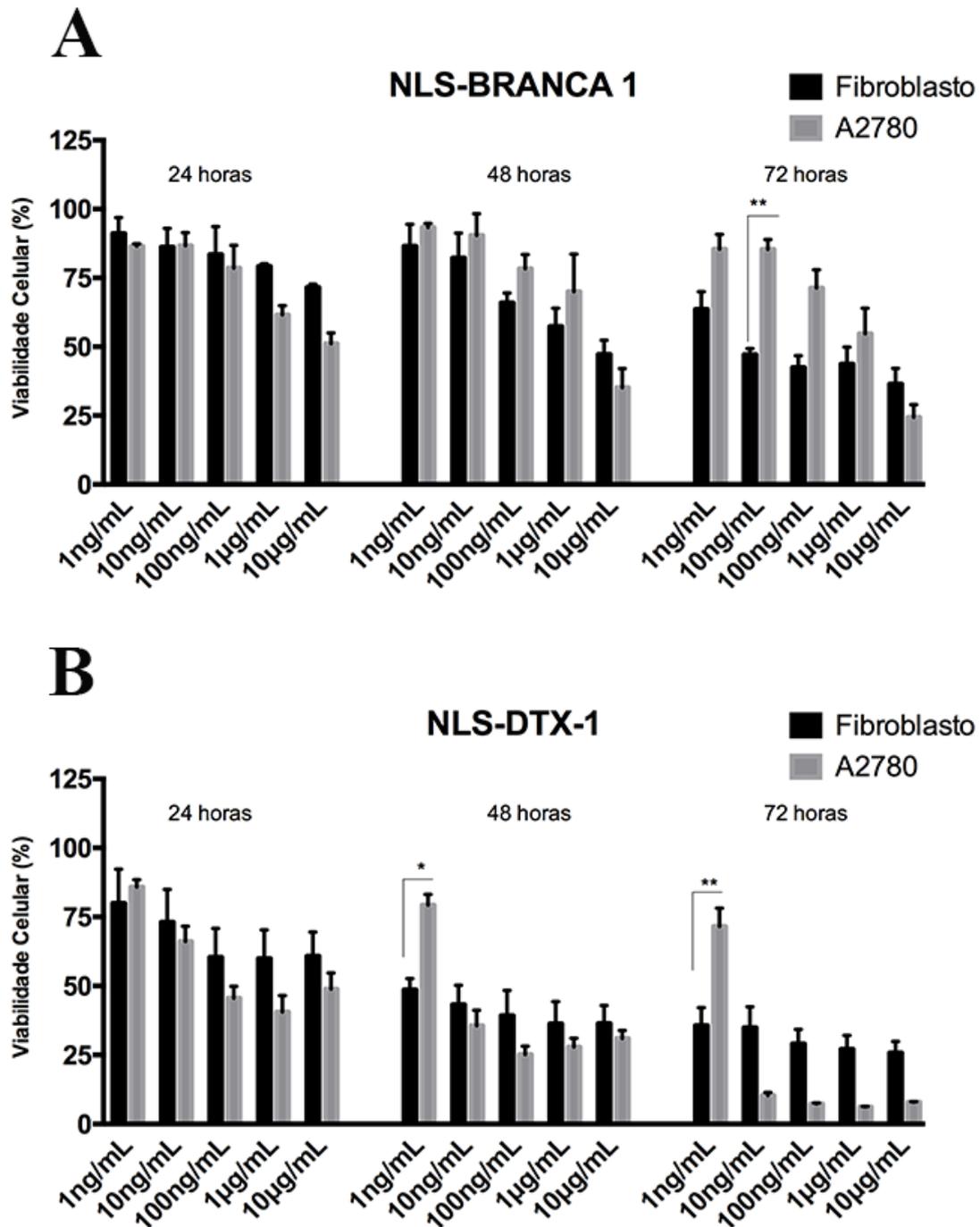


Figura 24 - Efeitos das NLS-BRANCA-1 e NLS-DTX-1 na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células fibroblasto e A2780 foram tratadas com NLS-BRANCA e NLS-DTX-1 nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05 e **P<0.01 se refere as linhagens comparadas entre si.

Os volumes de NLS-BRANCA utilizados como equivalente a NLS-DTX-2 (Figura 25A) tiveram uma toxicidade semelhante nas duas linhagens, porém os volumes correspondentes a 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ causaram maior mortalidade em A2780 do que em fibroblasto em todos os tempos. O tratamento com NLS-DTX-2 causou redução drástica nas duas linhagens, porém foi mais acentuada em A2780 (Figuras 25B), fato também observado em NLS-DTX-1.

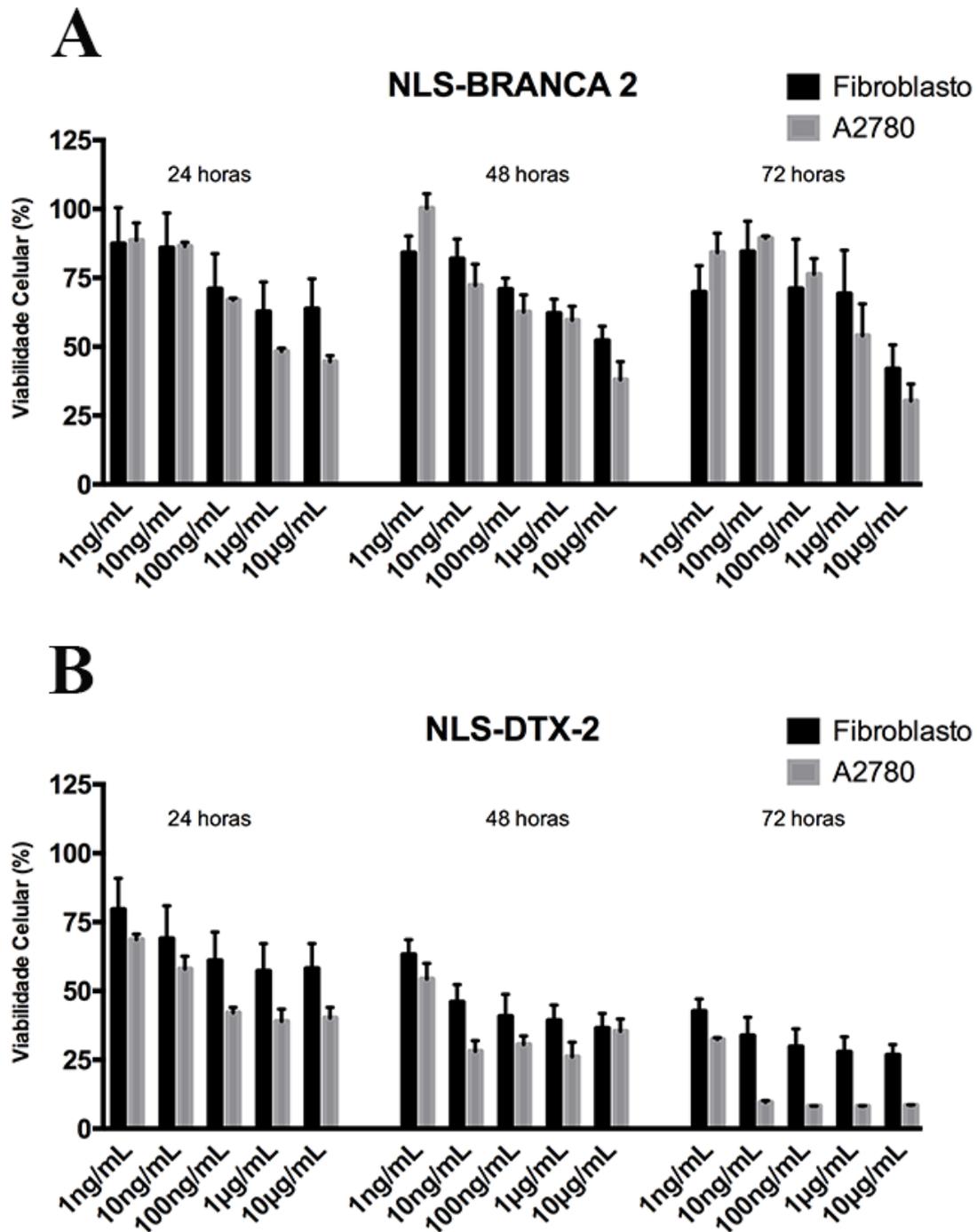


Figura 25 - Efeitos das NLS-BRANCA-2 e NLS-DTX-2 na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células fibroblasto e A2780 foram tratadas com NLS-BRANCA e NLS-DTX-2 nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata.

O etanol utilizado como solvente de DTX não mostrou redução significativa em nenhuma das linhagens (Figura 26A), enquanto o DTX já em 24 horas mostrou redução de aproximadamente 30% nas células fibroblastos e 50% nas células tumorais (Figura 26B). Com 48 horas, em todas as concentrações testadas a redução foi de mais de 50% por cento nas duas linhagens e em 72 horas a redução em fibroblasto foi de em média 70% e em A2780 de 90%.

