Juliana Ayello Moura

Uso de uma nanoemulsão rica em colesterol (LDE) como
veículo para o di-dodecil metotrexato

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Hematologia

Orientadora: Dra Claudete Justina
Valduga

São Paulo
2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que continuam
apaixonados pela pesquisa...
assim como eu.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente aos grandes ídolos de minha vida, meus pais, por todo o apoio e incentivo oferecidos até a conclusão dessa dissertação;
- Às minhas queridas irmãs Mariana e Adriana por toda a força e compreensão por toda a minha ausência durante esses três anos;
- A toda minha família por todo apoio e carinho;
- A Dra. Claudete J. Valduga pela orientação, dedicação e profissionalismo empregados na execução desta dissertação;
- Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão pela grande oportunidade e pela sua grande competência como pesquisador;
- Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR, o qual sempre me apoiou e auxiliou;
- Agradeço em especial à Elaine Rufo Tavares, funcionária do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, e grande amiga por ter dedicado tanto tempo, atenção, profissionalismo e paciência para me ajudar em todos os sentidos, desde dividir os choros até os momentos mais engraçados que passamos juntas no decorrer desses anos;
- Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Durvanei A. Maria por toda ajuda e dedicação para execução desta dissertação, assim como a todas as pessoas do seu laboratório, em especial ao Kleber, Rogério, Kamila e Ricardo;
- A toda a equipe do Biotério do Instituto de Química da USP por todo apoio prestado;
- Ao meu grande companheiro Darcio, por todas as visitas ao biotério de finais de semana, por toda compreensão pela minha ausência, todo carinho e apoio, os quais foram muito importantes, mesmo que vindos de longe;
- A todos os meus grandes e verdadeiros amigos, os quais tiveram que me “suportar” e me confortar nos momentos mais críticos;
- E por último, agradeço também ao meu grande amigo Fernando por toda amizade, paciência, e dedicação para que o meu medo de camundongos fosse superado, o que não aconteceu até hoje.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Gui de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Mari Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

3.	INTRODUÇÃO.....	15
1.	Câncer - Aspectos Gerais.....	15
2.	LDL e Câncer.....	17
3.	Nanoemulsão Rica em Colesterol (LDE) e Câncer.....	19
4.	Metotrexato.....	21
4.	JUSTIFICATIVA.....	28
5.	OBJETIVOS.....	29
6.	MÉTODOS.....	30
1.	Reagentes.....	30
2.	Instrumentação Geral.....	30
1.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	30
2.	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	30
3.	Espectrometria de Massa.....	31
4.	Análise Elementar/Microanálise.....	31
5.	Infravermelho.....	31
6.	Light Scatering.....	32
7.	Espectrofotometria de UV.....	32
8.	Preparo da LDE.....	32
9.	Síntese do di-Dodecil Metotrexato.....	33
3.	Determinação do Coeficiente de Partição (Log P).....	34
1.	Associação do di-Dodecil Metotrexato à LDE.....	34
2.	Estabilidade da Associação LDE-di-Dodecil Metotrexato.....	34
3.	Estudos <i>in vitro</i>	35
1.	Manutenção das Linhagens Celulares e HL 60 K 562.....	35
2.	Citotoxicidade.....	35
3.	Captação Celular.....	36
4.	Estudos <i>in vivo</i>	37
1.	Dose Máxima Tolerada (DMT) e Dose Letal de 50 % (DL ₅₀).....	37
2.	Toxicidade Hematológica.....	38
1.	Número de Eritrócitos.....	38

2.	Número de Plaquetas.....	38
3.	Número de Leucócitos e Contagem Diferencial.....	38
5.	Análise Estatística.....	39
7.	RESULTADOS.....	40
1.	Síntese do di-Dodecil Metotrexato.....	40
2.	Estabilidade da Associação LDE-di-Dodecil Metotrexato.....	45
3.	Estudos <i>in vitro</i>	45
1.	Citotoxicidade.....	45
7.	Captação celular.....	52
4.	Estudos <i>in vivo</i>	55
1.	Dose Máxima Tolerada (DMT) e Dose Letal de 50 % (DL ₅₀).....	55
2.	Toxicidade Hematológica.....	60
1.	Número de Eritrócitos.....	60
2.	Número de Plaquetas.....	61
3.	Número de Leucócitos e Contagem Diferencial.....	62
8.	DISCUSSÃO.....	65
9.	CONCLUSÕES.....	74
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido fólico e metotrexato.

Figura 2. Interconversões bioquímicas dos folatos, seus papéis nas reações metabólicas folato-dependentes. Abreviações: DHFR, diidrofolato redutase; TS, timidilato sintase; GARFT, glicinamida ribonucleotídeo transformilase; AICARFT, fosforibosilamina imidazol carboxamida transformilase; 5-CH₃-THF, 5-metil tetraidrofolato; 5-CHO-THF e 10-CHO-THF, 5-formil e 10-formil tetraidrofolato, respectivamente; 5,10-CH₂-THF, 5,10-metileno tetraidrofolato; 5,10-CH=THF, 5,10-metnil tetraidrofolato; DHF, diidrofolato; THF, tetraidrofolato; dTMP, desoxitimidilato; dUMP, deoxiuridilato.

Figura 3. Esquema reacional para obtenção do di-dodecil metotrexato.

Figura 4. Cromatograma do MTX **(A)** e do di-dodecil metotrexato **(B)** obtidos por HPLC Shimadzu equipado com coluna C₁₈, fase reversa, utilizando metanol como fase móvel a um fluxo de 1 mL/min.

Figura 5. Espectro de ¹H RMN do di-dodecil metotrexato **(A)** e de ¹³C RMN **(B)**. Os espectros foram realizados em espectrômetro Bruker AC300, dissolvido em CDCl₃ e com TMS como referência.

Figura 6. Espectro de massa (expandido) obtido em equipamento Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) acoplado a uma bomba Shimadzu LC-10A **(A)**. Espectro de infravermelho do di-dodecil metotrexato em pastilha de KBr **(B)**.

Figura 7. (A) Efeito citotóxico na linhagem K 562 pela adição de LDE (o) e da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (•) nas concentrações de 0,2 a 2 mM. A massa de LDE foi correspondente à massa de LDE presente na associação LDE-di-dodecil metotrexato. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % de LDE-di-dodecil metotrexato (IC₅₀) e sua correlação (R²). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % da LDE (IC₅₀) e sua correlação (R²).

Figura 8. (A) Efeito citotóxico na linhagem K 562 pela adição do MTX comercial nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % do metotrexato comercial (IC₅₀) e sua correlação (R²).

Figura 9. (A) Efeito citotóxico na linhagem HL 60 pela adição de LDE (o) e da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (●) nas concentrações de 0,1 a 0,6 mM. A massa de LDE foi correspondente à massa de LDE presente na associação LDE-di-dodecil metotrexato. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % de LDE-di-dodecil metotrexato (IC_{50}) e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % da LDE (IC_{50}) e sua correlação (R^2).

Figura 10. (A) Efeito citotóxico na linhagem HL 60 pela adição do MTX comercial nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % do metotrexato comercial (IC_{50}) e sua correlação (R^2).

Figura 11. (A) Captação das formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial pela linhagem celular K 562. As células foram incubadas por 4 horas a 37 °C com concentrações de 8,8 a 316,5 nM. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média de LDE-di-dodecil metotrexato e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média do metotrexato comercial e sua correlação (R^2).

Figura 12. (A) Captação das formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial pela linhagem celular HL 60. As células foram incubadas por 4 horas a 37° C com concentrações de 8,8 a 316,5 nM. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média de LDE-di-dodecil metotrexato e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média do metotrexato comercial e sua correlação (R^2).

Figura 13. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via endovenosa de metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 14. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em múltiplas doses via endovenosa do metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 15. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em dose única via endovenosa do metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 16. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 17. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em múltiplas doses via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47 e 94 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 18. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em dose única via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 19. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via plexo venoso retro-orbital de LDE nas respectivas doses da formulação LDE-di-dodecil metotrexato de 180 mg/kg para dose única e 94 mg/kg para múltiplas doses, durante 7 dias.

Figura 20. Número de eritrócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg de lípides/kg).

Figura 21. Número de plaquetas dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg/kg).

Figura 22. Número de leucócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg/kg).

Figura 23. Contagem diferencial de leucócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX e metotrexato.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC_{50} para o MTX, adicionado nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM, e LDE-di-dodecil metotrexato, adicionada nas concentrações de 0,1 a 2 mM nas linhagens leucêmicas K 562 e HL 60. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C.

Tabela 2: Valores de DMT e DL_{50} encontrados para o MTX e LDE-di-dodecil metotrexato injetados em dose única (D.U.) em camundongos Balb/c.

LISTA DE ABREVIATURAS

LDE – Nanoemulsão rica em colesterol
MTX – Metotrexato
IC₅₀ – Índice de Citotoxicidade 50 %
LLA – Leucemia Linfocítica Aguda
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDL-r – Receptores de LDL
LMA – Leucemia Mielocítica Aguda
LMC – Leucemia Mielocítica Crônica
DHFR – Diidrofolato redutase
TS – Timidilato sintase
AICAR – Aminoimidazol carboximida ribonucleotídeo formil transferase
FPGS – Folilpoliglutamato sintase
ATP – Adenosina Trifosfato
MTXPGs – Metotrexato poliglumatados
FPGH – Folilpoliglutamil hidrolase
DNA – Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
pRb – Proteína funcional retinoblastoma
E2F – Fator transcrição E2F
MDR – Multidrug Resistance (Resistência a Múltiplas Drogas)
ABC – Família de transportadores da membrana celular
MDR1 – Proteína constituinte da glicoproteína P
MRP1 – Multidrug Resistance Protein 1 (Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas tipo 1)
ABCG2 – Breast Cancer Resistance Protein (Proteína de Resistência de Câncer de Mama)
N-Oleil DNR – N-Oleil Daunorrubicina
DMSO – Dimetilsulfóxido
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
DMT – Dose máxima tolerada
DL₅₀ – Dose letal de 50 %
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono treze
TMS – Tetrametilsilano
s – Singleto

d – Dubleto

t – Tripleto

m – Multipleto

sl – Sinal largo

J – Constante de acoplamento (Hz)

UV – Ultravioleta

λ – Comprimento de onda (nm)

ESI – Ionizador eletro-spray

IV – Infravermelho (cm^{-1})

^1H δ - Deslocamento químico de hidrogênio (ppm)

^{13}C δ - Deslocamento químico de carbono treze (ppm)

1. RESUMO

Modificações moleculares e o emprego de transportadores podem tornar os agentes antineoplásicos menos tóxicos e mais específicos, sem reduzir sua atividade biológica. Outra estratégia é o emprego de uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol denominada LDE, cuja estrutura parece com a da LDL (lipoproteína de baixa densidade) e que é captada pelos mesmos receptores da LDL. Dessa forma, a LDE pode se concentrar nas células neoplásicas, as quais apresentam superexpressão desses receptores. Recentemente, o paclitaxel e o etoposídeo foram modificados quimicamente com a finalidade de torná-los mais lipofílicos, aumentando a taxa de associação à LDE e a estabilidade do complexo formado, o que resultou em um aumento do índice terapêutico dos mesmos e reduziu seus efeitos colaterais. Esse estudo teve por objetivo associar o metotrexato (MTX) à LDE com a finalidade de reduzir seus efeitos tóxicos. Para isso aumentou-se a lipofilicidade do quimioterápico pela esterificação dos dois grupos carboxila, resultando no derivado di-dodecil metotrexato. Foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade físico-química da associação LDE-di-dodecil metotrexato, sua citotoxicidade e captação nas linhagens humanas leucêmicas HL 60 (pró-mielocítica aguda) e K 562 (mielóide crônica) e sua toxicidade em camundongos, comparando-se com a formulação comercial. O rendimento da reação de esterificação foi de 98 % e coeficiente de partição passou de -1,4 para 3,9. A taxa de associação do di-dodecil MTX à LDE foi de 98 % e o tamanho da partícula foi 55 ± 10 nm. A associação LDE-di-dodecil metotrexato manteve-se estável por 45 dias a 4 °C e a taxa de dissociação em diálise contra plasma foi de aproximadamente 25 %. O IC_{50} da associação LDE-di-dodecil metotrexato foi de 0,2 mM para a linhagem HL 60 e 1,6 mM para a linhagem K 562, sendo aproximadamente 100 e 10 vezes menor em relação ao MTX comercial, respectivamente. Os estudos de captação celular demonstraram que o di-dodecil MTX, quando associado à LDE, teve captação maior nas linhagens estudadas em comparação com o MTX. A toxicidade hematológica dos animais foi reduzida, mostrando que a LDE é um veículo promissor para este fármaco.

2. SUMMARY

Molecular modifications and the use of carriers may reduce the toxicity of antineoplastic agents and enhance their specificity to neoplastic cells without reduce their biological activity. In this study, we used a cholesterol-rich nanoemulsion termed LDE that mimics the low-density lipoprotein (LDL), and can bind to the low-density lipoprotein receptor (LDL-r). Neoplastic cells shows overexpression of these receptors, thus LDE may target those cells delivering antineoplastic agents loaded into the nanoemulsion particles. Recently, the association of the chemotherapeutics agents paclitaxel and etoposídeo to LDE were substantially improved by derivatization of these agents to increase the lipophilicity. The resulting complexes were highly stable and the association to LDE markedly decreased the toxicity of these drugs while the therapeutic index was enhanced. The aim of this study was to associate methotrexate (MTX) into LDE, to reduce its toxic effects. The lipophilicity of MTX was increased by esterification of two carboxyl groups to produce di-dodecyl MTX. Assays were made to analyse the physico-chemical stability of LDE-di-dodecyl MTX, the cytotoxic activity and the uptake against human leukemic cell lines, HL 60 (acute pro myelocytic) and K 562 (chronic mielogenous) and the animal toxicity in mice compared to commercial formulation. Di-dodecyl methotrexate was obtained through an esterification reaction with a yield of 98 % and its coefficient of partition was increased from -1.4 to 3.9. The association rate of the derivative to LDE was 98 % and the particle size was 55 ± 10 nm. The formulation had physical and chemical stability for 45 days at 4 °C and the dissociation rate quantified by dialysis against human plasma was 25 %. The IC_{50} of the formulation was 0.2 mM for HL 60 and 1.6 mM for K 562, which was around a hundred and ten fold lower than that of the MTX, respectively. Cellular uptake assays showed that the di-dodecyl MTX, when associated to LDE, was higher by both cell lines than that of MTX. The haematological toxicity to animals was reduced, showing that LDE is a promising vehicle to this drug.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Câncer – Aspectos Gerais

Neoplasia é a segunda maior causa de morte por doença, após as cardiovasculares. Segundo dados do Ministério da Saúde, em 1970, 1,62 % da mortalidade era causada pelos diversos tipos de neoplasias, em 1975 este número cresceu para 3,38 %, em 1995 para 5,34 % e em 1998 para 11,9 %. No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorreram 472.050 novos casos de câncer (INCA).

