



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ENTREGA DE
4-NEROLIDILCATECOL BASEADO EM LIPOSSOMOS ELASTICOS COMO
POTENCIAL TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluno: Sabrina Cristina Guedes

Orientadora: Prof^a Dr^a Thaise Goncalves de Araújo

Coorientadora: Prof^a Dr^a Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

UBERLÂNDIA - MG

2023



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ENTREGA DE
4-NEROLIDILCATECOL BASEADO EM LIPOSSOMOS ELASTICOS COMO
POTENCIAL TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: Sabrina Cristina Guedes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Lúgia Nunes de Moraes Ribeiro

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).

UBERLÂNDIA - MG

2023



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G924 Guedes, Sabrina Cristina, 1996-
2023 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ENTREGA DE 4-
NEROLIDILCATECOL BASEADO EM LIPOSSOMOS ELASTICOS COMO
POTENCIAL TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER DE PRÓSTATA
[recurso eletrônico] / Sabrina Cristina Guedes. - 2023.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.
Coorientadora: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.531>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-,
(Orient.). II. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes, 1986-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Trinta de outubro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	09:30
Matrícula do Discente:	12122GBI003				
Nome do Discente:	Sabrina Cristina Guedes				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de um sistema de entrega de 4-nerolidilcatecol baseado em lipossomos elásticos como potencial tratamento contra o câncer de próstata.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de plataformas nanoteranósticas para neoplasias malignas.				

Aos trinta dias do mês de outubro de dois mil e vinte e três, às 09:00h, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Thaise Gonçalves de Araújo (Orientadora), Ludmilla David de Moura e Vivian Alonso Goulart. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Thaise Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação

pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ludmilla David de Moura, Usuário Externo**, em 30/10/2023, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/10/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/10/2023, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4869661** e o código CRC **E7CC73EC**.

Referência: Processo nº 23117.071233/2023-80

SEI nº 4869661



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Dedico este trabalho às pessoas que lutam contra o câncer de próstata, suas famílias e entes queridos, como um tributo à sua coragem e um lembrete de que não estão sozinhos nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor da minha vida, por ter me guiado e sustentado com saúde e determinação ao longo dessa caminhada, derramando graça sobre graça todos os dias na minha vida.

Aos meus pais Edivannia e Giovani, grandes incentivadores e facilitadores dos meus sonhos, obrigada por todo exemplo de determinação, cuidado e pelas orações diárias que me sustentam todos os dias, Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, companheiros de vida, Fellipe e Camila, Epelo apoio incondicional mesmo a distância. Sou muito grata a Deus por ter vocês na minha vida!

Ao meu namorado Alex, pela compreensão, por todo apoio e incentivo mesmo a distância.

À minha família, meus avós, tios e primos, por todo apoio pelos bons momentos que compartilhamos juntos!

Aos meus incríveis amigos que me incentivaram e fizeram essa caminhada mais leve! Minha eterna Gratidão!

À 12º IPB de Uberlândia em especial ao pastor Adilson e a Wânia, por terem me acolhido tão bem quando cheguei em Uberlândia, e por todo incentivo e orações ao longo desses anos.

Agradeço a minha orientadora Thaise pela confiança e oportunidade de desenvolver esse trabalho e pelos inúmeros ensinamentos.

À minha coorientadora Ligia por todo apoio e disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, em especial a Letícia, Lucas, Ruan e Samuel por toda ajuda, e acolhimento nos dias difíceis e por todas as risadas! Vocês foram essenciais nessa caminhada!

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia/IBTEC/UFU, em especial as servidoras Luciana e Natássia, por todo apoio e disponibilidade.

Ao Laboratório de Incubação de Aves (LIAVE) e Simone por toda ajuda e disponibilidade.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo financiamento.

E a todos aqueles que diretamente ou indiretamente cooperaram para esse processo, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	8
CAPÍTULO I - Fundamentação Teórica.....	9
1. Câncer: aspectos gerais e dados epidemiológicos	10
2. Aspectos histológicos da próstata e o desenvolvimento de tumores	14
3. Câncer de próstata resistente à castração: características e mecanismos.....	17
4. Abordagens Terapêuticas e Desafios no Tratamento do Câncer de Próstata	20
5. Abordagens com produtos naturais no tratamento do câncer de próstata: eficácia e desafios	24
6. Nanoformulações e produtos naturais: uma perspectiva integrada para o desenvolvimento de terapias eficazes	26
7. Aplicação de modelos animais em experimentação <i>in vivo</i>	29
8. Considerações Finais.....	31
CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES HÍBRIDAS NATURAIS COMPOSTAS POR LIPOSSOMAS, BIOSURFACTANTES E 4- NEROLIDILCATHECOL	33
RESUMO	34
1. Preparo das formulações híbridas	47
2. Caracterização biofísica e acompanhamento da estabilidade físico-química das formulações	48
3. Morfologia das nanopartículas	50
4. Cultivo celular e avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> das formulações lipossomais	50
5. Estudos <i>in vivo</i> de nanotoxicidade em modelo de embrião de galinha	53
6. Avaliação da eficácia antitumoral da formulação em modelo <i>in vivo</i> de embrião de galinha	55
7. Avaliações histopatológicas dos tumores	57
BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.....	59
REFERÊNCIAS.....	75

APRESENTAÇÃO

O câncer de próstata é uma das doenças mais prevalentes e letais em todo o mundo. Sua incidência é crescente, sendo uma nítida ameaça ao aumento da expectativa de vida dos homens. A elevada taxa de mortalidade, especialmente em casos de câncer de próstata resistente à castração, a carência de terapias específicas e a falta de marcadores para a avaliação e determinação do avanço da doença constituem obstáculos substanciais na busca por tratamentos eficazes e prognósticos otimistas.

Nesse contexto, o emprego da nanotecnologia, com o desenvolvimento de formulações lipossomais, abre novos caminhos na busca por agentes antitumorais, superando as limitações das abordagens convencionais. Lipossomos podem ser carreadores eficientes não somente para compostos químicos, mas também para produtos naturais. O encapsulamento garante uma entrega ao local do tumor, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos colaterais indesejados. Além disso, supera os desafios relacionados a produtos naturais, como a baixa estabilidade, restrita absorção e biodistribuição e rápido metabolismo e excreção.

O Capítulo 1 deste estudo apresenta seu referencial teórico, com informações relevantes que abordam as complexidades histológicas e moleculares do câncer de próstata, discute a limitação dos tratamentos convencionais e ressalta a necessidade de abordagens alternativas, sobretudo para o câncer de próstata resistente à castração. Evidenciando o grande potencial e versatilidades dos compostos naturais no tratamento do câncer, explorando, assim, o conceito de encapsulamento dessas substâncias, em conchavo com nanoformulações lipossomais.

Já o Capítulo 2 refere-se à patente desenvolvida, com a obtenção de formulações híbridas naturais compostas por lipossomas elásticos a base de 4-Nerolidilcatecol e biossurfactantes glicosídeos, testado em linhagem de câncer de próstata e em modelo *in vivo* de embriões de galinha. Essa dissertação, contextualizada nos problemas enfrentados na oncologia, apresenta uma nanoformulação inovadora, estando, portanto, em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (ODS), em especial ODS3 e ODS 10.

CAPÍTULO I - Fundamentação Teórica

1. Câncer: aspectos gerais e dados epidemiológicos

Câncer é um termo abrangente que engloba uma ampla gama de condições patológicas, em que células transformadas são capazes de proliferar descontroladamente e afetar diferentes regiões do corpo (OPAS/OMS). Nesse contexto, uma característica da malignidade é a rápida multiplicação de células anômalas para além de seus limites convencionais, infiltrando estruturas corporais adjacentes e propagando-se para órgãos distantes, em um processo denominado metástase. Esta é a principal causa de óbito relacionada a tumores (Strmiska et al., 2019).

O câncer é uma doença de caráter genético em que fatores intrínsecos e ambientais estão conectados à sua etiologia. Além disso, diferentes características são descritas como associadas ao seu desenvolvimento e progressão e podem ser adquiridas pelas células durante a transição de um estado normal para maligno (Lewandowska et al., 2019). De acordo com Hannahan, (2020), esses aspectos são: sinalização proliferativa sustentada, bloqueio de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, angiogênese, ativação de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e evasão da destruição imunológica. Além disso, processos facilitadores como a instabilidade genômica e a inflamação também desempenham um papel fundamental nos mecanismos celulares que levam à formação e evolução das células malignas, contribuindo para a complexidade da patogênese do câncer. Por fim, o desbloqueio da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética e os microbiomas foram incorporados pelos autores na dinâmica tumoral e estudos dedicados a essas características têm se destacado na literatura científica.

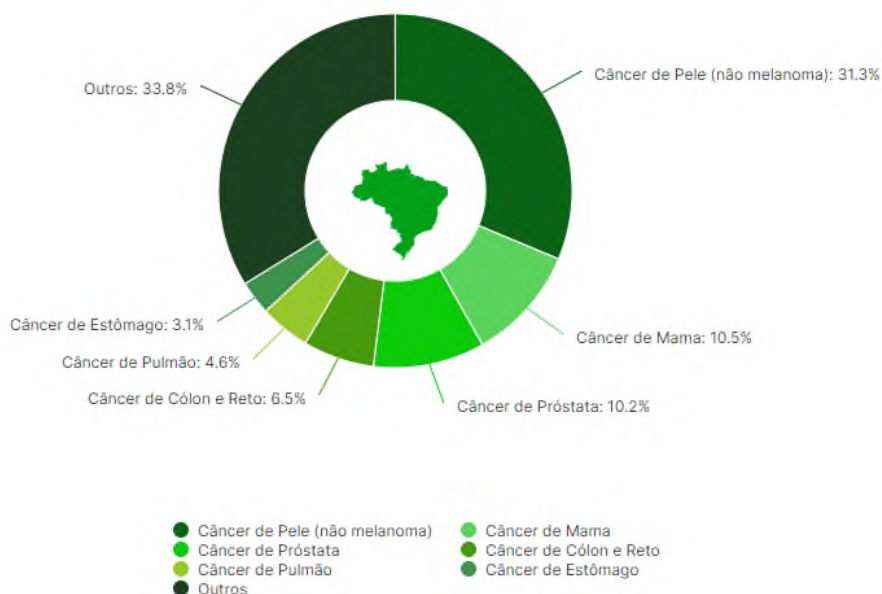
Apesar dos consideráveis avanços nos métodos de detecção e de tratamento das neoplasias malignas, o crescente número de casos e mortes desafiam a saúde pública (OMS, 2020). De fato, o câncer representa um importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo e figura como a principal ou a segunda causa de óbitos antes dos 70 anos (Siegel et al., 2023; Sung et al., 2021). De acordo com os dados da International Agency for Research on

Cancer (IARC, 2020), foram registrados, globalmente, 18,1 milhões de novos casos de câncer no ano de 2020 (excluindo o câncer de pele não melanoma). Esses números refletem o envelhecimento demográfico, o aumento populacional, a exposição a poluentes ambientais, as mudanças no perfil comportamental (prática de exercícios, dieta e recreação) e as diferenças socioeconômicas (Wild et al; 2020; Miller, 2022). Nos países com elevado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), por exemplo, iniciativas de combate à doença que envolvem a implementação eficaz de medidas de prevenção, detecção e tratamento contribuem para o diagnóstico precoce e cura. Em contrapartida, em nações com desenvolvimento humano médio ou baixo, os números são preocupantes e o desafio reside em otimizar o uso de recursos e esforços a fim de aprimorar o controle da doença de maneira mais efetiva (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME 2022; Ferlay et al., 2021).

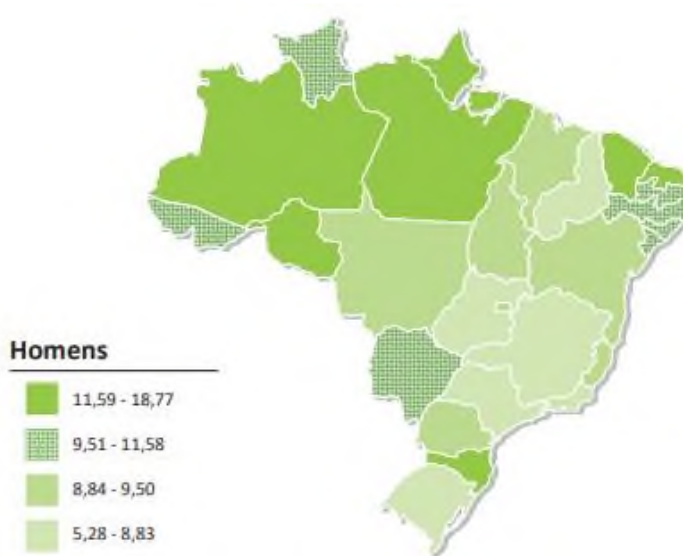
No Brasil, a previsão para o período entre 2023 e 2025 indica a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer, sendo 483 mil quando excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Notavelmente, cerca de 70% dos diagnósticos estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste. Dentre estas, a região Sudeste abriga metade dos pacientes (Santos et al., 2023). Globalmente, o Câncer de Próstata (CaP) ocupa o quarto lugar em termos de incidência, compreendendo 7,3% do total de casos em toda a população e 15,4% em indivíduos do sexo masculino (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021). Para o triênio de 2023 a 2025, estima-se aproximadamente 71.730 novos casos de CaP no Brasil, o que equivale a 67,86 novos diagnósticos a cada 100 mil homens, sendo o câncer mais incidente nesse grupo no país e em todas as regiões brasileiras, como representado graficamente pela Figura 1 (Santos et al., 2023).

Figura 1- Representação gráfica de dados epidemiológicos para a incidência de câncer de próstata no Brasil previsto para o ano de 2023. Na parte A está representada a estimativa em porcentagem de novos casos previstos para os tipos de câncer mais prevalentes no território nacional. Na parte B as taxas de incidência do câncer de próstata para cada 100 mil homens, de acordo com a Unidade da Federação.

A



B



Fonte: Adaptado de Santos et al., 2023

O CaP é predominantemente caracterizado como uma doença que afeta indivíduos idosos. Esse fato é corroborado por números, em que 75% dos homens são diagnosticados, em todo o mundo, a partir de 65 anos de idade (Wild et al., 2020). Portanto, a idade é um fator de risco estabelecido. Além disso, a história familiar desempenha um papel significativo, de modo que ter parentes afetados, especialmente de primeiro grau, aumenta consideravelmente as chances de

desenvolver a doença. Irmãos e filhos de homens com CaP apresentam um risco cerca de 2,5 vezes maior de também serem diagnosticados (Johns; Houlston, 2003; Carlsson; Vickers, 2020). Interessantemente, o CaP apresenta uma alta herdabilidade, estimada em 58%, em comparação a outros tipos de cânceres graves (Mucci et al., 2016). As duas variantes genéticas mais frequentes que conferem susceptibilidade autossômica dominante estão ligadas às mutações nos genes *HOXB13* (do inglês, *Homeobox B13*) e *BRCA2* (do inglês, *Breast cancer gene 2*) (Nyberg et al., 2021). No entanto, é importante notar que essas mutações são relativamente raras na população geral, ocorrendo em cerca de 0,3% dos indivíduos (Karlsson et al., 2021). Mutações nos genes *ATM* (do inglês, *Ataxia telangiectasia mutated*), *CHEK2* (do inglês, *Cell cycle checkpoint kinase 2*), *NBS1* (do inglês, *Nijmegen breakage syndrome protein 1*) também têm sido descritas e relacionadas a casos graves da doença, com prevalência de 10 a 20% (Bancroft et al., 2021; Shi et al., 2021).

Considerando que a população apresenta diferentes perfis mutacionais, a raça e a etnia também são fatores de risco (Rebbeck, 2007). Apesar das descobertas, os testes genéticos e orientações clínicas relacionados à predisposição e herdabilidade ainda não são amplamente praticados, evidenciando a necessidade de se intensificar as investigações para a compreensão molecular do CaP e seus desfechos clínicos (Brook et al., 2023).

Por fim, é crucial considerar os fatores de risco que podem ser alterados, como os hábitos pessoais, incluindo o sedentarismo, o consumo excessivo de gorduras animais e a baixa ingestão de frutas, vegetais e vitaminas. Assim, certos comportamentos, como a alteração na dieta e a prática regular de exercícios físicos, apresentam um papel fundamental na prevenção do CaP ao auxiliar, dentre outros fatores, no controle da glicemia e da obesidade (Zuniga et al., 2020). Estudos conduzidos por Oczkowski e colaboradores (2021) demonstraram que o consumo elevado de vegetais, frutas, peixes e alimentos integrais tem efeitos protetores ou terapêuticos relacionados a compostos bioativos como flavonoides, estilbenos e licopeno. Dietas baseadas em alimentos minimamente processados podem ser benéficas para o metabolismo da próstata ao inibir todas as etapas da carcinogênese. Ademais, a presença de processos inflamatórios crônicos e a

possível exposição a produtos químicos e radiações ionizantes conduzem ao surgimento do CaP (Bergengren et al., 2023; Rawla, 2019)

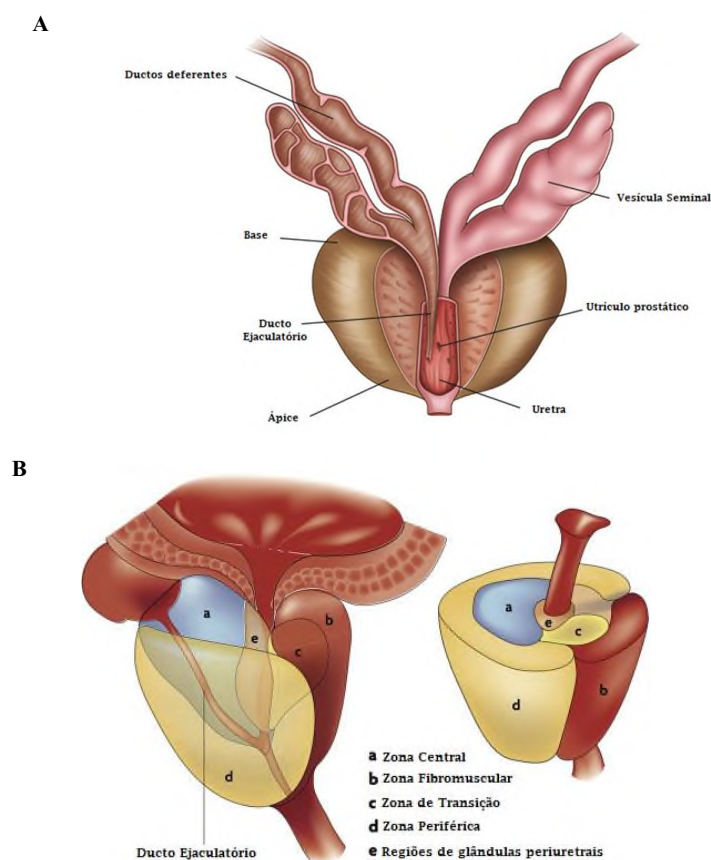
2. Aspectos histológicos da próstata e o desenvolvimento de tumores

A próstata é uma glândula acessória essencial do sistema reprodutor masculino e que desempenha um papel multifacetado. Assim, o estudo de sua anatomia e biologia é essencial para compreender sua funcionalidade e as nuances das diferentes patologias que podem acometê-la (Figura 2). A próstata é composta por elementos glandulares e estromais, os quais se unem firmemente em uma estrutura chamada pseudocápsula. A cápsula prostática é composta internamente por músculo liso, enquanto externamente é envolta por colágeno, apresentando um comprimento médio de, aproximadamente, 3 cm. (Paner, 2010; Van de Graaff, 2003). Situada estrategicamente, o órgão ocupa um espaço posterior à porção inferior da sínfise púbica e anterior ao reto, encontrando-se abaixo da bexiga urinária. Sua forma, frequentemente comparada a uma noz, é, na realidade, cônica, envolvendo a uretra proximal conforme emerge da bexiga urinária (Bhavsar; Verma, 2014). O ponto mais alto dessa estrutura piramidal é conhecido como ápice da próstata, o qual entra em contato direto com a uretra peniana, sendo este o canal que transporta tanto a urina quanto o esperma para o exterior. Por outro lado, a base da próstata, situada em seu ponto mais amplo, mantém uma conexão próxima com a bexiga. Nesse local estão localizadas as vesículas seminais, elementos vitais para o sistema reprodutivo masculino, posicionadas bilateralmente para facilitar o transporte e o armazenamento do esperma (Figura 2A) (Paner, 2010; Ferreira, 2011; Reeves et al., 2016).

Uma próstata saudável possui aproximadamente 15 a 20 gramas. Essa informação é extremamente relevante tanto para avaliações clínicas quanto para estudos comparativos referentes à saúde do órgão, cuja drenagem linfática é realizada pelos gânglios ilíacos internos (Ferreira, 2011; Lee et al., 2011; Paner, 2010). Adicionalmente, a próstata humana é dividida em zonas periférica, de transição e central, como indicado na Figura 2B. Essa segmentação histológica é de fundamental importância para a compreensão dos fundamentos de diversas

condições prostáticas e orienta tanto os diagnósticos quanto as abordagens terapêuticas. A zona periférica representa cerca de 70% do tecido glandular e circunda a parte externa do órgão, estendendo-se da base ao ápice, circundando a uretra distal. Nessa zona é mais comum serem detectados carcinomas, prostatites crônicas e atrofia pós-inflamatórias. A zona de transição, correspondendo a apenas 5% do tecido, consiste em dois pequenos lóbulos que circundam a uretra prostática proximal. Este é o segmento que tende a aumentar devido à hiperplasia prostática benigna (HPB). Por sua vez, a zona central, que corresponde a cerca de 25% do órgão, assume a forma de um cone que circunda os ductos ejaculatórios e não costuma ser associada a processos patológicos primários (Bhavsar; Verma, 2014; Paner, 2010; Harmelin et al., 2005).

Figura 2- Representação anatômica da glândula prostática. Na parte A encontram-se destacadas as estruturas de referência dos sistemas reprodutor e urinário masculinos, incluindo a próstata. Em B, são identificadas as zonas prostáticas e sua localização no órgão.



Fonte: Adaptado de: Marzo, 2007; Health books UK Ltd.