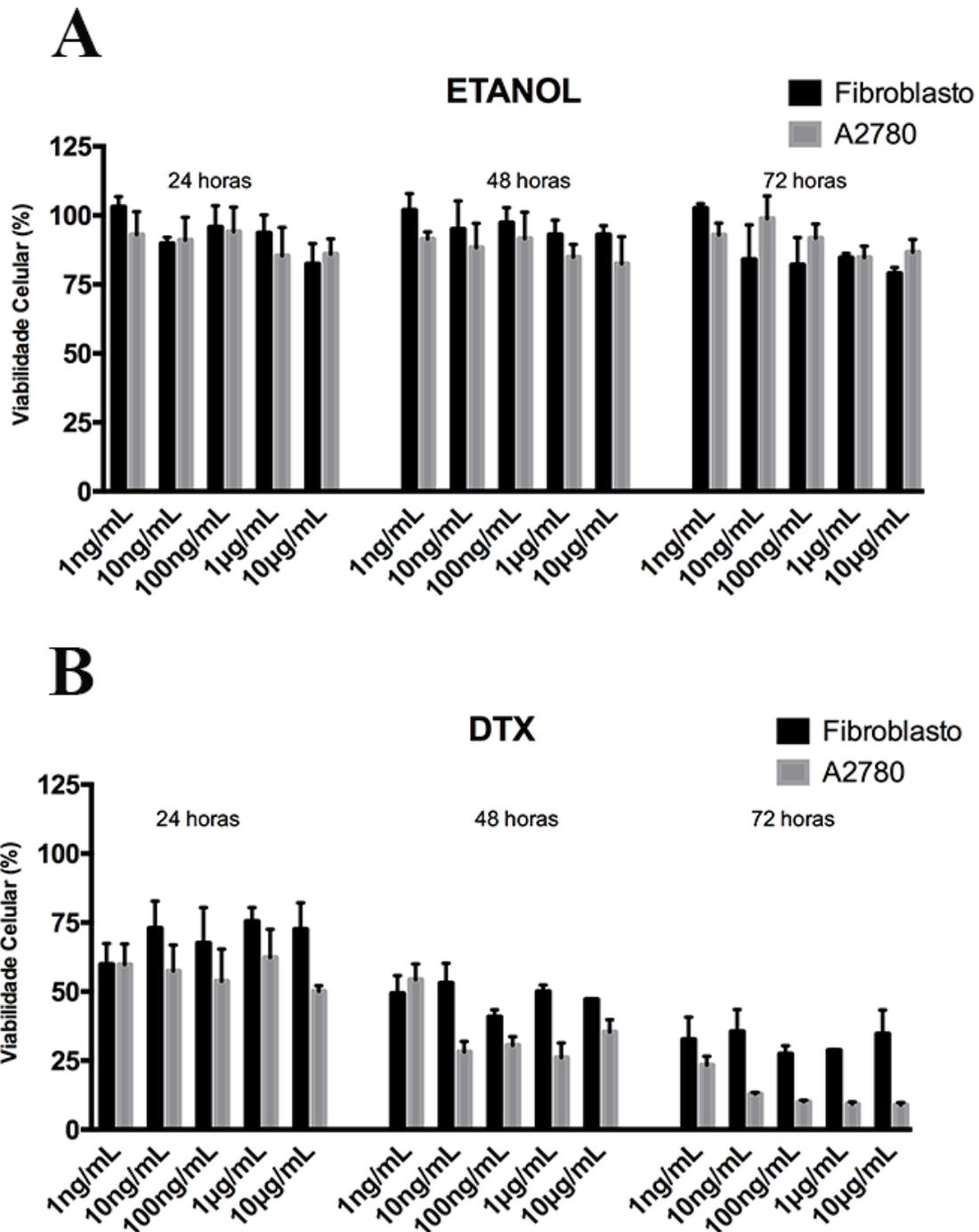


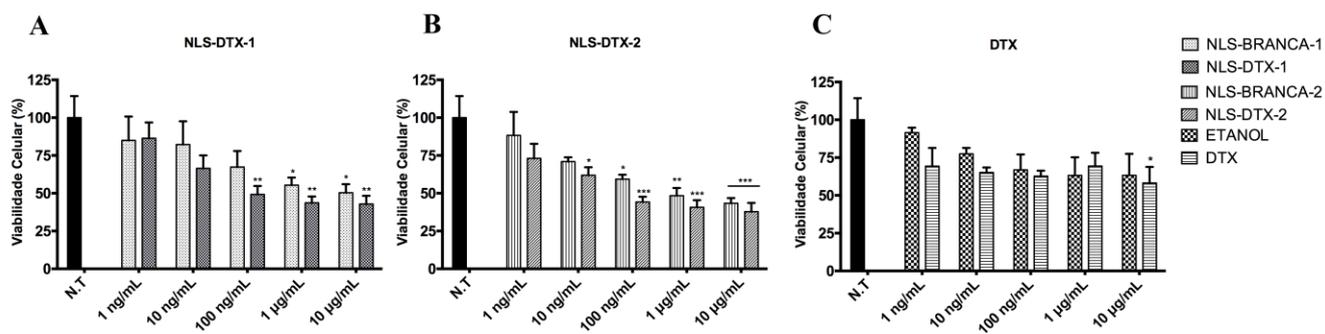
Figura 26 - Efeitos do ETANOL e DTX na viabilidade celular de células de cultivo primário de tecido conjuntivo constituído prioritariamente de fibroblasto comparado a viabilidade de A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células fibroblasto e A2780 foram tratadas com ETANOL e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata.

Com intuito de verificar se as NLS-DTX são capazes de reduzir a viabilidade das células A2780-MDR, as nanopartículas foram testadas nestas células e analisadas sua viabilidade após 24, 48 e 72 horas de tratamento. O modelo de tratamento foi igual ao realizado com A2780.

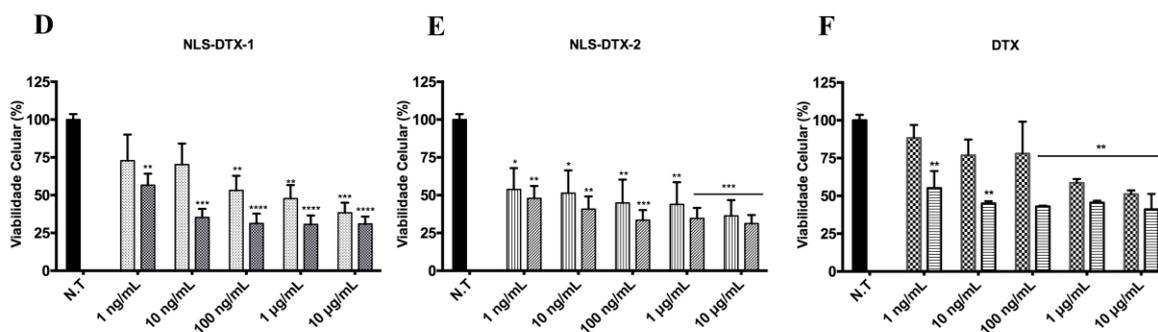
Como observado com o etanol, a célula A2780-MDR#2 foi mais sensível a NLS-BRANCA (Figura 27A, D e G) do que a A2780 e a A2780-MDR#3. No tempo de 24 horas (Figura 27A-C) as NLS-DTX causaram uma mortalidade maior que o fármaco livre, com redução de mais de 50% na viabilidade das células tratadas a partir da concentração de 100 ng/mL, porém a diferença entre toxicidade de NLS-BRANCA e as NLS-DTX foi inferior a 15% nessas doses. Desse modo não se pode dizer ao certo se a redução foi causada pelos componentes da formulação ou se pelo fármaco nela presente. Em 48 horas, a toxicidade de NLS-DTX-1 e a NLS-BRANCA correspondente (Figura 27D) causou mais de 50% de mortalidade em todas as concentrações, porém novamente não foi observado diferença entre as viabilidades desses dois tratamentos. A NLS-DTX-2 (Figura 27E) reduziu em mais de 50% a viabilidade a partir da concentração de 10 ng/mL e a NLS-BRANCA a partir de 1 µg/mL. As NLS-DTX continuaram sendo mais tóxicas que DTX nesse tempo. No tempo de 72 horas, a mortalidade causada por NLS-BRANCA (Figura 27G e H) não seguiu a mesma taxa que a das NLS-DTX, sendo significativamente menor em todas as concentrações de NLS-DTX-2 e nas quatro primeiras doses de NLS-DTX-1. Na NLS-DTX-1 (Figura 27G) a viabilidade teve redução de 80% a partir da concentração 100 ng/mL. NLS-DTX-2 (Figura 27H) teve redução de mais de 70% na viabilidade em todas as concentrações testadas. As células tratadas com as nanopartículas não tiveram a recuperação da viabilidade observada quando o tratamento é DTX.

A2780-MDR#2

24 horas



48 horas



72 horas

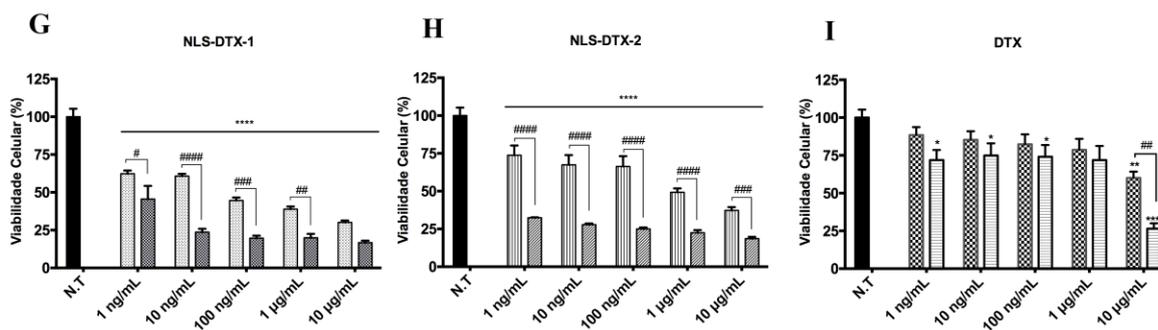
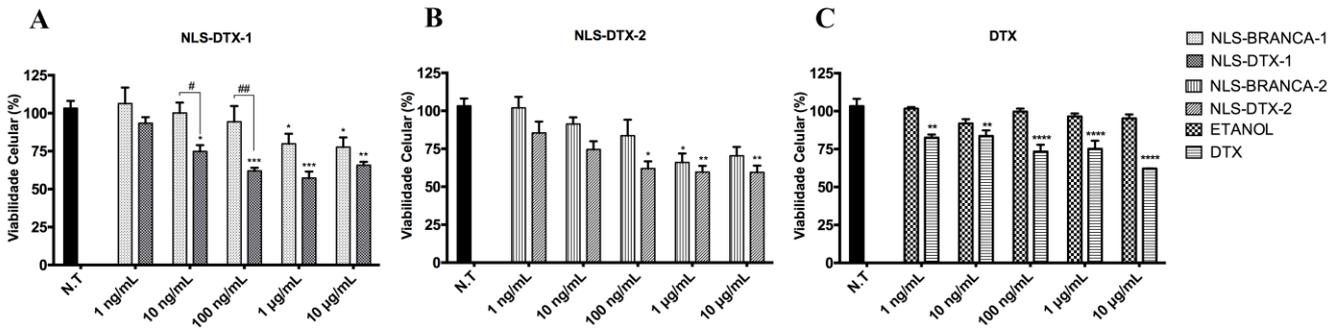


Figura 27 - Efeito citotóxico das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780-MDR#2 em 24, 48 e 72 horas de tratamento. A célula A2780-MDR#2 foi tratada com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. * comparados ao controle e # comparados aos solubilizantes correspondente.

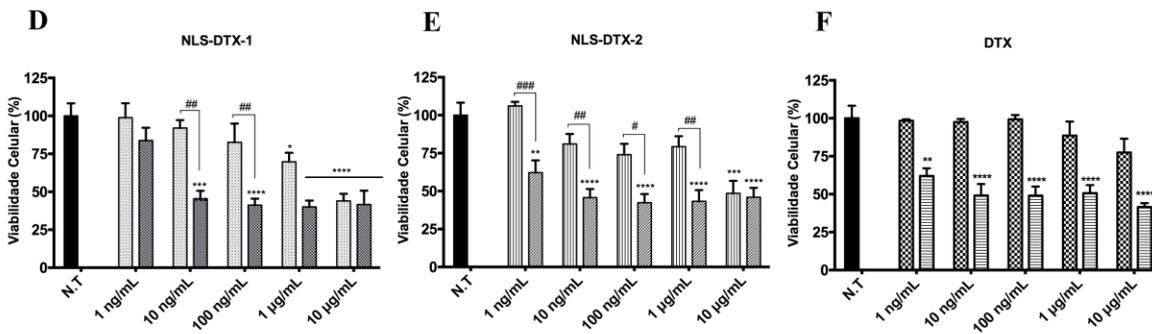
A linhagem A280-MDR#3 no tempo de 24 horas teve sua população $\leq 75\%$ depois do tratamento com as duas NLS-DTX (Figura 28A e B) a partir da concentração de 10 ng/mL e com DTX (Figura 28C) a partir da concentração de 100 ng/mL. Em 48 horas, NLS-DTX-1 (Figura 28D) levou a cerca de 60% de redução das células tratadas com doses a partir de 100 ng/mL. NLS-DTX-2 (Figura 28E) reduziu a aproximadamente 50% de células nos tratamentos a partir de 10 ng/mL. DTX (Figura 29F) teve o mesmo perfil de mortalidade de NLS-DTX-2. Em 72 horas, todas as doses de NLS-DTX-1 (Figura 28G) causaram grande mortalidade, com a menor concentração reduzindo mais de 60% a população e as demais concentrações reduziram mais de 80%. Em NLS-DTX-2 (Figura 28H) todas as concentrações reduziram mais de 80% da viabilidade. DTX (Figura 28I) causou 75% de morte em todas as concentrações testadas. Nessa linhagem a toxicidade das NLS-DTX foi maior que DTX, porém não foi expressiva como na linhagem A2780-MDR#2.