O surgimento do câncer como o maior problema da saúde pública no século XXI pode ser atribuído, em parte, ao crescimento marcante da expectativa de vida observada nesse século. Em adultos, o câncer é uma doença principalmente em indivíduos com cerca de 50 anos, o câncer colorretal, por exemplo, tem sua incidência aumentada exponencialmente após os 40 anos, com idade média de 64 anos de idade. As malignidades humanas mais comuns seguem esse padrão dramático de aumento da incidência idade-dependente. Os eventos moleculares que relacionam o processo de envelhecimento e o câncer não são completamente compreendidos. Mas, uma base genética foi estabelecida e determina que um acúmulo de mutações somáticas, idade e exposição mutagênica dependentes contribuem para o aumento da incidência de câncer em pessoas mais velhas (ISSA *et al.*, 1999).

A quimioterapia do câncer é diferente das demais terapias, pois geralmente utiliza-se uma combinação de quimioterápicos, após intervenção cirúrgica ou terapia de radiação, usualmente nos tratamentos iniciais para a maioria dos tumores sólidos. No caso das leucemias, por serem proliferações clonais neoplásicas de células progenitoras jovens do sistema hematopoiético, o grande desafio de seu tratamento é a erradicação dos clones e a restauração da hematopoiese normal (KHOURI *et al.*, 1997). Para isso, as principais técnicas utilizadas para atingir os índices atuais de cura, são associações de quimioterápicos, combinados a medicamentos que reduzem seus efeitos secundários (anemias, infecções e hemorragias) (INCA). Em alguns casos é indicado o transplante de células precursoras da hematopoiese da medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical, sendo do próprio paciente ou de doadores (NCI).

Há quatro décadas, a taxa de cura para a LLA (leucemia linfocítica aguda) era menor que 10 %; hoje está perto dos 90 % para crianças e de 30 a 40 % para adultos. O progresso no tratamento é devido principalmente à otimização do uso de fármacos já existentes do que pela descoberta de novos agentes (PUI *et al.*, 2003). As modificações moleculares e citogenéticas associadas às células doentes (incluindo as leucêmicas), fazem com que haja um direcionamento da terapia à origem genética da doença, tornando as terapias do câncer mais corretivas do que destrutivas. O custo do tratamento é reduzido à medida que os efeitos colaterais provocados pela quimioterapia são minimizados, pois o emprego de tecnologias de suporte para combater tais efeitos é o responsável por grande porcentagem do custo (KHOURI *et al.*, 1997).

A LLA ocorre tanto em crianças como em adultos, mas sua incidência muda conforme a idade. A maior incidência é observada em crianças com menos de 5 anos de idade. O prognóstico em crianças com LLA é um dos mais favoráveis entre todos os tipos de câncer disseminados: mais de 95 % atingem remissão completa e as taxas de sobrevivência livre da doença (5 anos) são de 63 a 85 % (SCRAPPE *et al.*, 2000). Nos adultos as taxas de remissão completa atingem de 75 a 89 % e de sobrevida livre da doença (5 anos) variam de 28 a 39 % (GOKBUGET *et al.*, 2002).

O câncer pediátrico resulta de defeitos genéticos relacionados ao crescimento e desenvolvimento dos diferentes órgãos ou tecidos durante os períodos de risco com ênfase proliferativa. O pico de incidência da LLA está entre 2 e 5 anos de idade, quando as células progenitoras de linfócito B estão em extensa proliferação (GREAVES *et al.*, 1986).

As diferenças nas características e prognóstico da LLA adulta comparados com a infantil, pode resultar do fato que, em crianças, o primeiro evento que pode originar leucemia acontece em células progenitoras linfóides maduras, ao contrário dos adultos, onde ocorre em células blásticas multipotentes. Como as células leucêmicas blásticas primitivas em adultos com LLA possuem características semelhantes às células blásticas normais, é provável que sua eliminação por quimioterapia acabe matando também as células hematopoiéticas normais. Além disso, sua capacidade de auto-renovação resulta em uma maior probabilidade de células resistentes. Ambos os fatores podem explicar o resultado clínico pouco efetivo dos programas de tratamento em adultos acometidos com LLA. Sob aspecto fisiológico, é possível que as células blásticas possuam mecanismos que as protejam

de substâncias tóxicas ou outros fatores potencialmente prejudiciais (PLASSCHAET *et al.*, 2004).

Milhares de compostos químicos são testados anualmente como potentes agentes antineoplásicos e a cura tem sido encontrada para certas formas de câncer. Mas, a quimioterapia não solucionou o problema do câncer e existem inúmeras razões para suas falhas, tais como a inespecificidade do quimioterápico em relação à célula neoplásica; o fato de que muitas células neoplásicas não são realmente estranhas ao hospedeiro, além de desenvolverem rapidamente resistência a agentes antineoplásicos; e ainda a falta de irrigação sanguínea de alguns tumores prejudica o acesso dos fármacos (KOROLKOVAS *et al.*, 1988).

Os esquemas convencionais de tratamento com quimioterápicos provocam toxicidade acentuada em diversos órgãos. Os efeitos mais agudos são náusea, vômito, cefaléia e perda de apetite. Como efeito sub-agudo pode ocorrer mielossupressão com comprometimento dos sistemas imunológico e hematológico. Como efeito tardio pode ocorrer toxicidade hepática, renal, pulmonar e cardíaca. Esses efeitos estão relacionados à falta de especificidade dos agentes antineoplásicos pelas células tumorais, a qual pode ser obtida pelo uso de transportadores, aumentando-se sua especificidade. Alguns transportadores têm sido desenvolvidos e testados, tais como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), transportadores poliméricos (KAN *et al.*, 1999), anticorpos (JUNGHANS *et al.* 1996), emulsões (MARANHÃO *et al.*, 1986; LUNDBERG *et al.*, 1994) e liposomas (TYAGI *et al.*, 1999; BELLOT *et al.*, 2001; SENGUPTA *et al.*, 2000).

3.2. LDL e Câncer

A maior parte do colesterol no organismo é transportada pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) as quais possuem a apolipoproteína B-100 que permite a ligação com os receptores de LDL (LDL-r), situados na superfície da membrana plasmática celular (BROWN *et al.*, 1986).

O LDL-r é um receptor de alta afinidade pela LDL sendo regulado pela concentração celular de colesterol. Ele está sujeito à regulação retroativa (feedback) e sua regulação é o principal fator para o controle da concentração plasmática de LDL (BROWN *et al.*, 1990). Pelo fato de as células neoplásicas se proliferarem

rapidamente, há um aumento da demanda de colesterol necessária para a síntese de membranas, e conseqüente aumento na remoção plasmática da LDL.

Em 1978, HO e col. observaram um aumento na atividade dos LDL-r nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA), em relação às células mononucleares de indivíduos sadios. Mais tarde foram realizados estudos em pacientes com leucemia mielocítica aguda e com leucemia não-linfocítica e foi observado um aumento na atividade dos LDL-r; assim como em pacientes em crise blástica aguda com leucemia mielocítica crônica (LMC). No entanto pacientes com leucemia linfoblástica aguda apresentaram baixa atividade desses receptores (VITOLS *et al.*, 1984). Tal fato foi observado posteriormente por Maranhão e col. (1994) em estudos com uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE), onde foi observado que a atividade dos LDL-r em pacientes com leucemia linfocítica aguda é similar a de células normais.

BUDD e GINSBURG , em 1986, observaram que os níveis de colesterol do plasma estavam reduzidos no momento do diagnóstico em pacientes com LMA ou LMC em crise blástica. Mais tarde notou-se que o aumento significativo nos níveis de colesterol total e de LDL plasmáticos estavam associados à remissão. Esses achados foram corroborados por ALEXOPOULOS e col. (1987) que demonstraram a nítida diminuição do colesterol em pacientes com tumores sólidos. HENRIKSSON e col., em 1989, observaram que pacientes com carcinoma de próstata metastático apresentavam diminuição acentuada nos níveis plasmáticos de colesterol.

Em 1981, GAL e col. demonstraram que as células de linhagens neoplásicas (carcinoma epidermóide vaginal, carcinoma epidermóide cervical e adenocarcinoma endometrial) expressam cerca de 15 a 30 vezes mais LDL-r do que as células de linhagens normais (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais de glândula endometrial proliferativa). O aumento da expressão de LDL-r também foi observado em linhagens celulares de glioblastomas (MALETINSKA *et al.*, 2000) e melanoma B16 (VERSLUIS *et al.*, 1996).

O fenômeno de superexpressão dos LDL-r em certas linhagens neoplásicas pode propiciar uma nova estratégia de direcionamento específico de fármacos aos tecidos acometidos (MOSLEY *et al.*, 1981). Essa possibilidade está baseada no fato de que a LDL é capaz de transportar grandes quantidades de componentes lipofílicos que podem ter efeitos citotóxicos, sendo captada da mesma maneira pelo mesmo receptor (LDL-r), fazendo com que haja uma maior concentração do

fármaco associado nas células neoplásicas em relação às células normais (SAMADI-BABOLI *et al.*, 1993).

A LDL foi utilizada como transportadora do quimioterápico derivado da doxorrubicina AD-143 por MASQUELIER e col., em 1986, demonstrando que a captação da associação LDL-AD-143 ocorre através da interação com o receptor de LDL.

Apesar dos bons resultados obtidos com a LDL, sua utilização parece restrita às experiências de laboratório, pois sua obtenção a partir do plasma humano, os procedimentos de incorporação dos fármacos e armazenamento dos complexos, dificulta sua utilização na prática clínica. Além disso, por ser um hemoderivado, ela pode provocar respostas imunológicas e contaminação por vírus da hepatite ou do HIV.

3.3. Nanoemulsão rica em colesterol (LDE) e Câncer

Para suprir as desvantagens da utilização da LDL, REDGRAVE e MARANHÃO (1985), desenvolveram uma nanoemulsão lipídica artificial, a LDE, que reproduz o metabolismo da LDL. A LDE não possui lipoproteína em sua constituição, porém adquire a apolipoproteína E quando encontra-se na circulação sanguínea, sendo assim captada pelos LDL-r (MARANHÃO *et al.*, 1993).

A LDE pode ser produzida em escala industrial, tornando factível a sua utilização na rotina. Estudos demonstraram que a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de células de LMA ocorre de maneira direta, através de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio^{99m}, comprovando-se que 70 % do volume de LDE injetado foi captado pelas células leucêmicas (MARANHÃO *et al.*, 1994). Verificou-se também que a LDE foi removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA do que nos controles. Na contraprova, após os pacientes serem tratados com esquemas terapêuticos convencionais e atingida completa remissão da doença, a remoção plasmática da LDE tornava-se mais lenta, normalizando-se. Isto mostra que as células LMA, com receptores em número muito maior, provocaram remoção acelerada da nanoemulsão. Quando foram destruídas pela quimioterapia, a remoção era normalizada.

Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama, mostraram que a LDE se concentra nos tecidos neoplásicos. As células de câncer de ovário, por

exemplo, captam em média 10 vezes mais LDE em relação ao tecido normal (ADES *et al.*, 2001) enquanto que em carcinoma de mama, a captação tumoral foi, em média, 4,5 vezes maior em relação ao tecido mamário normal (GRAZIANI *et al.*, 2002). Estes experimentos comprovam a possibilidade de direcionamento do veículo para as células neoplásicas, como foi demonstrado com a associação LDE-daunorrubicina. A formulação provocou a morte de 46,7% das células blásticas neoplásicas e 20,2% das células normais da medula óssea (DORLHIAC-LLACER *et al.*, 2001).

A LDE também foi utilizada como veículo dos quimioterápicos carmustina e paclitaxel. Quando associada à LDE, a carmustina apresentou diminuição dos seus efeitos tóxicos (MARANHÃO *et al.*, 2002). A associação da LDE com o paclitaxel mostrou-se estável, a atividade citotóxica do fármaco foi preservada e a toxicidade em camundongos foi menor (RODRIGUES *et al.*, 2002). O paclitaxel foi transformado no derivado oleato, com o objetivo de melhorar ainda mais a preparação. De fato, a associação LDE-oleato de paclitaxel mostrou-se mais estável que a anterior sem reduzir a ação citotóxica do fármaco. Além disso, a toxicidade animal foi em torno de doze vezes inferior à do fármaco comercial, e em ensaios de regressão tumoral a preparação foi novamente superior à formulação comercial (RODRIGUES *et al.*, 2005). Em pacientes com carcinoma de ovário a captação de LDE-oleato de paclitaxel foi 3,5 vezes maior nos tecidos tumorais em relação aos respectivos tecidos normais (DIAS *et al.*, 2007). A formulação LDE-oleato de paclitaxel não apresentou toxicidade quando utilizada no tratamento de pacientes com carcinoma de mama (dados não publicados).

A modificação e associação aumentaram o tempo de meia-vida do fármaco o que pode ser de extrema relevância, uma vez que sua eficácia antitumoral depende da duração da exposição deste às células e não da concentração do fármaco (GOBLE *et al.*, 2003).

Recentemente, em estudos desenvolvidos com oleato de etoposídeo associado à partícula de nanoemulsão, observou-se que a modificação química (introdução de um grupo oleíla), aumentou a lipofilicidade do fármaco, não alterou sua citotoxicidade e, além disso, elevou de 50 para aproximadamente 98% a taxa de associação a LDE. A citotoxicidade da associação LDE-oleato de etoposídeo, para a linhagem celular H 292 (células não-pequenas de pulmão) foi em torno de duas vezes menor do que a formulação comercial, sendo que essa diferença é atribuída à

toxicidade do veículo, na formulação comercial (Valduga *et al.* 2003). Nos ensaios realizados com LDE-oleato de etoposídeo em outras linhagens celulares, incluindo HL 60 (células de leucemia pró-mielocítica aguda), K 562 (células de leucemia mielóide crônica) e HT 29 (células adenocarcinoma de cólon humano), observou-se que a modificação química do etoposídeo não alterou sua ação citotóxica e ainda, quando associado à LDE, apresentou diminuição do IC₅₀ (Índice de Citotoxicidade 50 %) (MOURA, 2003 – Monografia para Conclusão de Curso).

Essa associação, além disso, apresentou toxicidade animal em torno de 5 vezes menor que a preparação comercial. A regressão tumoral em camundongos implantados com células de melanoma (B16) foi mais eficiente para a associação LDE-oleato de etoposídeo, em comparação ao etoposídeo comercial (LO PRETE *et al.*, 2006). Em ensaios clínicos com pacientes portadores de câncer de ovário, a captação do oleato de etoposídeo, associado à LDE, pelo tecido tumoral foi quatro vezes superior ao tecido ovariano contralateral normal (AZEVEDO *et al.*, 2005).

Em pacientes com linfoma, a associação LDE-oleato de etoposídeo na dose de 100 mg/m² de superfície corporal foi praticamente isento de efeitos colaterais, e ainda a doença permaneceu estável durante o período de tratamento (PINHEIRO *et al.*, 2006).

Outro fármaco modificado para viabilizar a associação a LDE, foi a daunorrubicina (DNR), fármaco de primeira linha no tratamento de LMA e câncer de mama, porém com elevada toxicidade cardíaca. Neste caso, a modificação e a associação à LDE reduziu a ação citotóxica do fármaco em torno de 4 vezes em relação ao fármaco comercial nas linhagens leucêmicas K 562 e HL 60. Porém, a toxicidade cardíaca em camundongos, foi em torno de 200 vezes menor, o que compensaria a redução da citotoxicidade do fármaco, uma vez que poderia ser administrado em doses maiores (TEIXEIRA. 2005 - Tese de Doutorado).