Já a composição celular da próstata humana é baseada em estudos de expressão gênica e de antígenos de superfície, além de sua localização nos ácinos glandulares (Shen; Abate-shen, 2010; DeMarzo et al., 2003). Nesse sentido, três tipos distintos de células epiteliais são descritos: (i) basais, (ii) luminais e (iii) neuroendócrinas. As células basais estão situadas próximas à membrana basal, possuem núcleos ovais e citoplasma pouco visível. Expressam citoqueratina 5 e o fator de transcrição p63. Em contraste, as células luminais têm uma configuração colunar, com núcleos localizados próximos à base da célula. São especializadas na secreção de produtos para o lúmen, incluindo o antígeno prostático específico (PSA), além de expressarem citoqueratina 8 e proteínas reguladas por andrógenos. Finalmente, as células neuroendócrinas expressam cromogranina e sinaptofisina (Ittmann, 2018; Henry et al., 2018). Fenótipos luminais ou basais têm sido observados em tumores, contudo, a relevância clínica permanece ambígua, com a agressividade relacionada tanto a células luminais quanto a células-tronco basais (Wang et al., 2013; Smith et al., 2015).

De fato, o CaP é uma doença complexa, multifatorial e heterogênea. Possui crescimento lento, manifestando-se, inicialmente, de forma assintomática ou com sintomas semelhantes à HPB (Banerjee et al., 2018). Entretanto, quando avançada, é uma doença agressiva que pode obstruir a bexiga e atingir os ossos (Shen; Abate-Shen, 2010). Assim, o diagnóstico tardio prejudica significativamente a expectativa de vida dos pacientes (Mimeault; Batra, 2011).

Para a detecção do CaP é adotado o toque retal digital (TRD), no qual o tamanho e a consistência do órgão são avaliados. Adicionalmente, são mensurados os níveis séricos de PSA, uma glicoproteína predominantemente produzida pelas células epiteliais da glândula (Lee et al., 2011). Contudo, o diagnóstico definitivo é alcançado por meio da análise histopatológica da lesão, sendo esta microscopicamente examinada para também ser estadiada conforme o tamanho e extensão do tumor (sistema TNM - *Tumor Node Metastasis*) e o grau de indiferenciação das células transformadas (escala de Gleason) (Mimeault; Batra, 2011; Epstein, 2010).

O processo de malignização se inicia, de modo geral, com o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial prostática (NIP) tipificada pela proliferação desordenada de células epiteliais glandulares da próstata, com

características celulares atípicas e dentro dos limites teciduais dos ductos e ácinos prostáticos. É considerada uma lesão pré-maligna, de modo que a NIP de alto grau (HGPIN) é considerada o precursor mais provável da maioria dos adenocarcinomas prostáticos, principalmente devido as semelhanças morfológicas existente entre as células epiteliais dessas lesões e o CaP invasivo (Brawer, 2005; Tolkach; Kristiansen, 2018). À medida que a camada de células basais é degradada, a HGPIN evolui para carcinoma localmente invasivo (Wang et al., 2018). O processo inicial de disseminação ocorre nos gânglios linfáticos de drenagem, seguido pela propagação para órgãos distantes, incluindo osso, fígado e pulmões, sendo os ossos a localização mais prevalente das metástases (Testa et al., 2019).

Em estágio avançado, o CaP é submetido à terapia de privação de andrógenos (TPA), uma estratégia terapêutica bastante eficaz e comum na prática clínica. Contudo, há casos em que ocorrem recorrências e progressão da doença, apesar dos baixos níveis de testosterona. Esse fato sinaliza o desenvolvimento de uma resistência à TPA e a transição para o câncer de próstata resistente à castração (CRPC), um subtipo tumoral agressivo, metastático e incurável (Morote et al., 2022). Estima-se que cerca de 10 a 20% dos casos de CaP progridem para uma fase mais agressiva da doença, após TPA (Morgan et al, 2010; Vellky; Ricke, 2020), sendo que estudos relatam a sobrevida média de 14 meses para homens com CRPC (Chin et al, 2010; Kirby et al., 2011). Genes relacionados à via hormonal, especialmente androgênica, e ao processo metabólico da testosterona são cruciais na transformação maligna. Contudo, vias adicionais podem ser ativadas no CRPC, em um processo dinâmico de progressão da doença (Bluemn; Nelson, 2012)

3. Câncer de próstata resistente à castração: características e mecanismos

É sabida a dependência do CaP a andrógenos e o papel crucial do receptor de andrógeno (AR) no desenvolvimento e progressão da doença (Hirst et al., 2012). A testosterona ocupa uma função de destaque nesse contexto, sendo produzida nos testículos e convertida na forma mais ativa, di-hidrotestosterona (DHT), no tecido prostático por meio da enzima 5 α -redutase. Complementarmente, a glândula

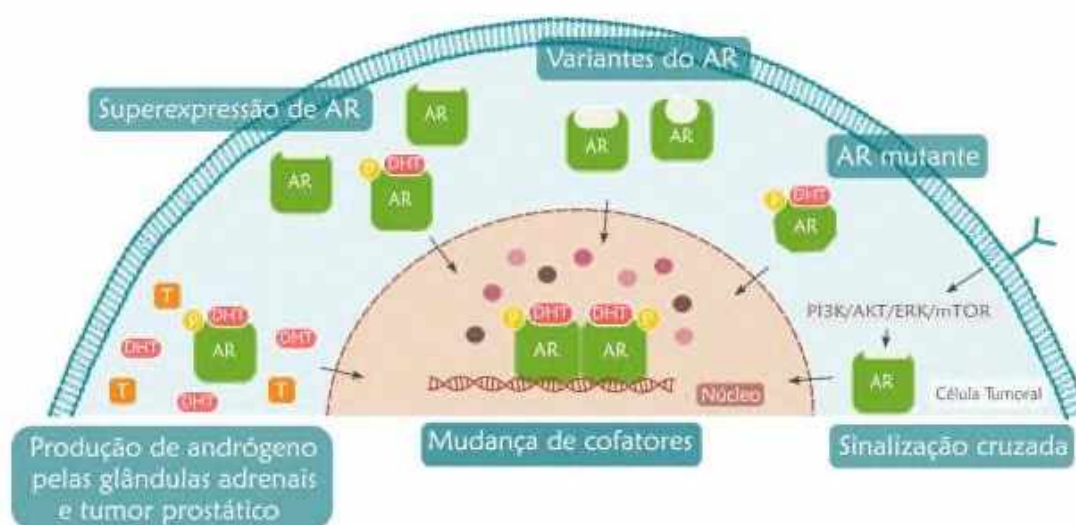
adrenal também sintetiza androstenediona e a desidroepiandrosterona, as quais podem ser convertidas, posteriormente, em testosterona (Gamat et al., 2017; Shen; Abate-Shen, 2010).

No tecido prostático saudável, o AR exerce um papel importante na proliferação e diferenciação de células epiteliais, além de ser essencial para o desenvolvimento das funções específicas da glândula prostática (Vickman et al., 2019). No contexto do CaP, o AR impulsiona a disseminação metastática (Han et al., 2005). Portanto, abordagens que se propõem a controlar a produção de andrógenos ou modular a atividade do AR são efetivas (Yanagisawa et al., 2022). De maneira geral, a TPA consegue induzir a remissão em aproximadamente 80% a 90% dos pacientes, conseguindo controlar o desenvolvimento do câncer por uma média de 2 a 3 anos (Harris et al., 2009). Contudo, é importante destacar que a regressão tumoral é apenas temporária, com a possibilidade de progressão da doença para um estado que não dependa mais de andrógenos (Eisermann et al., 2013; Decker et al., 2012). Dessa forma, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos de expressão do AR e da regulação da transcrição e das vias de sinalização mediadas por ele em células tumorais (Wu et al., 2007).

O CRPC surge por múltiplos eventos, sendo estes: a amplificação e superexpressão do AR, mutações no gene codificante do receptor, variantes de *splicing*, mudanças dos cofatores do AR, produção intratumoral, alterações na biossíntese de andrógenos e sinalização cruzada (Wang et al., 2022; Fujita; Nronomura, 2019) (Figura 3). No primeiro caso, a amplificação do AR torna as células tumorais sensíveis a baixos níveis circulantes de andrógeno, a qual pode ocorrer como resultado da seleção de células capazes de proliferar nessas condições (Hu et al., 2008). As mutações gênicas conduzem à promiscuidade do receptor para outros hormônios e sinais, ampliando as moléculas reconhecidas (Steinkamp et al., 2009; Robzyk et al., 2007; Buchanan et al., 2001). Isso resulta na capacidade das células cancerígenas de prosseguir com o processo de proliferação e evitar a apoptose se ligando a progesterona e estrogênio, por exemplo (Lallous et al., 2016; Azad et al., 2015). Já as variantes de *splicing* são o resultado do *splicing* alternativo do transcrito do gene *AR*, capazes de ativar constitutivamente a sinalização, independentemente de andrógenos ou antiandrogênios (Jacob et al.,

2021), uma vez que não possuem o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Schalken; Fitzpatrick, 2016).

Figura 3- Principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de próstata resistente à castração (CRPC): Estão representados: a amplificação e hipersensibilidade do receptor de andrógeno (AR), mutações no gene codificante do receptor, variantes de *splicing*, recrutamento de diferentes coativadores, produção intratumoral e alternativa de andrógenos e mudança de cofatores de AR. T, testosterona; DHT, di-hidrotestosterona. P, fosfato.



Fonte: Adaptado de Schalken e Fitzpatrick, 2015; Guimarães, 2021

Quanto ao recrutamento de diferentes coativadores, TIF2 (fatores intermediários transcrpcionais 2), SRC1(coativador do receptor de esteróide 1) e TIP60 (complexo histona acetilase TIP60) encontram-se superexpressos em CRPC, sensibilizando o receptor a baixos níveis de andrógenos (Halkidou et al., 2003). Além disso, a expressão endógena de enzimas de síntese de andrógenos pela lesão também contribui para a manutenção/aumento da sinalização do AR no microambiente tumoral (Montgomery et al., 2008; Locke et al., 2008; Jacob et al., 2021). As principais enzimas responsáveis pela conversão do colesterol em precursores de andrógenos, CYP17A1(citocromo P450 17A1) e HSDD3B2 (3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase/delta-deltaisomerase tipo II) , e as AKR1C3 (17β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5) e SRD5A1/2 (3-Oxo-5α-esteróide 4-desidrogenase 1), não apenas estão presentes como também superexpressas no

CRPC (Montgomery et al., 2008). Um aumento tão robusto na maquinaria de produção de andrógenos aumenta a disponibilidade do hormônio, reativando a cascata de sinalização de AR (Schrecengost; Knudsen, 2013).

Similarmente, a alteração na biossíntese de andrógenos ocorre devido à presença de uma mutação que proporciona ganho de função na 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (HSD3 β 1), responsável por catalisar uma etapa limitante da síntese de DHT a partir da desidroepiandrosterona (DHEA) (Chang et al., 2013). Mesmo com medicamentos que inibem a produção androgênica pelas glândulas supra-renais, níveis significativos de andrógenos são produzidos a partir do colesterol no CRPC, o que o torna também independente dos andrógenos adrenais circulantes (Fujita; Nonomura, 2019).

A sinalização cruzada envolve diferentes vias que possuem a capacidade de ativar ou inibir as moléculas comuns ao mecanismo androgênico (Schalken e Fitzpatrick, 2015). Citocinas, como IL-6 (interleucina-6), e outras moléculas como KGF (Fator de crescimento de queratinócitos), EGF (Fator de crescimento epidérmico) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), por exemplo, podem promover, via outros receptores, a translocação nuclear do AR (Gregory et al., 2004). Destacam-se as vias MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e PI3K/AKT (fosfoinosítideo 3-quinase/ proteína quinase B) (Ueda et al., 2002, Gregory et al., 2004). Assim, a completa compreensão desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes que visam retardar o início ou avanço do CaP para formas agressivas da doença. Essa é uma demanda premente, diante de um atual cenário crítico pós-pandemia, em que se espera um aumento dos casos de CRPC.

4. Abordagens Terapêuticas e Desafios no Tratamento do Câncer de Próstata

A notável heterogeneidade do CaP não só torna seu diagnóstico desafiador, mas também contribui para sua progressão e resistência terapêutica. A complexidade desse cenário é evidenciada pela dificuldade em se estratificar precisamente esses tumores, o que resultada em inúmeros subtipos moleculares (Plichta et al., 2021; Nguyen-Nielsen; Borre, 2016). A escolha do tratamento mais

apropriado para um paciente é baseada nos níveis de PSA, estadiamento da lesão, presença de comorbidades e das decisões particulares dos indivíduos (Bach et al., 2014; Sekhoacha et al., 2022). As principais estratégias adotadas são a prostatectomia radical, a radioterapia, TPA, imunoterapia e a quimioterapia (Chen et al., 2013).

A prostatectomia radical refere-se ao procedimento cirúrgico para a remoção completa da próstata, sendo frequentemente recomendada para pacientes com o tumor restrito ao órgão, com expectativa de vida superior a 10 anos e com poucas ou nenhuma comorbidades (Litwin et al., 2017). As possíveis complicações associadas a essa técnica incluem incontinência urinária e disfunção erétil, que podem surgir devido a danos cirúrgicos causados ao esfíncter urinário e aos nervos responsáveis pela função erétil (Mohan; Schellhammer, 2011; Mukkala et al., 2021).

A radiação terapêutica (RT) é eficaz em eliminar as células cancerosas da próstata através da incidência de radiações de alta intensidade, sendo empregada tanto como tratamento inicial, quanto complementar à prostatectomia (Naghavi et al., 2014). Nessa abordagem podem ser utilizados feixes externos, em que a energia é projetada através da pele para as áreas afetadas pelo câncer, ou pela implantação de sementes radioativas em locais específicos, denominada braquiterapia (Potosky, 2000). O objetivo é minimizar o impacto nos tecidos normais (Baskar et al., 2012). A RT através de feixe externo é frequentemente adotada em tumores localmente avançados de alto grau, particularmente quando a prostatectomia radical não é uma opção viável (Kipriyanov et al., 2020). A braquiterapia, por outro lado, é direcionada a homens com risco baixo a intermediário da doença (grau 1 ou 2), nos quais não há evidência clínica ou radiológica de envolvimento da próstata para além de seus limites (Zaorsky et al., 2017). A função erétil não é afetada, mas há queixas de urgência e frequência urinária, disúria, diarreia e proctite (Potosky, 2000).

Desde 1972, a TPA tem sido considerada o padrão ouro no tratamento inicial do CaP avançado. Essa abordagem pode englobar a remoção cirúrgica dos testículos (orquiectomia) ou a administração de químicos como agonista do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), antagonistas de LHRH e inibidores da síntese de andrógenos, visando essencialmente a redução da atividade da testosterona (Gerritsen; Sharma, 2011). Seu mecanismo de ação

reside na supressão da produção de testosterona e outros hormônios masculinos, privando as células cancerígenas da próstata de estímulo hormonal (Nishiyama, 2012; Crawford et al., 2015). Os agonistas de LHRH elevam o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), regulando negativamente os receptores da hipófise, reduzindo os níveis de LH e FSH e, por consequência, suprimindo a produção de testosterona. Diferem da orquiectomia por serem um método reversível. (Deluce et al., 2022; Heidenreich et al., 2008). Alguns agonistas comuns de LHRH incluem leuprolida, goserelina, triptorelina e histrelina. Por outro lado, os antagonistas bloqueiam diretamente os receptores da hipófise, resultando na inibição imediata da síntese de testosterona, com antiandrogênicos não esteroides, tais como bicalutamida, flutamida ou nilutamida (Iguchi et al., 2019).

Já os inibidores da síntese de andrógenos são moléculas que têm como alvo a CYP17, essencial na síntese de esteróides, precursores de testosterona e estrógenos. Os mais utilizados são cetoconazol, aminoglutetimida e o acetato de abiraterona, sendo este considerado um inibidor mais potente (Belkahlia et al., 2022, Stein et al., 2014). No entanto, a TPA está associada tanto a efeitos colaterais agudos como de longo prazo, como hiperlipidemia, fadiga, ondas de calor, osteoporose, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, anemia e disfunção sexual (Seidenfeld *et al.*, 2000). Nos últimos anos, novas opções terapêuticas foram investigadas quanto à sua eficácia no tratamento do CRPC, que permanece dependente da sinalização androgênica mesmo quando os níveis séricos de testosterona estão baixos após a castração (Henríquez et al., 2021), destacando-se a imunoterapia e os agentes antiandrogênicos não esteroides de segunda geração.

A imunoterapia é baseada no estímulo do sistema imunológico do paciente, podendo ativa ou passiva. Para o CaP, um exemplo é a vacina Sipuleucel-T (Provenge), uma terapia celular ativa autóloga aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) que induz a resposta imune tumoral ao sensibilizar, *ex vivo*, os glóbulos brancos do próprio paciente com a proteína fosfatase ácida prostática (PAP) (Sekhoacha et al., 2022, Cha et al., 2020). Os efeitos colaterais são febre, náusea, calafrios e dores musculares, sendo, portanto, considerados brandos em comparação a outros métodos de tratamento (Stein et al., 2014).

Quanto aos agentes antiandrogênicos de segunda geração, os que foram testadas em ensaios clínicos e demonstraram eficácia e segurança são a enzalutamida, apalutamida e darolutamida (Henríquez et al., 2021). São inibidores competitivos do AR e bloqueiam sua translocação. Os efeitos colaterais incluem fadiga, astenia, diarreia, vômito, diminuição do apetite, hipersensibilidade a medicamentos e disfagia (Yamada; Beltran, 2021; Cookson et al., 2013; Lokeshwar et al., 2021). Estudos *in vivo* demonstraram que a darolutamida possui uma menor penetração na barreira hematoencefálica em comparação com os inibidores relatados anteriormente, reduzindo os efeitos colaterais relacionados ao sistema nervoso central como disfunção cognitiva, convulsões e fadiga (Zurth et al., 2019).

A quimioterapia, no CaP, é adotada em casos graves, metastáticos, em que todas as estratégias anteriores não foram eficazes (Mizokami et al., 2017). Um dos principais medicamentos utilizados é o docetaxel, cuja ação consiste na inibição da despolimerização dos microtúbulos, ao se ligar à β -tubulina, interrompendo a divisão celular mitótica e induzindo a apoptose (Jain, 2005; Zhu et al., 2013). No entanto, o desenvolvimento de resistência a esse medicamento é comum, sendo atribuída a um aumento na expressão do gene *MDR1*, o qual codifica para a glicoproteína P responsável pelo efluxo de drogas (Abidi, 2013). Nesse contexto, o cabazitaxel é um antineoplásico semissintético que tem sido introduzido como uma terapia de segunda geração para tumores resistentes ao docetaxel. (Crawford et al., 2015). Para esses taxanos, os efeitos colaterais descritos incluem hipotensão, broncoespasmo, insuficiência renal, fadiga neurotóxica, alopecia e erupção cutânea/eritema generalizado e diarreia grave (Abidi, 2013).

Portanto, diante de tantos desafios e do expressivo número de mortes por CaP avançado, pesquisas voltadas para a descoberta e a identificação de novas alternativas terapêuticas são de extrema relevância. Tais esforços incluem a investigação do potencial terapêutico de produtos de origem natural aliados à nanotecnologia, como abordagens para enfrentar tanto a resistência aos medicamentos quanto para mitigar os efeitos adversos inerentes às opções atuais (Ahdoot et al., 2019).

5. Abordagens com produtos naturais no tratamento do câncer de próstata: eficácia e desafios

Ao longo da história, os compostos naturais têm desempenhado uma função essencial na identificação de substâncias bioativas com potencial terapêutico (Atanasov et al., 2015; Harvey et al., 2015). Nos últimos anos, esforços significativos foram empregados na obtenção de novos produtos naturais a partir de microrganismos, plantas e outras formas de vida, visando avaliar e desvendar suas propriedades e seus mecanismos de ação (Huang et al., 2021). De maneira geral, os compostos derivados de fontes naturais exibem estruturas inéditas, incluindo um aumento na quantidade de átomos de oxigênio, maior incidência de centros quirais, maior rigidez molecular, além de um aumento no número de doadores e receptores de ligações de hidrogênio (Barnes et al., 2016). Além disso, é observada uma proporção menor de átomos no anel aromático em relação ao total de átomos pesados. Também apresentam coeficiente de partição, massa molecular e diversidade de sistemas de anéis. Essas particularidades conferem aos produtos naturais uma extensa aplicabilidade (Li; Vederas, 2009; Koehn; Carter, 2005).

Na natureza, os produtos naturais passam por um processo de otimização estrutural durante a evolução para desempenhar funções biológicas específicas nos seres vivos em que são encontrados. Em geral, esses compostos estão envolvidos na regulação de mecanismos de defesa internos e em interações frequentemente competitivas com outros organismos (Atanasov et al., 2015). Na medicina, é uma abordagem de baixo custo e acessível, com o benefício adicional de serem menos tóxicos (Najmi et al., 2022).

Estima-se que entre os anos de 1981 e 2019, cerca de um quarto de todos os novos medicamentos anticâncer aprovados apresentavam origem em produtos naturais (Newman; Cragg, 2020). A vimblastina e a vincristina, por exemplo, são empregadas no tratamento de linfomas e leucemia (Zhu et al., 2015). A podofilotoxina, é utilizada como quimioterápico contra câncer cervical, osteossarcomas, carcinoma nasofaríngeo, câncer de cólon, de mama, de próstata e de pulmão (Zhang et al., 2018). Além do docetaxel e o paclitaxel, que são aplicados no tratamento do câncer de mama e CaP (Chhabra et al., 2018). De fato,

dados da literatura apontam que diversos produtos naturais podem atingir seletivamente moléculas e vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento e progressão tumorais, bloqueando a proliferação celular, angiogênese e metástase, modulando o sistema imunológico e processos redox e induzindo a apoptose e autofagia (Fontana 2020; Salehi et al., 2019; Taylor; Jabbarzadeh, 2017). Dentre essas moléculas destacam-se a quercetina, curcumina, resveratrol, epigallocatequina-3-galato (EGCG), ácido ursólico, berberina e o ácido tânico, potencialmente promissoras no controle do CaP em experimentos *in vitro* e pré-clínicos (Dutta et al., 2019; Yang, Shang., 2017).

O Brasil abriga a mais vasta e rica biodiversidade do mundo, apresentando um potencial significativo para a pesquisa de novos medicamentos provenientes de fontes naturais, sendo os Biomas Cerrado e Mata Atlântica os mais promissores (Melo et al., 2017; Dos Santos et al., 2016). Um notável composto natural é o 4-nerolidilcatecol (4-NC), um metabólito secundário que foi isolado da planta *Pothomorphe umbellata*, comumente conhecida como *caapeba*, pertencente à família *Piperaceae*. (Carolina et al., 2019). Estudos têm indicado que o 4-NC possui atividade antioxidante (Fernandes *et al.*, 2013), propriedades antitumorais (Da Silva Guimarães et al., 2023; Alves-Fernandes et al., 2020), e antiparasitária (Costa et al., 2023). Dados prévios demonstraram que o 4-NC exerce seu efeito citotóxico por meio da indução da apoptose por mecanismos dependentes da mitocôndria com o acúmulo de citocromo c, modulação da via de NF-κB e inibição da ciclina D1 (Benfica et al., 2017; Cortez et al., 2015). Além disso, o 4-NC inibe a invasão celular, gera espécies reativas de oxigênio, causa danos no DNA, aumenta a expressão de p53 e induz o estresse no retículo endoplasmático (Fernandes et al., 2019; Brohem et al., 2009). Em relação ao CaP, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que o 4-NC é capaz de induzir apoptose em células CRPC, inibir o ciclo celular e influenciar a atividade de genes relacionados à transição epitelial-mesenquimal (EMT), angiogênese e hipóxia (Cordeiro, 2019).