A2780-MDR#3

24 horas



48 horas



72 horas

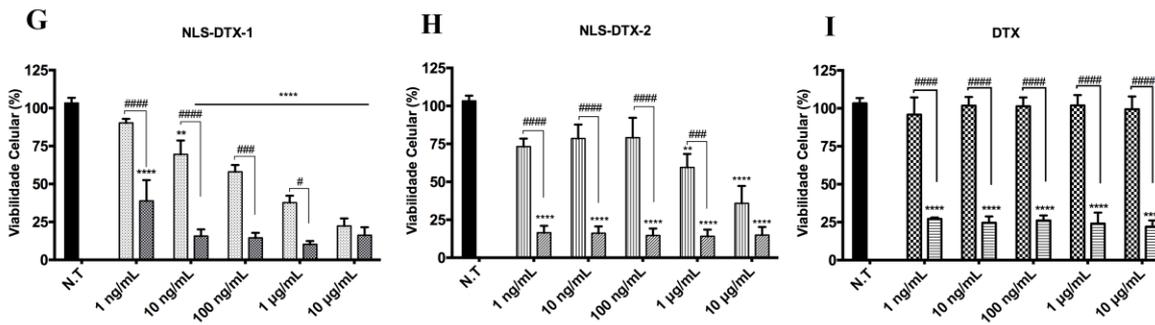


Figura 28 - Efeito citotóxico das NLS-DTX e DTX na viabilidade celular de A2780-MDR#3 em 24, 48 e 72 horas de tratamento. A célula A2780-MDR#3 foi tratada com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. * comparados ao controle e # comparados aos solubilizantes correspondente.

Em resumo, foi feito um apanhado dos tratamentos com as NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 nas três linhagens de carcinoma de ovário para que seja melhor visualizada a diferença entre elas. A linhagem A2780-MDR#3 nos tempos de 24 horas (Figura 29A, D e G) foi menos sensível a todos os tratamentos em todas as concentrações testadas tanto quando comparada com a célula parental quanto com a outra linhagem transformada. Em 48 horas (Figura 29B, E e H) a A2780-MDR#3 continuou sendo mais resistente porém quando comparada com a A2780. Em 72 horas (Figura 29C, F e I) a linhagem A2780-MDR#2 foi a menos sensível a todos os tratamentos quando comparada a A2780 e A2780-MDR#3, sendo sua viabilidade maior quando tratadas com DTX (Figura 29I) e com NLS-DTX-2 (Figura 29F).

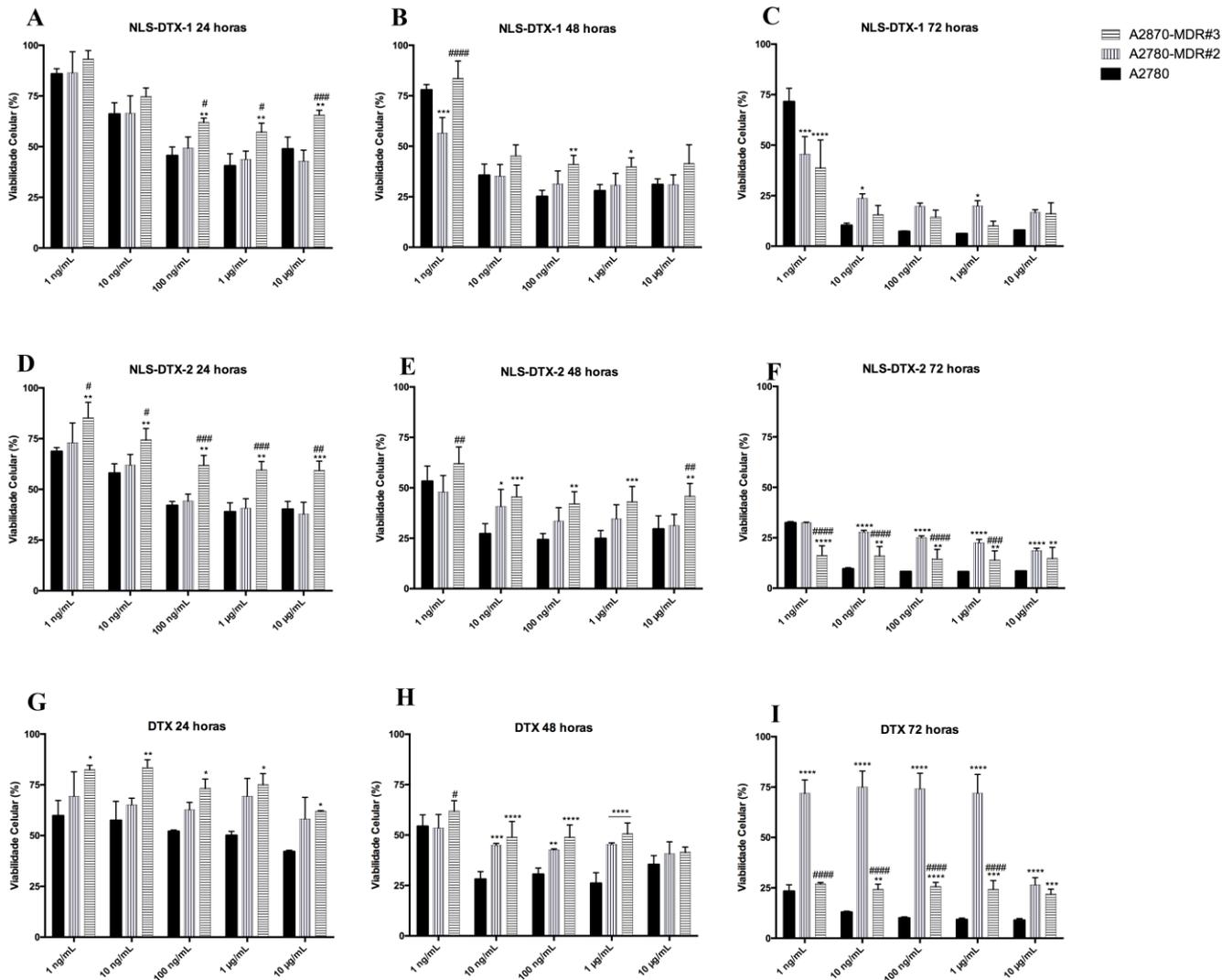


Figura 29 – Pannel comparativo das viabilidades dos tratamentos com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas linhagens de carcinoma de ovário sensíveis A2780 e resistentes A2780-MDR. As células A2780, A2780MDR#2 e A2780-MDR#3 foram tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0,001 e ****P<0,0001.* comparados à A2780 e # comparados à A2780-MDR#2.

5.6. Alterações morfológicas causadas pelos tratamentos na linhagem A2780

Os tratamentos com 1 µg/mL de docetaxel das NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX produziram alterações morfológicas consideráveis nas células A2780 após 24 horas com o tratamento (Figura 30). As células que receberam o tratamento com DTX, NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 (Figura 30B, D e E) apresentam tamanho reduzido, morfologia arredondada devido à perda de adesões focais e menor número de células aderidas ao poço. As células que foram expostas a NLS-BRANCA (1µL de formulação por mL) apresentaram uma pequena redução da sua população, com algumas células flutuando no meio(Figura 30C). Porém, a morfologia das células que ficaram aderidas não sofreu alteraçãoconsiderável quando comparadas ao controle (Figura 30A).

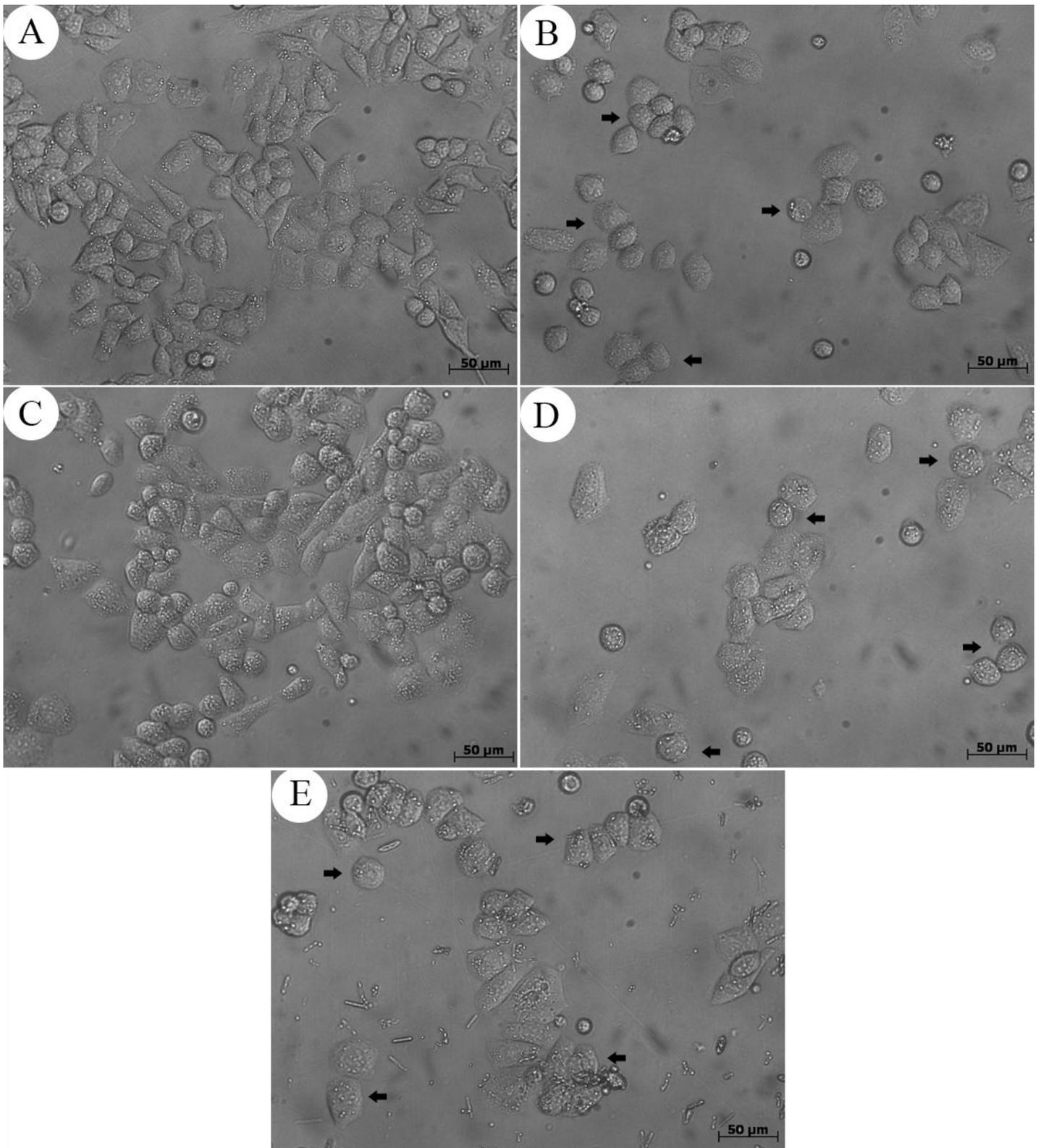


Figure 30 - Alterações morfológicas das células A2780 após 24h de tratamento. (A) Controle sem tratamento; (B) DTX 1µg/mL; (C) NLS-BRANCA volume equivalente; (D) NLS-DTX-1 1µg/mL e (E) NLS-DTX-2 1µg/mL. As alterações morfológicas foram analisadas sob microscópio de luz. As setas apontam células com morfologia arredondadas indicando perda das adesões focais. As imagens foram obtidas no aumento de 32 vezes, barra de 50µm.