Outra aplicação da LDE é na avaliação do metabolismo de lípidos, em pacientes com doença coronariana (MARANHÃO *et al.*, 1996).

3.4. Metotrexato

O metotrexato (MTX) é um quimioterápico da classe dos antimetabólicos que possui vasto potencial clínico, sendo utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda infantil, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos em mulheres,

osteosarcoma, linfomas de Burkitt e não-Hodgking, carcinomas de mama, cabeça, pescoço, ovário e bexiga, e micose fúngica. O metotrexato possui papel importante na indução da remissão e consolidação em leucemias infantis. Para os diversos tipos de leucemias adultas, o metotrexato não possui grande importância clínica, exceto para o tratamento e prevenção de leucemia meníngea e meningite carcinomatosa (GOODMAN e GILMAM, 2001).

O metotrexato também tem sido usado como agente imunossupressivo em transplante de órgãos, no tratamento de doenças auto-imunes, tais como psoríase e artrite reumatóide, e na terapia de asma severa (ALLISON, 2000).

As reações de hipersensibilidade ao MTX incluem anafilaxia, urticária, angioedema, pneumonites aguda, vasculite cutânea, toxicidade epidermóide severa, anemia hemolítica e hepatite (ALKINS *et al.*, 1996). Os efeitos tóxicos primários decorrentes do tratamento com MTX são mielossupressão resultando em neutropenia, e ainda toxicidade renal pode ser observada após administração de altas doses desse fármaco, resultado da precipitação do MTX nos túbulos renais. Tal efeito é reduzido pela hidratação e alcalinização da urina (GORLICK e BERTINO, 1999).

O MTX é um antifolato, análogo ao ácido fólico (Figura 1), com variações no carbono C2, que ao invés da carbonila tem o grupo amino e no nitrogênio N10, que possui um grupo metila (RUBINO, 2001).

Figura 1. Estrutura do ácido fólico e metotrexato.

Os dois grupos carboxila altamente polares, negativamente carregados, na cadeia lateral do sal sódico do MTX (preparação comercial) possuem um efeito de retardamento na difusão passiva desta molécula através da membrana da célula.

Dentro da célula, o MTX pode inibir três diferentes enzimas: a diidrofolato redutase (DHFR), a timidilato sintase (TS) e a aminoimidazol carboximida ribonucleotídeo formil transferase (AICAR). A DHFR catalisa a redução do diidrofolato a tetraidrofolato, precursor das formas ativas de cofator folato necessárias para síntese de timidilato, purinas, metionina e serina. A TS e a AICAR são enzimas importantes na síntese *de novo* do timidilato e da purina, respectivamente (ESTLIN, 2001). O complexo formado pelas três enzimas interconverte as várias formas de folatos reduzidos, como demonstrado na Figura 2.

23

O MTX é um substrato para poliglutamação intracelular pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS), um processo pelo qual até seis glutamatos são adicionados por uma ligação no carbono gama no final do grupo carboxil do folilglutamato; tal processo é dependente de ATP e os produtos finais são MTX poliglutamados (MTXPGs) (CHABNER *et al.*, 1985). A importância desse processo se deve ao fato desses derivados apresentarem a mesma afinidade e possivelmente ainda maior a DHFR em relação ao MTX. Uma vez formados, as formas poliglutamadas saem da célula muito mais lentamente do que o fármaco não metabolizado. Uma vez que a reversibilidade dos efeitos farmacológicos do MTX deriva do rápido efluxo, a poliglutamação converte essencialmente o MTX de uma forma rapidamente reversível a um inibidor muito menos reversível da atividade da DHFR. O tempo de retenção dos MTXPGs depende do tipo de célula e do comprimento da cadeia glutamílica (GOLDMAN e MATHERLY, 1985).

Não se sabe ao certo se uma ou mais enzimas ligadas ao MTX são responsáveis pela citotoxicidade e seletividade antitumoral. Porém, as captações de timidina e purinas exógenas, permitem que as células atenuem ou até mesmo revertam os efeitos citotóxicos do MTX. Entretanto, a citotoxicidade está associada com a bioquímica e os mecanismos que danificam o DNA, que são similares aqueles associados à inibição específica de TS.

Assim como acontece com os outros tipos de quimioterápicos, a classe dos antimetabólicos também apresenta o fenômeno de resistência. Em modelos experimentais de cultura de células, quatro mecanismos de resistência comuns ao MTX foram identificados: diminuição da captação, diminuição da retenção devido à poliglutamação deficiente ou aumento da quebra de poliglutamatos, aumento da atividade da DHFR assim como diminuição da ligação do MTX a essa enzima (BANERJEE *et al.*, 2002).

A habilidade de formar longas cadeias poliglutamadas está relacionada com o prognóstico de muitas leucemias: LLA adulta de linhagens T e B acumulam poucas formas poliglutamadas de cadeia longa comparadas a LLA infantil de linhagem B, o que está correlacionado ao pobre prognóstico, assim como na LLA infantil de linhagem T. Mas esse não é um parâmetro aceito para determinar o prognóstico para as leucemias, principalmente quanto a prever uma resposta à terapia com o MTX.

Devido à alta afinidade do MTX a DHFR, um aumento nos níveis intracelulares dessa enzima é esperado no fenômeno de resistência. A exposição de células tumorais a concentrações crescentes de MTX resulta na amplificação do gene da DHFR, aumentando a probabilidade de encontrar formas mutadas de DHFR com afinidade reduzida. A perda da proteína funcional retinoblastoma (pRb) também contribui para resistência de antimetabólitos, uma vez que células que não expressam pRb apresentam níveis aumentados de enzimas associadas à proliferação celular (DHFR e TS), devido aos níveis elevados de E2F, um fator de transcrição normalmente “degradado” pela pRb fosforilada durante o ciclo celular (BANERJEE *et al.*, 2002).

Existem dois mecanismos gerais de resistência a fármacos antitumorais: baixa disponibilidade, que resulta em uma pobre absorção de fármacos oralmente administrados, metabolismo aumentado ou excreção elevada, levando a uma baixa concentração do fármaco na circulação e difusão reduzida para a massa tumoral; e alterações genéticas e epigenéticas que afetam a sensibilidade ao fármaco. Características do microambiente tumoral, tais como composição da matriz extracelular, podem limitar a penetração do fármaco nas células mais distantes dos vasos sanguíneos. Tais células podem ser resistentes à quimioterapia convencional por três razões: a maior parte dos quimioterápicos age em células em proliferação, portanto células não proliferativas ou com baixa proliferação, são resistentes; alguns fármacos podem ser menos ativos em microambientes hipóxicos, ácidos ou pobres em nutrientes; e, por último, as células distantes dos vasos sanguíneos podem estar expostas a baixas concentrações do quimioterápico (MINCHINTON e TANNOCK, 2006).

Quando as células apresentam transporte deficiente, elas têm diminuição na capacidade de captação do MTX, via transportador. Uma das formas de se aumentar a captação pelas células é aumentar a concentração, porém produz efeito tóxico na medula óssea, mucosa epitelial e outros tecidos proliferativos normais (PIGNATELLO *et al.*, 2000).

Para minimizar os efeitos colaterais do MTX utiliza-se suplementação com ácido fólico (leucovorina), timidina e purinas, permitindo assim o uso de altas concentrações de MTX para matar as células tumorais enquanto protege as células normais (CHOW e RUBIN, 1998). Outra alternativa é o emprego de antifolatos que possam penetrar na célula mais facilmente, por transporte passivo. Uma terceira

alternativa é a modificação química da cadeia lateral do glutamato do MTX ("antifolatos híbridos", que mantêm a estrutura essencial dos antifolatos clássicos), diminuindo sua polaridade e aumentando sua capacidade de penetrar na membrana das células.

Derivados di-éster e bis-amida do MTX foram produzidos e verificou-se que em células com transporte deficiente, a sensibilidade é mantida para os derivados mono- e di-ésteres. As evidências sugerem que os di-ésteres provavelmente agem, em parte, como transportadores de difusão passiva, ou pró-fármacos, que podem ser convertidos nos α - ou γ -monoésteres e posteriormente no MTX via esterases intracelulares. A alta lipofilicidade de alguns derivados di-ésteres pode fazer com que eles se liguem a membranas de estruturas subcelulares ricas em lípidos aumentando a concentração intracelular, sofrendo ação das esterases. Isso pode ser um mecanismo de manutenção dos níveis citotóxicos no interior da célula por períodos tão longos quanto o MTX (PIGNATELLO *et al.*, 2000).

As modificações químicas do MTX têm como finalidade suplantiar a resistência ao transporte através da membrana, devido à baixa afinidade dos transportadores de folato reduzido usados pelas células para captar cofatores de folato reduzido e fármacos antifolato. Muitos autores sugerem que a redução na polaridade da molécula de MTX pode melhorar a internalização passiva do agente citotóxico em células resistentes. A modificação de um ou ambos os grupos carboxila, presentes no resíduo glutamato do MTX parece ser o ponto ideal para modificações, pois o principal ponto de ligação às enzimas DHFR e TS, está principalmente relacionado ao fragmento diaminopiridina do anel pteridina (HUENNEKENS, 1994). No entanto, o aumento no comprimento da cadeia de monoésteres do MTX, tem efeito negativo na ligação com DHFR, mas produz aumento consistente na toxicidade devido ao aumento da captação ou clivagem mais extensiva do MTX intracelular (ROSOWSKY *et al.*, 1984).

Alguns derivados amidoalcanos lipofílicos e lipoaminoácidos do MTX, estruturalmente relacionados com os antifolatos não-clássicos, foram sintetizados por PIGNATELLO e col. Tais compostos possuem capacidade de penetrar passivamente nas células tumorais e, muitos apresentaram melhor efeito inibitório comparado ao MTX. Além disso, em células resistentes, com captação reduzida de MTX, os derivados lipofílicos dissubstituídos mantiveram uma boa atividade de inibição de crescimento, comparados ao MTX. Os resultados encontrados confirmam

a possibilidade de suplantar o sistema de transporte defeituoso pelos transportadores de folato reduzido.

Tentativas de otimização do MTX envolvem captação seletiva do fármaco pelo tumor. Existem vários exemplos na literatura utilizando anticorpos monoclonais, que são direcionados para antígenos específicos nos tumores e que foram utilizados como veículos para transportar MTX. Os experimentos apresentaram algum sucesso, porém têm inúmeras limitações, como a habilidade de cada anticorpo de carregar somente uma quantidade muito pequena do fármaco, a necessidade de internalizar o conjugado fármaco-anticorpo, e a enzima requerida para efetuar a clivagem da ligação fármaco-anticorpo. Outra alternativa é o uso de pró-fármacos inativos conjugados com enzimas de anticorpos monoclonais (SINGH *et al.*, 1989).

Com a finalidade de aumentar a quantidade de MTX transportada por anticorpos monoclonais, estes foram ligados a liposomas ao invés de serem ligados diretamente ao fármaco, e testados *in vitro*, em células de câncer renal humano. A associação liposoma-fármaco-anticorpo foi endocitada e teve efeito inibitório muito maior que o MTX sozinho (WILLIAMS *et al.*, 1995). Quando o MTX encapsulado em liposomas foi utilizado em pacientes com artrite, observou-se que foi mais efetivo na redução da inflamação e menos hematotóxico que o MTX livre (GULATI *et al.*, 1998).

Provavelmente as tentativas mais bem sucedidas visando diminuir os efeitos tóxicos do MTX sejam o emprego de liposomas. Existem vários exemplos na literatura da utilização deste veículo. Porém, o fator limitante é a baixa lipofilicidade da molécula, o que leva a uma baixa taxa de incorporação do fármaco e a baixa estabilidade *in vivo*, o que leva a toxicidade celular não específica (PIGNATELO e PUGLISI, 2000). Por isso, na maioria dos exemplos de utilização do MTX encapsulado em liposomas, foi necessária modificação química para tornar o fármaco mais lipofílico. Todas as modificações ocorreram nas carboxilas do resíduo glutamato, pela transformação das mesmas em ésteres ou amidas.

4. JUSTIFICATIVA

Em estudos utilizando etoposídeo e paclitaxel, esses dois fármacos foram convertidos em derivados mais lipofílicos o que possibilitou um aumento da taxa de associação à LDE, promovendo maior estabilidade dos complexos formados, sem diminuir sua ação farmacológica. Provou-se assim que esta é uma boa estratégia para associar fármacos com elevado potencial clínico e de baixa lipofilicidade à partícula de nanoemulsão.

Os efeitos tóxicos observados em pacientes com câncer fazendo uso de quimioterapia convencional como alopecia, mielossupressão, náusea e vômito, entre outros não foi observada quando se utilizou a LDE como transportadora dos quimioterápicos carmustina, oleato de paclitaxel e oleato de etoposídeo. Isso comprova que a LDE é um veículo promissor para o direcionamento de fármacos de ação antitumoral, diminuindo a toxicidade dos mesmos.

O MTX é um fármaco que possui vasto potencial clínico, sendo utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda infantil, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos em mulheres, osteosarcoma, linfomas de Burkitt e não-Hodgking, carcinomas de mama, cabeça, pescoço, ovário e bexiga, e micose fúngica. O metotrexato também tem sido usado como agente imunossupressivo em transplante de órgãos, no tratamento de doenças auto-imunes, tais como psoríase e artrite reumatóide, e na terapia de asma severa.

Por ter um vasto uso clínico, baixo custo e ser de fácil aquisição, o metotrexato foi utilizado neste estudo com o objetivo de desenvolver uma nova e mais eficaz formulação farmacêutica para sua posterior utilização clínica.

5. OBJETIVOS

- Aumentar a lipofilicidade do metotrexato para propiciar máxima taxa de associação à LDE, com elevada estabilidade;
- Avaliar a estabilidade físico-química da associação LDE-di-dodecil metotrexato através de medidas do tamanho de partícula e diálise contra plasma *in vitro*;
- Determinar o Índice de Sobrevivência de 50 % (IC_{50}) da associação LDE-di-dodecil metotrexato para as linhagens leucêmicas HL 60 e K 562 e comparar a sua captação celular em relação ao metotrexato;
- Determinar a Dose Máxima Tolerada (DMT) e Dose Letal de 50 % (DL_{50}) do derivado associado à LDE, comparando-se com o metotrexato, em camundongos, e avaliar a toxicidade hematológica.

6. MÉTODOS

6.1. Reagentes

A trioleína e o colesterol foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). A fosfatidilcolina foi adquirida da Lipid Products (Surrey, UK) e oleato de colesterol da Amershan Internacional (Surrey, UK). Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck-Quimitra (Rio de Janeiro, Brasil). O Metotrexato foi adquirido da DEG (São Paulo, Brasil). A pureza dos lípides foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) (0,5 mm de espessura), utilizando sílica gel 60H e sistema solvente de hexano: éter etílico: ácido acético (70: 30: 1) v/v.

Os solventes utilizados foram purificados segundo procedimentos descritos na literatura (PERRIN *et al.*, 1980).