Contudo, existem desafios a serem superados em relação à utilização clínica de produtos naturais. Possuem limitada capacidade de dissolução em água, absorção reduzida, baixa biodisponibilidade e breve permanência nos sistemas biológicos (Seca; Pinto, 2018). Estima-se que mais de 90% dos tratamentos contra o câncer atualmente disponíveis têm limitações significativas em relação à sua

absorção no organismo e à farmacocinética (Iwamoto, 2013). Portanto, é de suma importância desenvolver novos sistemas de administração de medicamentos, especialmente os de origem natural, que possam aprimorar sua absorção, distribuição e direcionamento, tornando-os promissores na área oncológica (Huang et al., 2021).

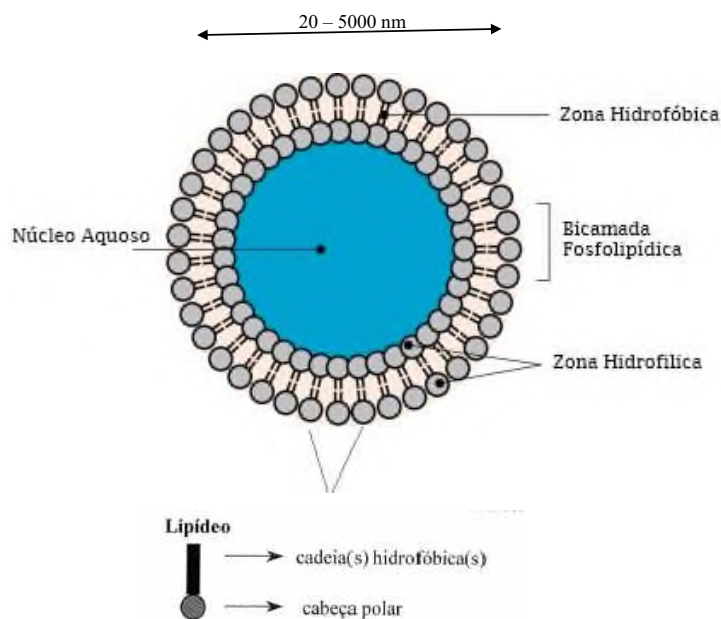
6. Nanoformulações e produtos naturais: uma perspectiva integrada para o desenvolvimento de terapias eficazes

A nanobiotecnologia é uma área em expansão, sobretudo na medicina, que tem viabilizado a ampliação das fronteiras relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos (Bayda et al., 2020). Nanomateriais vêm sendo extensivamente desenvolvidos e testados, permitindo uma entrega direcionada de várias moléculas funcionais, incluindo produtos naturais. De fato, o encapsulamento de compostos bioativos possibilita uma maior proteção a condições desfavoráveis de pH e temperatura, melhorando sua biodisponibilidade e sua solubilidade (Meena et al., 2020). Além disso, formulações com nanomateriais modulam processos biológicos cruciais, como a autofagia, o estresse oxidativo e a morte celular, resultando em uma interessante atividade antitumoral (Lee et al., 2011; Cordani; Somoza, 2019; Meena et al., 2020).

Contudo, as nanoformulações encontram diversos desafios relacionados à sua construção, entrega, interações no sistema biológico e potencial toxicidade (Akhter et al., 2011). O tamanho das partículas e a distribuição de tamanhos são fatores críticos que impactam a farmacocinética e a segurança (Ahmad et al., 2010; Kashyap et al., 2021). Dentre os sistemas de transporte de medicamentos disponíveis atualmente, os lipossomas têm desempenhado um papel proeminente. Desde sua primeira identificação na década de 1960, essas vesículas se estabeleceram como os nanocarregadores mais amplamente empregados em sistemas direcionados para a liberação controlada de fármacos, com maior acúmulo nos tecidos-alvo e maior eficácia de distribuição comprovados (Bayda et al., 2019; Frézard et al., 2005; Park, 2002).

Os lipossomas (Figura 4) são esferas constituídas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, com caráter hidrofóbico e hidrofílico, com tamanho variando desde vesículas muito pequenas, com apenas 0,025 μm , até lipossomas de tamanho considerável, chegando a 2,5 μm , como ilustrado na figura 03 (Frézard et al., 2005). Seu tamanho desempenha um papel crucial na determinação da meia-vida de circulação e, juntamente com o número de bicamadas, influencia a quantidade de fármaco encapsulado (Himanshu et al., 2011). Assim, com base em suas dimensões e na presença de uma ou várias bicamadas, os lipossomas podem ser categorizados em quatro grupos: (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV), (iii) vesículas multilamelares (MLV) e (iv) vesículas multivesiculares (MVV) (Akbarzadeh et al., 2013). Nos lipossomas de estrutura unilamellar, a bicamada lipídica é única, enquanto nos lipossomas de estrutura multilamellar, ela assume uma configuração semelhante a uma cebola, com várias camadas. As vesículas multivesiculares (MVV) formam uma organização multilamellar, com esferas fosfolipídicas concêntricas, pois várias vesículas unilamelares são geradas dentro de lipossomas maiores (Shaheen et al., 2006).

Figura 4- Características estruturais dos lipossomas. Essas estruturas possuem uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas em torno de um compartimento aquoso interno que permite a retenção de compostos hidrofílicos, enquanto a própria bicamada retém compostos de caráter mais lipofílico ou anfifílico.



Fonte: Adaptado de FRÉZARD et al., 2005; DEB et al.;2019.

Os fármacos são predominantemente introduzidos nas nanovesículas por meio de interações físicas, como aprisionamento, adesão à superfície ou encapsulamento (Nsairat et al., 2022). Em uma análise do banco de dados de medicamentos aprovados e disponíveis nos sites da FDA, foram identificadas mais de 18 formulações lipossomais aprovadas para administração intravenosa, intramuscular e oral (Kim; Jeong, 2021). Na terapia anticâncer, numerosas formulações de lipossomas com diferentes agentes anticancerígenos já demonstraram menor toxicidade do que a droga livre (Davaran et al., 2012). Além disso, lipossomas tem apresentado uma liberação contínua do medicamento encapsulado, resultando em concentrações terapêuticas mais elevadas e sustentadas na corrente sanguínea (Valizadeh et al., 2012; Akbarzadeh et al., 2013). Um marco notável foi a aprovação do Doxil (lipossomas contendo doxorrubicina) pelo FDA em 1995 como o primeiro produto lipossomal autorizado e destinado ao tratamento do câncer de ovário e sarcoma de Kaposi (Barenholz, 2012).

De fato, uma das principais vantagens dos lipossomas em comparação com outros sistemas de entrega é a sua biocompatibilidade, especialmente quando compostos por produtos naturais (Akbarzadeh et al., 2013). Thangapazham e

colaboradores (2009) demonstraram uma entrega direcionada e uma maior eficácia da curcumina encapsulada no tratamento de células de CaP, com uma inibição de 70-80% da proliferação. Além disso, foi observado que o conjugado peguilado de curcumina se mostrou consideravelmente mais potente na inibição do crescimento de células tumorais pancreáticas em comparação com a curcumina não encapsulada (Li et al., 2009). O encapsulamento da vincristina em lipossomas à base de esfingomielina e colesterol proporcionou uma circulação prolongada sem alterações na superfície dos lipossomas, e um maior acúmulo nos tecidos-alvo, com liberação sustentada do ativo (Silverman; Deitcher, 2012). Paclitaxel, quando incorporado aos lipossomas Lipusu® para o tratamento do carcinoma gástrico, causou menos efeitos adversos (Koudelka; Turánek, 2012). Por fim, Vyxeos®, também conhecido como CPX-351, é uma formulação composta por citarabina e daunorrubicina encapsuladas em lipossomas para o tratamento de leucemia mieloide aguda de alto risco, com expressiva eficácia e reduzidos efeitos adversos (Passero et al., 2016; Krauss et al., 2019)

Importante salientar que, mesmo diante dos avanços das pesquisas, é crucial realizar ajustes detalhados em todos os parâmetros durante o processo de desenvolvimento de nanoformulações à base de produtos naturais, incluindo a distribuição de tamanho e a incorporação de componentes adicionais, a fim de aprimorar os perfis de segurança (Liu et al., 2022).

Contudo, não há dúvidas que essa abordagem abrirá portas para o desenvolvimento de sistemas de distribuição de medicamentos eficientes e menos tóxicos, e de abordagens terapêuticas mais eficazes, resultando em melhores desfechos clínicos.

7. Aplicação de modelos animais em experimentação *in vivo*

A experimentação animal tem se mostrado como uma etapa crucial na validação de compostos relacionados à área da saúde (Davies et al., 2020), desempenhando um papel significativo no progresso da ciência biomédica e contribuindo substancialmente para o desenvolvimento de uma melhor compreensão da anatomia e fisiologia humana e animal. Além disso, modelos

animais permitem um aprofundamento do conhecimento sobre os processos patológicos, biológicos e farmacológicos (Lee et al., 2020) e possibilitam não apenas o desenvolvimento, mas também a avaliação de fármacos, vacinas e procedimentos cirúrgicos (Andersen; Winter, 2019). Apesar das diferenças interespecies em termos de anatomia, metabolismo, fisiologia e genética (Kim et al., 2019), são avaliadas a faixa de dosagem, via de administração e toxicidade sistêmica (Andrade et al., 2016), uma vez que esses modelos oferecem informações significativas sobre o fundamento de doenças (Gupta; Singh, 2018),

Nos últimos cinco anos, diversas espécies incluindo primatas não humanos, roedores, lagomorfos, cães, porcos e até mesmo organismos invertebrados, como peixes-zebra e nematoides, foram importantes para o estudo de doenças de grande interesse global, tais como COVID-19, câncer de mama, diabetes, obesidade e Parkinson (Domínguez-Oliva et al., 2023). Desses organismos, os roedores têm sido o modelo de referência para a pesquisa de doenças humanas ao longo de muitas décadas (Cheon; Orsulic, 2011). Suas vantagens incluem o seu tamanho compacto, a capacidade reprodutiva e a variedade de modelos existentes (Zhang et al., 2011). No entanto, além das preocupações éticas e científicas relativas aos modelos murinos, a experimentação é dispendiosa e demorada (Jackson; Thomas, 2017). Em estudos de câncer, o desenvolvimento de tumores pode levar semanas ou até meses, o que tem demandado a caracterização e validação de outras espécies (Cheon; Orsulic, 2011).

O modelo de membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha fornece uma alternativa barata e rápida. O tempo máximo de crescimento da lesão na CAM é de 2 semanas. Além disso, a janela aberta na casca do ovo criada para a implantação do tumor também permite a visualização direta do seu crescimento (Banstola; Reynolds, 2022). Devido à sua natureza imunologicamente comprometida e à sua tolerância ao sistema imunológico, é possível implantar tecidos de qualquer organismo nos ovos, evitando, assim, a necessidade de recorrer a animais transgênicos onerosos (Sharro et al., 2021). O emprego da CAM na investigação do câncer tornou-se mais proeminente no início dos anos 2000, coincidindo com os avanços na tecnologia de imagem 3D e na observação de células e tecidos vivos, que podem ser aplicados a esses modelos (Hu et al., 2019).

Na literatura, a CAM tem sido amplamente utilizada para investigar processos como angiogênese (Nowak et al; 2014; Ribatti, 2012;), invasão de células cancerosas (Xiao et al., 2015, Lokman et al., 2012), e metástase (Deryugina;Quigley, 2008). Já foi empregada com sucesso em estudos com glioma (Hagedorn et al., 2005; Kavaliauskaitė et al., 2017), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Rudy et al., 2016; Liu et al., 2013); leucemia (Loos et al., 2014; Canale et al., 2011), câncer de pâncreas (Rovithi et al., 2017), e câncer colorretal (Majerník et al., 2019). Além disso, modelos CAM foram desenvolvidos para pesquisas em neuroblastoma (Swadi et al., 2018), linfoma de Burkitt (Klingenberg et al., 2014), melanoma (Avram et al., 2017), e fibrossarcoma felino (Zabielska-Koczywās et al., 2017). Estudos anteriores também abordaram o transplante de linhagens celulares de câncer de bexiga (Skowron et al., 2017) e CaP (Jefferies et al., 2017), embora com informações de protocolo limitadas. Vale ressaltar que, em comparação com camundongos, os ovos não apenas apresentam um custo muito menor, mas também proporcionam resultados altamente consistentes e reprodutíveis (Strojník et al., 2010; Taizi et al., 2006).

O uso do modelo tumoral CAM é reconhecido e aceito pela comunidade científica, o que é perceptível no aumento do número de publicações em revistas de renome que abordam seu uso (Hu et al., 2019). A pesquisa conduzida por Hu e sua equipe em 2019, utilizando enxertos xenotransplantados de cânceres urológicos na CAM para investigar metástases, bem como o estudo de Sharrow e colaboradores em 2020, que envolveu enxertos de tumores ginecológicos e urológicos, demonstraram que esse sistema *in vivo* é altamente vantajoso para acelerar a identificação de mecanismos moleculares cruciais na biologia do câncer, particularmente em relação à doença metastática.

8. Considerações Finais

O desenvolvimento de terapias inovadoras representa uma abordagem promissora no tratamento do CaP, com destaque para o CRPC. O progresso no desenvolvimento de terapias mais eficazes é essencial para melhorar a qualidade de vida e as perspectivas de sobrevivência dos pacientes. As nanoformulações

lipossomais, combinadas com produtos naturais, representam uma possibilidade de tratamentos mais direcionados, menos tóxicos e mais eficazes, os quais podem ser validados em modelos *in vivo* alternativos, com vistas em agilizar sua possível aplicação clínica.

CAPÍTULO II
FORMULAÇÕES HÍBRIDAS NATURAIS COMPOSTAS
POR LIPOSSOMAS, BIOSSURFACTANTES E
4-NEROLIDILCATECOL

RESUMO

A presente invenção reivindica o desenvolvimento de formulações híbridas naturais compostas por lipossomas, biossurfactante e 4-Nerolidilcatecol (4-NC), com atividade antitumoral. Os lipossomas elásticos resultantes foram obtidos pela técnica de formação de filme lipídico contendo 4-NC, sendo ressuspensos em solução tampão contendo biossurfactante e subsequentemente sonicados por 10 minutos, originando a formulação híbrida natural. Esta estratégia permitiu desenhar um sistema lipossomal elástico composto exclusivamente por excipientes naturais com atividade antitumoral intrínseca. Além disso, tais sistemas apresentaram estabilidade físico-química por 120 dias (4°C) em relação ao tamanho de partículas (nm), índice de polidispersão e carga elétrica superficial (mV). Os estudos de citotoxicidade em células de câncer de próstata humano revelaram um comportamento antitumoral seletivo da nanoformulação, sem diminuição da viabilidade de células saudáveis. Os testes de toxicidade *in vivo* em embriões de galinha demonstraram que as formulações híbridas não apresentaram nanotoxicidade nos embriões, não afetando seu desenvolvimento fetal normal, determinando uma dose segura de 2 mg/ml. Além disso, os testes de regressão e inibição tumoral realizados nos mesmos embriões de galinha corroboraram os resultados observados nos testes de citotoxicidade *in vitro*, confirmando a atividade antitumoral da formulação e sua eficácia na redução e disseminação das células cancerígenas. As avaliações histopatológicas dos tecidos tumorais de embriões de galinha demonstraram diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle em relação ao padrão de inflamação tecidual e à presença e extensão de áreas necróticas, que são indicativos de morte celular. Notavelmente, esses parâmetros foram mais acentuados no grupo tratado com a formulação lipossomal elástica contendo 4NC.

Campo da Invenção

[001] A presente invenção descreve o método para obtenção de formulações híbridas naturais compostas por lipossomas elásticos a base de 4-Nerolidilcatecol e biossurfactantes glicosídeos, sendo testado em diferentes linhagens tumorais de próstata e em modelo *in vivo* de embriões de galinha, com aplicação antitumoral.

Descrição do Estado da Técnica

[002] A Nanotecnologia é definida como um campo que engloba ciência, engenharia e tecnologia na escala nano, variando de estruturas de 1 a 100 nanômetros. (About Nanotechnology/Nanotechnology Initiative. Nos últimos anos, os produtos e processos decorrentes dessa área têm sido evidenciados por suas aplicações promissoras na área da saúde humana, especialmente no âmbito do tratamento do câncer. (Disponível em: <<https://www.nano.gov/about-nanotechnology>>).

[003] Com potencial diagnóstico e terapêutico, é notável a variedade de produtos médicos contendo nanomateriais já disponíveis no mercado dos Estados Unidos. (BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 112, 2019.). Nesse contexto, os nanofármacos se destacam, englobando nanomateriais desenvolvidos para a entrega otimizada de medicamentos. (HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology. *Human & Experimental Toxicology*, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015).

[004] Os avanços mais proeminentes têm ocorrido na área da nano-oncologia, aprimorando a eficácia dos medicamentos quimioterápicos tradicionais e auxiliando no controle de cânceres humanos agressivos. Assim, a nanotecnologia tem permitido a entrega direcionada de diferentes moléculas funcionais, incluindo nanopartículas, anticorpos e agentes citotóxicos. (LEE, P. Y.; WONG, K. K. Y. Nanomedicine: A new frontier in cancer therapeutics. *hub.hku.hk*, 2011).

[005] Nanopartículas metálicas isoladamente e formulações envolvendo nanomateriais são capazes de modular processos biológicos cruciais, como autofagia, estresse oxidativo e morte celular, resultando em uma expressiva atividade antitumoral. (CORDANI, M.; SOMOZA, Á. Targeting autophagy using

metallic nanoparticles: a promising strategy for cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 7, p. 1215–1242, 2019). Atualmente, os lipossomas são os nanocarreadores mais comumente utilizados em sistemas direcionados de liberação de fármacos. Desde sua descoberta, na década de 1960, têm sido amplamente pesquisados e continuam a suscitar grande interesse na comunidade científica devido à sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade. (PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, n. 0, 2016).

[006] Essas características dos lipossomas são alcançadas devido à composição anfifílica dessas vesículas, as quais são constituídas por uma bicamada de fosfolipídios que envolvem um núcleo aquoso. Essas estruturas são capazes de encapsular tanto substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas, o que possibilita o aumento da concentração da droga no local de administração e a redução de efeitos colaterais indesejados. (BAVARSAID, N. et al. Preparación y caracterización fisicoquímica de liposomas tópicos cargados con quercetina. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, v. 60, n. 1, 2019). De fato, a natureza anfifílica dos fosfolipídios em solução reproduz as características das membranas celulares naturais, o que possibilita interações altamente eficazes entre os lipossomas e as membranas celulares dos mamíferos, resultando em uma absorção eficiente. (GUIMARÃES, D. CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 601, p. 120571, 2021). Além disso, com base em seu tamanho e quantidade de bicamadas, os lipossomas podem ser divididos em duas principais categorias: (1) vesículas multilamelares (MLV) e (2) vesículas unilamelares. As vesículas unilamelares, por sua vez, podem ser classificadas em duas subcategorias: (1) grandes vesículas unilamelares (LUV) e (2) pequenas vesículas unilamelares (SUV). Nas vesículas LUV a estrutura consiste em uma única camada de bicamada fosfolipídica que envolve a solução aquosa. (AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, v. 8, n. 1, 2013.)

[007] A encapsulação em lipossomas não apenas oferece proteção contra inativação precoce e degradação de ativos, mas também melhora sua solubilidade.

Além disso, permite uma distribuição mais precisa e controlada, bem como a liberação direcionada, prolongada e sustentada da substância, resultando na diminuição da toxicidade, ao mesmo tempo em que amplia a eficácia terapêutica. (JOHNSTON, M. J. W. et al. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1768, n. 5, p. 1121–1127, 2007). Estudos prévios confirmam essas características, com redução na toxicidade e aprimoramento na eficácia do encapsulamento com lipossoma quando comparados aos compostos não encapsulados. (STANO, P. et al. Novel Camptothecin Analogue (Gimatecan)-Containing Liposomes Prepared by the Ethanol Injection Method. *Journal of Liposome Research*, v. 14, n. 1-2, p. 87–109, 2004) e de OMRI, A.; SUNTRES, Z. E.; SHEK, P. N. Enhanced activity of liposomal polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of lung infection. *Biochemical Pharmacology*, v. 64, n. 9, p. 1407–1413, 2002.

[008] Adicionalmente, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado o ganho no desempenho farmacocinético dessas estruturas em relação a drogas antitumorais. (HOFHEINZ, R.-D. et al. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs*, v. 16, n. 7, p. 691–707, 2005). De fato, formulações de lipossomas contendo agentes anticancerígenos têm apresentado menor toxicidade em comparação com as formas livres dos fármacos (DAVARAN, S. et al. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled delivery of doxorubicin. *Nanotechnology, Science and Applications*, p. 13, 2012). Doxil, uma formulação lipossomal modificada com polietilenoglicol (PEG), representa o pioneiro entre os produtos lipossomais aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para tratar o sarcoma de Kaposi em indivíduos portadores do vírus HIV/AIDS, BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012) (ULRICH, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports*, v. 22, n. 2, p. 129–150, 2002). Atualmente, formulações de medicamentos em lipossomas são consideradas, nos EUA e na Europa, padrão ouro no tratamento de alguns tipos de cânceres como câncer de ovário e mieloma múltiplo, (BLADÉ, J. et al. Efficacy and Safety of Pegylated Liposomal Doxorubicin in Combination With Bortezomib for

Multiple Myeloma: Effects of Adverse Prognostic Factors on Outcome. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, v. 11, n. 1, p. 44–49, 2011). Portanto, a nanobiotecnologia aplicada a oncologia é altamente promissora, permitindo aprimorar as taxas de resposta ao tratamento do tumor e, ao mesmo tempo, reduzir de forma significativa a toxicidade sistêmica associada às terapias quimioterápicas convencionais (PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, n. 0, 2016).

[009] O câncer constitui um desafio de saúde global. Durante a última década, foi registrado um crescimento de 20% na prevalência da doença e é previsto que até 2030 surjam mais de 25 milhões de novos casos (SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 2023).