5.6 Atividade de NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 na estrutura do citoesqueleto

Para confirmar se o efeito antimitótico devido a hiperestabilização dos microtúbulos causada pelo fármaco docetaxel se mantém intacto após a associação com as NLS foi realizado uma imunomarcação de α -tubulina, componente estrutural dos microtúbulos, nas células A2780 tratadas com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2, DTX na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ NLS-BRANCA no volume correspondente ao usado em NLS-DTX-1, ou nas células que não receberam tratamento (controle) por 24 horas, e depois foram analisadas em microscópio confocal de varredura à laser (Figuras 31 e 32). As células do controle não tratadas possuem o citoesqueleto íntegro, com os microtúbulos organizados e distribuídos por toda a célula (Figura 31). As células tratadas com NLS-BRANCA apresentam morfologia semelhante à vista por microscopia de luz, com algumas células arredondadas (Figura 31). Porém é possível notar que mesmo com essa morfologia, o citoesqueleto se mantém organizado e os microtúbulos com aspecto normal. Nas células tratadas com as NLS-DTX e DTX é possível visualizar a desestruturação no citoesqueleto causada pelos tratamentos quando comparadas ao controle não tratado e com NLS-BRANCA, com células arredondas e os microtúbulos desorganizados (Figura 32 setas brancas).

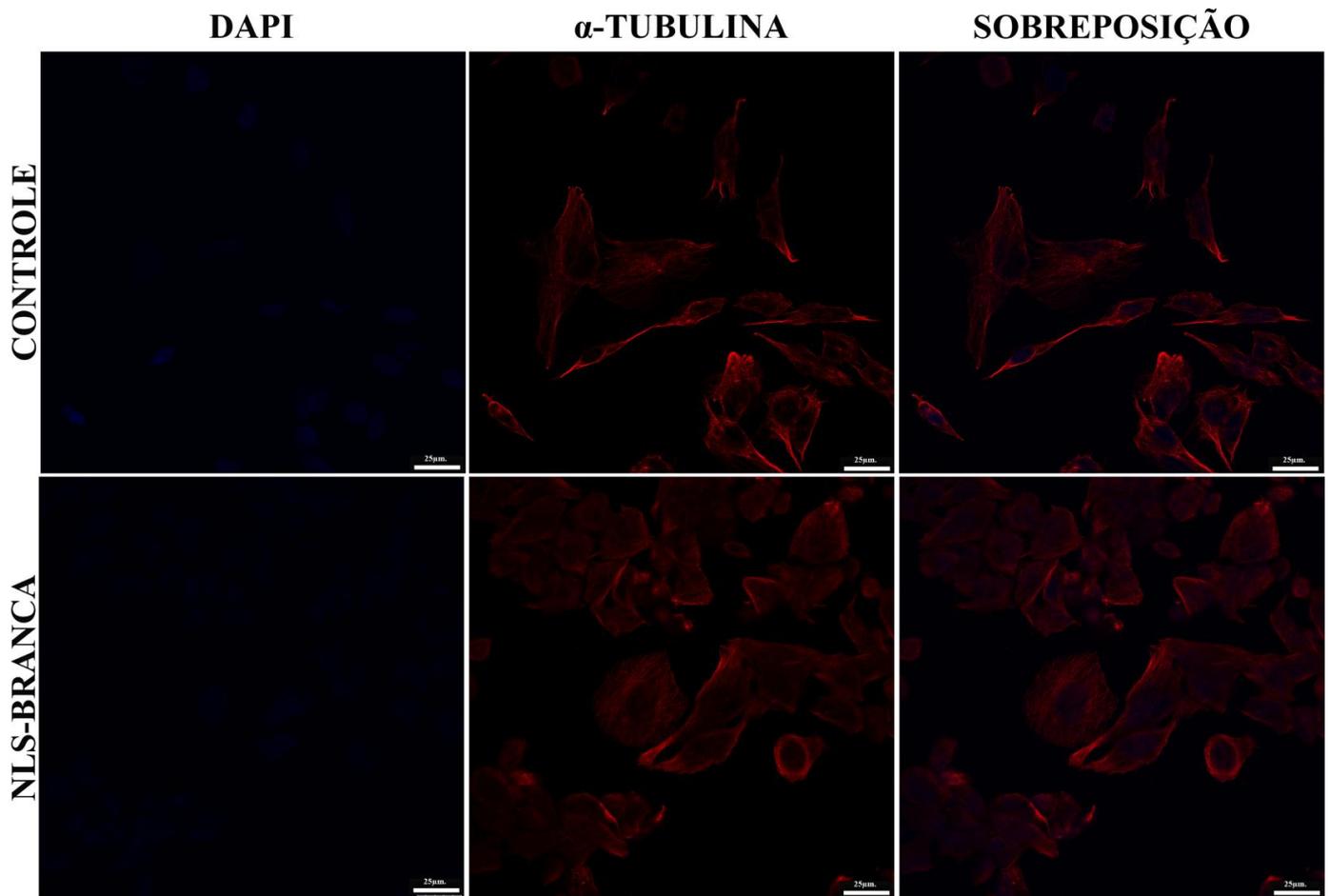


Figura 31 – Organização do citoesqueleto das células A2780 controle não tratada e tratada com NLS-BRANCA. As células A2780 foram tratadas por 24 horas com 10 μ L de NLS- ou não receberam tratamento (CONTROLE). As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (vermelho) e o DNA das células foi corado com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser e mostram a organização normal dos microtúbulos. As imagens foram obtidas no aumento de 63 vezes, barra de 25 μ m.

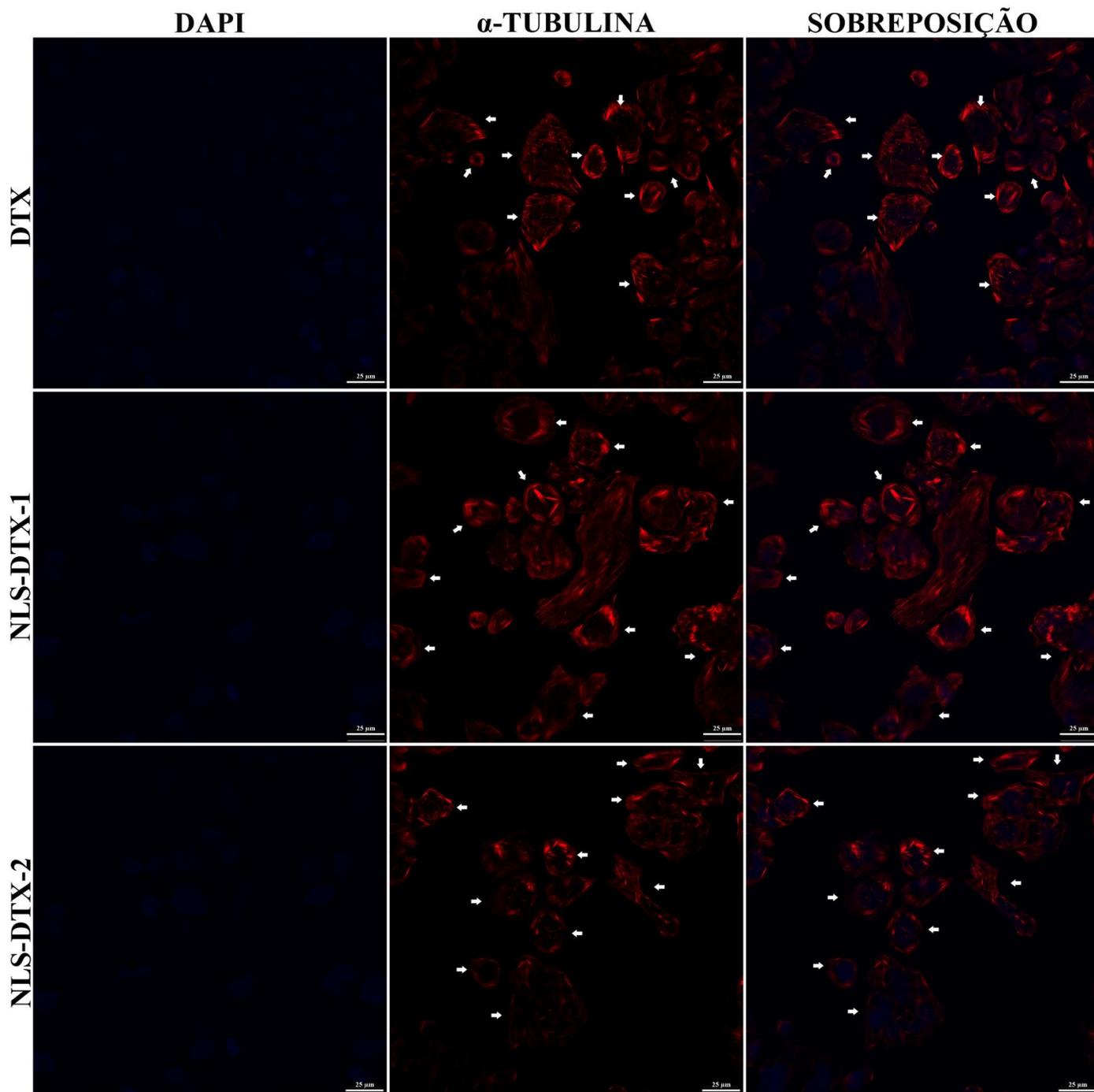


Figura 32 – Efeitos do docetaxel presente nas NLS-DTX-1 e NLS-DTX-2 causam desorganização e ruptura dos microtúbulos das células A2780. As células A2780 foram tratadas por 24 horas com 10 μ g/mL de NLS-DTX-1, NLS-DTX-2, DTX e NLS-BRANCA no volume equivalente ao usado de NLS-DTX-1 ou não receberam tratamento (CTL). As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (vermelho) e o DNA das células foram corados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser e mostram a desorganização e desestruturação dos microtúbulos (seta branca). As imagens foram obtidas no aumento de 63 vezes, barra de 25 μ m.