6.2. Instrumentação Geral

6.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os dados de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional (RMN 1D e RMN 2D) de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) foram obtidos em um aparelho Bruker DPX-300 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Utilizou-se clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram descritos em partes por milhão em relação ao trimetilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. Foi colocada entre parênteses a multiplicidade dos sinais (s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, m = multipeto, sl = sinal largo), e a constante de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

6.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Pureza e quantificação do MTX e do di-dodecil MTX no decorrer dos experimentos foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), em equipamento Shimadzu Modelo SPD-10AV com detetor de UV ($\lambda = 254$ nm), coluna Shim-pack 4.6 mm I.D X 15 cm, CLC-ODS (M) C_{18} (Shimadzu,

Columbia, ML) e uma pré-coluna Luna C₁₈ (2) (guard cartridge) (Phenomenex, Torrance, USA). Para análise do di-dodecil MTX foi utilizado metanol como fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min e para análise do MTX foi utilizado tampão acetato de sódio (0,75 M, pH 6)/acetonitrila, na proporção 9:1, a um fluxo de 1,0 mL/min. Para a quantificação de ambas as substâncias foi realizada curva de calibração com concentrações de 78 – 100.000 ng.

6.2.3. Espectrometria de Massa

O espectro de massas do di-dodecil MTX foi obtido em espectrômetro Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) equipado com electrospray para ionização da amostra e acoplado a uma bomba Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Columbia, ML), no Laboratório de Espectrometria de Massa – CAT/CEPID, do Instituto Butantan.

A amostra foi diluída em metanol (5,0 nM) e 5,0 µL foram injetados. Utilizou-se como fase móvel acetonitrila:água:ácido fórmico (50:50:0,2) a 20 µL/min e, como gás de nebulização, nitrogênio ultra-puro a 300 L/h. O di-dodecil MTX foi analisado com potenciais de 3,1 kV para o capilar de ESI (ionizador eletro-spray) e 75 V no cone. A análise foi realizada utilizando varredura total do scan (*full scan*) de *m/z* 50 a 1000.

6.2.4. Análise Elementar/ Microanálise

A análise elementar do produto foi realizada no laboratório de microanálises da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando o equipamento Perkin Elmer CHN 2400 Elemental Analyzer.

6.2.5. Infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho (IV) em pastilha de KBr foi obtido em um espectrômetro BOMEM-FTIR-MB102, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo.

6.2.6. Light Scattering

O diâmetro das partículas da LDE e LDE-di-dodecil metotrexato foi determinado por espalhamento de luz em analisador de potencial Zeta (Brookhaven Instruments Co., Holtscille-NY). Todas as amostras foram mantidas a 4 °C, diluídas e filtradas momentos antes da análise. Para avaliar a estabilidade da preparação pela variação do diâmetro de partícula, as amostras foram analisadas em função do tempo, por até 45 dias.

6.2.7. Espectrofotometria de UV

Os dados de espectrofotometria de ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro Beckman DU 530 UV/Vis (Life Science) e Hitachi U2001 Spectrophotometer.

6.2.8. Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita na literatura (MARANHÃO *et al.*, 1993). Em um frasco de vidro foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1,0 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre. A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas a 4 °C para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 mL de solução TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,05, a mistura de lípides foi submetida à irradiação ultra-sônica, utilizando-se um disruptor celular Branson Ultrasonics Corp., modelo B 450 (Danbury, EUA) equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro, com potência de 125 Watts, por 3 h sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 50 e 55 °C. A nanoemulsão foi centrifugada a 36.000 rpm por 30 minutos a 4 °C (Ultracentrífuga Beckman, rotor Beckman SW- 41 T I). A parte superior do tubo, perfazendo um total de 10 % do volume da nanoemulsão, foi desprezada por conter partículas maiores do que o desejado. Ajustou-se a densidade da nanoemulsão, para 1,21 g/mL adicionando-se brometo de potássio. Centrifugou-se novamente por 2 horas, a 4 °C a 36.000 rpm com o mesmo rotor. A fração do topo do tubo que corresponde a 20 % do total é a LDE. A LDE purificada foi dialisada utilizando-se 4,0 L de solução tampão estéril TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0,

e membrana de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., LA), por 16 h, à 4 °C, para a total remoção do brometo de potássio utilizado na etapa final de purificação. A LDE foi então esterilizada utilizando-se filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) e estocada em frascos estéreis a 4°C por até 30 dias.

A composição final da LDE é de aproximadamente 64 % de fosfolípides, 33 % de colesterol esterificado, 1 % colesterol não-esterificado, e 2 % de triglicérides.

6.2.9. Síntese do di-Dodecil Metotrexato

Metotrexato (sal sódico) (2,0 g, 4,01 mmol) foi diluído em 120 mL de dimetilsulfóxido e foram adicionados carbonato de cézio (1,43 g, 4,40 mmol) e brometo de dodecila (2,5 g, 10 mmol). Após 24 h de agitação, à temperatura ambiente, foram adicionados 100 mL de água e o produto foi extraído com clorofórmio (5x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (3x 100 mL), seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada. O produto foi purificado em coluna de sílica gel (230-400 mesh), utilizando como fase móvel Metanol/clorofórmio 2,5 %, 5 % e por último metanol 100 %.

Rendimento da reação: 98 %

Ponto de fusão: 122-124 °C

¹H δ(ppm): 0,86 (6H, t, $J = 6,0$ Hz), 1,23 (36H, s); 1,50-1,68 (4H, m), 2,08-2,20 (1H, m), 2,21-2,32 (2H, m), 2,42-2,50 (1H, m), 3,12 (3H, s), 4,00 (2H, t, $J = 6,0$ Hz), 4,13 (2H, t, $J = 6,0$ Hz), 4,67 (2H, s), 4,75-4,83 (1H, m), 5,98 (2H, sl), 6,69 (2H, d, $J = 6,0$ Hz); 7,02 (1H, sl), 7,69 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 8,56 (1H, s). **¹³C δ(ppm):** 13,99, 22,54, 25,75, 27,31, 28,42, 29,15, 29,24, 29,53, 30,55, 31,80, 38,90, 52,16, 55,68, 64,85, 65,66, 111,21, 121,37, 121,87, 128,79, 146,65, 146,71, 149,10, 151,31, 154,86, 162,51, 162,89, 166,96, 172,63, 173,21. **Massa:** 338,31, 381,27, 675,63, 791,48(100), 792,49, 793,52. **IV ν(cm⁻¹):** 3478,8, 2924,2, 2855,9, 1737,5, 1630,7, 1512,6, 1445,9, 1204,3, 1096,0, 816,9. **Análise Elementar:** **Calc.:** 66,80 (C), 8,92 (H), 14,16 (N). **Obtido:** 66,50 (C), 8,68 (H), 14,10 (N).

6.3. Coeficiente de Partição (Log P)

O coeficiente de partição P é definido como a concentração de um determinado composto na fase octanol, dividido pela concentração do mesmo na fase aquosa. A análise foi feita pelo método clássico, octanol/água. Solubilizou-se 1 mg de di-dodecil metotrexato em 1 mL de octanol e 1 mL de tampão fosfato foi adicionado. Deixou-se a mistura sob agitação por 24 h a 37 °C e ao final foram coletados 20 µL de cada uma das fases para quantificação por HPLC.

6.3.1. Associação do di-Dodecil Metotrexato à LDE

A LDE, preparada e esterilizada conforme descrito anteriormente, foi submetida à sonicação com o di-dodecil metotrexato (solubilizado em etanol absoluto a 10 % do volume final da preparação) na proporção de 1:5 massa de fármaco:massa de lípides por um período de 1 h. A temperatura foi monitorada por termômetro digital e mantida abaixo de 70 °C. Após sonicação, a associação foi novamente esterilizada.

A quantificação do di-dodecil metotrexato associado à LDE foi feita em HPLC. O diâmetro de partícula LDE-di-dodecil metotrexato foi determinado por espalhamento de luz em analisador de potencial Zeta.

6.3.2. Estabilidade de LDE-di-Dodecil Metotrexato

A estabilidade da associação foi avaliada em função do tempo. A dissociação do derivado da LDE, foi quantificada diariamente, em amostras armazenadas a 4 °C. Foi avaliado também o tamanho da partícula de nanoemulsão após associação do derivado no decorrer do tempo.

Além disso, foram realizados ensaios de cinética *in vitro* por diálise contra plasma humano: 1 mL de LDE-di-dodecil metotrexato contido em uma membrana de diálise (Sigma, St. Louis, EUA) foi dialisado contra 20 mL de plasma humano, sob agitação, durante o período de 72 h, para avaliar a dissociação do di-dodecil metotrexato da LDE. Nos tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 e 72 horas) 10 µL de LDE-di-dodecil metotrexato foram coletados de dentro da membrana, diluídos a 1,0 mL de metanol e quantificados por HPLC. Duas alíquotas

de 500 µL de plasma foram coletadas ao final de cada experimento, e adicionou-se 1 mL de metanol a cada uma. Após agitação em vórtex, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm. 1 mL da fração sobrenadante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, reconstituído em 200 µL de diclorometano e foi filtrado em membrana 0,22 nm. A amostra foi novamente evaporada e reconstituída em 100 µL de metanol e 20 µL desta foram injetados em HPLC.

6.3.3. Estudos *in vitro*

6.3.3.1. Manutenção das Linhagens Celulares HL 60 e K 562

As linhagens celulares HL 60 (leucemia pró-mielocítica aguda) e K 562 (leucemia mielóide crônica) foram mantidas em estufa umidificada (5 % de CO₂, 95 % de ar) em meio RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 20 µg/mL de L-glutamina, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de suspensão em garrafas de 75 cm² e repicadas a cada dois dias. A suspensão celular foi centrifugada por 3 min. a 1.500 rpm. O botão celular foi novamente suspenso e colocado em cultura a uma densidade de 5 x 10⁵ células/mL (GONG *et al.*, 2000).

6.3.3.2. Citotoxicidade

Para análise da citotoxicidade foi empregado o método MTT (MOSMANN, 1983). As células foram plaqueadas a uma densidade de 5 x 10⁵ células/mL, em microplacas de 96 poços (Corning Inc., New York, EUA). Os testes foram realizados com diferentes concentrações de metotrexato comercial (2,25 a 22,5 mM) e da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (0,1 a 2 mM) no momento do plaqueamento e incubadas durante 48 h em estufa umidificada (5 % de CO₂, 95 % de ar). Após o período de incubação, foram adicionados a cada poço 22 µL de MTT (5 mg/mL), atingindo concentração final de 10 %. As placas foram mantidas por 4 h em estufa, o meio de cultura foi removido e adicionaram-se 100 µL de DMSO para completa solubilização dos cristais de formazona. A leitura das placas foi realizada após a

adição do DMSO em leitor de ELISA (Microplate BIORAD, California, EUA) a 570 nm e 655 nm de referência.

O di-dodecil metotrexato não foi avaliado sozinho, uma vez que não foi possível solubilizá-lo em solventes não citotóxicos ou que não interferissem nas propriedades bioquímicas das células.

O IC₅₀, Índice de citotoxicidade 50 %, foi determinado após leitura das absorbâncias em leitor ELISA (Microplate BIORAD) através da equação (1):

$$IC_{50} = \frac{\text{média das absorbâncias das amostras} \times 100}{\text{média das absorbâncias dos controles}} \quad (1)$$

6.3.3.3. Captação Celular

As células foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^5 células/mL em placas de 60 mm X 15mm (Corning Inc., New York, EUA) em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 20 µg/mL de L-glutamina, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina, e incubadas por 24 h. O meio de cultura foi trocado por meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino sem lipoproteínas (Invitrogen, California, EUA), 20 µg/mL de L-glutamina, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina e as placas foram incubadas por mais 24 h. O meio de cultura foi trocado novamente (10 % soro fetal bovino), as células foram inoculadas com diferentes concentrações de LDE-di-dodecil metotrexato e MTX (8,8 a 316,5 nM) para a K 562 e para a HL 60 e incubadas por 4 h. As células foram então lavadas três vezes com tampão fosfato (pH 7,4), ressuspensas em 200 µL de água desionizada e lisadas em disruptor celular. Uma alíquota de 20 µL foi retirada de cada amostra para posterior dosagem de proteína. Foram adicionados 500 µL de solução isopropanol/acetato de etila (50:50), e as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm para precipitação das proteínas e extração do fármaco. O sobrenadante foi retirado e evaporado sob fluxo de nitrogênio.

O metotrexato foi adicionado nas mesmas concentrações que o di-dodecil metotrexato (8,8 a 316,5 nM) após o mesmo procedimento de plaqueamento e

incubação. As células foram lavadas e lisadas da mesma maneira, porém o solvente utilizado para precipitação de proteínas e extração do fármaco foi acetonitrila.

As amostras foram reconstituídas em 200 µL da mesma fase móvel do HPLC para ambos os fármacos (metanol para di-dodecil MTX e tampão acetato de sódio/acetonitrila 90:10 para o MTX).

Para correção das concentrações captadas, foi feita a dosagem de proteína total do lisado celular pelo método de LOWRY (1951) para estimar a concentração de fármaco/mg de proteína.

O método de extração para ambas as formulações foi validado analisando-se três concentrações definidas (156, 625 e 2500 ng/mL) em quadruplicata, cada uma nas respectivas condições descritas, porém sem o período de incubação com as formulações. As amostras foram reconstituídas em 200 µL das respectivas fases móveis do HPLC e a recuperação dos fármacos foi analisada.

6.3.4. Estudos *in vivo*

Nos experimentos de toxicidade foram utilizados grupos de 10 camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, com peso médio de 20 g e idade de 30 a 45 dias. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto Butantan em sala com temperatura controlada, em ciclos de claro/escuro de 12 h e com acesso livre a ração e água.

6.3.4.1. Dose Máxima Tolerada (DMT) e Dose Letal de 50 % (DL₅₀)

Grupos com 10 camundongos receberam as doses de 47, 94 e 180 mg/kg do metotrexato comercial (25 mg/mL) e LDE-di-dodecil metotrexato (10 mg/mL), diluídos na proporção de 1:2 em solução salina, os fármacos foram administrados via endovenosa no plexo venoso retro-orbital, em dois esquemas: 1- dose única (DU) e 2- múltiplas doses (MD), por três dias consecutivos. Todas as doses foram ajustadas com base no peso corpóreo médio de cada grupo. Medidas de peso foram realizadas a cada 2 dias e a sobrevivência dos animais foi observada diariamente. Os grupos controle receberam 0,3 mL de solução salina e LDE na massa correspondente à massa das doses mais altas da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (720 mg de lípides/kg para dose única e 1200 mg de lípides /kg para múltiplas doses), diluída na proporção de 2:1 em solução salina.

A Dose Máxima Tolerada (DMT) corresponde à dose onde não houve morte ou perda de peso corpóreo superior a 15 % em nenhum animal do grupo.

A DL_{50} , que representa a dose letal responsável pela morte de 50 % dos animais, foi calculada através da interpolação dos resultados obtidos (porcentagem de morte no grupo/dose).

6.3.4.2. Toxicidade Hematológica

Para as análises da toxicidade hematológica, o sangue total dos camundongos injetados com 180 mg/kg em dose única, das formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial, foi coletado pela punção do plexo venoso retro-orbital com auxílio de um microcapilar Helmington contendo EDTA como anticoagulante. Os respectivos grupos controle, LDE e salina, receberam 720 mg lípides/kg e 0,3 mL de solução salina.

6.3.4.2.1. Número de Eritrócitos

Uma alíquota do sangue de cada grupo foi diluída na proporção 1:1000 em solução salina para a análise do número de glóbulos vermelhos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e o número de células foi expresso em 10^9 /mL.