[010] Tumores na próstata possuem natureza multifatorial e são complexos molecular e clinicamente. São indolentes e assintomáticos quando em estágio inicial. Quando os sinais são identificados, se assemelham aos da hiperplasia prostática benigna (DAMBER, J.-E.; AUS, G. Prostate cancer (Review). *Lancet*, v. 371, n. 9625, p. 1710 1721, 2008). Além disso, o câncer de próstata pode progredir de maneira rápida e agressiva, levando à obstrução da bexiga e à disseminação, principalmente, para os ossos. (MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Frequent Gene Products and Molecular Pathways Altered in Prostate Cancer- and Metastasis-Initiating Cells and Their Progenies and Novel Promising Multitargeted Therapies. *Molecular Medicine*, v. 17, n. 9-10, p. 949–964, 2011).

[011] O tratamento do câncer de próstata abrange múltiplas abordagens incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal e imunoterapia. As decisões são tomadas levando em consideração os benefícios de cada opção de tratamento em comparação com os possíveis riscos e efeitos colaterais (Prostate Cancer Treatment. <<https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/treating.html>>). Contudo, a heterogeneidade dessa doença promove a sua progressão e pode resultar na ineficácia das abordagens terapêuticas empregadas (SAMYKUTTY, A. et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e65889, 2013).

[012] A progressão para o câncer de próstata resistente à castração, frequentemente em estágio metastático e letal, é um desafio para a oncologia e continua sendo a principal causa de óbitos relacionados ao câncer de próstata. (KONG, P. et al. Emerging Proteins in CRPC: Functional Roles and Clinical Implications. *Frontiers in Oncology*, v. 12 2022. Uma das características do câncer de próstata resistente à castração é sua progressão independente da presença de andrógenos, a qual pode se desenvolver por diferentes mecanismos como: (i) aumento da sensibilidade do receptor de andrógeno, o qual se torna responsivo a outros hormônios e sinais de crescimento, e (ii) ativação de receptores de tirosina-quinase e de vias alternativas, que culminam com o avanço da doença na ausência de andrógeno (FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The Development of androgen-independent Prostate Cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 1, n. 1, p. 34–45, out. 2001. A linhagem celular PC3 utilizada neste trabalho é uma célula de câncer de próstata independente de andrógeno e, portanto, representativa de um tumor agressivo e refratário

[013] Nos últimos anos, têm sido adotados agentes antiandrogênicos de primeira e segunda geração, imunoterapia e quimioterápicos com docetaxel e cabazitaxel para o tratamento do câncer de próstata. No entanto, essas abordagens frequentemente vêm acompanhadas de efeitos colaterais indesejáveis e não atingem a eficácia desejada na redução da evolução do câncer de próstata para um fenótipo hormônio independente. Isso realça a necessidade de se buscar novas substâncias que sejam mais eficazes e menos tóxicas (VELLKY, J. E.; RICKE, W. A. Development and prevalence of castration-resistant prostate cancer subtypes. *Neoplasia*, v. 22, n. 11, p. 566–575, 2020).

[014] Os produtos naturais são promissores. Um relatório realizado por Eric Patridge e sua equipe (PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016) revelou que a FDA aprovou, ao longo dos anos (de 1827 a 2013), um total de 547 produtos naturais e suas derivações como tratamentos medicinais. Estes têm sido empregados para o tratamento de diversas enfermidades, notavelmente câncer, infecções bacterianas e hipertensão. A mesma pesquisa constatou que 68% de todos os 136 medicamentos de moléculas pequenas com propriedades anticancerígenas disponíveis entre 1940 e 2014 eram originários de

substâncias naturais. Por possuírem a vantagem de apresentar baixa toxicidade e de ter múltiplos alvos e mecanismos de ação, as propriedades antitumorais de compostos derivados de recursos naturais têm sido extensivamente estudadas, com notável habilidade de integração em cenários clínicos.

[015] Empregados como abordagem preventiva para o câncer em estágios iniciais e como suplemento para estágios avançados da doença, os produtos naturais são capazes de induzir a apoptose e inibir a proliferação e metástase. (NAEEM, A. et al. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022). Ademais, os produtos naturais têm o potencial de aprimorar os tratamentos quimioterápicos e facilitar a administração de nanomedicamentos direcionados a células tumorais. Compostos como o resveratrol e a epigallocatequina já foram investigados clinicamente para o tratamento do câncer (MA, L. et al. Plant Natural Products: Promising Resources for Cancer Chemoprevention. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 933, 2021). Entretanto, otimizações estruturais nas substâncias naturais são necessárias, visando aprimorar não apenas a eficácia, mas também a segurança, a acessibilidade química e a farmacocinética (XIAO, Z.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K.-H. Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates. *Medicinal research reviews*, v. 36, n. 1, p. 32–91, 2016).

[016] Popularmente conhecida como “caapeba” ou “pariparoba”, *Pothomorphe umbellata* L. Miq. é uma planta arbustiva que apresenta ampla distribuição geográfica, desde a Amazônia até o sul do Brasil e em vários países da América Latina. Relatos apontam seu uso na medicina popular no tratamento de reumatismo, úlceras, febre, diarreia, queimaduras, distúrbios hepáticos e inflamação (REGINALDO VICENTE RIBEIRO et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 205, p. 69–102, 2017; ROERSCH, C. M. F. B. *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 3, p. 522–537, 2010).

[017] Na literatura acadêmica extratos de folhas, raízes e caules de *P. umbellata* foram avaliados e demonstraram significativas atividades antimaláricas, anti-inflamatórias, antitumorais, antifúngicas e antibacterianas (BAGATELA, B. S.

et al. Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from the aerial parts of *Piper umbellata* L. (Piperaceae). *Natural Product Research*, v. 27, n. 23, p. 2202–2209, 2013; PERAZZO, F. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of water–ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 215–220, 2005; SILVA et al. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. v. 151, n. 1, p. 137–143, 2014; CRISTINA, A. et al. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, v. 44, n. 6, p. 2731–2735, 2009.

[018] O catecol prenilado de fórmula molecular C₂₁H₃₀O₂ denominado 4-Nerolidilcatecol (4-[(6E)-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-3-il]benzeno-1,2-diol) é um dos principais compostos bioativos isolados de *P. umbellata* (C. DESMARCHELIER et al. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* Spp. Scavenges Peroxyl Radicals and Inhibits Fe(II)-Dependent DNA Damage. *Planta Medica*, v. 63, n. 06, p. 561–563, 1997). O 4-Nerolidilcatecol e alguns derivados têm apresentado atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-genotóxica, antimalárica, anti-Schistosoma mansoni, antibacteriana, antifúngica, analgésica e antitumoral (COSTA, D. DE S. et al. Antiparasitic properties of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) in vitro and in mice models with either prepatent or patent *Schistosoma mansoni* infections. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 313, p. 116607, 2023; ALVES-FERNANDES, D. K. et al. In vivo antitumoral effect of 4-nerolidylcatechol (4-NC) in NRAS-mutant human melanoma. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 141, p. 111371, 2020; DÉBORA KRISTINA ALVES-FERNANDES et al. ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcatechol (4-NC). *Pharmacological Research*, v. 141, p. 63–72, 2019; FREITAS, J. A. et al. In vitro bioassay guided anti-dermatophyte and cytotoxic activities from *Piper umbellatum* L. Miq. led to 4-nerolidylcatechol. *Natural Product Research*, v. 34, n. 23, p. 3423–3427, 2020; POLYANA LOPES BENFICA et al. 4-Nerolidylcatechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. v. 55, n. 1, p. 1899–

1908,2017; ALANE PEREIRA CORTEZ et al. 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. *European Journal of Pharmacology*, v. 765, p. 517–524,2015; ROCHA E SILVA, L. F. et al. In Vivo Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of 4-Nerolidylcatechol Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 6, p. 3271–3280,2015; GAETIL, M. P. N. et al. Liposomal Entrapment of 4-Nerolidylcatechol: Impact on Phospholipid Dynamics, Drug Stability and Bioactivity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, n. 1, p. 838–847,2015; BAGATELA, B. S. et al. Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcathecol from the aerial parts of *Piper umbellata* L. (Piperaceae). *Natural Product Research*, v. 27, n. 23, p. 2202–2209,2013; KELLY SOUZA FERNANDES et al. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and α -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, n. 9, p. 780–788,2013; MEDANHA DA CUNHA et al., 4-Nerolidylcatechol and its synthetic analogues: antioxidant activity and toxicity evaluation. *Eur J Med Chem*. 2013; ELSON ALVES COSTA et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 — A 4-nerolidylcatechol derivative. v. 92, n. 3, p. 237–244,2013; LOPES, A. P. et al. Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcathecol from aerial parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). *BioMed Research International*, v. 2013, p. 206581, 2013; LIMA, E. et al. Stability and Antioxidant Activity of Semi-synthetic Derivatives of 4-Nerolidylcatechol. *Molecules*, v. 18, n. 1, p. 178–189,2012; LINO, R. C. et al. Anti-inflammatory effect of (E)-4-(3,7-dimethylocta-2,6-dienylamino)phenol, a new derivative of 4-nerolidylcatechol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 1, p. 133–141,2013; PINTO et al., New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009; BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 23, n. 1, p. 111–119,2009; VALADARES, M. C. et al. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 45, n. 10, p. 1975–1978,2007; ROCHA E SILVA, L. F. et al. In Vivo and In Vitro Antimalarial Activity of 4-Nerolidylcatechol. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 8, p. 1181–1188,2011.

[019] Estudos *in vitro* demonstraram uma citotoxicidade significativa do 4-Nerolidilcatecol a linhagens de melanoma, carcinoma de cólon, glioblastoma, câncer de mama e leucemia. Além disso, em um exemplo de modelo *in vivo* de melanoma, o composto reduziu o crescimento do tumor positivo para mutação NRAS (ALVES-FERNANDES, D. K. et al. In vivo antitumoral effect of 4-nerolidylcatechol (4-NC) in NRAS-mutant human melanoma. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, v. 141, p. 111371, 2020; DÉBORA KRISTINA ALVES-FERNANDES et al. ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcatechol (4-NC). Pharmacological Research, v. 141, p. 63–72, 2019; POLYANA LOPES BENFICA et al. 4-Nerolidylcatechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. v. 55, n. 1, p. 1899–1908, 2017; ALANE PEREIRA CORTEZ et al. 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. European Journal of Pharmacology, v. 765, p. 517–524, 2015; CRISTINA, A. et al. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. European journal of medicinal chemistry, v. 44, n. 6, p. 2731–2735, 2009; BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. Toxicology in Vitro, v. 23, n. 1, p. 111–119, 2009.

[020] Biologicamente, o 4-Nerolidilcatecol é capaz de inibir as metaloproteinases extracelulares MMP-2 e MMP-9, perturbar a função proteasomal, bloquear as fosfolipases A2, inibir a enzima topoisomerase I, induzir autofagia, além de atuar como antioxidante por ser capaz de modular o estado redox das células (CRISTINA DISLICH ROPKE et al. In Vitro and In Vivo Inhibition of Skin Matrix Metalloproteinases by Pothomorphe umbellata Root Extract. Photochemistry and Photobiology, v. 82, n. 2, p. 439–439, 2006; BROHEM, C. A. et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. Pigment Cell & Melanoma Research, v. 25, n. 3, p. 354–369, 2012; NÚÑEZ, V. et al. Inhibitory effects of Piper umbellatum and Piper peltatum extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. Phytochemistry, v. 66, n. 9, p. 1017–1025, 2005; MONGELLI, E. et al. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from Pothomorphe peltata inhibits topoisomerase I activity. Planta Medica, v. 65, n. 4, p.

376–378,1999; RENATO RAMOS MASSARO et al. 4-Nerolidylcatechol induces autophagy in human glioblastoma cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 3,2018; C. DESMARCHELIER et al. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* Spp. Scavenges Peroxyl Radicals and Inhibits Fe(II)-Dependent DNA Damage. *Planta Medica*, v. 63, n. 06, p. 561–563,1997.

[021] Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou, por meio de ensaios funcionais, que o 4-Nerolidilcatecol, possui atividades citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica sobre as células PC3, agindo de forma efetiva e seletiva contra essa linhagem de câncer de próstata hormônio independente (CORDEIRO, A. O. Extratos e substâncias naturais promissores para o tratamento do câncer de próstata. *Repositorio.ufu.br*, 2023). Além disso, agiu sinergisticamente com o docetaxel no controle dessas células. Contudo, os ensaios foram conduzidos apenas em linhagens celulares e com o 4-Nerolidilcatecol livre, de forma que foram evidenciadas suas limitações e a necessidade de se desenvolver nanoestruturas como as apresentadas nessa patente e, portanto, não avaliadas previamente.

[022] De fato, mesmo contendo grupos hidroxilas ionizáveis, o 4-Nerolidilcatecol é altamente lipofílico e praticamente insolúvel em água (0.007014 mg/L), fato que contribui para sua baixa biodisponibilidade e dificulta sua veiculação em formulações farmacêuticas aquosas (VALERIANO, V. S. Complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol emhidroxipropil- β -ciclodextrina. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2005). Na tentativa de contornar essa dificuldade, estudos vêm sendo conduzidos na busca de análogos mais hidrofílicos ou incorporando-os em sistemas nanoestruturados, por exemplo, com sua conjugação em formulações contendo ciclodextrinas, nanopartículas poliméricas e lipossomas.

[023] No cenário farmacêutico mundial, deve-se ressaltar que ainda não existem formulações lipossomais disponíveis comercialmente contendo 4-Nerolidilcatecol para fins terapêuticos de nenhuma doença. Apenas um artigo científico refere-se ao encapsulamento de 4-NC nesse tipo de formulação. Neste, lipossomas tradicionais preparados a partir de fosfatidilcolina de soja contendo 4-NC exibiram um comportamento de liberação prolongada quando comparados ao fármaco livre, sendo citotóxicos a células leucêmicas (GAETIL, M. P. N. et al. Liposomal Entrapment of 4-Nerolidylcatechol: Impact on Phospholipid Dynamics, Drug Stability and Bioactivity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15,

n. 1, p. 838–847, 2015). No entanto, o sistema apresentado no artigo e o método de obtenção de tais formulações diferem das formulações reivindicadas nesse pedido de patente. Além disso, os autores não mencionam a avaliação de segurança e eficácia de tais formulações em modelos animais, apenas se limitando a avaliar a sua citotoxicidade na linhagem de leucemia K562.

[024] Realizamos também uma busca extensiva em bancos de patentes utilizando os termos chaves: (i) 4-nerolidilcatecol (4-nerolidylcatechol), (ii) 4-NC, (iii) Composições farmacêuticas (Pharmaceutical compositions), (iv) Lipossomas (Liposomes), (v) Lipossomas elásticos (Elastic liposomes), (vi) Sistemas lipossomais elásticos (Elastic liposomal systems), (vii) Formulações lipossômicas híbridas (Hybrid liposomal formulations), (viii) Câncer (Cancer), (ix) Câncer de próstata (Prostate cancer). A patente BR102012012728A2 refere-se a uma formulação farmacêutica à base de picão-preto e caapeba para uso contra vírus de hepatites e outras doenças do fígado. As patentes EP1578433B1, WO2004026323A1 e US20060062858A1 descrevem o uso do extrato de *P. umbellata* para preparar composições dermocosméticas ou farmacêuticas para o tratamento ou prevenção de danos à pele causados pela exposição à luz, envelhecimento cutâneo e câncer de pele. As patentes BRPI0721725B1, US20110136901A1 e WO2009082795A1 referem-se ao 4-Nerolidilcatecol e seus derivados para tratamento de sintomas de malária, incluindo tratamento de pacientes resistentes aos antimaláricos tradicionais. As patentes EP3256141A1 e WO2016128386A1 reivindicam formulações multiparticuladas compreendendo extratos de ervas secos por pulverização, sendo as formulações preparadas por extrusão-esferonização. Já as invenções US20200016092A1, US20220280445A1, US20210145849A1 e WO2020014431A1 propõem métodos para obtenção de filmes orodispersíveis (strip oral), sendo que um dos ingredientes ativos reivindicados para sua composição é o 4-Nerolidilcatecol. Nenhuma dessas patentes descreve os métodos e o processo presentemente reivindicados na obtenção de formulações lipossomais híbridas com o 4-Nerolidilcatecol.

[025] A aplicação dos métodos exigidos por esta patente tem o potencial de validar e evidenciar um progresso inédito significativo na utilização desse do 4-Nerolidilcatecol encapsulado em lipossomas. Isso, por sua vez, permitirá a aprimoração de sua atividade citotóxica e anti carcinogênica, bem como a

otimização dos aspectos farmacocinéticos e sua utilização no controle de tumores ainda não demonstrados em outras patentes e/ou publicações.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção reivindica formulações híbridas naturais compostas por lipossomas, biossurfactantes e 4-Nerolidilcatecol com atividade antitumoral contra tumores epiteliais, em especial câncer de próstata.

[027] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um método para preparar a formulação a partir das etapas:

[028] Solubilização dos fosfolípidios e 4- Nerolidilcatecol (a partir de 1 mg/mL) em clorofórmio,

[029] Filme lipídico composto por fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) e colesterol ou fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol (col) e alfa tocoferol (vit E), contendo 4- Nerolidilcatecol através da evaporação do solvente por fluxo de N₂ e manutenção do filme obtido em vácuo por 2 h (25 ° C),

[030] Hidratação do filme lipídico com solução tampão fosfato salino (10 mM) pH 5,5 contendo biossurfactantes da classe do poliaquil glicosídeos, preferencialmente o decil poliglucosídeo Seguido de ultrassonicação por 10 minutos.

[031] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê que as formulações híbridas aqui reivindicadas são capazes de incorporar o bioativo 4-Nerolidilcatecol sem alterar a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas.

[032] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê que, enquanto manutenção da morfologia, a incorporação de 4- Nerolidilcatecol pelos lipossomas não alterou a integridade e nem a morfologia das vesículas, que atuaram como excelentes anfitriãs para o bioativo hidrofóbico.

[033] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê que as formulações possuem tempo de prateleira de 4 meses a 4 °C.

[034] Biologicamente a presente invenção promoveu a morte de células de câncer de próstata, além de reduzir a massa tumoral e inibir seu crescimento em modelo animal de embrião de galinha, sendo, portanto, uma formulação com aplicável ao tratamento de tumores.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[035] O objetivo desta patente foi introduzir uma nova formulação híbrida utilizando vesículas lipossomais unilamelares nanoestruturadas (LUV). Esses portadores são projetados para encapsular com eficiência metabólitos de plantas. Especificamente, o foco recai sobre o metabolito 4- Nerolidilcatecol purificado de *Pothomorphe umbellata*.

[036] Outro objetivo notável desta patente é introduzir uma formulação que exiba potenciais efeitos citotóxicos nas células de câncer de próstata, controlando a citotoxicidade do ativo em células não tumorigênicas, evidenciando, assim, a seletividade na ação do 4- Nerolidilcatecol formulado.

[037] Além disso, esta patente visa apresentar um método de fabricação da formulação, garantindo sua estabilidade físico-química ao longo do armazenamento até sua eventual utilização.

[038] Um objetivo adicional desta patente é estabelecer um método de administração seguro e eficiente para as formulações acima mencionadas em modelos biológicos. Garantir a longevidade dessas formulações em termos de qualidade, segurança e eficácia é fundamental.

[039] Conforme comprovado pelos dados experimentais fornecidos, este relatório descritivo demonstra que as formulações aqui descritas cumprem com sucesso todos os objetivos propostos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

1. Preparo das formulações híbridas

[040] As formulações lipossomais elásticas híbridas foram preparadas pela técnica de formação de filme lipídico. Os lipossomas podem ser compostos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) e colesterol ou fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol (col) e alfa tocoferol (vit E), sendo preferencialmente compostos por EPC, col e vit E na razão 4:3:0,07 mol%, respectivamente, com concentração final de 5 a 30 mM, especificamente 20 mM. Após a solubilização dos lipídios e 4- Nerolidilcatecol, apresentado abreviado como 4-NC (2 mg/mL) em clorofórmio, os

excipientes foram conservados em fluxo de N₂ e vácuo por 2 h (25 ° C), para completa evaporação do solvente e subsequente formação do filme lipídico contendo 4-NC na concentração de 1 a 2,5 mg/mL, preferencialmente a 2 mg/mL.

[041] Então, o filme lipídico foi hidratado com solução tampão fosfato salino (10 mM) pH 5,5 contendo biossurfactantes da classe do poliaquil glicosídeos, preferencialmente o decil poliglucosídeo (Plantaren 2000) de 1 a 5 µL/mL, preferencialmente 4 µL/mL, sendo agitadas em vórtex de 3 a 8 min, preferencialmente 5 min, resultando na formação de vesículas multilamelares grandes. A formulação resultante foi submetida à sonicação ou a um processo de extrusão manual, preferencialmente sonicação em banho de gelo de 5 a 20 minutos, preferencialmente 10 minutos (frequência de 37 kHz e amplitude de 50 %) para a miniaturização e homogeneização de tamanho das vesículas. Formulações lipossomais convencionais de mesma composição lipídica, porém, sem 4-NC, contendo tampão fosfato salino pH 5,5 (10 mM) e Plantaren 2000 (4 µL/mL) foram preparadas como controle. As formulações resultantes (LUV e LUV/4-NC) foram armazenadas em vidro âmbar a 4 °C até uso posterior.

[042] Todas as formulações exibiram aspecto leitoso e translúcido compatível com os lipossomas tradicionais. Porém, a formulação contendo 4-NC (LUV/4-NC) apresentou um tom avermelhado dada a presença do bioativo. O desenvolvimento de um sistema lipossomal elástico híbrido, contendo exclusivamente excipientes naturais e com atividade antineoplásica contra câncer de próstata ainda não havia sido descrito até então.

2. Caracterização biofísica e acompanhamento da estabilidade físico-química das formulações

[043] O tamanho de partícula (nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (mV) das formulações foram analisados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS; LiteSizer 500, Anton Paar, Alemanha), logo após o preparo e em tempos pré-determinados durante 120 dias, a fim de garantir a estabilidade físico-química (tempo de prateleira) das formulações aqui reivindicadas.

[044] As análises foram realizadas em triplicata (25 ° C), para ambas as amostras (LUV e LUV/4-NC). A estabilidade físico-química é um pré-requisito preconizado pelas farmacopeias brasileira, norte-americana e europeia para a garantia do tempo de prateleira de sistemas particulados, sendo monitorada em relação ao tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV).