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

Para avaliar se as células que sobreviveram ao tratamento com as NLS-DTX mantêm sua capacidade de proliferarem e formarem colônias, as células A2780 foram tratadas com 1µg/mL de NLS-DTX-1 e 2, DTX e com NLS-BRANCA nos volumes correspondentes. Após 24 horas de tratamento, as células que resistiram ao tratamento foram desaderidas, contrastadas com corante vital azul de tripan para verificação da viabilidade das mesmas, depois contadas e semeadas em uma nova placa e mantidas com meio de cultura normal por 12 dias e no final do período as colônias formadas foram analisadas.

Na figura 33 é possível observar que as células que não receberam tratamento se espalharam por todo o poço e formaram várias colônias de diversos tamanhos, às vezes não sendo possível nem identificar os limites das colônias. O tratamento com a NLS-BRANCA nas duas proporções testadas reduziu a quantidade de células comparada ao controle, porém houve formação de colônias grandes e fortemente coradas, indicando que há muitas células agregadas no local. As células que receberam tratamento das NLS-DTX formaram poucas e pequenas colônias se comparada com as colônias em NLS-BRANCA e também formaram colônias menores das que as vistas em DTX.

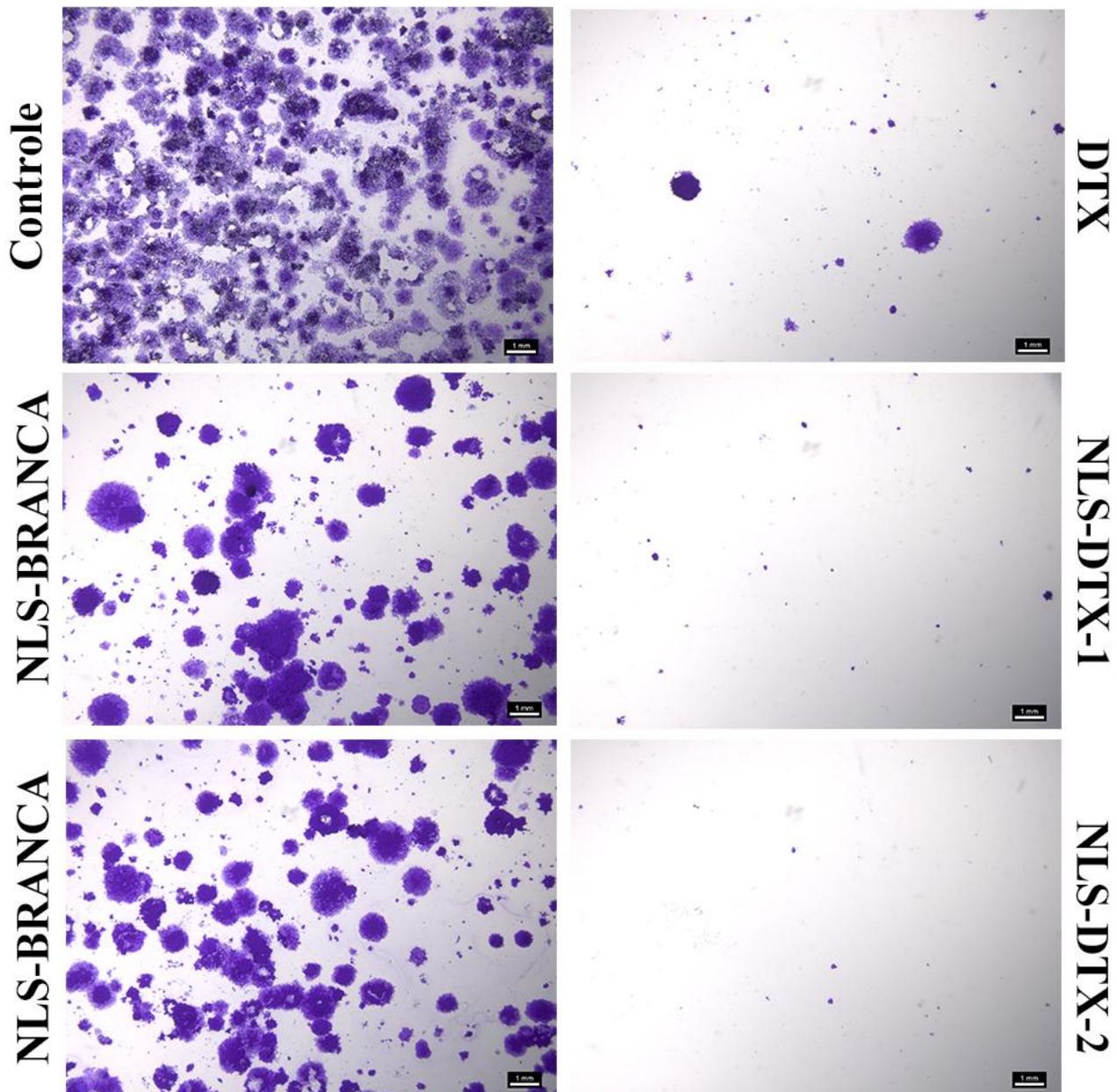


Figure 33 – Efeito do tratamento com as NLS-DTX e DTX na capacidade das células A2780 de formarem colônias. As células A2780 foram tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DTX, NSL-DTX-1 e 2 por 24 horas. Após esse tempo, 103 células que sobreviveram ao tratamento foram plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas por 12 dias. Imagens foram obtidas em estereoscópio no aumento de oito vezes. Barra de 1mm.

5.8 Efeito das NLS-DTX no ciclo celular

O docetaxel é um fármaco citostático com atividade bem descrita e que causa parada na progressão do ciclo celular, prendendo as células na fase G2/M. Para avaliar se essa atividade do docetaxel se mantém quando ele passa pelo processo de associação com nanopartículas lipídica sólida, as células A2780 foram tratadas com 1 µg/mL de NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 E DTX (controle positivo) ou não receberam tratamento e depois de 24h, 48h e 72h foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo.

Na figura 34 é mostrado o histograma do resultado da alteração no ciclo celular que o tratamento com as NLS-DTX causou às células tumorais de ovário. No tempo de 24 horas (Figura 35) já é possível notar o aumento do número de células paradas na fase G2/M quando comparadas ao controle não tratado e se assemelhando com o ciclo celular das células tratadas com o fármaco livre DTX. É no tempo de 48 horas que se nota um maior aumento do número das células retidas G2/M e impedidas de progredirem a divisão celular (Figuras 34 e 35).

Em 72 horas o percentual de células em G2/M é ainda maior que o controle porém não tanto como no tempo anterior, isso pode ter ocorrido porque várias células que se encontravam retidas em G2/M no tempo anterior entraram e morreram entre o tempo de 48 e 72 horas. Em todos os tempos, não houve diferença significativa entre o ciclo celular das células tratadas com NLS-BRANCA quando comparada ao controle, porém houve diferença entre as células tratadas com as NLS-DTX no tempo de 48 horas.

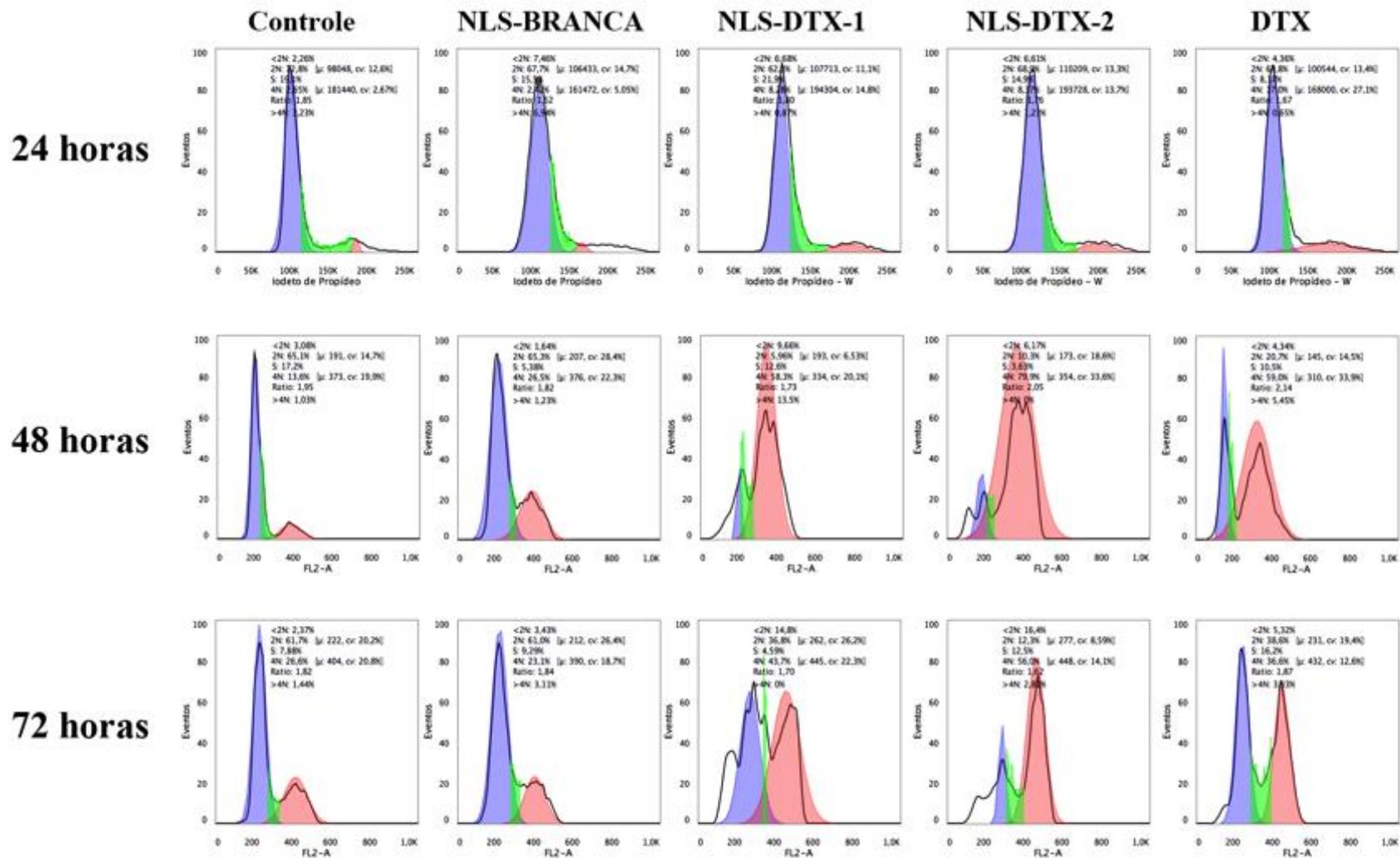


Figura 34 – As NLS-DTX impedem a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais de ovário em G2/M – Histogramas das fases do ciclo celular. A2780 foi tratada com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX (controle positivo) na concentração de 1µg/mL, com NLS-BRANCA no volume corresponde a NLS-DTX-1, ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo) por 24h, 48h e 72h. Após, as células foram marcadas com PI para análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Os histogramas correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes e mostra distribuição das células controle e tratadas nas diferentes fases do ciclo celular (Intensidade da fluorescência – FL2 x N° de células) nos tempos de 24, 48h e 72h. Fases: G1 (azul), S (verde), G2/M (vermelho).