6.3.4.2.2. Número de Plaquetas

Uma alíquota do sangue total foi diluída na proporção 1:100 em líquido de Brecker (solução de oxalato de amônio a 1 %). A contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer e o número de células foi expresso em 10^3 /mL.

6.3.4.2.3. Número de Leucócitos e Contagem Diferencial

Uma alíquota do sangue total foi diluída na proporção 1:100 em solução de Turk (azul de metileno 0,5 % em 30 % de ácido acético glacial) para a análise do número de leucócitos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, e expressa em 10^6 células/mL. Parte do material foi utilizado para a confecção do

esfregaço sanguíneo. As lâminas foram fixadas e coradas utilizando-se o sistema de coloração Panótico Rápido (Laborclin, Paraná), lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após a secagem das lâminas foram realizadas as contagens diferenciais de leucócitos em microscopia óptica com aumento de 1000x.

6.3.5. Análise Estatística

Os valores obtidos nos ensaios *in vitro*, expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (dp), foram analisados através de curvas de regressão linear e obtidas as concentrações inibitórias de 50 % (IC₅₀).

Os valores obtidos nos ensaios *in vivo*, expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (dp), foram analisados pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Nas análises, os valores de ***p < 0.0001 foram considerados extremamente significantes, **p < 0.001 altamente significantes, *p < 0.05 significantes e p > 0.05 não significantes (ns).

7. RESULTADOS

7.1. Síntese e Análise do di-Dodecil Metotrexato

O di-dodecil metotrexato foi obtido com alto rendimento (98 %) através de reação de esterificação com brometo de di-dodecila em presença de carbonato de Césio como catalisador, conforme Figura 3.

Figura 3. Esquema reacional para obtenção do di-dodecil metotrexato.

As Figuras 4A e 4B mostram os cromatogramas do MTX e do seu derivado após reação de esterificação, onde é possível observar a elevada pureza do produto obtido.

Figura 4. Cromatograma do MTX **(A)** e do di-dodecil metotrexato **(B)** obtidos por HPLC Shimadzu equipado com coluna C₁₈, fase reversa, utilizando metanol como fase móvel a um fluxo de 1 mL/min.

No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) (Figura 5A) observam-se os sinais característicos dos grupos dodecila: um tripleto em 0,86 ppm referente às metilas terminais dos grupos dodecila; um singlete em 1,23 ppm referente à maioria dos hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos;

dois tripletos correspondentes aos hidrogênios dos carbonos ligados ao oxigênio da carboxila, sendo um em 4,00 ppm e outro em 4,13 ppm. Os demais sinais do espectro são idênticos ao do MTX. No espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C) (Figura 5B), observam-se sinais que confirmam a ligação dos dois grupos dodecila ao MTX: um sinal em 13,99 ppm referente aos carbonos terminais; o grande número de sinais entre 20 e 40 ppm referentes aos carbonos metilênicos; os sinais em 64,85 e 65,66 ppm correspondentes aos carbonos ligados ao oxigênio dos ésteres e em 172,63 e 173,21 ppm observam-se os sinais correspondentes aos carbonos das carbonilas dos ésteres. Os demais sinais do espectro são idênticos ao do MTX.

Figura 5. Espectro de ^1H RMN do di-dodecil metotrexato **(A)** e de ^{13}C RMN **(B)**. Os espectros foram realizados em espectrômetro Bruker AC300, dissolvido em CDCl_3 e com TMS como referência.

No espectro de massa (Figura 6A) observa-se um pico de massa 791,48 m/z , referente à massa molecular do composto e 792,49 e 793,52 m/z sendo M+1 e M+2 respectivamente. Um pico de 675,63 m/z que corresponde ao di-dodecil metotrexato com uma quebra no anel pirimidínico da extremidade da cadeia. Em 308,11 m/z observa-se um pico referente ao fragmento sem o glutamato di-esterificado, e o principal fragmento em 338,31 m/z referente à quebra na ligação amida, conforme mostra a fragmentação da estrutura presente no espectro.

No espectro de infravermelho (Figura 6B) as principais bandas que caracterizam o produto são: uma banda larga em 3478,8 cm^{-1} referente aos estiramentos N-H dos grupos amino; as duas bandas em 2924,2 e 2855,9 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos C-H alifáticos e aromáticos; banda em 1737,5 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O da função amida e 1630,7 cm^{-1} uma banda referente ao estiramento das ligações C=O das carbonilas dos ésteres.

Figura 6. Espectro de massa (expandido) obtido em equipamento Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) acoplado a uma bomba Shimadzu LC-10A **(A)**. Espectro de infravermelho do di-dodecil metotrexato em pastilha de KBr **(B)**.

E, finalmente, os resultados da análise elemental para o di-dodecil metotrexato mostraram que os valores de massa elemental percentual para os elementos C, H e N estão dentro da variação permitida em relação aos dados

teóricos, ou seja, inferiores a 0,4 %. Calculado: C (66,80 %), H (8,92 %) e N (14,16 %). Encontrado: C (66,50 %), H (8,68 %) e N (14,10 %).

A esterificação dos grupos carboxila do MTX proporcionou um grande aumento de lipofilicidade em relação ao MTX, que era de -1,4 e passou para 3,9, observado em experimentos para determinação do coeficiente de partição.

7.2. Estabilidade da Associação LDE-di-Dodecil Metotrexato

Durante o processo de sonicação não se observa nenhuma alteração na estrutura química do di-dodecil metotrexato, mesmo após armazenamento por um período de 45 dias.

O diâmetro da LDE passou de 40 ± 10 nm para 55 ± 10 nm após associação com o derivado, e manteve-se inalterado durante o período de análise.

A taxa média de dissociação do di-dodecil metotrexato da LDE em um período de 45 dias foi de 10 ± 5 %, a 4 °C, sendo que a partir de 45 dias observa-se a formação de pequenos cristais correspondentes ao di-dodecil metotrexato livre. O tamanho da partícula não sofreu alteração durante esse período.

A estabilidade da associação da LDE-di-dodecil metotrexato, foi determinada também através de diálise contra plasma. A taxa de dissociação do fármaco após 72 h de diálise contra plasma humano foi de apenas 25 %, sendo que a maior saída do fármaco da nanopartícula ocorreu nas primeiras 24 h.

7.3. Estudos *in vitro*

7.3.1 Citotoxicidade

A análise de sobrevivência celular para as linhagens estudadas, foi realizada com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), que envolve a conversão do sal de tetrazólio em cristais de formazona coloridos pelas células vivas, servindo como um método de contagem direta de proliferação e viabilidade celular. Os cristais de formazona formados foram dissolvidos em DMSO e a densidade óptica foi medida em leitor ELISA em dois comprimentos de onda, para subtrair a absorção do DMSO utilizado na solubilização da formazona. Os valores de controle foram obtidos de culturas de células sem adição das substâncias teste.

As concentrações das substâncias teste foram ajustadas com a finalidade de se obter o valor de IC_{50} , próximo das concentrações medianas.

As curvas dose-resposta da preparação LDE-di-dodecil metotrexato e do metotrexato comercial para a linhagem K 562 estão apresentadas nas figuras 7A e 8A respectivamente. Observa-se diferença marcante entre a ação citotóxica da preparação e do fármaco comercial, com valores de IC_{50} de 1,6 e 18,2 mM respectivamente. Estes valores foram determinados a partir da análise de regressão linear de ambas as curvas de sobrevivência (Figuras 7B e 8B), com valor de R^2 de 0,97 e 0,98, respectivamente. As análises mostraram uma regressão negativa quanto à sobrevivência.

A LDE não apresentou atividade citotóxica nas concentrações utilizadas para essa linhagem (Figura 7A), como mostra a análise de regressão linear negativa (Figura 7C), com valor de R^2 de 0,96.

Figura 7. (A) Efeito citotóxico na linhagem K 562 pela adição de LDE (o) e da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (•) nas concentrações de 0,2 a 2 mM. A massa de LDE foi correspondente à massa de LDE presente na associação LDE-di-dodecil metotrexato. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % de LDE-di-dodecil metotrexato (IC_{50}) e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % da LDE (IC_{50}) e sua correlação (R^2).

Figura 8. (A) Efeito citotóxico na linhagem K 562 pela adição do MTX comercial nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % do metotrexato comercial (IC₅₀) e sua correlação (R²).

A Figura 9A mostra a atividade citotóxica da preparação LDE-di-dodecil metotrexato na linhagem leucêmica HL 60. O IC₅₀ da preparação foi de 0,2 mM, determinado a partir da análise de regressão linear da formulação (Figura 9B), com

valor de R^2 de 0,96. A LDE não apresentou ação citotóxica nas concentrações utilizadas para essa linhagem, mostrando uma regressão linear negativa (Figura 9C) com valor de R^2 de 0,93.

O IC_{50} do MTX comercial foi determinado em 26 mM através da análise de regressão linear ($R^2 = 0,99$) representado na Figura 10B. O efeito do fármaco foi dose-dependente, apresentando-se menos citotóxico em relação à associação LDE-di-dodecil metotrexato (Figura 10A).

Figura 9. (A) Efeito citotóxico na linhagem HL 60 pela adição de LDE (o) e da formulação LDE-di-dodecil metotrexato (•) nas concentrações de 0,1 a 0,6 mM. A massa de LDE foi correspondente à massa de LDE presente na associação LDE-di-dodecil metotrexato. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % de LDE-di-dodecil metotrexato (IC_{50}) e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % da LDE (IC_{50}) e sua correlação (R^2).

Figura 10. (A) Efeito citotóxico na linhagem HL 60 pela adição do MTX comercial nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando o índice de citotoxicidade de 50 % do metotrexato comercial (IC_{50}) e sua correlação (R^2).

A Tabela 1 mostra os valores de IC_{50} encontrados para o MTX e LDE-di-dodecil metotrexato nas linhagens leucêmicas estudadas.

Tabela 1. Valores de IC_{50} para o MTX, adicionado nas concentrações de 2,25 a 22,5 mM, e LDE-di-dodecil metotrexato, adicionada nas concentrações de 0,1 a 2 mM nas linhagens leucêmicas K 562 e HL 60. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C.

Formulações Testadas	IC_{50} (mM)	
	K 562	HL 60
LDE-di-dodecil metotrexato	1,6	0,2
Metotrexato comercial	18,2	26
LDE	-	-

7.3.2. Captação Celular

Os estudos de captação celular demonstraram que a formulação LDE-di-dodecil metotrexato foi mais captada pela linhagem K 562 em relação ao fármaco comercial (Figura 11A). Estes valores foram determinados a partir das curvas de regressão linear (Figuras 11B e 11C) com valores de R^2 de 0,92 e 0,84 respectivamente. A correlação para ambas as formulações foi positiva para esta linhagem.

Figura 11. (A) Captação das formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial pela linhagem celular K 562. As células foram incubadas por 4 horas a 37° C com concentrações de 8,8 a 316,5 nM. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média de LDE-di-dodecil metotrexato e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média do metotrexato comercial e sua correlação (R^2).

A linhagem HL 60 apresentou maior captação da associação LDE-di-dodecil metotrexato como mostra a Figura 12A. A captação média da associação foi em torno de 90 vezes maior em relação ao fármaco comercial, determinada a partir das

curvas de regressão linear (Figuras 12B e 12C), mostrando uma correlação positiva para ambas as formulações.

Figura 12. **(A)** Captação das formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial pela linhagem celular HL 60. As células foram incubadas por 4 horas a 37° C com concentrações de 8,8 a 316,5 nM. **(B)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média de LDE-di-dodecil metotrexato e sua correlação (R^2). **(C)** Curva de regressão linear demonstrando a captação média do metotrexato comercial e sua correlação (R^2).

O método empregado para extração dos fármacos, mostrou-se eficiente para ambos, com recuperação em torno de 100 %.

7.4. Estudos *in vivo*

7.4.1. Dose Máxima Tolerada (DMT) e Dose Letal de 50 % (DL_{50})

A Figura 13 mostra as curvas de variação das médias do peso dos animais após a administração do metotrexato comercial. Houve perda de peso superior a 15 % dos animais dos grupos injetados com múltiplas doses, sendo que todos os animais morreram 7 dias após a última dose administrada (Figura 14). Os grupos que receberam o fármaco em dose única não apresentaram perda de peso superior a 15 % e sobreviveram até o final do período de observação, com exceção do grupo que recebeu a dose de 180 mg/kg a taxa de sobrevivência dos animais foi de 80 %. A DMT para o metotrexato comercial foi de 94 mg/kg administrado em dose única.

De acordo com os resultados obtidos para a DMT do metotrexato comercial, a DL_{50} foi superior à dose máxima administrada, e foi calculada em 470 mg/kg. A

dose de 180 mg/kg administrada em dose única correspondeu à DL_{20} deste fármaco (Figura 15).

Figura 13. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via endovenosa de metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 14. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em múltiplas doses via endovenosa do metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 15. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em dose única via endovenosa do metotrexato comercial nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

As curvas de variação de peso dos animais após administração da formulação LDE-di-dodecil metotrexato estão representadas na Figura 16. Não foi realizada a administração em múltiplas doses da concentração de 180 mg/kg, uma vez que, ao administrar a formulação em dose única, houve morte de todos os animais em 7 dias. Houve perda de peso superior a 15 % dos animais dos grupos de múltiplas doses (47 e 94 mg/kg), sendo que esses animais morreram 7 dias após a última dose administrada (Figura 17). Os grupos que receberam o fármaco em dose única, não apresentaram perda de peso superior a 15 % porém, todos os animais do grupo da dose de 180 mg/kg morreram. A DMT para a LDE-di-dodecil metotrexato foi de 47 mg/kg administrada em dose única.

De acordo com os dados obtidos para DMT, a DL_{50} foi calculada em 115 mg/kg para o esquema de dose única, uma vez que todos os animais dos grupos de esquema de múltiplas doses morreram (Figura 18).

Figura 16. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 17. Porcentagem de sobrevida dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em múltiplas doses via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47 e 94 mg/kg, durante 7 dias.

Figura 18. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos (n=10) obtida pelo teste Kaplan-Meier, após administração em dose única via endovenosa de LDE-di-dodecil metotrexato nas doses 47, 94 e 180 mg/kg, durante 7 dias.

Os animais injetados com LDE não apresentaram perda de peso por toxicidade aguda, e as taxas de sobrevivência foram de 100 %. Os dados estão representados na Figura 19.

Figura 19. Variação de peso dos camundongos (n=10) após administração em dose única (DU) e múltiplas doses (MD) via plexo venoso retro-orbital de LDE nas respectivas doses da formulação LDE-di-dodecil metotrexato de 180 mg/kg para dose única e 94 mg/kg para múltiplas doses, durante 7 dias.

A Tabela 2 mostra os valores de dose máxima tolerada e dose letal de 50 % encontrados para as formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial, quando administrados em dose única. O esquema de administração em múltiplas doses apresentou elevada mortalidade para ambas as formulações, permitindo encontrar a dose letal de 60 % (DL₆₀) do MTX comercial (47 mg/kg).

Tabela 2: Valores de DMT e DL₅₀ encontrados para o MTX e LDE-di-dodecil metotrexato injetados em dose única (D.U.) em camundongos Balb/c.