[045] Foi possível observar que após 120 dias de monitoramento, o lipossoma controle (LUV) exibiu tamanho de partícula inferior ao LUV/4-NC, apresentando tamanhos médios de 190,0 nm e 342,3 nm, respectivamente. Essa diferença de tamanho entre os sistemas se deve à presença do bioativo 4-NC, que é uma molécula de elevada massa molecular e hidrofobicidade, que se arranja espontaneamente entre a bicamada fosfolipídica do LUV elástico, o que também explica a diferença de tamanho significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo. Porém, sem apresentar nenhuma tendência de aumento de tamanho ou instabilidade físico-química, conforme o requerido para este tipo de sistema (**Figura 1**). Com relação aos valores de PDI (**Figura 2**), ambos os sistemas descreveram uma distribuição homogênea dos tamanhos, apresentando, após 120 dias, valores médios de PDI de 0,115 para LUV e 0,233 para LUV/4-NC. Cabe ressaltar, que apenas a formulação controle LUV exibiu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para este parâmetro. Isso sugere que as formulações híbridas aqui reivindicadas são capazes de incorporar o bioativo 4-NC sem alterar a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas.

[046] O potencial Zeta é uma medida teórica da mobilidade eletrocinética de partículas em suspensão, comumente relacionada à estabilidade físico-química de formulações particuladas. Seu valor se dá em módulo e deverá apresentar valores mais distantes de zero possível. A **Figura 3** demonstrou que a encapsulação de 4-NC foi responsável por aumentar em módulo os valores de Zeta, tornando tais amostras ainda mais estáveis ao longo do tempo. A formulação LUV/4-NC apresentou o potencial Zeta mais negativo (~ -32 mV) após 120 dias de acompanhamento, enquanto as amostras de LUV exibiram valores médios de -19 mV ao fim do período de análise, ambas as amostras apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo, determinadas pelo rearranjo

supramolecular intrínseco às formulações coloidais. Tais achados garantiram a estabilidade físico-química da presente invenção aqui reivindicada.

3. Morfologia das nanopartículas

[047] A morfologia das formulações de LUV e LUV/4-NC foram elucidadas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV).

[048] Para tanto, uma gota de cada amostra foi aderida a uma lamínula de vidro previamente pregada a um porta-amostra de alumínio (*stub*). Após a completa evaporação do solvente, os *stubs* foram submetidos ao processo de *sputtering* durante 120 s a 30 kV e armazenados em dissecador até a análise. As amostras foram visualizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo ZEISS EVO MA10 modelo EVO da marca JEOL, com detectores de elétrons secundários e retroespalhados, operando em alto vácuo sob tensão de 20 kV, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

[049] Foram confirmadas as morfologias esféricas de contornos aparentes das nanopartículas de ambas as amostras (**Figura 4**). A incorporação de 4-NC pelos lipossomas não alterou a integridade e nem a morfologia das vesículas, que atuaram como excelentes anfitriãs para o bioativo hidrofóbico.

4. Cultivo celular e avaliação de citotoxicidade *in vitro* das formulações lipossomais

[050] Foram utilizadas duas linhagens celulares prostáticas provenientes do banco de células American Type Culture Collection (ATCC): (i) PNT2, linhagem celular não tumorigênica (saudável); e (ii) PC3, linhagem tumoral hormônio independente. Todas as células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina, e mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os meios de cultura

foram trocados em dias alternados até que as células atingissem aproximadamente 80% de confluência.

[051] Para a análise da atividade citotóxica das formulações foi realizado o ensaio utilizando Alamar Blue® Cell Viability Assay Reagent. As linhagens celulares foram cultivadas conforme descrito anteriormente, desagregadas enzimaticamente, centrifugadas, coradas com o corante azul de tripano e contabilizadas na câmara de Neubauer em microscópio óptico (Thermo Evos XL Microscope Imaging System). Foram semeadas 2×10^4 células por poço em placas de 96 poços sendo mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas para aderência. Foram conduzidos três ensaios independentes em triplicata.

[052] Para os tratamentos, foram estabelecidos 4 grupos: 4-NC (produto natural não encapsulado), LUV (vesículas lipossomais não-formuladas), LUV/4-NC (formulação lipossomal encapsulando 4-NC) e controle (células não tratadas). O 4NC foi diluído em dimetil-sulfóxido (DMSO) e meio de cultura. Os tratamentos foram conduzidos com os compostos nas concentrações, em µM de 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 e 320. Após 48 horas, foi adicionado 10 µl do reagente colorimétrico Resazurina diluído em tampão fosfato salino a 0,1 mg/mL por 4 horas. Por fim, a absorbância (Abs) foi medida em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. Os valores de viabilidade celular foram expressos como porcentagem relativa à absorbância determinada, de modo que foi calculada a diferença percentual entre as células tratadas e o controle de células não tratadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{O2} \times \text{A1}) - (\text{O1} \times \text{A2})}{(\text{O2} \times \text{P1}) - (\text{O1} \times \text{P2})} \times 100 \quad (\text{Eq 01})$$

Em que:

O1 = Coeficiente de oxidação do Alamar Blue em 570 nm

O2 = Coeficiente de oxidação do Alamar Blue em 600 nm

A1 = Valor de absorbância das amostras teste em 570 nm

A2 = Valor de absorbância da amostra teste em 600 nm

P1 = Valor de absorbância do controle em 570 nm

P2 = Valor de absorbância do controle em 600 nm

[053] Os resultados foram plotados e o gráfico de citotoxicidade foi gerado através do software GraphPad Prism 8.0. Foi analisada a normalidade de distribuição dos dados pelo teste Shapiro wilk e a significância estatística estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey.

[054] Como ilustrado na **Figura 5**, os resultados revelaram uma notável citotoxicidade de LUV/4-NC dependente da concentração às células tumorais de próstata, evidenciada de forma marcante nas duas concentrações mais elevadas da formulação encapsulada. Para as células não tumorigências a viabilidade se manteve em torno de 100%. O 4-NC não encapsulado, por sua vez, apresentou uma porcentagem de morte celular também dependente da concentração, mas em ambas as linhagens – normal e tumoral, o que reforça seu potencial citotóxico não seletivo.

[055] Para verificar a seletividade da formulação e do produto em sua forma livre frente às células tumorais, foi calculado o índice de seletividade (IS), que é dado pela relação entre as concentrações necessárias para reduzir 50 % da viabilidade celular (IC50) das células não-tumorais em relação às tumorais, sendo determinada a partir da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC50 \text{ da linhagem não tumoral (Eq 02)}}{IC50 \text{ da linhagem tumoral}}$$

Em que: $IS \geq 2$ qualificam o composto como mais seletivo para as linhagens tumorais, ou seja, é duplamente mais eficaz contra as células malignas em relação às células saudáveis, sendo considerados promissores.

[056] A **Tabela 1** mostra as concentrações necessárias para reduzir 50 % da viabilidade celular (IC50) e o índice de Seletividade (IS).

COMPOSTOS	IC50 (µM)	IS
-----------	-----------	----

	PNT2	PC3	
4-NC	38,84	42,26	0,92
LUV/4NC	1.868,0*	246,7	7,57

Tabela 1- IC50 dos compostos 4-NC Livre e LUV/4NC nas linhagens celulares PNT2 e PC3 e seus respectivos índices de Seletividade (IS). O valor identificado com * foi estimado por regressão não linear.

[057] Portanto, observou-se que 4-NC Livre não se mostrou seletivo, comprometendo de forma expressiva a viabilidade da linhagem não tumorigênica. Já LUV/4-NC aumentou em cerca de 48 vezes o valor de IC50 para as células PNT2 e foi citotóxico à linhagem de câncer de próstata hormônio independente, PC3. Isso é um aspecto relevante e promissor, pois indica que a formulação direciona a citotoxicidade do produto natural preferencialmente às células cancerosas, preservando a viabilidade das células normais. Esse resultado ressalta a importância da encapsulação do 4-NC pelos lipossomas. Além disso, evidencia que a estratégia inédita de construção híbrida reivindicada nesta patente permitiu melhorar a seletividade e a eficácia do composto contra as células malignas, enquanto minimizou seu efeito citotóxico sobre as células normais.

[058] Com base em tais resultados, foi possível determinar as concentrações seguras dos tratamentos, ou seja, adequadas para os experimentos biológicos subsequentes, sendo elas 80 e 160 µm.

5. Estudos in vivo de nanotoxicidade em modelo de embrião de galinha

[059] A nanotoxicidade da formulação foi avaliada no modelo *in vivo* de embrião de galinha, utilizando como parâmetros a viabilidade e alteração de peso dos embriões e dos anexos. Além disso, os embriões foram submetidos a avaliações macroscópicas para verificar a presença de malformações, alterações circulatórias e possíveis modificações visuais nos órgãos internos. Essas avaliações foram realizadas comparando todos os grupos tratados com o controle a fim de identificar quaisquer efeitos adversos induzidos pela formulação. De fato,

a biocompatibilidade e a segurança de produtos farmacêuticos nanoestruturados são aspectos cruciais para que esses novos sistemas possam ser viáveis comercialmente. Assim, espera-se que uma formulação segura não cause alterações significativas na viabilidade e nem no desenvolvimento do embrião.

[060] Para o experimento, foram utilizados 40 ovos da linhagem W-36 de *Gallus gallus*. Antes das análises, os ovos passaram por ovoscopia para verificar a viabilidade dos embriões no 7º dia de desenvolvimento. Os ovos foram pesados e divididos em 4 grupos (n=10 para cada grupo): controle negativo (CN), no qual os ovos foram tratados com Plantaren 2000(diluyente das formulações); 4-NC; LUV e LUV/4-NC nas concentrações a partir de 1 mg/mL, preferencialmente a 2 mg/mL. Em seguida, os ovos foram incubados e, no 14º dia de desenvolvimento embrionário, foram pesados novamente e a viabilidade verificada. A alteração de peso do embrião foi calculada pela diferença entre o peso dos ovos antes e depois dos tratamentos, de acordo com a seguinte equação:

$$aW = (ce. ysW \times 50) \div ieW \quad (Eq\ 3)$$

Em que:

aW = peso do ovo ajustado para 50.

ce.ysW = peso do embrião.

ieW = peso inicial do ovo.

[061] Interessantemente, no grupo tratado com 4-NC, observou-se a morte de todos os embriões no segundo dia do tratamento, evidenciando a toxicidade apresentada pelo composto não encapsulado (**Figura 6**). Nos demais grupos, os embriões se mantiveram viáveis durante todo o experimento.

[062] Os pesos dos embriões tratados na maior concentração de LUV e LUV/4NC também foram avaliados (**Figura 7**). Observou-se uma redução no peso dos embriões tratados com LUV (11.11%) e LUV-4NC (6,11%) comparados com o controle. Contudo, entre as LUV e LUV/4NC não houve diferença estatisticamente significativa. Apesar dessa redução no peso, nas avaliações necroscópicas, não foram observadas diferenças na formação ou coloração dos órgãos internos dos

embriões nos grupos tratados com LUV e LUV/4NC em comparação com o grupo controle. Adicionalmente, todos os órgãos se desenvolveram de acordo com o esperado para essa fase embrionária. Os resultados reforçam a importância das formulações lipossomais na redução da toxicidade, uma vez que a encapsulação do composto 4-NC em lipossomos permitiu um desempenho superior em termos de segurança, preservando a viabilidade dos embriões.

6. Avaliação da eficácia antitumoral da formulação em modelo *in vivo* de embrião de galinha

[063] Foram conduzidos dois ensaios independentes, o de inibição tumoral e o de regressão tumorais. Estes proporcionaram uma investigação detalhada do efeito da formulação no controle do crescimento tumoral das células de câncer de próstata da linhagem PC3 (hormônio independente) e na inibição de sua disseminação. As células foram implantadas na membrana cariolantoide (CAM) de embrião de galinha juntamente com uma matriz extracelular, a qual desempenha um papel crucial ao fornecer suporte estrutural e bioquímico. A CAM é uma via de administração que oferece acesso direto ao embrião. O tratamento é prontamente adsorvido após aplicação na membrana, penetrando rapidamente na corrente sanguínea do embrião e atingindo de forma eficaz o tumor.

[064] O objetivo do teste de inibição tumoral é avaliar a capacidade de inibir o desenvolvimento e o avanço das células tumorais entre os grupos do estudo. Para isso, ovos com 7 dias de desenvolvimento foram divididos em 4 grupos (n = 10 para cada grupo): controle, onde apenas as células PC3 e a matriz extracelular foram inoculadas; 4-NC, no qual as células PC3 tratadas com 4-NC na concentração de 2 mg/mL foram inoculadas juntamente com a matriz extracelular; LUV, no qual as células PC3 foram tratadas com LUV na concentração de 2 mg/mL e inoculadas juntamente com a matriz extracelular; e LUV/4-NC, em que as células PC3 tratadas com a formulação de LUV/4-NC na de 2 mg/mL e inoculadas juntamente com a matriz extracelular. Os ovos foram incubados e, no 14º dia, foram abertos para avaliação do tamanho da massa tumoral. Os tumores foram, então,

coletados, pesados e armazenado em formalina para avaliações histopatológicas posteriores.

[065] Conforme observado na **Figura 8A**, houve uma significativa inibição do crescimento e progressão do tumor no grupo tratado com LUV/4-NC. O tamanho da massa tumoral desse grupo também foi visivelmente menor em comparação ao grupo controle e aos grupos tratados com LUV e com apenas 4-NC. Além disso, uma análise comparativa dos pesos dos tumores (**Figura 8B**) permite traçar um paralelo entre cada tratamento e o grupo controle. É notável que o grupo tratado com LUV/4NC apresenta um peso tumoral 40.37% significativamente menor em relação ao controle. Esses resultados corroboram e fortalecem a formulação lipossomal LUV/4NC como capaz de conter o estabelecimento e o avanço das células malignas.

[066] O teste de regressão difere do teste de inibição ao avaliar o potencial dos tratamentos em reduzir o tamanho de um tumor já implantado e já em crescimento no embrião. Neste experimento, os grupos seguiram as mesmas distribuições mencionadas anteriormente.

[067] Os ovos de 7 dias de desenvolvimento foram inoculados com células PC3 e matriz extracelular, e, então, incubados para permitir o crescimento e desenvolvimento do tumor. No 10º dia, cada grupo foi tratado com seus respectivos compostos na concentração a partir de 1 mg/mL, preferencialmente a 2 mg/mL. Posteriormente, os ovos foram novamente incubados. Somente no 14º dia os ovos foram abertos para avaliar o tamanho do crescimento tumoral, coletar amostras, pesar e analisar o tumor, que foi armazenado em formalina para avaliações histopatológicas posteriores.

[068] Os resultados confirmaram os achados do experimento de inibição celular, macroscopicamente sugerindo uma redução na densidade tumoral no grupo tratado com LUV/4-NC em comparação ao grupo controle (**Figura 9A**). O potencial terapêutico da formulação requerida é evidenciado ao demonstrar uma redução de 20,77% do tumor implantado em relação ao grupo controle e de 16,85% e 29.41% em relação aos demais grupos 4NC E LUV, respectivamente (**Figura 9B**). Outro aspecto notável é que o 4-NC não apresentou diferenças significativas na regressão do tamanho tumoral em comparação com o controle, apesar de afetar a

viabilidade do embrião devido ao seu poder tóxico previamente conhecido e debatido.

[069] Esses resultados indicam o potencial antineoplásico da formulação testada na regressão de tumores estabelecidos. A combinação sinérgica dos lipossomas (LUV) com o composto natural (4-NC) pode apresentar possíveis aplicações clínicas no futuro no tratamento de tumores em estágio avançado.

7. Avaliações histopatológicas dos tumores

[070] A avaliação histopatológica dos fragmentos de tumores obtidos nos experimentos descritos anteriormente proporciona uma análise mais aprofundada da estrutura e composição do tumor. Para isto, os fragmentos de tumores foram fixados em formol tamponado a 10% e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A morfologia tumoral foi avaliada qualitativamente, levando em consideração a presença de achados histológicos compatíveis com inflamação, degeneração e necrose, em comparação com o controle.

[071] Durante a análise do processo inflamatório, foram realizadas avaliações microscópicas em todos os fragmentos de tumores dissecados dos embriões. Foram observados o número de focos inflamatórios e a localização e o número de células inflamatórias presentes nesses focos. O processo inflamatório foi classificado como 0 para casos normais, sem a presença de processo inflamatório; 1 como leve, quando o número de focos inflamatórios era inferior a três, com um infiltrado inflamatório leve; 2 como moderado, quando o número de focos inflamatórios variava de três a cinco, com um infiltrado inflamatório moderado; e 3 como acentuado, quando o número de focos inflamatórios era superior a cinco, com um infiltrado inflamatório acentuado.

[072] Durante a análise de necrose, foram observados os números de focos de necrose e suas características, incluindo a associação com o processo inflamatório. A necrose foi classificada da seguinte forma: 0 para casos normais, nos quais não havia presença de processo necrótico; 1 - leve, quando o número de focos de necrose era inferior a três; 2 - moderado, quando o número de focos de necrose variava de três a cinco; e 3 - acentuado, quando o número de focos de

necrose era superior a cinco. Essa classificação permitiu avaliar a extensão e a intensidade da necrose presente nos tecidos analisados.

[073] Nos tumores extraídos do teste de inibição tumoral, foi observado um discreto processo inflamatório peritumoral em todos os tecidos analisados. Esse processo inflamatório foi caracterizado principalmente pela presença de heterófilos, indicando uma resposta imunológica do embrião à implantação de células externas ao seu próprio tecido. Essa reação inflamatória pode ser uma resposta natural do organismo à presença do tumor (**Figura 10 A.**)

[074] Para análise estatística da contagem de heterófilos entre os grupos testados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise indicou que há diferença na contagem de heterófilos entre os grupos ($p=0,007$) com o grupo teste LUV/4-NC apresentando contagem de heterófilos maior que os demais grupos (**Figura 10 B**). A análise da normalidade dos dados foi realizada utilizando teste de Kolmogorov Smirnov sendo $p= 0,002$, indicando que os dados não apresentam distribuição normal

[075] No teste de regressão tumoral também foi observada uma leve inflamação peritumoral em todos os grupos, caracterizada pela presença de heterofilos, similar ao observado no experimento anterior. No entanto, nos grupos tratados com a LUV/4-NC foi também evidenciado um padrão inflamatório intratumoral moderado, diferenciando-se dos demais grupos. Isso sugere que a formulação utilizada pode provocar uma resposta inflamatória mais intensa dentro do próprio tumor (**Figura 11 A**).

[076] A análise da normalidade dos dados foi realizada utilizando teste de Shapiro-Wilk sendo $p= 0,041$, indicando que os dados não possuem distribuição normal. Para análise da contagem de heterófilos entre os grupos testados utilizou-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise indicou que há diferença na contagem de heterófilos entre os grupos ($p< 0,001$) (**Figura 11 B**). Na análise post hoc utilizou-se o teste ANOVA para amostras independentes em pares que indicou com o grupo LUV/4-NC possui contagem de heterófilos maior que o grupo controle.

[077] Em relação à presença de áreas necróticas embora fosse observado focos necróticos mais frequentes no grupo tratado com LUV/4-NC, sendo classificadas principalmente como moderados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

[078] A **Figura 12** ilustra, em uma perspectiva comparativa, que LUV/4-NC tanto controla a progressão para um fenótipo mais agressivo do câncer de próstata, caracterizado pela independência hormonal e resistência à castração, quanto impede seu avanço. Assim, pode ser introduzido no tratamento desses tumores em diferentes momentos e, portanto, é uma promissora estratégia de tratamento.

[079] Em conclusão, os achados apresentados neste estudo são de extrema importância, uma vez que destacam o potencial terapêutico da formulação híbrida à base de lipossoma elástico e 4NC (LUV/4-NC) aqui reivindicada, que se revelou altamente eficaz na inibição do crescimento tumoral e na supressão do desenvolvimento do tumor, em comparação aos grupos de controle. Esses resultados são consistentes com os testes de citotoxicidade realizados anteriormente, o que fortalece as evidências da atividade antitumoral da formulação em um ambiente biologicamente relevante.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[080] **Figura 1** – Análises de tamanho de partícula (nm) das formulações de LUV (controle) e LUV/4-NC (2mg/mL) em triplicata (25°C). As variações estatisticamente significativas intragrupo foram analisadas através do teste multivariado One-way ANOVA e Tukey post hoc teste por 120 dias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[081] **Figura 2** – Análises dos valores de PDI das formulações de LUV (controle) e LUV/4-NC (2 mg/mL) em triplicata (25 ° C). As variações estatisticamente significativas intragrupo foram analisadas através do teste multivariado One-way ANOVA e Tukey post hoc teste por 120 dias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[082] **Figura 3-** Análises dos valores de potencial Zeta (mV) das formulações de LUV (controle) e LUV/4-NC (2 mg/mL) em triplicata (25 ° C). As variações estatisticamente significativas intragrupo foram analisadas através do

teste multivariado One-way ANOVA e Tukey post hoc teste por 120 dias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[083] **Figura 4-** Imagens de microscopia eletrônica de Varredura das formulações de LUV **(A)** e LUV/4-NC **(B)**.

[084] **Figura 5-** Análise da viabilidade de linhagens prostáticas após tratamentos com 4-NC, LUV e LUV/4-NC por 48 horas. Tratamento da linhagem de próstata não tumorigênica PNT2**(A)**. Tratamento da linhagem tumoral hormônio independente PC3 **(B)**. Foi conduzido o ensaio de Alamar Blue e a significância estatística foi estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[085] **Figura 6-** Gráfico da avaliação da toxicidade de 4-NC, LUV e LUV/4-NC em modelo *in vivo*. Foi avaliada a viabilidade e mortalidade dos embriões de galinha tratados com 4-NC, LUV e LUV/4-NC em diferentes estágios embrionários em comparação com o controle. Tratamento com 1 mg/mL **(A)**. Tratamento com 2 mg/ml **(B)**. Ovos quebrados ou mortos pelo processo de inoculação foram retirados da análise. A significância estatística foi estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[086] **Figura 7-** Gráfico de análise das variações de peso dos embriões de galinha antes e após o tratamento com 4-NC, LUV e LUV/4-NC na concentração de 2 mg/mL. A significância foi estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[087] **Figura 8-** Ensaio de inibição tumoral conduzido em modelo *in vivo* de membrana corioalantoide de embrião de galinha. Avaliação macroscópica da inibição do tamanho tumoral dos grupos tratados com 4-NC; LUV e LUV/4-NC (2 mg/mL) em comparação com o grupo controle **(A)**. Análise das variações de peso

dos tumores nos testes de inibição tumoral após o tratamento com 4-NC, LUV e LUV/4-NC, na concentração de 2 mg/mL **(B)**. A significância foi estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[088] **Figura 9-** Ensaio de regressão tumoral conduzido em modelo *in vivo* de membrana cariolantoide de embrião de galinha. Avaliação macroscópica da regressão do tamanho tumoral dos grupos tratados com 4-NC; LUV e LUV/4-NC (2 mg/mL) em comparação com o grupo controle **(A)**. Análise das variações de peso dos tumores nos testes de regressão tumoral após o tratamento com 4-NC, LUV e LUV/4-NC, na concentração de 2 mg/mL **(B)**. A significância foi estabelecida pela análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[089] **Figura 10-** Avaliação e caracterização microscópica do padrão de inflamação e da presença de heterofilos em cortes histológicos dos tumores dissecados após os ensaios de inibição tumoral. Os heterofilos estão devidamente sinalizados indicados por setas pretas. Imagens dos controle e tumores dissecados após tratamento 4-NC, LUV e LUV/4-NC, na concentração de 2 mg/mL **(A)**. Gráfico representativo da análise estatística da contagem de heterofilos nos cortes histológicos **(B)**. A significância foi estabelecida pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[090] **Figura 11-** Avaliação e caracterização microscópica do padrão de inflamação e da presença de heterofilos em cortes histológicos dos tumores dissecados após os ensaios de regressão tumoral. Os heterofilos estão devidamente sinalizados indicados por setas pretas. Imagens dos controles e tumores dissecados após tratamento 4-NC, LUV e LUV/4-NC, na concentração de 2 mg/mL **(A)**. Gráfico representativo da análise estatística da contagem de heterofilos nos cortes histológicos. A significância foi estabelecida pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

[091] **Figura 12-** Gráfico comparativo da eficácia dos tratamentos dos embriões de galinha com 4-NC, LUV e LUV/4-NC, na concentração de 2 mg/mL nos ensaios de inibição tumoral e regressão tumorais.