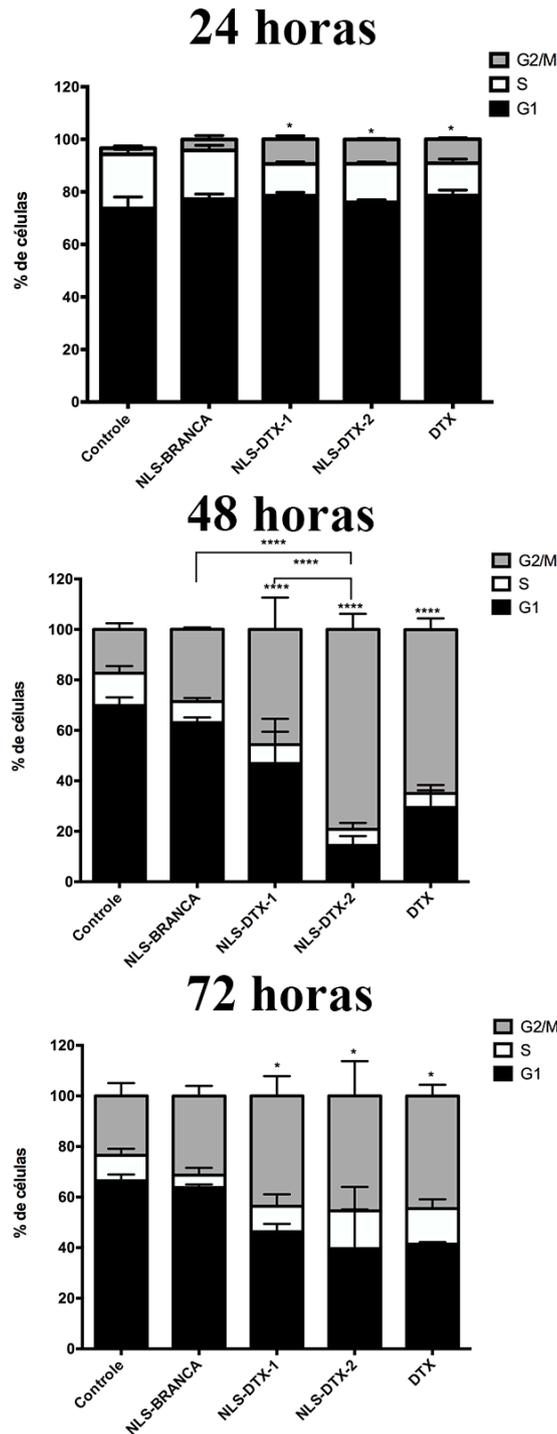


Figura 35 - As NLS-DTX impedem a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais de ovário em G2/M – % de células em cada fase do ciclo. A2780 foi tratada com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX (controle positivo) na concentração de 1µg/mL, com NLS-BRANCA no volume corresponde a NLS-DTX-1, ou não receberam nenhum tratamento por 24h, 48h e 72h. Após, as células foram marcadas com PI para análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Os dados representam três experimentos independentes (n=1) expressos como a porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular ± SEM, após 24, 48 e 72h de tratamento. *P<0.05 e ****P<0,0001 comparados ao controle não tratado.

5.9 Tipo de morte celular causada pelos tratamentos com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2

Para analisar o perfil de morte celular induzido pelas NLS-DTX, as células A2780 foram tratadas com cada uma das formulações e com o fármaco livre na concentração de 1 µg/mL por 72 horas e após esse período foram marcadas com Anexina-V e iodeto de propídio. Essa concentração foi escolhida porque ocasionou a morte de mais de 80% das células tratadas com as NLS-DTX e DTX.

A dose utilizada levou a morte 65% das células tratada com NLS-BRANCA, 88% tratadas com NLS-DTX-1, 97% com NLS-DXT-2 e 95% com DTX. Essa alta mortalidade condiz com os resultados de viabilidade (Figura 36). O perfil de morte dos tratamentos com docetaxel foram semelhantes, indicando a apoptose como tipo de morte celular prevalente na maioria das células.

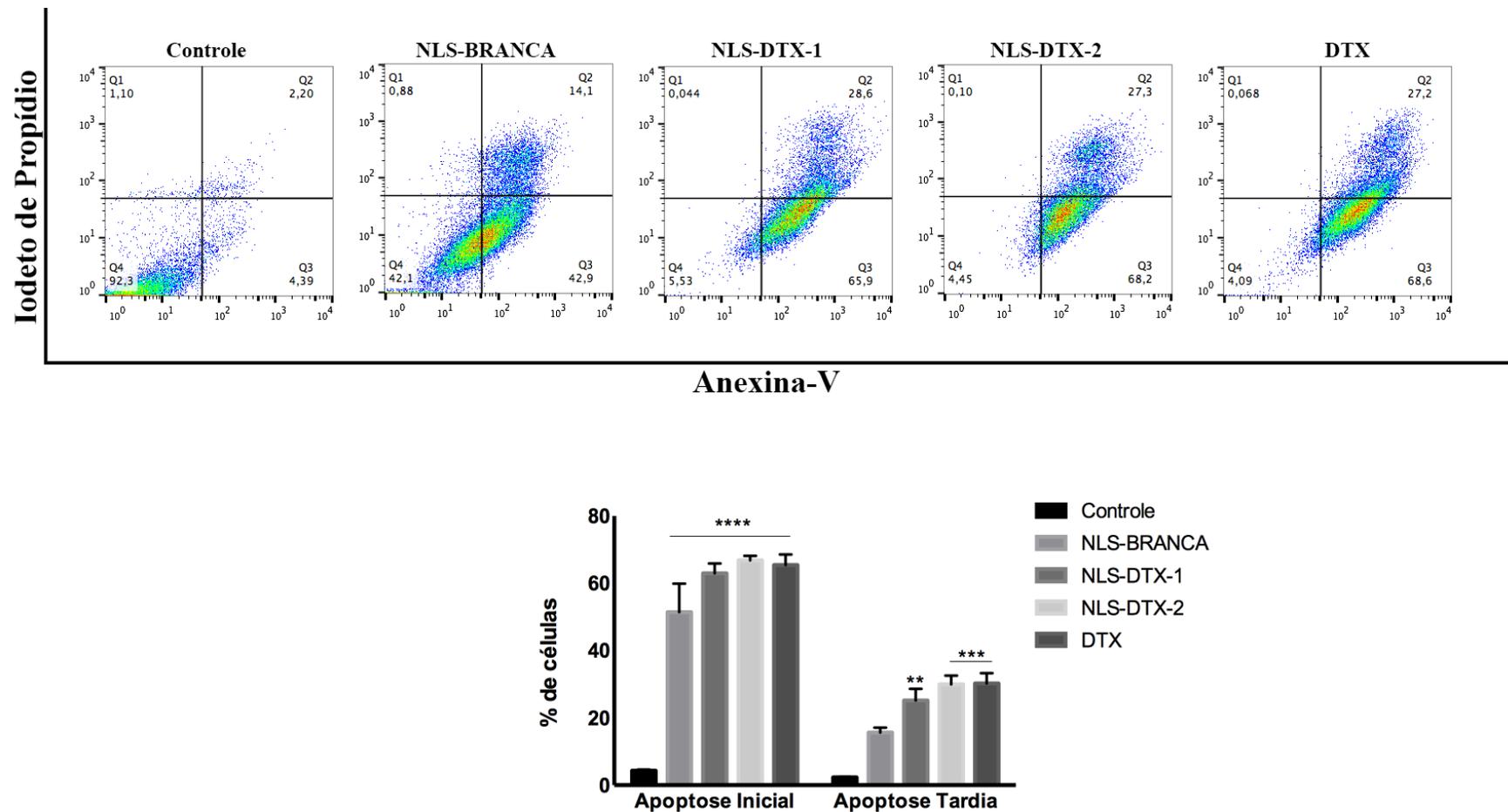


Figura 36 - Tratamento com as NLS-DTX induz a morte por apoptose em células tumorais de ovário. A linhagem A2780 foi tratada por 72h com NLS-DTX-1, NLS-DTX-2 e DTX (controle positivo) na concentração de 1µg/mL, com NLS-BRANCA no volume corresponde a NLS-DTX-1 ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo) e então foram analisadas usando citômetro de fluxo para marcação com Anexina-V conjugada a Alexa 680/FITC e Iodeto de Propídio (PI). Os dados representativos de um experimento independente são mostrados. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial, o superior direito às células em apoptose tardia e o superior esquerdo às células necróticas. O gráfico mostra a porcentagem de células em apoptose inicial ou tardia induzidas por 72h de tratamento como descrito acima. Os dados representam a média ± SEM de dois experimentos independentes, n=1. **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001 comparados ao controle não tratado.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi analisado *in vitro* algumas características biológicas de duas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao docetaxel em células tumorais de ovário A2780. Também foram estabelecidas duas linhagens resistentes a docetaxel derivada da linhagem A2780 e foi testado as NLS-DTX para avaliar a citotoxicidade nessas células. Os resultados obtidos evidenciam que a associação do docetaxel com o sistema de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS-DTX) não comprometeu a atividade citotóxica do mesmo. Assim como mostrado na literatura (CHO *et al.*, 2014), o fármaco manteve sua ação antimitótica por meio da hiperestabilização de microtúbulos comprometendo a progressão do ciclo celular e desencadeando o processo de apoptose.

Um dos maiores problemas enfrentados na quimioterapia utilizando o docetaxel é sua insolubilidade em água, sendo necessário utilizar solventes tóxicos para a sua solubilização e administração. A associação de docetaxel com nanossistemas vem se mostrando uma alternativa para melhorar a solubilidade do mesmo além de proteger o fármaco de degradações causadas pelos solventes, aumentar a biodisponibilidade na corrente sanguínea, promover o direcionamento do tratamento até o alvo e diminuir a toxicidade dos veículos utilizados para administrar o docetaxel (GALLEGO-YERGA *et al.*, 2017). O sistema de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como sistema de entrega de docetaxel é uma alternativa interessante por ser formado por componentes lipídicos que são fisiologicamente tolerados, além de ter o poder de solubilizar fármacos hidrofóbicos, como o docetaxel por exemplo, além de promover uma entrega controlada de fármaco (HRKACH *et al.*, 2012; ZHANG & ZHANG, 2013; CHO *et al.*, 2014).

O uso de medicamentos associados a NLS em células tumorais resistentes à multifármacos pela superexpressão de P-glicoproteína vem sendo amplamente estudado (CHOUDHURY *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). É sabido que os fármacos, quando ligados ou encapsulados a um nanossistema, evitam de ser expulsos do meio intracelular pelas bombas de efluxo, pois quando as moléculas quimioterápicas estão vinculadas ou encapsuladas passam a não ser fisicamente reconhecidas como substratos pelos sistemas de efluxo ABC (MARKMAN *et al.*, 2013). Pensando nisso, decidimos testar a citotoxicidade das NLS-DTX estudadas em células tumorais de ovário resistente MDR (A2780-MDR).