Formulações Testadas	D.U.	
	DMT	DL ₅₀
LDE-di-dodecil metotrexato	47 mg/kg	115 mg/kg
Metotrexato comercial	94 mg/kg	470 mg/kg

7.4.2. Toxicidade Hematológica

7.4.2.1. Número de Eritrócitos

As determinações dos números de glóbulos vermelhos dos grupos injetados com LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial na dose de 180 mg/Kg estão representados na Figura 20, assim com os valores encontrados para os animais dos grupos injetados com salina (0,3 mL) e LDE (720 mg/kg). Os animais que receberam metotrexato comercial apresentaram diminuição no número de glóbulos vermelhos, sendo que os animais que receberam a formulação LDE-di-dodecil metotrexato não apresentaram alterações.

Figura 20. Número de eritrócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg de lípides/kg).

ns $p > 0.05$: LDE x LDE-di-dodecil MTX;

** $p < 0.01$: Controle x LDE;

*** $p < 0.001$: Controle x LDE-di-dodecil MTX e Controle x MTX;

&&& $p < 0.001$: LDE x MTX;

$p < 0.001$: LDE-di-dodecil MTX x MTX.

7.4.2.2. Número de Plaquetas

Nos grupos injetados com as formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial, observou-se uma acentuada redução do número de plaquetas apenas para o grupo do fármaco comercial (Figura 21).

Figura 21. Número de plaquetas dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg/kg).

ns $p > 0.05$: Controle x LDE;

*** $p < 0.001$: Controle x LDE-di-dodecil MTX e Controle x MTX;

&& $p < 0.01$: LDE x LDE-MTXE;

&&& $p < 0.001$: LDE x MTX;

$p < 0.001$: LDE-di-dodecil MTX x MTX.

7.4.2.3. Número de Leucócitos e Contagem Diferencial

Os valores encontrados para os animais injetados com as formulações estão representados na Figura 22. Os animais que receberam LDE e LDE-di-dodecil metotrexato apresentaram um aumento significativo do número de leucócitos.

Figura 22. Número de leucócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX, metotrexato e LDE (720 mg/kg).

ns $p > 0.05$:Controle x MTX;

*** $p < 0.001$: Controle x LDE, Controle x LDE-di-dodecil MTX;

& $p < 0.05$: LDE x LDE-di-dodecil MTX;

&&& $p < 0.001$: LDE x MTX;

$p < 0.001$: LDE-di-dodecil MTX x MTX.

O metotrexato, quando administrado em associação a LDE, provocou menor eosinofilia, encontrada no grupo que recebeu o fármaco comercial para a dose de 180 mg/kg (Figura 23). E, aumentou ainda a proporção de neutrófilos.

Figura 23. Contagem diferencial de leucócitos dos camundongos (n=10) após 24 horas da administração via endovenosa de 180 mg/kg das formulações LDE-di-dodecil MTX e metotrexato.

ns $p > 0.05$;

*** $p < 0.001$.

8. DISCUSSÃO

As evidências de que as células neoplásicas apresentam um aumento no número de receptores de LDL (HO *et al.*, 1978), reduzindo as concentrações plasmáticas de colesterol nesse tipo de patologia, fez com que vários autores investigassem a possibilidade de utilizar a LDL como veículo de quimioterápicos, para aumentar sua seletividade às células tumorais (MASQUELIER *et al.*, 1986; LUNDBERG *et al.*, 1987; VITOLS *et al.*, 1990; MASQUELIER *et al.*, 2000)

Embora o uso da LDL humana tenha sido alvo de vários estudos, o procedimento de obtenção é de alta complexidade. O maior obstáculo para a aplicação da LDL está relacionado a sua natureza endógena, o que implica na necessidade de isolamento a partir do soro humano. Uma vez isolada, ainda existe a dificuldade de manipulação e armazenamento, além da possibilidade de transmissão de doenças infecciosas como hepatite e AIDS.

A utilização de emulsões artificiais semelhantes à LDL é uma das alternativas propostas por alguns autores para superar as desvantagens do uso da LDL natural (GINSBURG *et al.*, 1982, HALBERT *et al.*, 1984 e OWENS *et al.*, 1995).

Estudos realizados por MARANHÃO e colaboradores a respeito da utilização da LDE, uma nanoemulsão artificial rica em colesterol, como ferramenta para avaliar o metabolismo lipídico da LDL, mostraram que a nanoemulsão é reconhecida e captada pelos receptores celulares da LDL (REDGRAVE e MARANHÃO, 1985; MARANHÃO *et al.* 1986, 1993 e 1997).

A investigação do uso da LDE como veículo para quimioterápicos foi proposta inicialmente após a confirmação de que a mesma se concentrava preferencialmente em tecidos neoplásicos (MARANHÃO *et al.*, 1994).

Uma das propriedades exigidas para que um fármaco seja associado à LDE de forma estável é a sua alta lipofilicidade. Recentemente, quimioterápicos de maior lipossolubilidade como a carmustina, ou modificados quimicamente para adquirir esta propriedade, como o oleato de etoposídeo, foram associados à LDE, apresentando excelentes resultados (MARANHÃO *et al.*, 2002 e VALDUGA *et al.*, 2003). Nos estudos desenvolvidos com oleato de etoposídeo associado à LDE, foi observado que a modificação química (introdução de um grupo oleíla) aumentou a lipofilicidade do fármaco, não alterando sua citotoxicidade e, além disso, elevou de 50 para aproximadamente 98 % a taxa de associação à LDE. Em ensaios realizados

com as linhagens HL 60 (células de leucemia pró-mielocítica aguda), K 562 (células de leucemia mielóide crônica) e HT 29 (células adenocarcinoma de cólon humano), observou-se uma diminuição dos valores de IC₅₀, sendo que a diferença na atividade citotóxica foi atribuída à toxicidade do veículo, na preparação comercial (MOURA, 2003 – Monografia para Conclusão de Curso). Além disso, a associação apresentou toxicidade animal em torno de 5 vezes menor que a preparação comercial (VALDUGA *et al.*, 2003).

Em ensaios clínicos com pacientes portadores de câncer de ovário, a captação do oleato de etoposídeo associado à LDE pelo tecido tumoral foi quatro vezes superior ao tecido ovariano contralateral normal (AZEVEDO *et al.*, 2005). Em pacientes com linfoma, a associação LDE-oleato de etoposídeo na dose de 100 mg/m² de superfície corporal foi praticamente isento de efeitos colaterais, e a doença permaneceu estável durante o período de tratamento (PINHEIRO *et al.*, 2006).

A associação LDE- oleato de paclitaxel (RODRIGUES, *et al.*, 2002) apresentou alta taxa de associação e citotoxicidade seis vezes menor do que o paclitaxel comercial. A toxicidade animal dessa associação foi dez vezes menor em relação ao fármaco comercial.

Em pacientes com câncer de mama (dados não publicados) e pacientes com carcinoma ginecológico (DIAS, *et al.*, 2007) a captação da associação LDE-oleato de paclitaxel pelo tecido tumoral foi 2 e 3,5 vezes maior em relação ao tecido normal, respectivamente. Em testes clínicos realizados em pacientes com câncer de mama não foi observada toxicidade associada ao fármaco.

Foi verificado que a associação LDE-carmustina não altera o direcionamento da LDE para os seus sítios de ligação específicos, mantendo-se a atividade citotóxica do fármaco. A biodistribuição em camundongos e a cinética plasmática em humanos da LDE não foram alteradas após associação do fármaco. Os estudos em pacientes com mieloma múltiplo avançado, resistentes ao tratamento convencional, mostraram que a associação deste fármaco com a LDE diminui drasticamente os efeitos colaterais da quimioterapia (MARANHÃO, *et al.*, 2002; HUNGRIA *et al.*, 2004).

O metotrexato é um fármaco de vasto uso clínico. Pacientes fazendo uso de MTX comumente apresentam como efeitos colaterais depressão da medula óssea, alteração dos testes de função hepática, náusea, vômitos e diarreia, erupções

cutâneas eritematosas, manifestações de toxicidade pulmonar, insuficiência renal, além de outros efeitos adversos tais como febre e cefaléia.

Os tecidos ativamente proliferativos tais como células tumorais, medula óssea, células fetais, das mucosas bucal e intestinal, espermatogônias e células da bexiga urinária são geralmente mais sensíveis às ações farmacológicas do MTX.

Após entrar na célula, o MTX inibe a formação de tetraidrofolatos (pela ligação relativamente irreversível à diidrofolato redutase) que resulta na interferência da síntese e reparo do DNA e replicação celular. O MTX é substrato para poliglutamação, resultando em formas poliglutamadas do fármaco que possuem tempo de retenção muito maior do que o MTX inalterado.

Tendo em vista que o transporte e a poliglutamação dos antifolatos clássicos contribuem para sua seletividade antitumoral, o desenvolvimento de antifolatos não-clássicos tem um papel importante no que diz respeito principalmente a células transporte-resistentes. Isso foi comprovado em estudos utilizando o trimetotrexato em carcinoma de cólon e sarcoma M5076 murínico. Esses tumores foram responsivos ao fármaco lipofílico e não ao MTX, concluindo que para esses tipos de tumores sólidos é necessário um transporte facilitado para que a eficácia antitumoral do fármaco seja atingida (JACKSON, 1999). Porém, não está claro se esses dados podem ser extrapolados para tumores sólidos humanos, pois alguns são responsivos ao MTX e a outros antifolatos clássicos.

A diversidade da classe de antifolatos quanto ao alvo de inibição, propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, transporte e poliglutamação é muito grande, gerando a oportunidade de escolher o melhor agente para tumores com perfil bioquímico particular. Por isso os antifolatos são considerados objeto de estudo promissor no que diz respeito ao direcionamento do fármaco e seletividade.

O presente estudo foi desenhado com a finalidade de desenvolver uma formulação para o MTX, utilizando a LDE com veículo, para utilização posterior em doenças que envolvem processos proliferativos, ou ainda aquelas em que o MTX é empregado, a fim de obter maior eficácia e redução dos efeitos secundários ao tratamento com MTX. Para isso, produziu-se um derivado do MTX mais lipofílico, o di-dodecil MTX, que foi associado à LDE. Foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade físico-química da associação LDE-di-dodecil metotrexato, sua citotoxicidade e captação nas linhagens humanas leucêmicas e sua toxicidade em camundongos, comparando-se com a formulação comercial.

O MTX foi adquirido na forma de sal dissódico, sendo solúvel em água, com um coeficiente de partição baixo, o que impossibilita sua associação à nanoemulsão. Mesmo com a transformação do sal para regenerar o ácido, ainda assim, o coeficiente de partição continua baixo, resultando em uma associação insuficiente.

Foram realizadas várias tentativas infrutíferas para esterificar o MTX envolvendo reações clássicas, usando catalisadores ácidos e básicos como ácido acético e hidróxido de sódio, condensação de carboxila de ácido com um álcool correspondente na presença de dicicloexilcarbodiimida e dimetilaminopiridina, na presença de montmorilonita, K-10 dopado com tetracloreto de titânio, e ainda transformação das carboxilas do MTX nos respectivos cloretos para posterior reação com álcool oleílico. Na reação com um haleto de alquila, o brometo de dodecila, e carbonato de cézio como catalisador, o produto desejado foi obtido. As condições de reação são brandas e o produto pode ser purificado facilmente, além do excelente rendimento.

Optou-se por esterificar as duas carboxilas devido à dificuldade de se realizar uma reação regioseletiva para esterificar apenas uma das carboxilas, pois as células tumorais possuem esterases podendo, portanto, hidrolisar ambos os ésteres e regenerar o MTX (LUNDBERG *et al.*, 1994). A alta lipofilicidade de alguns derivados di-ésteres pode fazer com que eles se liguem a membranas de estruturas subcelulares ricas em lípides aumentando a concentração intracelular. Esses dois fatores podem ser um mecanismo de manutenção dos níveis citotóxicos no interior da célula por períodos tão longos quanto o MTX (PIGNATELLO *et al.*, 2000). Além disso, o aumento do comprimento da cadeia de monoésteres do MTX dificulta a ligação com a DHFR, produzindo um aumento significativo da toxicidade (ROSOWSKY *et al.*, 1984).

A confirmação da estrutura do produto obtido, di-dodecil metotrexato, foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa sequencial, ressonância magnética nuclear, infravermelho e análise elementar. A reação apresentou 98 % de rendimento e mostrou ser dependente de condições anidras. Esta afirmação está baseada no fato de que, quando em condições anidras, o rendimento da reação era aumentado.

A reação de esterificação do MTX aumentou seu coeficiente de partição de – 1,4 para 3,9, confirmado através de experimento clássico em octanol/água. Este aumento permitiu que houvesse elevada taxa de associação à LDE e, além disso,

possibilitou a formação de uma associação emulsão-fármaco bastante estável. A estrutura química do di-dodecil MTX não foi alterada após o procedimento de associação do derivado à LDE, o que poderia acontecer por força da energia emanada pela radiação ultrassônica.

Uma das características desejadas em um sistema de direcionamento de fármacos é que o veículo seja capaz de retê-lo até sua captação celular. Neste sentido, objetivando-se avaliar a estabilidade da associação LDE-di-dodecil metotrexato, a mesma foi submetida à diálise contra plasma humano por um período de 72 h. Neste experimento, a maior taxa de dissociação do fármaco da LDE ocorre nas primeiras 24 h, sendo que, após esse período a formulação permaneceu estável.

Não houve variação do diâmetro da partícula num intervalo de 45 dias armazenada a 4 °C, indicando que as partículas de LDE-di-dodecil metotrexato não sofreram coalescência, fenômeno importante na análise de estabilidade de emulsões descrito por KABALNOV *et al.* em 1996. Esta estabilidade se deve aos fosfolípides de superfície da LDE, que possuem carga positiva e estabilizam a nanoemulsão com mais eficiência em relação aos carregados negativamente (SAITO *et al.* 1999).

Portanto, as análises realizadas confirmam que a modificação do metotrexato aumentou a taxa de associação à LDE e conferiu ao sistema a propriedade de ser uma formulação estável por um período superior ao necessário para que a maior parte dele desapareça do compartimento plasmático e atinja o sítio de ligação.

Para verificar a ação citotóxica do fármaco após a modificação e associação à LDE, foram realizados experimentos de citotoxicidade utilizando o método de MTT nas linhagens leucêmicas humanas HL 60 e K 562. Comparando-se os valores de IC₅₀ da associação LDE-di-dodecil metotrexato com a formulação comercial, observou-se aumento de cerca de 100 vezes do efeito inibitório sobre o crescimento celular para ambas as linhagens. Comparando-se a ação citotóxica da associação entre as duas linhagens leucêmicas, concluiu-se que esta formulação foi cerca de 90 vezes mais citotóxica para a linhagem HL 60. As análises realizadas através das curvas de regressão linear mostraram uma correlação negativa quanto à sobrevivência celular para as formulações LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial. A LDE não apresentou efeito citotóxico para ambas as linhagens, o que foi comprovado pela sua correlação positiva.

Através da comparação entre a citotoxicidade da LDE-di-dodecil metotrexato e do fármaco disponível comercialmente ficou claro que a modificação química do MTX e sua associação à LDE aumentaram a atividade citotóxica do fármaco. Estes resultados condizem com a afirmação de ROSOWSKY *et al.*, 1984, que demonstraram que derivados do MTX compostos por cadeias com 10-12 átomos de carbono são ideais para manter a ação do fármaco. O aumento da ação citotóxica do MTX após a associação à LDE foi de 100 vezes para a HL 60 e 10 vezes para a K 562, provavelmente devido à alta especificidade da formulação pelos receptores LDL.