FIGURA 1

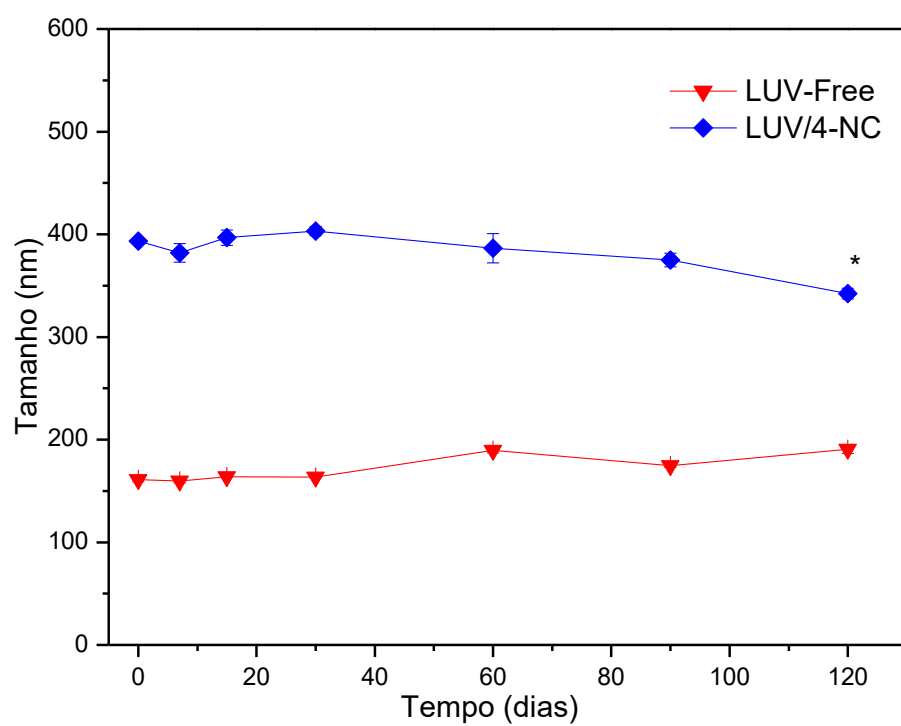


FIGURA 2

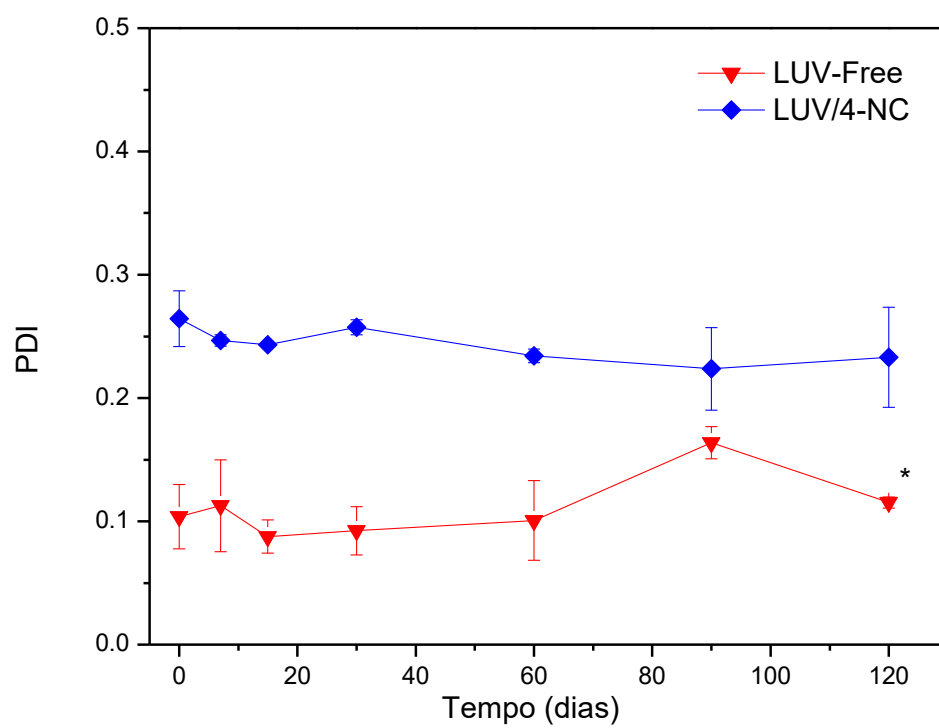


FIGURA 3

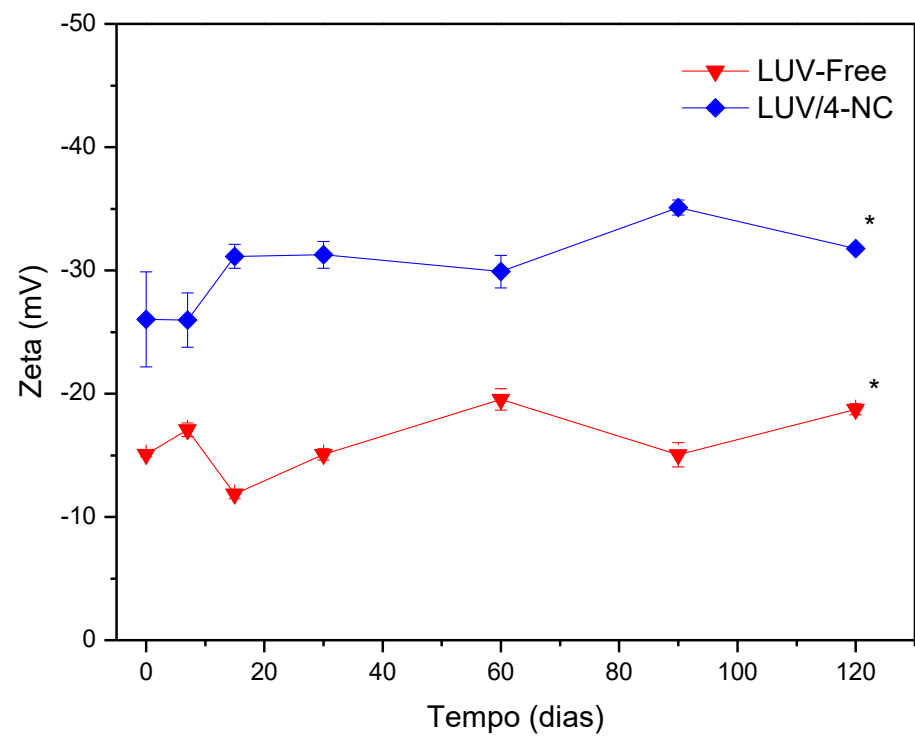


FIGURA 4

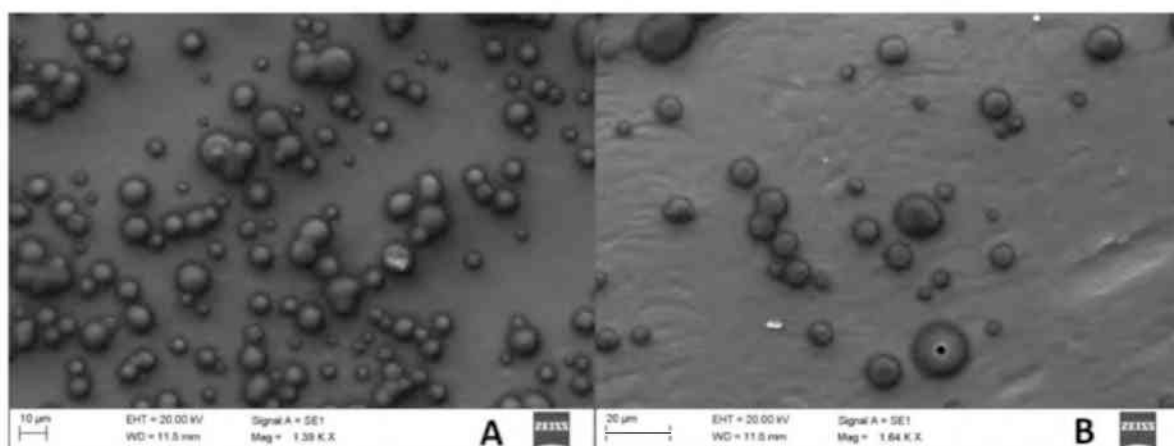
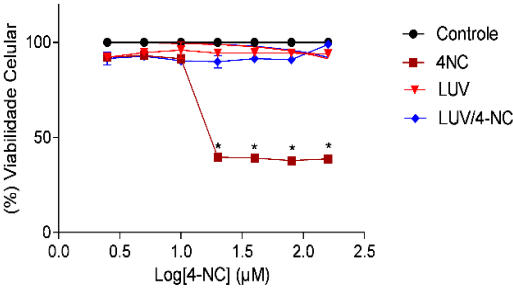


FIGURA 5

A- Linhagem PNT2



B- Linhagem PC3

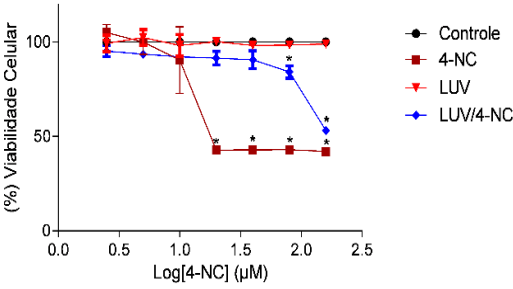


FIGURA 6

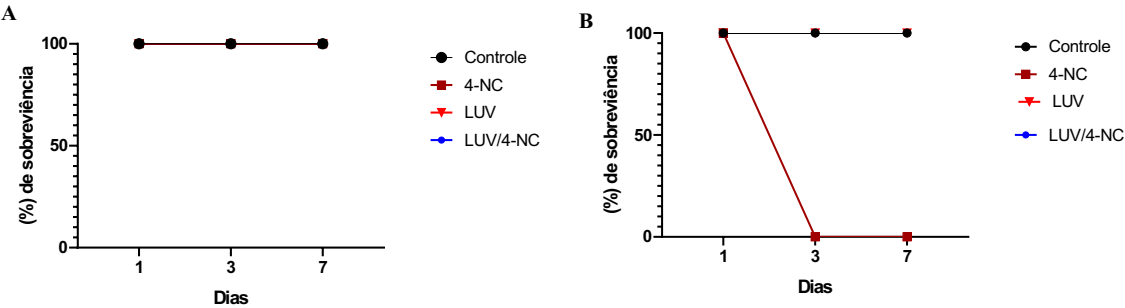


FIGURA 7

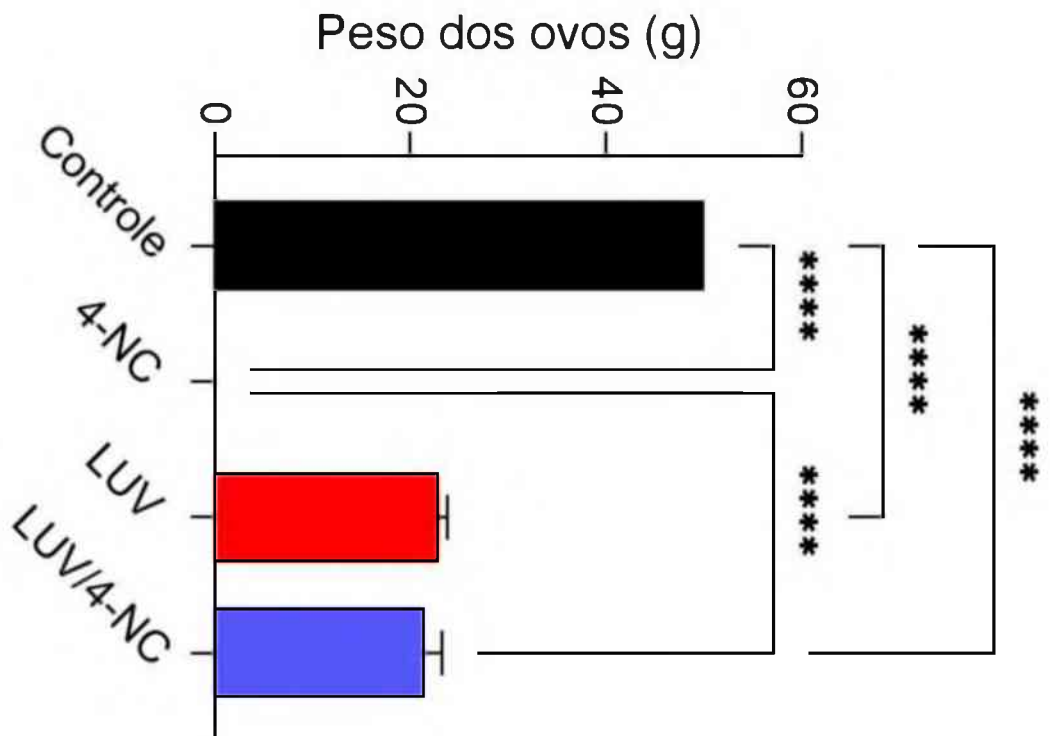


FIGURA 8

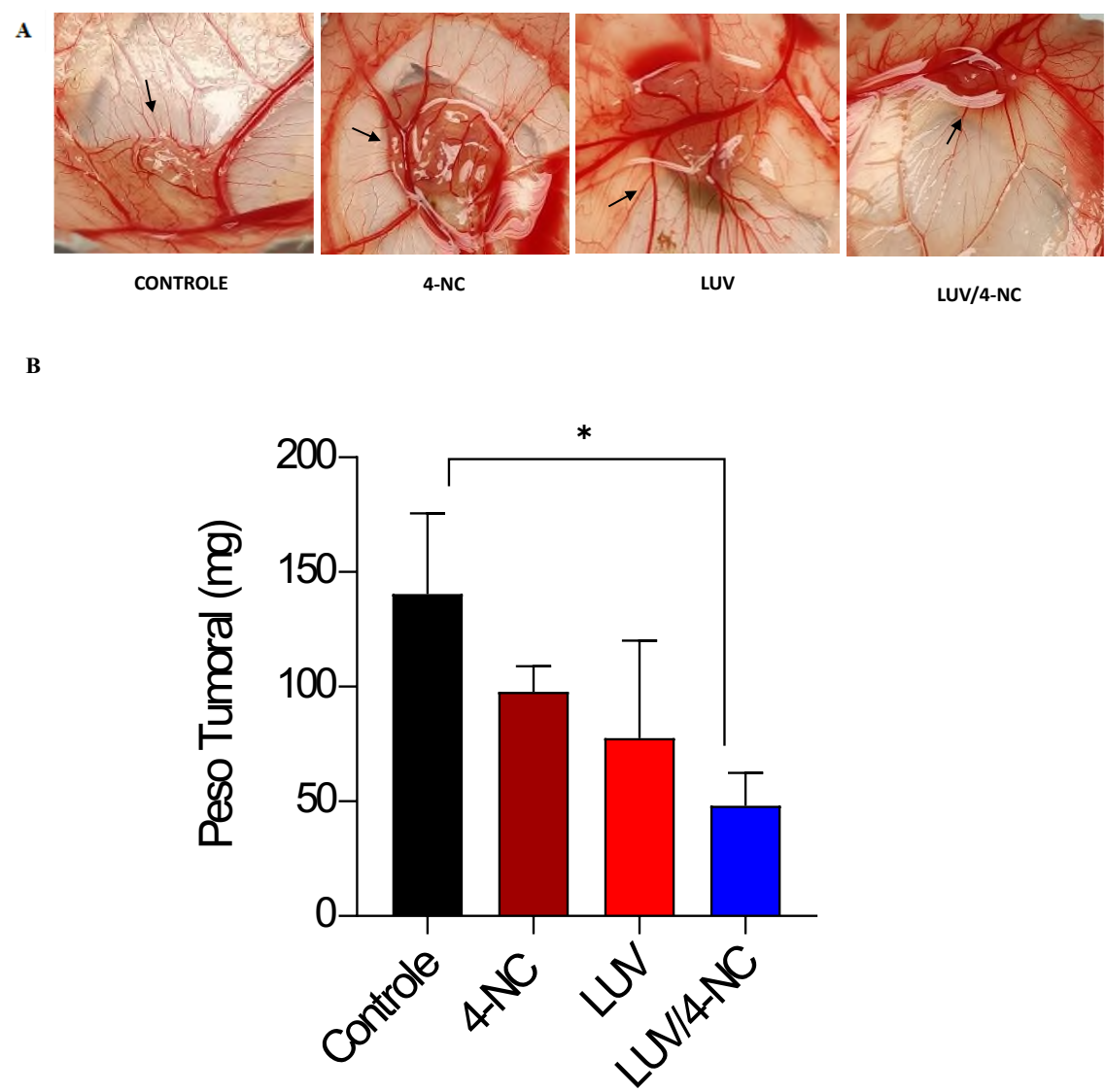


FIGURA 9

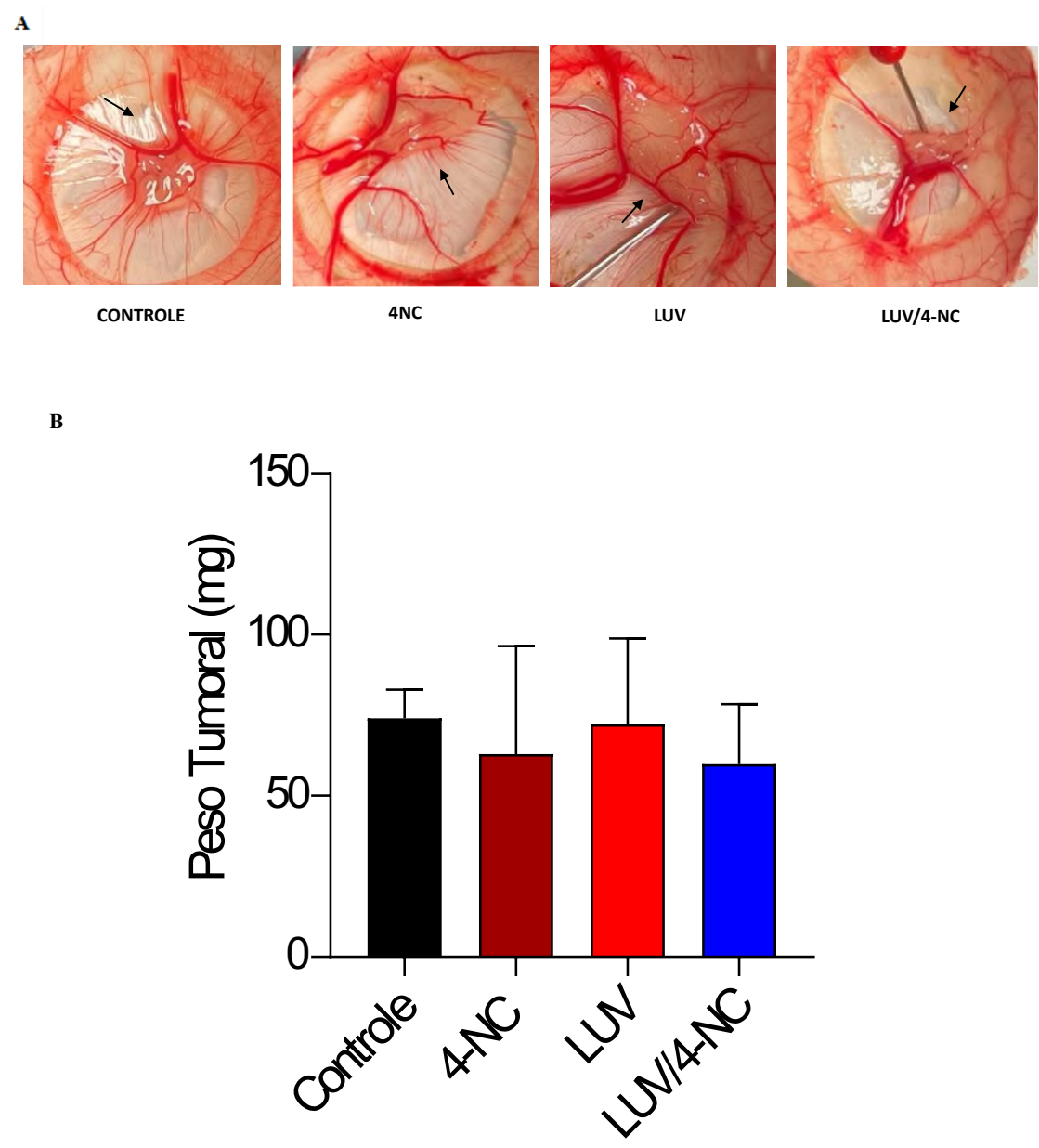
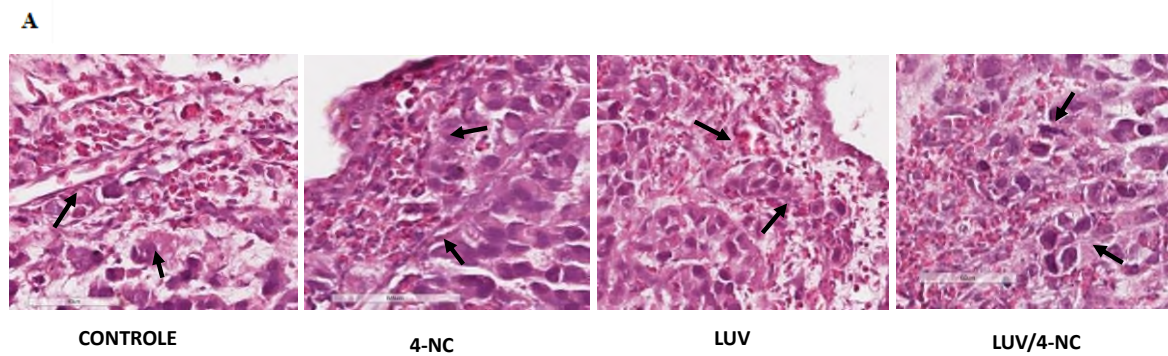