Para realizar essa avaliação, primeiro foi necessário estabelecer linhagens resistentes ao docetaxel pelo aumento da expressão de P-gp. Para isso foi feito o protocolo de transformação celular com o plasmídeo retroviral contendo o gene de P-gp, pHaMDR, de acordo com Pastan *et al.* (1988). Outra metodologia muito usada para o estabelecimento de resistência por aumento de P-gp em linhagens tumorais é a exposição contínua e com doses graduais de fármacos. Porém, já vêm sendo relatados que a resistência gerada por esse mecanismo é diferente ao tipo de resistência gerada pela inserção do gene MDR no genoma da células. A transdução com plasmídeos contendo MDR leva ao aumento da expressão de P-gp sem alterar outros comportamentos fisiológicos naturais das células, fato observado na metodologia de exposição gradual à fármacos (GOTTESMAN *et al.*, 2016). O objetivo desse procedimento é que A2780 passe a expressar uma quantidade maior de bombas de efluxo e tenha sua sensibilidade à docetaxel reduzida. Não foram encontrados na literatura outros estudos de transformação de A2780 com o plasmídeo pHaMDR, logo não foi possível comparar os resultados obtidos com nenhum outro estudo.

O processo de transformação da linhagem A2780 em A2780-MDR causou alteração na morfologia das células. As células A2780-MDR são aparentemente maiores e se organizam em colônias. Quando vistas por microscopia de luz é possível ver essas alterações, mas não é possível ter nitidez de como são as células A2780-MDR quando estão aglomeradas. Por microscopia eletrônica de varredura é visível o limite das células A2780-MDR e o tamanho aumentado em comparação à linhagem parental. A imunomarcagem de p-glicoproteína nas linhagens estudadas nos permitiu visualizar como a proteína está distribuída na membrana. Em A2780-MDR#3 as P-gp estão concentradas na região perinuclear como visto em A2780 e em MDR#2 elas estão espalhadas por toda a extensão da célula. A sensibilidade ao docetaxel das duas linhagens foi menor que a linhagem parental, visto que o IC₅₀ de DTX nessas células foi superior ao de A2780 em todos os tempos testados. Esse efeito é descrito por Pastan *et al* (1988) em outras linhagens transformadas com o plasmídeo pHaMDR.

As linhagens A2780-MDR mostraram diferenças entre si em relação a sensibilidade aos tratamentos. A A2780-MDR#2 teve mais sensibilidade ao etanol mesmo em concentrações baixas, fato não observado nas outras linhagens. Foi observado que a A2780-MDR#2 sofre redução da viabilidade em 24 horas, porém essa redução não continua em 48 horas, indicando que as células que sobreviveram ao tempo anterior não respondem mais ao tratamento. Em 72 horas, as células voltam a proliferar e apresentam viabilidade maior que os tempos anteriores. Esse perfil pode indicar que essas células quando tratadas tem uma expressão maior e mais rápida de P-gp do que as outras linhagens, fazendo com que o fármaco passe a ser expulso do citoplasma e as células voltem a proliferar. A linhagem A2780-MDR#3 teve menos sensibilidade ao docetaxel nos tempos de 24 e 48 horas quando comparadas a outra linhagem

transformada e a parental, e no tempo de 72 horas mesmo tendo uma redução alta da viabilidade a população sobrevivente é significativamente maior que a da A2780.

As formulações estudadas, NLS-DTX-1 e NLS-DXT-2, mostraram eficiência a partir das menores concentrações na linhagem de carcinoma de ovário A2780, semelhante ao controle positivo DTX. Comparando as duas entre si, as nanopartículas contendo 2 mg/mL de docetaxel (NLS-DTX-2) apresentaram melhor desempenho que a de 1 mg/mL (NLS-DTX-1), sendo mais citotóxicas já na menor concentração, além de ser necessário um volume duas vezes menor de formulação. Nas concentrações até 100 ng/mL, a toxicidade causada pelos componentes da formulação observada em NLS-BRANCA foi inferior a 30%, valor de citotoxicidade considerado tolerável para nanopartículas vazias (DOKTOROVOVA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2017). As formulações não foram tóxicas para a linhagem não tumoral (fibroblasto) nas faixas de concentrações em que se encontra o IC₅₀ das NLS-DXT em A2780, sugerindo que as NLS-DTX podem ter menos efeitos adversos quando colocadas em um sistema completo *in vivo* (DOKTOROVOVA *et al.*, 2014).

As NLS-DTX desenvolvidas pelo nosso grupo causaram morte das duas linhagens resistente obtidas, demonstrando assim o potencial dessas formulações em tratar resistência a multifármacos. Além da associação com as NLS proteger estruturalmente o docetaxel do efluxo promovido por P-gp, o surfactante pluronic utilizado na síntese dessas formulações tem ação inibidora de P-gp, auxiliando assim na citotoxicidade do sistema (MARKMAN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2107).

A ação NLS-DTX causa alterações na morfologia externa da célula A2780 e na organização do citoesqueleto semelhantes às visualizadas com o DTX. Esse fato já era esperado, pois o docetaxel se liga a β -tubulina, interferindo na dinâmica da

polimerização e despolimerização dos microtúbulos, causando danos ao citoesqueleto e deformando as células (MONTERO *et al.*, 2005; ZHANG & ZHANG, 2013; GALLEGO-YERGA *et al.*, 2017). As semelhanças nas alterações causadas pelos tratamentos com as NLS-DTX e com o fármaco livre indica que o agente causador de danos às células é o docetaxel presente nas nanopartículas e não outros reagentes que compõem a formulação, isso porque não houve alteração na morfologia e na organização do citoesqueleto das células tratadas com NLS-BRANCA.

Outra ação importante causada pelo tratamento com as NLS-DTX foi a redução drástica da capacidade clonogênica das células A2780, indicando que as células que sobreviveram à 24 horas de tratamento tiveram sua viabilidade reprodutiva reduzida. As células que foram capazes de aderir tiveram a proliferação menor que as tratadas com DTX, o que pode indicar que as células resistiram mais aos efeitos citotóxicos de DTX livre do que do encapsulado. Esse comportamento pode estar relacionado com a liberação controlada do fármaco quando associado à NLS, pois mesmo as células que resistiram ao tratamento podem ter internalizado as nanopartículas e morrendo após 24 horas, semelhante ao observado com outras nanoformulações (PEIRA *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2016).

A estabilização do citoesqueleto promovida pelo tratamento com as NLS-DTX levou ao aumento do número de células presas na fase G2/M do ciclo celular. Esse efeito já é bem descrito em docetaxel livre (MONTERO *et al.*, 2005; ZHANG & ZHANG, 2013), confirmando assim mais uma vez que as nanopartículas estudadas mantiveram a atividade do docetaxel. A interrupção da dinâmica dos microtúbulos causa o aprisionamento das células em G2/M e impede a progressão do ciclo no ponto de checagem da mitose, pois a célula não é capaz de formar fusos mitóticos. A

incapacidade de formar fusos mitóticos leva a célula a ficar aprisionada em G2/M e posteriormente entrar em apoptose (DUMONTET & SIKIC,1999; DUBEY *et al.*, 2015). Foi visto que o número de células paradas no ciclo foi maior em 48 horas do que em 72 horas, demonstrando que grande parte das células com o ciclo prejudicado iniciaram o processo de morte celular após 48 horas. Quando realizado o ensaio de determinação do tipo de morte celular, houve indícios que a grande maioria das células morreram por apoptose.

Resumindo, os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que as formulações NLS-DTX foram citotóxicas em células tumorais de ovário sensíveis assim como nas resistentes estabelecidas (A2780-MDR). O fármaco manteve sua atividade antimitótica através da estabilização dos microtúbulos, levando ao aumento de células retidas em G2/M no ciclo celular e consequente morte celular através de apoptose.

7. CONCLUSÃO

Com os dados e informações obtidas com esse trabalho foi possível concluir:

- As nanopartículas lipídicas sólidas compostas pelo lipídio sólido behenato de glicerila (Compritol® 888. ATO), surfactantes sorbitano 80 (Span®80) e poloxâmero (Pluronic P127®) associadas à docetaxel mostraram citotoxicidade em concentrações menores que 1 µg/mL em células tumorais de ovário A2780.
- O fármaco manteve sua atividade antimitótica devido a estabilização dos microtúbulos, levando ao aumento de células retidas em G2/M no ciclo celular e consequente morte celular possivelmente por apoptose.
- As células A2780 quando transformadas com o plasmídeo pHaMDR apresentaram alteração na morfologia e redução da sensibilidade à docetaxel.

- As NLS-DTX tiveram citotoxicidade em células tumorais de ovário resistentes devido a superexpressão de p-glicoproteína.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade desse trabalho são:

1. Verificar se as NLS-DTX são eficientes para outros tipos de tumores, podendo assim ampliar o espectro de ação desse sistema.
2. Avaliar os níveis de expressão de p-glicoproteína nas linhagens transformadas A2780-MDR afim de confirmar se a transdução com pHaMDR está causando superexpressão de P-gp.
3. Analisar os efeitos de NLS-DTX no tratamento do tumor de ovário *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABBASALIPOURKABIRREH, R. *et al.* Cytotoxicity effect of solid lipid nanoparticle on human breast cancer cell lines. **Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 528-533, 2011.
- 2- ABDALLAH, H.M. *et al.* P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 1, p. 45-62, 2015.
- 3- AHMAD, G. *et al.* Nanoemulsion formulation of a novel taxoid DHA-SBT-1214 inhibits prostate cancer stem cell-induced tumor growth. **Cancer letters**, v. 406, p. 71-80, 2017.

- 4- ALEX, M.R.A. *et al.*. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 11-18, 2011.
- 5- ANWAR, A. *et al.* Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: a novel drug delivery system. **IET Nanobiotechnology**, v. 11, n. 6, p. 621-629, 2017.
- 6- ANNOVAZZI, L. *et al.* Solid lipid nanoparticles loaded with antitumor lipophilic prodrugs aimed to glioblastoma treatment: preliminary studies on cultured cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, n. 5, p. 3606-3614, 2017.
- 7- AUNE, D. *et al.* Anthropometric factors and ovarian cancer risk: A systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 8, p. 1888-1898, 2015.
- 8- BAHARI, L.A.S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; a comparative literature review. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143, 2016.
- 9- BARENHOLZ, Y. C. Doxil® - the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of controlled release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.
- 10- BARRETT, J.C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen riskassessment. **Environmental health perspectives**, v. 100, p. 9-20, 1993.
- 11- BERGH, M. *et al.* Contact allergenic activity of Tween® 80 before and after air exposure. **Contact dermatitis**, v. 37, n. 1, p. 9-18, 1997.
- 12- CAIRNS, R.A.; MAK, T.W. The current state of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 613-614, 2016.