A captação de LDE-di-dodecil metotrexato pelas linhagens leucêmicas foi comparada à captação do fármaco comercial, através de ensaios onde as células foram expostas a concentrações crescentes de ambas as formulações. O aumento da concentração de LDE-di-dodecil metotrexato no meio promoveu aumento na sua captação celular, até alcançar um estado de equilíbrio, num comportamento característico de ligação entre receptor e proteína, o que foi confirmado através da correlação positiva. Isso confirma os valores obtidos quanto à atividade citotóxica dos fármacos, mostrando que a diminuição do IC₅₀ do MTX se deve à associação à LDE, o que resultou em maior afinidade pelos receptores.

As análises de regressão linear mostraram que a captação da formulação LDE-di-dodecil metotrexato foi cerca de 75 vezes maior em relação ao fármaco comercial para a linhagem HL 60 e 90 vezes para a K 562. Apesar das duas formulações apresentarem diferentes vias de captação, os estudos realizados mostram que a afinidade da LDE-di-dodecil metotrexato é maior do que a afinidade do MTX, cada formulação ao seu respectivo receptor, para as duas linhagens leucêmicas.

A captação da LDE, quando associada ao oleato de etoposídeo, foi maior em relação à captação da nanoemulsão sozinha nas linhagens leucêmicas HL 60 e K 562 (MOURA, 2003 – Monografia para Conclusão de Curso). Os receptores de LDL reconhecem a partícula devido à presença da apolipoproteína E, a qual confere alta afinidade à nanoemulsão (MARANHÃO *et al.*, 1997).

O MTX entra na célula através do carregador folato reduzido (CFR), que apresenta alta afinidade para o fármaco e muito baixa para outros folatos, sendo este um sistema que pode sofrer saturação. A distribuição dos transportadores de folato na membrana dos tecidos é estrutural e funcionalmente diferente em células

normais e malignas. A atividade do CFR é alta em tecidos neoplásicos não diferenciados e tecido fetal, porém essa taxa diminui com a maturação e diferenciação celular. A expressão do RNAm do CFR1 é alta em células de câncer de mama e leucêmicas, demonstrado por MOSCOW *et al.* em 1997.

Os estudos *in vivo* para avaliar a toxicidade do MTX comercial e LDE-di-dodecil metotrexato foram realizados em camundongos da linhagem Balb/c. As doses administradas foram determinadas a partir de dados obtidos do fabricante do fármaco comercial. O MTX comercial, administrado em dose única, não apresentou DL₅₀ e sua DMT foi de 94 mg/kg e a DL₅₀ foi calculada em 470 mg/kg para este esquema de administração. Tal concentração é incompatível ao sistema biológico neste modelo experimental. Para se atingir altas concentrações, o fármaco foi administrado em múltiplas doses e a DL₅₀ foi determinada em 47 mg/kg. As informações descritas pelo fabricante mostram que a DL₅₀ é de 94 mg/kg em camundongos, porém o valor encontrado neste trabalho diverge do informado.

O metotrexato quando administrado em múltiplas doses causou caquexia acentuada nos animais, sendo elevada sua taxa de mortalidade para todas as doses administradas. Quando administrado em dose única, as maiores concentrações administradas causaram acentuada toxicidade, caracterizada principalmente pela perda de peso e pela grande variação dos parâmetros hematológicos.

Estudos realizados com camundongos da linhagem Swiss Webster mostraram grande diferença de DMT entre grupos de animais que receberam MTX em diferentes vias e esquemas de administração (LOBO e BALTHASAR, 2003). A DMT variou de 760 mg/kg (intraperitoneal) à 3,8 mg/kg (infusão em 72 horas). No mesmo experimento também foi comparada a perda de peso entre os animais tratados com diferentes esquemas de administração, sendo que a caquexia mais acentuada foi encontrada nos animais que receberam 10 mg/kg de MTX durante 72 horas, mostrando uma relação entre a caquexia causada e o tempo de exposição ao fármaco. Resultados semelhantes também foram encontrados neste estudo, sendo que houve maior toxicidade nos grupos expostos ao fármaco por períodos mais longos, obtidos a partir da administração de múltiplas doses.

A formulação LDE-di-dodecil metotrexato não foi administrada em múltiplas doses na concentração de 180 mg/kg, uma vez que 100 % dos animais morreram quando receberam essa concentração em dose única.

A DMT para LDE-di-dodecil metotrexato foi de 47 mg/kg e a DL₅₀ foi de 115 mg/kg para o esquema de dose única, uma vez que 100 % dos animais dos grupos do esquema de múltiplas doses morreram. Os animais que receberam LDE-di-dodecil metotrexato em múltiplas doses apresentaram caquexia acentuada em relação aos animais dos grupos de dose única, porém a redução de peso foi menor quando comparada aos animais que receberam metotrexato comercial. Essa diferença se deve ao fato da LDE aumentar o tempo de meia-vida do fármaco, fato observado em experimentos de farmacocinética realizados em coelhos, em que o tempo de meia-vida foi aproximadamente duas vezes maior em relação do fármaco comercial (dados não publicados). E, ainda à presença de grupos éster na molécula do fármaco, faz com que seja necessária sua quebra por ação de esterases intracelulares para que o mesmo volte à forma inalterada, o que aumenta o tempo para se atingir os efeitos do antifolato quanto à inibição da síntese de purinas e timidinas. O aumento do tempo de meia-vida proporcionado pela associação à LDE também já foi observado para o oleato de etoposídeo e oleato de paclitaxel (AZEVEDO *et al.* 2005 e RODRIGUES *et al.*, 2002),

Os animais injetados com LDE não apresentaram perda de peso e as taxas de sobrevivência foram de 100 %, mesmo quando injetada em múltiplas doses. Esses dados mostram que o uso da LDE não provocou a caquexia apresentada pelos animais que receberam metotrexato comercial, independente do esquema utilizado.

Os estudos das alterações hematológicas realizadas com os animais que receberam 180 mg/kg de LDE-di-dodecil metotrexato e metotrexato comercial em dose única, mostraram modificações quantitativas dos elementos celulares. Os camundongos que receberam 180 mg/kg de LDE-di-dodecil metotrexato apresentaram um aumento do número de eritrócitos, assim como os animais que receberam a nanoemulsão na dose de 720 mg de lípides/kg. Houve redução significativa somente no grupo que recebeu MTX comercial, o que está de acordo com os dados da literatura (JACKSON 1999), uma vez que anemia é um dos efeitos esperados após administração deste fármaco.

O fármaco comercial provocou uma importante trombocitopenia, sendo que após a sua associação à LDE, esse efeito não foi tão pronunciado. Os animais que receberam LDE não apresentaram alterações.

Os animais dos grupos LDE-di-dodecil metotrexato apresentaram aumento do número de leucócitos em relação ao fármaco comercial. Porém, quando

analisados os valores da contagem diferencial observou-se que LDE-di-dodecil metotrexato provocou menor eosinofilia em relação ao metotrexato comercial e ao mesmo tempo acentuou a neutrofilia. O MTX comercial apresentou ainda linfoblastos (desvio à esquerda), o que indica que a toxicidade do fármaco provocou uma resposta da medula óssea. Eosinofilia é encontrada após administração de muitos fármacos, incluindo o MTX, assim como neutrofilia (KUMMAR *et al.*, 2005, ACKERMAN *et al.*, 2005).

Segundo dados obtidos pelo fabricante, em humanos, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e anemia são efeitos esperados com uso do metotrexato. Tais efeitos foram reproduzidos para este experimento, mesmo em dose mais elevada.

O entendimento detalhado sobre os fatores que contribuem para a atividade do MTX, tais como transporte de membrana, poliglutamação e inibição enzimática, promoveu um grande avanço para o desenvolvimento de novos antifolatos, bem como o uso de novos transportadores. A modificação molecular e associação do MTX à LDE proporcionaram aumento da eficiência do transporte através da membrana celular, provável aumento do tempo de retenção intracelular e aumento do tempo de meia-vida do fármaco. Provavelmente todos estes fatores contribuíram para a diminuição da DMT, em relação ao fármaco comercial, porém isso pode ser compensado pelo aumento da eficiência da formulação e também pela redução da toxicidade hematológica.

9. CONCLUSÕES

As análises dos resultados permitiram concluir que:

- A reação de esterificação do metotrexato aumentou a lipofilicidade do fármaco, o que possibilitou sua associação à LDE com elevado rendimento;
- O processo de associação por sonicação ultrassônica não alterou a estrutura química do derivado;
- A associação manteve-se estável por um período de 45 dias a 4 °C no que diz respeito a tamanho de partícula e taxa de dissociação;
- Os estudos de dissociação da LDE-di-dodecil metotrexato contra plasma humano comprovaram também uma alta estabilidade da associação;
- Os estudos de citotoxicidade mostraram que a atividade citotóxica do MTX em relação à LDE-di-dodecil metotrexato aumentou em torno de 100 vezes após a modificação e associação à nanoemulsão, para a linhagem HL 60 e 10 vezes para a K 562, mostrando correlação negativa quanto à sobrevivência celular;
- A captação celular da associação LDE-di-dodecil metotrexato apresentou correlação positiva e foi cerca de 90 vezes maior em relação ao fármaco comercial para a linhagem K 562 e 75 vezes para a HL 60;
- A DMT do MTX comercial foi de 94 mg/kg administrado em dose única, e a DL_{50} foi calculada em de 470 mg/kg. Para a associação LDE-di-dodecil metotrexato, encontrou-se valores de 47 e 115 mg/kg, respectivamente, administrada em dose única;
- As análises dos hemogramas dos camundongos mostraram que o MTX comercial provoca acentuada toxicidade hematológica (anemia, plaquetopenia e neutrofilia e eosinofilia), em contraste com o derivado associado à LDE.

10. Referências Bibliográficas

ACKERMAN SJ, BUTTERFIELD JH. Eosinophilia, eosinophil-associated disease, chronic eosinophil leukemia, and the hypereosinophilic syndromes. In: HOFFMAN R, BENZ JR EJ, SHATTIL SJ, FURIE B, COHEN HJ, SILBERSTEIN LE, MACGLAVE P. Hematology-Basic Principles and Practice. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005; 763.

ADES A, CARVALHO JP, GRAZIANI SR, AMÂNCIO RF, SOUEN JS, PINOTTI JA, MARANHÃO RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol. Oncol.* 2001; 81: 84.

ALEXOPOULOS CG, BLASTIOS B, AVGERINOS A. Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients. *Cancer.* 1987; 60: 3065.

ALKINS SA, BYRD JC, MORGAN SK, WARD FT, WEISS RB. Anaphylactoid Reactions to Methotrexate. *American Cancer Society.* 1996; 2123.

ALLISON AC. Immunosuppressive Drugs: the first 50 Years and a Glance Forward. *Immunopharmacol.* 2000; 47: 63.

AZEVEDO CH, CARVALHO JP, VALDUGA CJ, MARANHÃO RC. Plasma Kinetics and Uptake by the Tumor of a Cholesterol-rich Microemulsion (LDE) Associated to Etoposide Oleate in Patients with Ovarian Carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2005; 97, 1: 178.

BANERJEE D, MAYER-KUCKUK P, CAPIAUX G, BUDAK-ALPDOGAN T, GORLICK R, BERTINO JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1587: 164.

BELLOT R, POUNA P, ROBERT J. Separation and determination of liposomal and non-liposomal daunorubicin from the plasma of patients treated with daunoxone. *J. Chromatogr B.* 2001; 757: 257.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science.* 1986; 232: 34.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Scavenging for receptors. *Nature.* 1990; 343: 508.

BUDD D, GINSBURG H. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Cancer.* 1986; 58: 361.

CHABNER BA, ALLEGRA CJ, CURT GA, CLENDENINN NJ, BARAM J, SCHOICHI K, DRAKE JC, JOLIVET J. Polyglutamation of Methotrexate is Methotrexate a Prodrug? *J. Clin. Investig.* 1985; 76: 907.

CHOW M, RUBIN H. Selective killing of preneoplastic and neoplastic cells by methotrexate with leucovorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 4550.

CHUN Y-J, LEE S, YANG SA, PARK S, KIM MY. Modulation of CYP3A4 expression by ceramide in human colon carcinoma HT-29 cells. *Science*. 2002; 298: 687.

DIAS ML, CARVALHO JP, RODRIGUES DG, GRAZIANI SR, MARANHÃO RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2007; 59:105.

DORLHIAC-LLACER PE, MARQUEZINI MV, TOFFOLETTO O, CARNEIRO RCG, MARANHÃO RC, CHAMONE DAF. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2001; 34: 1257.

ESTLIN EJ. Continuing Therapy for Childhood Acute Lymphoblast Leukaemia: Clinical and Cellular Pharmacology of Methotrexate, 6-Mercaptopurine and 6-Thioguanine. *Cancer Treat. Rev*. 2001; 27: 351.

GAL D, MACDONALD PC, PORTER JC, SMITH JW, SIMPSON ER. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. *Cancer Res*. 1981; 41: 473.

GOBLE S, BEAR HD. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. *Surg Clin North Am*. 2003; 83, 4: 943.

GOKBUGET N, HOELZER D. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002; 6: 114.

GOLDMAN D, MATHERLY LH. The Cellular Pharmacology of Methotrexate. *Pharmac. Ther*. 1985; 28: 77-102.

GONG Y, WANG Y, CHEN F, HAN J, MIAO J, SHAO N, FANG Z, YANG RO. Identification of the Subcellular Localization of Daunorubicin in Multidrug-Resistance K 562 Cell Line. *Leukemia Res*. 2000; 24: 769.

GOODMAN LS, GILMAM A. As Bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, 9ª Ed. 2001.

GORLICK R, BERTINO JR. Clinical Pharmacology and Resistance to Dihydrofolate Reductase Inhibitors. In: JACKMAN, A. L. ed. Antifolate Drugs in Câncer Therapy. New Jersey: Humana Press. 1999; 37- 59.

GRAZIANI SR, IGREJA FAF, HEGG R, MENEGHETTI C, BRANDIZZI LI, BARBOZA R, AMÂNCIO RF, PINOTTI JA, MARANHÃO RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol. Oncol*. 2002; 85: 493.

GREAVES MF. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science*. 1986; 234: 697.

GRISWOLD JR DP, TRADER MW, FREI III E, PETERS WP, WOLPERT MK, LASTER JR WR. Response of Drug-sensitive and -resistant L1210 Leukemias to High-Dose Chemotherapy. *Cancer Res*. 1987; 47: 2323.

GULATI M, GROVER M, SINGH S, SINGH M. Lipophilic Drug Derivatives in Liposomes. *Int. J. Pharm*. 1998; 165: 129.

HENRIKSSON P, ERIKSSON M, ERICSSON S, RUDLING M, STEGE R, BERGLUND L, ANGELIN B. Hypocholesterolemia and Increased elimination of low-density lipoproteins In metastatic cancer of prostate. *Lancet II*. 1989; 1178.

HO YK, SMITH RG, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Blood*. 1978; 52: 1099.

HUENNEKENS FM. The Methotrexate Story: A Paradigm for Development of Cancer Chemotherapeutic Agents. *Advan. Enzyme Regul*. 1994; 34: 397.