FIGURA 10



B

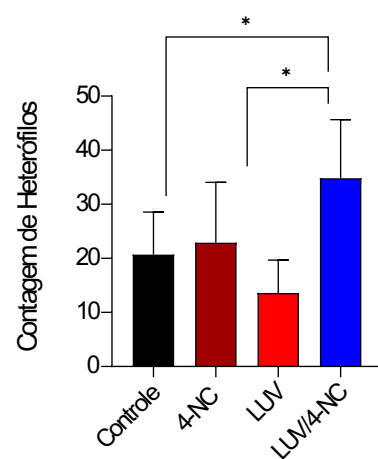


FIGURA 11

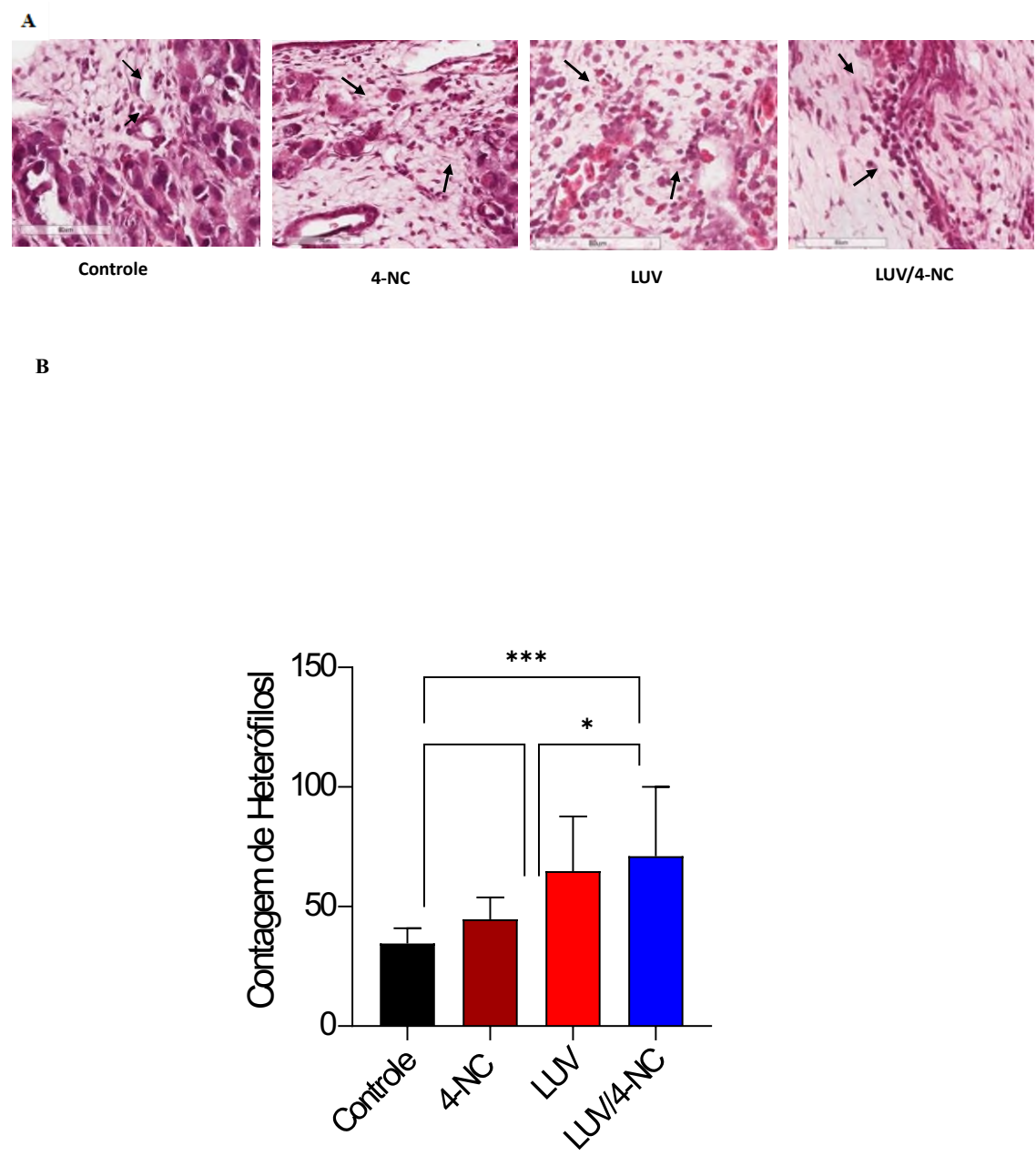
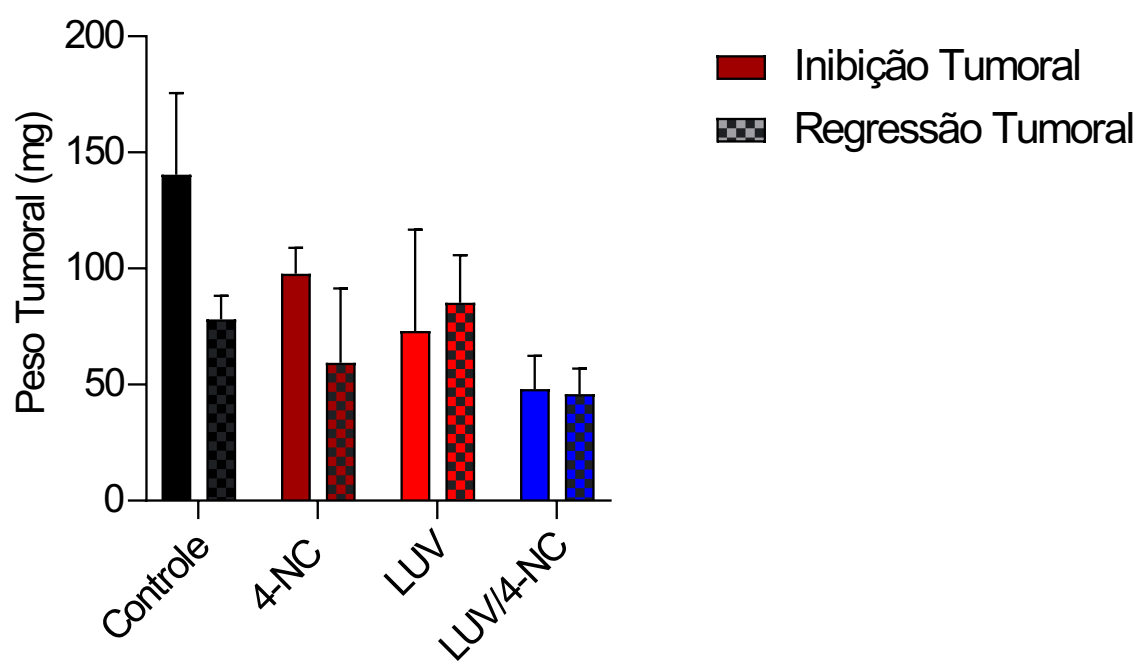


FIGURA 12



REFERÊNCIAS

ABIDI, A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 230, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825997/>. Acesso em 8 Jul.2023.

AHDOOT, M. et al. Contemporary treatments in prostate cancer focal therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 31, n. 3, p. 200–206, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000515>. Acesso em: 14 Jun.2023.

AHMAD, M. Z. et al. Metallic nanoparticles: technology overview & drug delivery applications in oncology. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 8, p. 927–942, 20 jul. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645671/>. Acesso em: 19 Ju.2023.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, 22 fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>. Acesso em: 10 jun 2023.

AKHTER, S. et al. Cancer Targeted Metallic Nanoparticle: Targeting Overview, Recent Advancement and Toxicity Concern. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1834–1850, 1 jun. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21568874/>. Acesso em: 19 Ju.2023.

ALANE PEREIRA CORTEZ et al. 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p. 517–524, 1 out. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.024>. Acesso em: 19 Jul. 2023.

ALON HARMELIN et al. Biopsy of the mouse prostate. *Laboratory Animals*, 1 abr. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15901365/>. Acesso em 10Jul.2023.

ALVES-FERNANDES, D. K. et al. In vivo antitumoral effect of 4-nerolidylcatechol (4-NC) in NRAS-mutant human melanoma. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 141, p. 111371, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111371>. Acesso em: 5 Ago. 2023.

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, n. suppl 1, p. e20170238, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28876358/>. Acesso 17 Set.2023.

ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics,

safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, 12 dez. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmr/a/F5yTr9KkbwrCYw8j9hQmy6v/>. Acesso em: 17 Jul.2023.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26281720/>. Acesso em 15 Set.2023.

AVRAM, S. et al. Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. **Oncology Reports**, v. 38, n. 1, p. 89–99, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2017.5658>. Acesso em: 20 Jul.2023.

AZAD, A. A. et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 10, p. 2315–2324, 23 fev. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25712683/>. Acesso 09 Set.2023.

BACH, C. et al. The status of surgery in the management of high-risk prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 6, p. 342–351, 13 maio 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818848/>. Acesso em: 06 Ago.2023.

BANCROFT, E. K. et al. A prospective prostate cancer screening programme for men with pathogenic variants in mismatch repair genes (IMPACT): initial results from an international prospective study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 11, p. 1618–1631, nov. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34678156/>. Acesso em: 18 Jul.2023.

BANERJEE, P. P. et al. Androgen action in prostate function and disease. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 6, n. 2, p. 62–77, 1 abr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902724/>. Acesso em: 12 Ago.2023.

BANSTOLA, A.; REYNOLDS, J. N. J. The Sheep as a Large Animal Model for the Investigation and Treatment of Human Disorders. **Biology**, v. 11, n. 9, p. 1251, 23 ago. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36138730/>. Acesso em: 19 Set.2023.

BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>. Acesso em: 19 jun 2023.

BARNES, E. C.; KUMAR, R.; DAVIS, R. A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for

drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 372–381, 2016. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/np/c5np00121h>. Acesso em: 19 Ago.2023.

BASKAR, R. et al. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 27 fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>. Acesso em: 12 Set 2023.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>. Acesso em: 29 Jul.2023.

BELKAHLA, S. et al. Advances and development of prostate cancer, treatment, and strategies: A systemic review. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 9 set. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9501970/>. Acesso em: 09 Set.2023.

BHAVSAR, A.; VERMA, S. Anatomic Imaging of the Prostate. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25243174/>. Acesso em: 17 Jul.2023.

BLUEMN, E. G.; NELSON, P. S. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 24, n. 3, p. 251–257, maio 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161359/>. Acesso em: 9 Jul.2023.

BRAWER, M. K. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. **Reviews in Urology**, v. 7, n. Suppl 3, p. S11–S18, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1477603/>. Acesso em: 3 Set. 2023.

BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 111–119, fev. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19059332/>. Acesso em 9 Set.2023.

BROOK, M. N. et al. Family History of Prostate Cancer and Survival Outcomes in the UK Genetic Prostate Cancer Study. v. 83, n. 3, p. 257–266, 1 mar. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3652847>. Acesso em 7 Set.2023.

BUCHANAN, G. et al. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1273–1281, 1 maio 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11350894/>. Acesso em 16 Jun.2023.

CANALE, S. et al. Interleukin-27 inhibits pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cell spreading in a preclinical model. **Leukemia**, v. 25, n. 12, p. 1815–1824, 24 jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2011.158>. Acesso em: 18 Ago. 2023.

Câncer - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 10 Set.2023

CARLSSON, S. V.; VICKERS, A. J. Screening for Prostate Cancer. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 6, p. 1051–1062, nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099450/>. Acesso em: 9 Jul.2023.

CAROLINA, A. et al. Análise fitoquímica e toxicológica de *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 17–17, 11 jan. 2019. Disponível em: <https://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/41>. Acesso em: 14 Jul.2023.

CHA, H.-R.; LEE, J. H.; PONNAZHAGAN, S. Revisiting Immunotherapy: A Focus on Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 80, n. 8, p. 1615–1623, 15 abr. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7641094/>. Acesso em 6 Set.2023.

CHANG, K.-H. et al. A Gain-of-Function Mutation in DHT Synthesis in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Cell**, v. 154, n. 5, p. 1074–1084, 29 ago. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931012/>. Acesso em: 15 Set.2023.

CHEN, J. et al. Translational Bioinformatics for Diagnostic and Prognostic Prediction of Prostate Cancer in the Next-Generation Sequencing Era. **BioMed Research International**, v. 2013, p. e901578, 15 jul. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23957008/>. Acesso em: 09 Jun.2023.

CHEON, D.-J.; ORSULIC, S. Mouse Models of Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 95–119, 28 fev. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>. Acesso em 22 de Ago 2023.

CHHABRA, G. et al. Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. **Cancer Letters**, v. 422, p. 9–18, maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471004/>. Acesso: 15 Jul.2023.

Chin, S. N., Wang, L., Moore, M., & Sridhar, S. S. (2010). A review of the patterns of docetaxel use for hormone-resistant prostate cancer at the Princess Margaret Hospital. **Current Oncology**, 17(2), 24-29. <https://doi.org/10.3747/co.v17i2.482>. Acesso: 12 Jun.2023.

COOKSON, M. S. et al. Castration-Resistant Prostate Cancer: AUA Guideline. **Journal of Urology**, v. 190, n. 2, p. 429–438, ago. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665272/>. Acesso em: 3 Set.2023.

CORDANI, M.; SOMOZA, Á. Targeting autophagy using metallic nanoparticles: a promising strategy for cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 7, p. 1215–1242, 2019).Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483817/>. Acesso em: 27 Jul.2023.

CORDEIRO, Antonielle Oliveira. Extratos e substâncias naturais promissores para o tratamento do câncer de próstata. 2019. - Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/26898>. Acesso em: 25 Jul.2023.

COSTA, D. DE S. et al. Antiparasitic properties of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) in vitro and in mice models with either prepatent or patent *Schistosoma mansoni* infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 313, p. 116607, 15 set. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874123004750?via%3Dihub>. Acesso em: 23 Jul.2023.

CP, W.; E, W.; BW, S. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. [s.l: s.n.]. OPAS/OMS, **Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em 10 Jun.2023.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. Suppl. 2, p. 41–59, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5588531/>. Acesso em: 23 Jul.2023.

CRAWFORD, E. D. et al. Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. **Journal of Urology**, v. 194, n. 6, p. 1537–1547, dez. 2015.Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26196735/>. Acesso em 21 Jun.2023.

DA SILVA GUIMARÃES, G. et al. 4-Nerolidylcatechol (4-NC) and Docetaxel Synergize in Controlling Androgen- independent Prostate Cancer Cells. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 943–955, 1 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568026623666230207095253>. Acesso em: 28 Ago 2023.

DA SILVA GUIMARÃES, G. et al. 4-Nerolidylcatechol (4-NC) and Docetaxel Synergize in Controlling Androgen- independent Prostate Cancer Cells. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 943–955, 1 abr. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36748811/>. Acesso em: 19 Abril.2023

DAVARAN, S. et al. Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin-loaded Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. **International Journal of Nanomedicine**, p. 511, fev. 2012.Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3273983/>. Acesso em: 11 Jun. 2023.

DAVATGARAN TAGHIPOUR, Y. et al. Nanoformulations of natural products for management of metabolic syndrome. **International Journal of**

Nanomedicine, v. Volume 14, p. 5303–5321, jul. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6642644/>. Acesso em: 25 Jul.2023.

Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. **Israel Journal of Medical Sciences**. 1987 Jun;23(6):551-555. PMID: 3312096. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3312096/>. Acesso em: 15 Ago.2023.

DAVIES, G. et al. Animal research nexus: a new approach to the connections between science, health and animal welfare. **Medical Humanities**, v. 46, n. 4, p. 499–511, 19 fev. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7786151/>. Acesso em: 03 Set.2023.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2090>. Acesso em: 23 jul.2023

DEB, P. K. et al. Protein/Peptide Drug Delivery Systems. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, p. 651–684, 2019. Disponível em: <http://10.1016/B978-0-12-817909-3.00016-9>. Acesso em: 10 Jun.2023.

DÉBORA KRISTINA ALVES-FERNANDES et al. ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcatechol (4-NC). **Pharmacological Research**, v. 141, p. 63–72, 1 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.006>. Acesso em: 15 Mai. 2023.

DECKER, K. F. et al. Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration-resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 21, p. 10765–10779, 27 set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23019221/>. Acesso em 12 Jun.2023.

DELUCE, J. E. et al. Emerging Biomarker-Guided Therapies in Prostate Cancer. **Current Oncology**, v. 29, n. 7, p. 5054-N.PAG5076, 1 jul. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9319825/>. Acesso em: 22 de Jul.2023.

DEMARZO, A. M. et al. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 955–964, mar. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12648986/>. Acesso em 2 Jun.2023.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 6, p. 1119–1130, 13 nov. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699943/>. Acesso em: 15 Ago.2023.

DOMÍNGUEZ-OLIVA, A. et al. The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. **Animals**, v. 13, n. 7, p.

1223, 31 mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13071223>. Acesso em: 23 Set. 2023.

DOMÍNGUEZ-OLIVA, A. et al. The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. **Animals**, v. 13, n. 7, p. 1223, 31 mar. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/7/1223>. Acesso em: 3 Set. 2023.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 15–25, 24 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337882/>. Acesso em 5 Jun.2023.

DROZ, J.-P. et al. Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 73, n. 1, p. 68–91, jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.09.005>. Acesso em: 12 set. 2023.

EISERMANN, K. et al. Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. **Translational andrology and urology**, v. 2, n. 3, p. 137–147, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25045626/>. Acesso em 15 Jun.2023.

EPSTEIN, J. I. An Update of the Gleason Grading System. **Journal of Urology**, v. 183, n. 2, p. 433–440, fev. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20006878/>. Acesso em: 29 Jul.2023.

FERREIRA, L. B. Estudo funcional do DD3 no Câncer de Próstata e sua interação com a via do Receptor de Androgênio. **ninho.inca.gov.br**, 2011. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/12956>. Acesso em: 18 Set.2023.

FONTANA, F. et al. Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 460, 18 fev. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/460>. Acesso em: 19 Jun 2023.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511–518, jun. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gSRzGNSrnMPPWyCQcWfrypj/>. Acesso em: 2 Ago.2023.

FU, B. et al. Multi-Component Herbal Products in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Associated Toxicity and Side Effects: A Review on Experimental and Clinical Evidences. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 29 nov. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281965/>. Acesso em: 5 Ago.2023.

FUJITA, K.; NONOMURA, N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. **The world journal of men's health**, v. 37, n. 3, p. 288–295, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6704300/>. Acesso em: 12 Jul.2023.

GAMAT, M.; MCNEEL, D. G. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 24, n. 12, p. T297–T310, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0145>. Acesso em: 8 jun 2023

GERRITSEN, W. R.; SHARMA, P. Current and Emerging Treatment Options for Castration-Resistant Prostate Cancer: A Focus on Immunotherapy. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 1, p. 25–35, 4 nov. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22048979/>. Acesso em 12 Ago.2023.

GREGORY, C. D. et al. Epidermal Growth Factor Increases Coactivation of the Androgen Receptor in Recurrent Prostate Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7119–7130, 20 fev. 2004.

GUIMARÃES, GABRIELA DA SILVA. Avaliação Da Atividade Sinérgica Entre Compostos Naturais Puros E O Quimoterápico Docetaxel Em Modelos Celulares De Câncer De Próstata. 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/31300?mode=full>. Acesso em: 6 Set.2023.

GUO, Z. et al. A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Up-regulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen Depletion-Resistant Growth. **Cancer Research**, v. 69, n. 6, p. 2305–2313, 24 fev. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672822/>. Acesso em: 16 Set.2023.

GUPTA, U.; SINGH, A. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt. **Indian Journal of Medical Research**, v. 147, n. 5, p. 456, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082569/>. Acesso em: 17 Set.2023.

GUPTA, V. Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, p. 115, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19516890/>. Acesso em: 23 Jul.2023.

HAGEDORN, M. et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1643–1648, 21 jan. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547849/>. Acesso em 10 Jun.2023.

HAN, G. et al. Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 4, p. 1151–1156, 25 jan. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544619/>. Acesso em: 9 Jun.2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>. Acesso em: 25 jun.2023

HARRIS, W. P. et al. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 6, n. 2, p. 76–85, fev. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19198621/>. Acesso em 15 Set.2023.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 23 jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614221/>. Acesso em 15 Set.2023.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, dez. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2311300617300125>.

HEEMERS, H. V. et al. Androgen Modulation of Coregulator Expression in Prostate Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 4, p. 572–583, 1 abr. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2667711/>. Acesso em: 03 Set.2023.

HEIDENREICH, A. et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 68–80, jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17920184/>. Acesso em 12 Jun.2023.

HENRÍQUEZ, I. et al. Current and Emerging Therapies for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC). **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1247, 17 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091247>. Acesso em: 12 Jul.2023.

HENRY, G. H. et al. A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. **Cell Reports**, v. 25, n. 12, p. 3530-3542.e5, dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6411034/>. Acesso em 6 Jun.2023.

HIMANSHU, Anwekar; SITASHARAN, Patel; SINGHAI, A. K. Liposomes as drug carriers. **IJPLS**, v. 2, n. 7, p. 945-951, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/282811783_Liposome-as_Drug_Carriers. Acesso em: 13 Jun.2023.

HIRST, C. J.; CABRERA, C.; KIRBY, M. Epidemiology of castration resistant prostate cancer: A longitudinal analysis using a UK primary care database. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 6, p. e349–e353, dez. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22910034/>. Acesso em: 3 Jun.2023.

HSING, A. W. et al. High Prevalence of Screen Detected Prostate Cancer in West Africans: Implications for Racial Disparity of Prostate Cancer. **Journal of**

Urology, v. 192, n. 3, p. 730–736, set. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332806/>. Acesso em: 13 Jun.2023.

HU, J. et al. Establishment of xenografts of urological cancers on chicken chorioallantoic membrane (CAM) to study metastasis. **Precision Clinical Medicine**, v. 2, n. 3, p. 140–151, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz018>. Acesso em: 18 Ago.2023.

HU, R. et al. Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 16–22, 31 dez. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19117982/>. Acesso em: 8 Ago.2023.

HUANG, M.; LU, J.-J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 1, p. 5–13, 3 jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33389713/>. Acesso em: 8 Jun.2023.