- 13- CHEN, M. *et al.* Synthesis and anticancer activity of novel quinoline–docetaxel analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 13, p. 2867-2870, 2014.
- 14- CHEN, V.W. *et al.* Pathology and classification of ovarian tumors. **Cancer**, v. 97, n. S10, p. 2631-2642, 2003.
- 15- CHEN, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer letters**, v. 370, n. 1, p. 153-164, 2016.
- 16- CHO K.R., SHIH I-M. Ovarian Cancer. **Annual review of pathology**, v. 4, p.287-313, 2009.
- 17- CHO, E. K. *et al.* . Open-label, randomized, single-dose, crossover study to evaluate the pharmacokinetics and safety differences between two docetaxel products, CKD-810 and Taxotere injection, in patients with advanced solid cancer. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 9-16, 2014.
- 18- CHO, H. J. *et al.* . Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 495, 2014.
- 19- CHOI, Y-J. *et al.* Differential Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles in Human Ovarian Cancer Cells and Ovarian Cancer Stem Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, p. 2077, 2016.
- 20- CHOWDHURY, P. *et al.* Pluronic Nanotechnology for Overcoming Drug Resistance. In: **Bioactivity of Engineered Nanoparticles**. Springer, Singapore, 2017. p. 207-237.
- 21- CHU, K.S. *et al.* Plasma, tumor and tissue pharmacokinetics of Docetaxel delivered via nanoparticles of different sizes and shapes in mice bearing SKOV-

- 3 human ovarian carcinoma xenograft. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 5, p. 686-693, 2013.
- 22- COSTI, M.P.; GREEN, J.A.; FERRARI, S. Ovarian Cancer Drug Resistance. In: Encyclopedia of Cancer. **Springer Berlin Heidelberg**, 2011. p. 2683-2686.
- 23- CLARKE, S.J.; RIVORY, L.P. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, n. 2, p. 99-114, 1999.
- 24- DARAEI, H. *et al.* Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410-422, 2016.
- 25- DECHERNEY, A.H. *et al.* *Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology*. 11 ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2016
- 26- DESANTIS, C.E. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252-271, 2014.
- 27- DESHPANDE, A. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges. In: **Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices**. 2017. p. 291-330.
- 28- DOKTOROVOVA, S. *et al.* Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—a systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 1-18, 2014.
- 29- DOLATABADI, J.E.N; VALIZADEH, H.; HAMISHEHKAR, H. Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: recent breakthroughs. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 2, p. 151, 2015.
- 30- DONG, X. *et al.* Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. **Cancer research**, v. 69, n. 9, p. 3918-3926, 2009.

- 31- DONG, X.; MUMPER, R.J. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. **Nanomedicine**, v. 5, n. 4, p. 597-615, 2010.
- 32- DUBEAU, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. **The lancet oncology**, v. 9, n. 12, p. 1191-1197, 2008.
- 33- DUBEY, J.; RATNAKARAN, N.; KOUSHIKA, S.P. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 343, 2015.
- 34- DUMONTET, C.; SIKIC, Branimir I. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 1061-1061, 1999.
- 35- ELLISON, L.M. *et al.* Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 86, 2017.
- 36- FLAVAHAN, W.A. *et al.* Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 110, 2016.
- 37- GALLEGO-YERGA, L. *et al.* Docetaxel-Loaded Nanoparticles Assembled from β -Cyclodextrin/Calixarene Giant Surfactants: Physicochemical Properties and Cytotoxic Effect in Prostate Cancer and Glioblastoma Cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 249, 2017.
- 38- GHARIBVAND, L. *et al.* The association between ambient fine particulate matter and incident adenocarcinoma subtype of lung cancer. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 71, 2017.
- 39- GORAIN, B. *et al.* Comparative biodistribution and safety profiling of olmesartan medoxomil oil-in-water oral nanoemulsion. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 20-31, 2016.

- 40- GOTTESMAN, M. M. *et al.* Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 56, p. 85-102, 2016.
- 41- GUO, B. *et al.* Potent killing of paclitaxel-and doxorubicin-resistant breast cancer cells by calphostin C accompanied by cytoplasmic vacuolization. **Breast cancer research and treatment**, v. 82, n. 2, p. 125-141, 2003.
- 42- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 3, p.57-70, 2000.
- 43- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- 44- HEITZ, A. E. *et al.* Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality. **Breast cancer research and treatment**, p. 1-11, 2017.
- 45- HEMBRUFF, S. L. *et al.* Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 318, 2008.
- 46- HENDRIKX, J.M.A.*et al.* Ritonavir inhibits intratumoral docetaxel metabolism and enhances docetaxel antitumor activity in an immunocompetent mouse breast cancer model. **International journal of cancer**, v. 138, n. 3, p. 758-769, 2016.
- 47- HOFFMAN, B. *et al.* *Ginecologia de Williams*. 2. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2014.
- 48- HRKACH, J. *et al.* Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. **Science translational medicine**, v. 4, n. 128, p. 128ra39-128ra39, 2012.
- 49- HU, L.D.; TANG, X.; CUI, F.D. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1527-1535, 2004.

- 50- INCA. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018-v11.pdf>
- 51- JAHANGIRIAN, H. *et al.* A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2957, 2017.
- 52- JAYSON, G. C. *et al.* Ovarian cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1376-1388, 2014.
- 53- KAPSE-MISTRY, S. *et al.* Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 159, 2014.
- 54- KATHAWALA, R.J. *et al.* The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. **Drug Resistance Updates**, v. 18, p. 1-17, 2015.
- 55- LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **European journal of cancer prevention**, v. 26, n. 1, p. 55-62, 2017.
- 56- LAUBY-SECRETAN, B. *et al.* Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.
- 57- LI, X. *et al.* Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein in vitro and in vivo: Herb–drug interactions mediated via P-gp. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 275, n. 2, p. 163-175, 2014.
- 58- LIN, C-H. *et al.* Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipidic nanoparticles as the carriers. **Journal of food and drug analysis**. v. 25, n. 2, p. 219-234, 2017

- 59-MARKMAN, J.L. *et al.* Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13, p. 1866-1879, 2013.
- 60-MATZ, M. *et al.* The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). **Gynecologic oncology**, v. 144, n. 2, p. 405-413, 2017.
- 61-MCCREERY, M.Q.; BALMAIN, A. Chemical Carcinogenesis Models of Cancer: Back to the Future. **Annual Review**, 2017.
- 62-MISHRA, P.K. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug discovery today**, 2017.
- 63-MONTERO, A. *et al.* Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **The lancet oncology**, v. 6, n. 4, p. 229-239, 2005.
- 64-MOSALLAEI, N. *et al.* Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization, in vitro, and in vivo evaluations. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 102, n. 6, p. 1994-2004, 2013.
- 65-NABHOLTZ, J-M. *et al.* Prospective randomized trial of docetaxel versus mitomycin plus vinblastine in patients with metastatic breast cancer progressing despite previous anthracycline-containing chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1413-1413, 1999.
- 66-NARVEKAR, M. *et al.* Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs—barriers of translation and solutions. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 822-833, 2014.
- 67-NIK, N. N. *et al.* Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 27-45, 2014.

- 68- NG, A.; BARKER, N. Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 10, p. 625-638, 2015.
- 69- OH, K.S. *et al.* Docetaxel-loaded multilayer nanoparticles with nanodroplets for cancer therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 1077, 2016.
- 70- OUYANG, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.
- 71- OZA, A.M. *et al.* . Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 8, p. 928-936, 2015.
- 72- PASTAN, I. *et al.* A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 12, p. 4486-4490, 1988.
- 73- PATCH, A-M. *et al.* . Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 489-494, 2015.
- 74- PAWAR, H. *et al.* Folic acid functionalized long-circulating co-encapsulated docetaxel and curcumin solid lipid nanoparticles: In vitro evaluation, pharmacokinetic and biodistribution in rats. **Drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 1453-1468, 2016.
- 75- PEIRA, E. *et al.* Solid lipid nanoparticles carrying lipophilic derivatives of doxorubicin: preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity studies. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 4, p. 381-390, 2016.

- 76-PÉRES-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.
- 77-ROSEN, D.G. *et al.* Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 14, p. 2089, 2009.
- 78-SAFARI, J.& ZARNEGAR, Z. **Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design A Review**. J. Saudi Chem. Soc.v. 18, p. 85-99, 2014.
- 79-SHAABAN, A.M. *et al.* Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features. **Radiographics**, v. 34, n. 3, p. 777-801, 2014.
- 80-SHI, L-L. *et al.* Positively Charged Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles Promote the Intestinal Transport of Docetaxel through Multifunctional Mechanisms in Rats. **Molecular pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 2667-2676, 2016.
- 81-SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 104-117, 2014.
- 82-SORRENTINO, A. *et al.*. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. **Gynecologic oncology**, v. 111, n. 3, p. 478-486, 2008.
- 83-STEWART, C. J. R. *et al.* Value of Pathology Review in a Population-based Series of Ovarian Tumors. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 36, n. 4, p. 377-385, 2017.

- 84- SUN, X. *et al.* Pharmacokinetic effects of curcumin on docetaxel mediated by OATP1B1, OATP1B3 and CYP450s. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 31, n. 4, p. 269-275, 2016.
- 85- TIPS, G. R. E.; TIPS, TOEFL; PHARMA, M. B. A. Novel drug delivery approaches to bypass P-glycoprotein efflux pump. 2011.
- 86- TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.65, p. 87–108, 2015.
- 87- TSILIDIS, K. K. *et al.* . Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **British journal of cancer**, v. 105, n. 9, p. 1436-1442, 2011.
- 88- TURAKOVA, K. *et al.* Reduced UDP-glucose Levels Are Associated with P-glycoprotein Over-expression in L1210 Cells and Limit Glucosylceramide Synthase Activity. **Anticancer research**, v. 35, n. 5, p. 2627-2634, 2015.
- 89- United States of America (USA), National Institutes of Health (NIH). Genetic testing for hereditary cancer syndromes (2013).
- 90- URIEN, S. *et al.* Docetaxel serum protein binding with high affinity to alpha 1-acid glycoprotein. **Investigational new drugs**, v. 14, n. 2, p. 147-151, 1996.
- 91- VARSHOSAZ, J. *et al.* Poly (Butylene Adipate-Co-Butylene Terephthalate) Nanoparticles Prepared by Electrospraying Technique for Docetaxel Delivery in Ovarian Cancer Induced Mice. **Drug development and industrial pharmacy**, n. just-accepted, p. 1-37, 2018.
- 92- WANG, F. *et al.* Hyaluronic acid decorated pluronic p85 solid lipid nanoparticles as a potential carrier to overcome multidrug resistance in cervical and breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 595-604, 2017.

- 93- WANG, L. *et al.* Monoclonal antibody targeting MUC1 and increasing sensitivity to docetaxel as a novel strategy in treating human epithelial ovarian cancer. **Cancer letters**, v. 300, n. 2, p. 122-133, 2011.
- 94- WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90-99, 2010.
- 95- WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, p. 3-14, 2017.
- 96- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.
- 97- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer and Figures 2016**.
Disponível em: <http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html>
- 98- YANG, Y. *et al.* Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 279-289, 2017.
- 99- YIN, F. *et al.* Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer (review). **Oncology reports**, v. 30, n. 1, p. 3-10, 2013.
- 100- YU, M. *et al.* Transcriptional regulation of the proto- oncogene Zfp521 by SPI1 (PU. 1) and HOXC13. **genesis**, v. 54, n. 10, p. 519-533, 2016.
- 101- ZHANG, L.; ZHANG, N. How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 2927-2941, 2013.
- 102- ZHANG, P. *et al.* Pharmacokinetics in rats and efficacy in murine ovarian cancer model for solid lipid nanoparticles loading docetaxel. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 10, n. 11, p. 7541-7544, 2010.

103- ZHAO, P.; ASTRUC, D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. **ChemMedChem**, v. 7, n. 6, p. 952-972, 2012.