Instituto Nacional do Câncer, disponível no endereço: www.inca.gov.br

ISSA JEAN-PIERRE. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999; 32: 31.

JACKSON RC. Antifolate Drugs- Pats and Futures Perspectives. In: JACKMAN AL, ed. Antifolate Drugs in Câncer Therapy. New Jersey: Humana Press. 1999; 7-12.

JUNGHANS RP, SGOUROS G, SCHEINBERG D. AN antibody-based immunotherapies for cancer. *Cancer Chemother. Biother*. 1996; 655.

KABALNOV A, TARARA T, ARLAUSKAS R, WERRS J. Phospholipids as Emulsion Stabilizers 2.Phase Behavior versus Emulsion Stability. *J Colloid Interface Sci*. 1996; 184: 227.

KAN P, CHEN Z, CHU I. Developmente of nonionic surfactant o/w emulsion as a paclitaxel delivery sistem. *J. Control. Rel*. 1999; 58: 271.

KHOURI I, SANCHEZ FG, DEISSEROTH A. Leukemias in DEVITA JR, V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A. Cancer-Principles & Practice of Oncology. 5^a ed., Lippincott-Raven, Filadélfia-NY, 1997, 2285.

KOROLKOVAS A. *Essentials of Medicinal Chemistry*. 2nd edition, John Wiley & Sons, USA. 1988.

KUMMAR S, NORONHA V, CHU E. Pharmacology of Cancer Chemotherapy. In: DEVITA JR VT, HELLMAN S, ROSENBERG SA. Cancer Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005; 358.

LOBO ED, BALTASAR JP. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Methotrexate-Induced Toxicity in Mice. *J Pharm Sci.* 2003; 92: 1654.

LO PRETE AC, MARIA D A, RODRIGUES DG, VALDUGA CJ, IBAÑEZ OCM, MARANHÃO RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. *J. Pharm. and Pharmacol.* 2006; 58:801.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265.

LUNDBERG B. The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllotoxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture. *Int. J. Pharm.* 1994; 109: 73.

MALETINSKA L, BLAKELY EA, BORNSTAD KA, DEED DF, KNOFF J, FORTE TM. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density-lipoprotein receptor and low-density -lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res.* 2000; 60: 2300.

MARANHÃO RC, CESAR TB, PEDROSO-MARIANI SR, HIRATA MH, MESQUITA CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lipids.* 1993; 28: 691.

MARANHÃO RC, FERES MC, MARTINS MT, MESQUITA CH, TOFFOLETTO O, VINAGRE CGC, GIANINNI SD, PILEGGI F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. *Atheroscler.* 1996; 126: 15.

MARANHÃO RC, GARICOCHEA B, SILVA EL, LLACER PD, CADENA SMS, COELHO IJC, MENEGHETTI JC, PILEGGI FJC, CHAMONE DAF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994; 54: 4660.

MARANHÃO RC, GARICOCHEA B, SILVA EL, LLACER PD, CADENA SMS, COELHO IJC, MENEGHETTI JC, PILEGGI FJC, CHAMONE DAF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994; 54: 4660.

MARANHÃO RC, GRAZIANI SR, YAMAGUCHI N, MELO RF, LATRILHA MC, RODRIGUES DG, COUTO RD, SCHREIER S, BUZAID AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002; 49: 487.

MARANHÃO RC, ROLAND IA, TOFFOLETTO O, RAMIRES JA, GONÇALVES RP, MESQUITA CH, PILEGGI F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptor. *Lipids.* 1997; 32: 627.

MARANHÃO RC, TERYAC AM, REDGRAVE TG. Effects of cholesterol content on metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1986; 875: 247.

MASQUELIER M, VITOLS S, PETERSON C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Res.* 1986; 46: 3842.

MELLADO W, MAGRI NF, KINGSTON DGI, GARCIA-ARENAS R, ORR G, HORWITZ SB. Preparation and biological activity of taxol acetates. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 1984; 124, 2: 329.

MINCHINTON AI, TANNOCK IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 583.

MOSKOW JA, CONNOLLY T, MYERS TG, CHENG CC, PAULL K, COWAN KH. Reduced folate carrier gene (RFC1) expression and anit-folate resistance in transfected and non-selected cell lines. *Int. J. Cancer.* 1997; 184.

MOSLEY ST, GOLDSTEIN JL, BROWN MS, FALCK JR, ANDERSON RGW. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981; 78: 5717.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55.

MOURA JA. Determinação do potencial citotóxico do etoposide oléico associado a uma emulsão lipídica artificial rica em colesterol (LDE) nas linhagens celulares: K 562, HT 29, HL 60 e H 292 [Monografia] São Paulo: Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Metodista de São Paulo; 2003.

National Cancer Institute, disponível no endereço: www.cancer.gov

PERRIN DD, ARMAREGO WLF, PERRIN DR. Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press, Oxford, 2nd ed., 1980.

PIGNATELLO R, PUGLISI G. Lipophilicity Evaluation by RP-HPLC of two Homologous Series of Methotrexate Derivatives. *Pharm. Acta Helv.* 2000; 74: 405.

PIGNATELLO R, SPAMPINATO G, SORRENTI V, DI GIACOMO C, VICARI L, MCGUIRE JJ, RUSSELL C A, PUGLISI G, TOTH I. Lipophilic Methotrexate Conjugates with Antitumor Activity. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 10: 237, e referências citadas.

PINHEIRO KV, HUNGRIA VT, FICKER ES, VALDUGA CJ, MESQUITA CH, MARANHÃO R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 57: 624.

PLASSCHAERT SLA, KAMPS WA, VELLENGA E, DE VRIES EGE, DE BONT ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? *Cancer Treat Rev.* 2004; 30: 37.

PUI CH, RELLING MV, EVANS WE. Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Prac Res Clin Haematol.* 2003; 15: 741.

REDGRAVE TG, MARANHÃO RC. Metabolism of Protein-Free Lipid Emulsion Models of Chylomicrons in Rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 835: 104.

RODRIGUES DG, MARIA DA, FERNANDES DC, VALDUGA CJ, COUTO RD, IBANEZ OC, MARANHÃO RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 55, 6: 565-576.

RODRIGUES DG, COVOLAN CC, CORADI ST, BARBOZA R, MARANHÃO RC. Use of a cholesterol- rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J. Pharm. and Pharmacol.* 2002; 54: 765.

ROSOWSKY A, FORSCH RA, YU CS, LAZARUS H, BEARDSLEY GP. Methotrexate Analogues. 21. Divergent Influence of Alkyl Chain Length on the Dihydrofolate Reductase Affinity and Cytotoxicity of Methotrexate Monoesters. *J. Med Chem.* 1984; 27: 605.

RUBINO FM. Separation Methods for Methotrexate, its Structural Analogues and Metabolites. *J. Chromatog B.* 2001; 764: 217.

SAITO H, KAWAGISHI A, TANAKA M, TANIMOTO T, OKADA S, KOMATSU H, HANDA T. Coalescence of Lipid Emulsions in Floating and Freeze-Thawing Processes: Examination of the Coalescence Transition State Theory. *J Colloid Interface Sci.* 1999; 219: 129.

SAMADI-BABOLI M, FAVRE G, CANAL P, SOULA G. Low-density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivate against B 16 melanoma in mice. *Br. J. Cancer.* 1993; 68: 319.

SCHRAPPE M, CARMITTA B, PUI CH. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000; 14: 2193.

SENGUPTA S, TYAGI P, VELPADIAN T, GUPTA YK, GUPTA SK. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol. Res.* 2000; 42.

SINGH M, GHOSE T, FAULKNER G, KRALOVEC J, MEZEI M. Targeting of Methotrexate-containing Liposomas with a Monoclonal Antibody against Human Renal Cancer. *Cancer Res.* 1989; 49: 3976.

TEIXEIRA RS. ASSOCIAÇÃO DE DERIVADOS DO QUIMIOTERÁPICO DAUNORRUBICINA À NANOEMULSÃO LIPÍDICA QUE SE LIGA AOS RECEPTORES DA LDL : ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

TYAGI P, SENGUPTA S, VELPADIAN T, GUPTA YK, KOCHUPILLAI V, GUPTA SK. Evaluation of the antitumour activity of liposomal formulations of etoposide against choriocarcinoma xenografts in Balb/c nu/nu mice. *Pharm. Commun.* 1999; 5: 595.

VALDUGA CJ, FERNANDES DC, LO PRETE AC, AZEVEDO CHM, RODRIGUES DG, MARANHÃO RC. Use of a Cholesterol-Rich Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposide. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003; 55: 1615.

VERSLUIS AJ, GEEL VAN PJ, OPPELAAR H, BERKEL VA TJC, BIJTERBOSCH MK. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B 16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br. J. Cancer.* 1996; 74: 525.

VITOLS S, GAHRTON G, ÖST A, PETERSON C. Elevated low-density lipoprotein receptor activity in leukemic cells with monocytic differentiation. *Blood.* 1984; 63: 1186.

WILLIAMS AS, PUNN YL, COOPER AM, WILLIAMS BD. The Effect of Liposomally conjugated Methotrexate upon Mediator Release from Human Peripheral Blood Monocytes. *Br. J. Rheumat.* 1995; 34: 241.

APÊNDICE 1

Aprovação do Comitê de Ética para Projetos de Pesquisa

DIRETORIA CLÍNICA **Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 11.05.04 tomou ciência que o Protocolo de Pesquisa nº 329/99 - intitulado "Lipoproteínas Artificiais na Investigação das Dislipidemias e no Tratamento do Câncer", apresentado pela Comissão Científica e de Ética do Incor e aprovado por esta Comissão em 28.10.99, contempla o subprojeto nº 349/04 intitulado "Uso de uma microemulsão rica em colesterol (LDE) como veículo de derivados lipofílicos do metotrexato", apresentado pelo DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, tendo como:

Orientador: Prof. Dr. Dalton de Aiençar Fischer Chamone

Aluna de Pós-Graduação: Sra. Juliana Ayello Moura

CAPPesq, 11 de Maio de 2004

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

A Hematologia
13.05.2004

ELIANA COSTA PONTE
Secretária do Departamento de Clínica
Médica do Incor

APÊNDICE 2

Análise estatística da toxicidade hematológica: ANOVA - Bonferroni
Formulação: LDE

a) Número de Eritrócitos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	- 2.060	7.689	*** p < 0.001
Controle x LDE MD	1.520	5.673	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	3.580	11.784	*** p < 0.001

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa.

b) Número de Leucócitos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	-4.500	6.689	*** p < 0.001
Controle x LDE MD	-6.380	9.483	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	-1.880	2.464	ns p > 0.05

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

c) Número de Plaquetas

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	-42.730	1.141	ns p > 0.05
Controle x LDE MD	375.6	10.032	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	418.33	11.173	*** p < 0.001

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

d) Contagem Diferencial

- **Linfócitos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	0.000	0.000	ns p > 0.05
Controle x LDE MD	18.000	5.075	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	18.000	4.475	*** p < 0.001

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

- **Neutrófilos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	4.070	0.8025	ns p > 0.05
Controle x LDE MD	20.400	4.022	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	16.330	2.840	* p < 0.05

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

* p < 0.05: significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

- **Eosinófilos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	-3.630	3.199	** p < 0.01
Controle x LDE MD	-2.300	2.027	ns p > 0.05
LDE DU x LDE MD	1.330	1.034	ns p > 0.05

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

** p < 0.01: altamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

- **Monócitos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE DU	-1.630	1.311	ns p > 0.05
Controle x LDE MD	-15.300	12.301	*** p < 0.001
LDE DU x LDE MD	-13.670	9.693	*** p < 0.001

Controle: Salina;

DU: dose única;

MD: múltiplas doses;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

APÊNDICE 3

Análise estatística dos dados de toxicidade hematológica - Bonferroni

Dose: 180 mg/Kg – DOSE ÚNICA

a) Número de Eritrócitos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	- 2.060	5.335	*** p < 0.001
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	-2. 440	6319	*** p < 0.001
Controle x MTX	2.250	5.827	*** p < 0.001
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	-0.3800	0.8679	ns p > 0.051
LDE x MTX	4.310	9.844	*** p < 0.001
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	4.690	10.712	*** p < 0.001

Controle: Salina;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

b) Número de Leucócitos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	-4.500	5.859	*** p < 0.001
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	-7.180	9.348	*** p < 0.001
Controle x MTX	-0.4500	0.5859	ns p > 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	-2.680	3.077	* p < 0.05
LDE x MTX	4.050	4.650	*** p < 0.001
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	6.730	7.727	*** p < 0.001

Controle: Salina;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

* p < 0.05: significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

c) Número de Plaquetas

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	-42.730	1.066	ns p > 0.05
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	140.60	3.508	** p < 0.01
Controle x MTX	490.60	12.240	*** p < 0.001
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	183.33	4.034	** p < 0.01
LDE x MTX	533.33	11.735	*** p < 0.001
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	350.00	7.701	*** p < 0.001

Controle: Salina;

*** p < 0.001: extremamente significativa;

** p < 0.01: altamente significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

d) Contagem Diferencial

• Linfócitos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	0.000	0.000	ns p > 0.05
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	3.000	0.5023	ns p > 0.05
Controle x MTX	19.000	3.181	* p < 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	3.000	0.4430	ns p > 0.05
LDE x MTX	19.000	2.806	* p < 0.05
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	16.000	2.363	ns p > 0.05

Controle: Salina;

* p < 0.05: significativa;

ns p > 0.05: não significativa.

• Neutrófilos

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	4.070	0.8060	ns p > 0.05
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	-0.8000	0.1584	ns p > 0.05
Controle x MTX	10.200	2.020	ns p > 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	-4.870	0.8506	ns p > 0.05
LDE x MTX	6.130	1.071	ns p > 0.05
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	11.000	1.921	ns p > 0.05

Controle: Salina;

ns p > 0.05: não significativa.

- **Eosinófilos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	-3.630	1.098	ns p > 0.05
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	0.7000	0.2117	ns p > 0.05
Controle x MTX	-8.900	2.692	ns p > 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	4.330	1.155	ns p > 0.05
LDE x MTX	-5.270	1.406	ns p > 0.05
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	-9.600	2.560	ns p > 0.05

Controle: Salina;

ns p > 0.05: não significante.

- **Monócitos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	-1.630	1.684	ns p > 0.05
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	-3.100	3.203	* p < 0.05
Controle x MTX	-1.500	1.550	ns p > 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	-1.470	1.339	ns p > 0.05
LDE x MTX	0.1300	0.1184	ns p > 0.05
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	1.600	1.458	ns p > 0.05

Controle: Salina;

* p < 0.05: significante;

ns p > 0.05: não significante.

- **Linfoblastos**

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA MÉDIA	t	VALOR p
Controle x LDE	1.700	4.765	*** p < 0.001
Controle x LDE-DI-DODECIL MTX	1.700	4.765	*** p < 0.001
Controle x MTX	-0.3000	0.8409	ns p > 0.05
LDE x LDE-DI-DODECIL MTX	0.000	0.000	ns p > 0.05
LDE x MTX	-2.000	4.944	*** p < 0.001
LDE-DI-DODECIL MTX x MTX	-2.000	4.944	*** p < 0.001

Controle: Salina;

*** p < 0.001: extremamente significante;

ns p > 0.05: não significante.