HUANG, M.-Y. et al. Anticancer drug discovery from Chinese medicinal herbs. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, 4 jul. Disponível em: 2018.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29997684/>. Acesso em: 5 Jun 2023.

HUGGINS, C. STUDIES ON PROSTATIC CANCER. **Archives of Surgery**, v. 43, n. 2, p. 209, 1 ago. 1941. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/canjclin.22.4.232>. Acesso em: 24 jul 2023.

IGUCHI, T. et al. Enzalutamide versus flutamide for castration-resistant prostate cancer after combined androgen blockade therapy with bicalutamide: the OCUU-CRPC study. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 3, p. 486–494, 28 set. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31564004/>. Acesso em: 10 Ago.2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. List of classification by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, IARC monographs volumes 1-132. Lyon: IARC, 2019. Disponível em: https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classifications_by_cancer_site.pdf. Acesso em 9 Jun 2023.

ITTMANN, M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 5, 1 maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038334/>. Acesso em: 10 Ago.2023.

IWAMOTO, T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 715–718, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-01102>. Acesso em: 03 Jun. 2023.

JACKSON, S. J.; THOMAS, G. J. Human tissue models in cancer research: looking beyond the mouse. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 8, p. 939–

942, 1 ago. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560067/>. Acesso em: 18 Jul.2023.

JACOB, A. et al. Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer and Therapeutic Strategies. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5417, 28 out. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34771580/>. Acesso em: 17 jun. 2023.

JAIN, K. K. Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, n. 9, p. 1463–1476, ago. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16086635/>. Acesso em: 6 jul. 2023.

JEFFERI, N. E. S. et al. The Role of ER α and ER β in Castration-Resistant Prostate Cancer and Current Therapeutic Approaches. **Biomedicines**, v. 11, n. 3, p. 826, 9 mar. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36979805/>. Acesso em: 6 jul. 2023.

JEFFERIES, B. et al. Non-invasive imaging of engineered human tumors in the living chicken embryo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 10 jul. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28694510/>. Acesso em: 9 Ago.2023.

JOHNS, L. E.; HOULSTON, R. S. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. **BJU International**, v. 91, n. 9, p. 789–794, 23 maio 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12780833/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

KALIPSO HALKIDOU et al. Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. v. 22, n. 16, p. 2466–2477, 24 abr. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12717424/>. Acesso em 1 Jun.2023.

KARLSSON, Q. et al. Rare Germline Variants in ATM Predispose to Prostate Cancer: A PRACTICAL Consortium Study. **European Urology Oncology**, v. 4, n. 4, p. 570–579, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33436325/>. Acesso em: 2 Ago. 2023.

KASHYAP, D. et al. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Seminars in Cancer Biology*, v. 69, p. 5–23, 1 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.014>. Acesso em: 15 Jul.2023.

KASHYAP, D. et al. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. **Seminars in Cancer Biology**, v. 69, p. 5–23, 1 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31421264/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

KATARZYNA ZABIELSKA-KOCZYWAŚ et al. 3D chick embryo chorioallantoic membrane model as an in vivo model to study morphological and histopathological features of feline fibrosarcomas. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 26 jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485740/>. Acesso em: 9 Jun.2023.

KAVALIAUSKAITĖ, D. et al. The Effect of Sodium Valproate on the Glioblastoma U87 Cell Line Tumor Development on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and on EZH2 and p53 Expression. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5469982/>. Acesso em: 23 Set.2023.

KELLY SOUZA FERNANDES et al. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and α -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 9, p. 780–788, 1 set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24068194/>. Acesso em 09 Jul.2023.

KIM, E.-M.; JEONG, H.-J. Liposomes: Biomedical Applications. *Chonnam Medical Journal*, v. 57, n. 1, p. 27, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7840352/>. Acesso em: 8 Ago.2023.

KIM, T.-W.; CHE, J.-H.; YUN, J.-W. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 105, p. 15–29, jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30930176/>. Acesso em: 15 Jun.2023.

KIPRIYANOV, E. A. et al. RADICAL PROSTATECTOMY AND ROBOTIC RADIOSURGERY AS TREATMENT OPTIONS FOR LOCALIZED PROSTATE CANCER. **Siberian journal of oncology**, v. 19, n. 1, p. 50–56, 1 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-1-50-56>. Acesso em: 5 de Set.2023.

KIRBY, M.; et al. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 65, n. 11, p. 1180–1192, 14 out. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21995694/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

KITA, Y. et al. Castration-Resistant Prostate Cancer Refractory to Second-Generation Androgen Receptor Axis-Targeted Agents: Opportunities and Challenges. **Cancers**, v. 10, n. 10, p. 345, 1 out. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6210307/>. Acesso em: 12 set.2023.

KLINGENBERG, M. et al. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, 18 maio 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24884418/>. Acesso em: 23 Ago 2023.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 24 fev. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729362/>. Acesso em: 15 Ago.2023.

KONG, P. et al. Emerging Proteins in CRPC: Functional Roles and Clinical Implications. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 10 jun. 2022. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9226405/>. Acesso em: 17 Jun. 2023.

KOUDELKA, Š.; TURÁNEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 3, p. 322–334, nov. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22989535/>. Acesso em: 3 Set. 2023.

KRAUSS, A. C. et al. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 9, p. 2685–2690, 1 maio 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30541745/>. Acesso em 13 Jun. 2023.

LALLOUS, N. et al. Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 26 jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26813233/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, set. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21889721/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

LEE, K. H. et al. The “R” principles in laboratory animal experiments. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 1, dez. 2020. Disponível em: <https://labanimres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42826-020-00078-6>. Acesso em: 25 jun. 2023.

LEWANDOWSKA, A. et al. Environmental risk factors for cancer – review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1–7, 22 mar. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30922021/>. Acesso em: 2 set. 2023.

LI, J. et al. Polyethylene Glycosylated Curcumin Conjugate Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth through Inactivation of Jab1. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81–90, 1 jul. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30541745/>. Acesso em: 5 Ago. 2023.

LI, J. W.-H. ; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 9 jul. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589993/>. Acesso em: 17 Ago. 2023.

LINJA, M. J. et al. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3550–3555, 1 maio 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11325816/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

LITWIN MS, TAN H. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532–2542. doi:10.1001/jama.2017.7248. Disponível em:

LIU, J. et al. Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 22, p. 7567–7569, 10 jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja902039y>. Acesso em: 23 Jul. 2023

LIU, J.; CHOU, H.-H.; LIN, H. A tale of the two PEGylated liposomal doxorubicins. **OncoTargets and Therapy**, p. 1719, jul. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508070/>. Acesso em: 11 Ago.2023.

LIU, M. et al. The Histone Methyltransferase EZH2 Mediates Tumor Progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a Novel Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Translational Oncology**, v. 6, n. 3, p. 273–281, jun. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3660795/>. Acesso em: 19 Ago.2023.

LIU, P., CHEN, G., & ZHANG, J. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Molecules**, 27(4). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8879473/>. Acesso em: 12 Ago.2023.

LOCKE, J. A. et al. Androgen Levels Increase by Intratumoral De novo Steroidogenesis during Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 15, p. 6407–6415, 1 ago. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18676866/>. Acesso em: 11 Jun.2023.

LOKESHWAR, S. D.; KLAASSEN, Z.; SAAD, F. Treatment and trials in non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, v. 18, n. 7, p. 433–442, 17 maio 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41585-021-00470-4>. Acesso em: 12 Set.2023.

LOKMAN, N. A. et al. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9959–9970, 10 ago. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22949841/>. Acesso em: 19 jun. 2023

LOOS, C. et al. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. **Biomaterials**, v. 35, n. 6, p. 1944–53, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24331713/>. Acesso em: 8 Jun.2023.

MAJERNÍK, M. et al. Novel Insights into the Effect of Hyperforin and Photodynamic Therapy with Hypericin on Chosen Angiogenic Factors in Colorectal Micro-Tumors Created on Chorioallantoic Membrane. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3004–3004, 19 jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627608/>. Acesso em: 5 Jun.2023.

MEENA, J. et al. Inorganic nanoparticles for natural product delivery: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2107–2118, 7 ago. 2020. Disponível em: <https://DOI:10.1007/s10311-020-01061-2>. Acesso em: 15 Ago.2023.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 5, 23 jun. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35736631/>. Acesso em: 8 jul. 2023.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Frequent Gene Products and Molecular Pathways Altered in Prostate Cancer- and Metastasis-Initiating Cells and Their Progenies and Novel Promising Multitargeted Therapies. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 9-10, p. 949–964, 20 maio 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3188882/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MIZOKAMI, A. et al. Therapies for castration-resistant prostate cancer in a new era: The indication of vintage hormonal therapy, chemotherapy and the new medicines. **International Journal of Urology**, v. 24, n. 8, p. 566–572, 3 jun. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28577511/>. Acesso em: 17 jun. 2023.

MOHAN, R.; SCHELLHAMMER, P. F. Treatment Options for Localized Prostate Cancer. **American Family Physician**, v. 84, n. 4, p. 413–420, 15 ago. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-020-01061-2>. Acesso em: 9 Set.2023.

MOHAN, R.; SCHELLHAMMER, P. F. Treatment options for localized prostate cancer. **American Family Physician**, v. 84, n. 4, p. 413–420, 15 ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21842788/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

MONTGOMERY, R. B. et al. Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth. **Cancer Research**, v. 68, n. 11, p. 4447–4454, 1 jun. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536685/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

MORGAN, C. et al. PCN17 CASTRATION-RESISTANT PROSTATE CANCER (CRPC): A UK EPIDEMIOLOGY STUDY. *Value in Health*, v. 13, n. 3, p. A26, maio 2010. Disponível em: [http://10.1016/S1098-3015\(10\)72108-2](http://10.1016/S1098-3015(10)72108-2). Acesso em 13 Jun.2023.

MOROTE, J. et al. Definition of Castrate Resistant Prostate Cancer: New Insights. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 689, 17 mar. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35327491/>. Acesso em: 9 set. 2023.

MUCCI, L. A. et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. **JAMA**, v. 315, n. 1, p. 68, 5 jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26746459/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

MUKKALA, A. N. et al. A systematic review and meta-analysis of unplanned hospital visits and re-admissions following radical prostatectomy for prostate

cancer. *Canadian Urological Association Journal*, v. 15, n. 10, 18 mar. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8525525/>. Acesso em: 15 Ago.2023.

MULHALL, J. P. et al. Validation of the erection hardness score. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 4, n. 6, p. 1626–1634, 1 nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17888069/>. Acesso em: 10 Jul.2023.

NAGHAVI A.O. et al. Clinical implications of a prostate-specific antigen bounce after radiation therapy for prostate cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 598–604, 6 set. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25193155/>. Acesso em : 19 Jul.2023.

NAJMI, A. et al. Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 1 jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35056662/>. Acesso em: 2 set. 2023.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 12 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32162523/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

NGUYEN-NIELSEN, M.; BORRE, M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 46, n. 6, p. 484–490, 1 nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27825428/>. Acesso em: 11 jun. 2023.

NICOLOSI, P. et al. Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. **JAMA oncology**, v. 5, n. 4, p. 523–528, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30730552/>. Acesso em: 5 Set.2023.

NISHIYAMA, T. Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 3-5, p. 179–190, 1 abr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22269996/>. Acesso em: 14 jul. 2023.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779–804, 1 out. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138280/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

NSAIRAT, H. et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. e09394, maio 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35600452/>. Acesso em: 1 jun. 2023.

NYBERG, T. et al. Homeobox B13 G84E Mutation and Prostate Cancer Risk. **European Urology**, v. 75, n. 5, p. 834–845, maio 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30527799/>. Acesso em: 13 Jul.2023.

NYBERG, T.; TISCHKOWITZ, M.; ANTONIOU, A. C. BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants and prostate cancer risk: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, p. 1–15, 28 dez. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-021-01675-5>. Acesso em: 25 Ago 2023.

OCZKOWSKI, M. et al. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 496, 3 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33546190/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

OSKAR BERGENGREN et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. *European Urology*, 1 maio 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37202314/>. Acesso em: 5 Jun.2023.

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, n. 0, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/P8DqhfXHQgcVQmwcpY8CgXK/?lang=en>. Acesso em: 10 Jun.2023.

PARK, J. W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 3, jun. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12052251/>. Acesso em 02 Set.2023.

PASSERO, F. C. et al. The safety and efficacy of Onivyde (irinotecan liposome injection) for the treatment of metastatic pancreatic cancer following gemcitabine-based therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 16, n. 7, p. 697–703, 3 jun. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27219482/>. Acesso em: 16 Jul.2023.

PLICHTA, K. A.; GRAVES, S. A.; BUATTI, J. M. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Theranostics for Treatment of Oligometastatic Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12095, 9 nov. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34829977/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

BENFICA, L. B. et al. 4-Nerolidylcatechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. v. 55, n. 1, p. 1899–1908, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1311351>. Acesso em: 23 Set. 2023.

POTOSKY, A. L. Health Outcomes After Prostatectomy or Radiotherapy for Prostate Cancer: Results From the Prostate Cancer Outcomes Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 19, p. 1582–1592, 4 out. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11018094/>. Acesso em: 4 jun. 2023.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 20 abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.14740/wjon1191>. Acesso 17 Ago. 2023.

REBBECK, T. R. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 27, n. 1, p. 3–10, jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27986209/>. Acesso em: 7 set. 2023.

REEVES, F. et al. The Surgical Anatomy of the Prostate. **Prostate Cancer**, p. 253–263, 2016. Disponível em: <https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/1098133-the-surgical-anatomy-of-the-prostate>. Acesso em: 25 jul. 2023.

RIBATTI, D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 843, p. 47–57, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22222520/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

ROBZYK, K. et al. Uncoupling of hormone-dependence from chaperone-dependence in the L701H mutation of the androgen receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 268, n. 1-2, p. 67–74, mar. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904484/>. Acesso: 9 Set.2023.

ROVITHI, M. et al. Development of bioluminescent chick chorioallantoic membrane (CAM) models for primary pancreatic cancer cells: a platform for drug testing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44686, 17 mar. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5356332/>. Acesso em: 12 Jun.2023.

RUDY, S. F. et al. In vivo Wnt pathway inhibition of human squamous cell carcinoma growth and metastasis in the chick chorioallantoic model. **Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 45, p. 26, 26 abr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4845503/>. Acesso em: 17 Jul.2023.

SALEHI, B. et al. Phytochemicals in Prostate Cancer: From Bioactive Molecules to Upcoming Therapeutic Agents. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 29 jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6683070/>. Acesso em: 1 set. 2023.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 30 jun. 2023.

SCHALKEN, J.; FITZPATRICK, J. M. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. **BJU International**, v. 117, n. 2, p. 215–225, 6 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25818596/>. Acesso em: 30 jun.2023.

SCHRECENGOST, R.; KNUDSEN, K. E. Molecular Pathogenesis and Progression of Prostate Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 40, n. 3, p. 244–258, jun. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727396/>. Acesso em: 9 set. 2023.

SEBESTA, E. M.; ANDERSON, C. B. The Surgical Management of Prostate Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 44, n. 5, p. 347–357, out. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29580436/>. Acesso em: 9 Set.2023.

SECA, A.; PINTO, D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 16 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29337925/>. Acesso em: 14 Ago.2023.

SEIDENFELD, J. et al. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 7, p. 566–577, 4 abr. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10744594/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

SEKHOACHA, M. et al. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 27, n. 17, p. 5730, 5 set. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36080493/>. Acesso em: 02 Jun.2023.

SEKHOACHA, M. et al. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 17, p. 5730, 5 set. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36080493/>. Acesso em: 12 jul. 2023

SHAHEEN, S. M. et al. Liposome as a Carrier for Advanced Drug Delivery. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 6, p. 1181–1191, 1 mar. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32065133/>. Acesso em: 28 Jul.2023.

SHARROW, A. C. et al. Using the Chicken Chorioallantoic Membrane In Vivo Model to Study Gynecological and Urological Cancers. **Journal of Visualized Experiments**, n. 155, 28 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32065133/>. Acesso em: 17 Ago.2023.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p. 1967–2000, 15 set. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2939361/>. Acesso em: 3 set. 2023.

SHI, Z. et al. Performance of Three Inherited Risk Measures for Predicting Prostate Cancer Incidence and Mortality: A Population-based Prospective Analysis. **European Urology**, v. 79, n. 3, p. 419–426, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33257031/>. Acesso em: 9 Set.2023.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, jan. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36633525/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

SILVERMAN, J. A.; DEITCHER, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 555–564, 5

dez. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579462/>. Acesso em: 19 Jul.2023.

SKOWRON, M. A. et al. Applying the chicken embryo chorioallantoic membrane assay to study treatment approaches in urothelial carcinoma. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 35, n. 9, p. 544.e11–544.e23, set. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28551413/>. Acesso em: 15 Jul.2023.

SMITH, B. A. et al. A basal stem cell signature identifies aggressive prostate cancer phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, 12 out. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26460041/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

STEINKAMP, M. P. et al. Treatment-Dependent Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Exploit Multiple Mechanisms to Evade Therapy. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4434–4442, 14 abr. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19366804/>. Acesso em: 2 set. 2023.

STRMISKA, V. et al. Prostate cancer-specific hallmarks of amino acids metabolism: Towards a paradigm of precision medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 248–258, abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30708041/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

STROJNIK, T. et al. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4851–4860, 1 dez. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187462/>. Acesso em: 20 Ago.2023.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 23 Set. 2023.

SWADI, R. et al. Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 4 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29301505/>. Acesso em 7 Set.2023.

TAIZI, M. et al. A novel and rapid in vivo system for testing therapeutics on human leukemias. **Experimental Hematology**, v. 34, n. 12, p. 1698–1708, dez. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17157167/>. Acesso em: 4 jul. 2023.

TAYLOR, W. F.; JABBARZADEH, E. The use of natural products to target cancer stem cells. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 7, p. 1588–1605, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5523038/>. Acesso em: 5 set. 2023.

TESTA, U.; CASTELLI, G.; PELOSI, E. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 82, 30 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicines6030082>. Acesso em 18 Ago 2023.

THANGAPAZHAM, R. et al. Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. **International Journal of Oncology**, 1 maio 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425340/>. Acesso em: 20 Jun.2023

TOLKACH, Y.; KRISTIANSEN, G. Is high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) a reliable precursor for prostate carcinoma? Implications for clonal evolution and early detection strategies. **The Journal of Pathology**, v. 244, n. 4, p. 389–393, 7 mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29377129/>. Acesso em: 19 jun. 2023.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. **Human Development Report** 2021-22. Disponível em: <https://hdr.undp.org/content/human-development-report-2021-22>. Acesso em: 17 jul. 2023.

VALIZADEH, A. et al. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 480, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3463453/>. Acesso em: 1 set. 2023.

VAN DE GRAAFF, KM. Sistema genital masculino. In: **Anatomia humana**. 6ª ed. São Paulo: Manole 2003, 20: 697-723.

VELLKY, J. E.; RICKE, W. A. Development and prevalence of castration-resistant prostate cancer subtypes. **Neoplasia**, v. 22, n. 11, p. 566–575, nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32980775/>. Acesso em: 18 jun. 2023.

VICKMAN, R. E. et al. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian Journal of Urology*, v. 7, n. 3, out. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7385520/>. Acesso em: 17 Jul.2023.

WANG, F.-M. et al. Allogeneic Expanded Human Peripheral NK Cells Control Prostate Cancer Growth in a Preclinical Mouse Model of Castration-Resistant Prostate Cancer. **Journal of immunology research**, v. 2022, p. 1–11, 11 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/1786395>. Acesso em: 15 Ago 2023.

WANG, G. et al. Genetics and Biology of Prostate Cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105–1140, 1 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30181359/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

WANG, Z. A. et al. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer

heterogeneity. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 274–283, 24 fev. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23434823/>. Acesso em: 4 de set. 2023.

WU, C.-T. et al. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 31, p. 12679–12684, 31 jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1937526/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

XIAO, X. et al. Chick Chorioallantoic Membrane Assay: A 3D Animal Model for Study of Human Nasopharyngeal Carcinoma. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130935, 24 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26107941/>. Acesso em: 19 Jul. 2023.

YAMADA, Y.; BELTRAN, H. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 2, 12 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11912-020-01003-9>. Acesso em: 10 Ago 2023.

YAMADA, Y.; BELTRAN, H. The treatment landscape of metastatic prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 519, p. 20–29, out. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383521002950?via%3Dihub>. Acesso em: 16 Jun. 2023.

YAMADA, Y.; BELTRAN, H. The treatment landscape of metastatic prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 519, p. 20–29, out. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34153403/>. Acesso em: 3 set. 2023.

YAN LEE, P.; K.Y. WONG, K. Nanomedicine: A New Frontier in Cancer Therapeutics. **Current Drug Delivery**, v. 8, n. 3, p. 245–253, 1 maio 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21291378/>. Acesso em 18 Jun. 2023.

YANAGISAWA, T. et al. Androgen Receptor Signaling Inhibitors in Addition to Docetaxel with Androgen Deprivation Therapy for Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **European Urology**, ago. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35995644/>. Acesso em: 21 jun. 2023.

YANG, C. et al. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume11, p. 431–439, fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28243065/>. Acesso em: 11 jul. 2023.

YU, R. et al. Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 17, p. 24, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441158/>. Acesso em: 21 Jun. 2023.

ZABIELSKA-KOCZYWAŚ, K.; WOJTALEWICZ, A.; LECHOWSKI, R. Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. **Acta Veterinaria**

Scandinavica, v. 59, n. 1, 17 jul. 2017. disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0315-y>. Acesso em: 23 Set 2023.

ZAORSKY, N. G. et al. The evolution of brachytherapy for prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 7, p. 415–439, 1 jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7542347/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

ZHANG, W.; MOORE, L.; JI, P. Mouse models for cancer research. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 3, p. 149–152, 5 mar. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013310/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

ZHANG, X. et al. Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 340–355, jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29269253/>. Acesso em: 17 Jul. 2023.

ZHU, Y. et al. Inhibition of ABCB1 Expression Overcomes Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 9, p. 1829–1836, 1 set. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3947549/>. Acesso em: 14 jul. 2023.

ZUNIGA, K. B. et al. Diet and lifestyle considerations for patients with prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 38, n. 3, jul. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1078143919302479?via%3Dihub>. Acesso em: 2 set. 2023.

ZURTH, C. et al. Higher blood–brain barrier penetration of [14C] apalutamide and [14C]enzalutamide compared to [14C]darolutamide in rats using whole-body autoradiography. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 7_suppl, p. 156–156, 1 mar. 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/331601742_Higher_blood-brain_barrier_penetration_of_14_Capalutamide_and_14_Cenzalutamide_compared_to_14_Cdarolutamide_in_rats_using_whole-body_autoradiography. Acesso em: 10 jun. 2023.