LUIS ANTONIO PIRES

**Uso de emulsão lipídica como veículo do paclitaxel
na terapia sistêmica do carcinoma da mama**

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

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Hegg

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

Dedico a ...

À Deus, por ter permitido que alcançasse e concluísse mais esta etapa da minha vida.

Ao meu pai Manuel (*in memorian*), que sempre foi um exemplo de determinação, coragem e responsabilidade, cujo investimento e apoio constantes foram responsáveis pela minha formação e evolução.

Ao meu sogro Luiz (*in memorian*), exemplo de caráter e dedicação, que me ensinou a persistir e vencer obstáculos.

À minha mãe Laura, meus irmãos, Marcelo e Christiane pelo apoio, carinho e conselhos.

À minha sogra Ana Maria e meu cunhado Luiz, sempre dispostos a ajudar no que for preciso.

À minha esposa Ana Luiza, fiel e companheira, que me incentivou e ajudou em todos os momentos, partilhando de tristezas e alegrias em todo o tempo.

De modo especial, às nossas filhas Luana e Manuella, que todos os dias iluminam a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Hegg, orientador desta tese, pela amizade, incentivo, confiança, dedicação e apoio recebido durante todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, co-orientador desta tese, pela dedicação e pelo constante estímulo recebido durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Domingos Auricchio Petti, pela oportunidade cedida e tão importante para minha formação.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pelo apoio e auxílio recebido nas fases finais deste trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Maggio da Fonseca, pelo exemplo e disposição de ensinar, pelo incentivo e colaboração na revisão desta tese.

Ao Prof. Dr. Gilson Luchesi Delgado, meu mestre e amigo, que sempre se mostrou disponível quando na necessidade de qualquer ajuda.

À Dra. Débora Garcia Rodrigues, pela amizade, paciência e ajuda em todas as fases deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, em especial a Cláudia, pela sua dedicação e presteza.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR, pelo apoio e incentivo.

Aos docentes da clínica de Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Às mulheres participantes desta pesquisa, por terem contribuído de forma tão carinhosa, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	8
2 – OBJETIVOS.....	24
3 – MÉTODOS.....	25
3.1 – Casuística.....	25
3.1.1 - Critérios de Inclusão.....	25
3.1.2 - Critérios de Exclusão.....	26
3.2 - Características das pacientes.....	27
3.3 – Metodologia.....	27
3.3.1 - Determinações bioquímicas séricas.....	28
3.3.2 - Preparo da associação LDE-oleato de paclitaxel.....	30
3.3.2.1 - Preparação da microemulsão LDE marcada com [¹⁴ C]-oleato de colesterol.....	30
3.3.2.2 - Síntese do oleato de paclitaxel.....	32
3.3.2.3 - Incorporação de oleato de paclitaxel à LDE.....	33
3.3.3 - Determinação da cinética plasmática da associação LDE-oleato de paclitaxel e do paclitaxel em sua formulação comercial.....	34
3.3.4 - Obtenção dos fragmentos da mama.....	35
3.3.5 - Extração de lípides – Captação tecidual da associação LDE-oleato de paclitaxel.....	36
3.3.6 - Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel e do paclitaxel em sua formulação comercial.....	37
3.3.7 - Análise estatística.....	38
4 – RESULTADOS	39
4.1 - Cinética plasmática da associação LDE-oleato de paclitaxel.....	39
4.2 - Cinética plasmática do paclitaxel comercial.....	43
4.3 - Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel e do paclitaxel comercial.....	46
4.4 - Extração de lípides - Captação tecidual da associação LDE-oleato de paclitaxel.....	48
5 – DISCUSSÃO.....	50
6 – CONCLUSÕES.....	58
7 – ANEXOS.....	59
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

PIRES, LA. **Uso de emulsão lipídica como veículo do paclitaxel na terapia sistêmica do carcinoma da mama.** São Paulo, 2006. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: Estudos mostraram que, após a injeção de LDE na corrente sanguínea de mulheres portadoras de câncer de mama, ela encontra-se mais concentrada em tecido neoplásico que no tecido normal. Recentemente, estudos pré-clínicos comprovaram que a associação LDE-oleato de paclitaxel é estável, menos tóxica e com mais atividade terapêutica quando comparada ao uso de paclitaxel comercial em animais. O presente estudo teve como objetivo verificar a estabilidade dessa associação na circulação, a sua capacidade em se concentrar no tecido neoplásico e determinar os parâmetros farmacocinéticos em relação ao paclitaxel isolado.

MÉTODOS: Para determinar os parâmetros farmacocinéticos foram administrados, por via intravenosa, [^3H]-oleato de paclitaxel associado a [^{14}C]-oleato de colesterol-LDE em três pacientes e [^3H]-paclitaxel comercial em duas pacientes 24 horas antes do procedimento cirúrgico. Todas as pacientes eram portadoras de neoplasia maligna da mama. Amostras de sangue foram colhidas durante 24 horas. A radioatividade foi medida por cintilação líquida e os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando um modelo multicompartmental. Fragmentos de tecido neoplásico e de tecido normal mamário foram coletados durante a cirurgia e submetidos à contagem radioativa.

RESULTADOS: As taxas fracionais de remoção da LDE e do oleato de paclitaxel foram semelhantes ($0,0296 \pm 0,0264$ e $0,0182 \pm 0,0186$, respectivamente, $p = 0,5742$). A captação tanto da LDE quanto do oleato de paclitaxel mostrou concentração 2,5 a 3 vezes maior no tecido tumoral do que no tecido mamário normal. O tempo de meia vida do oleato de paclitaxel foi maior do que o da formulação comercial ($18,97 \pm 7,7$ horas e $7,34 \pm 0,40$ horas) e, a depuração plasmática, menor ($1,51 \pm 0,18$ (L/h) e $7,95 \pm 4,32$ (L/h)).

CONCLUSÃO: A maior parte do fármaco ficou retido na microemulsão até sua remoção da circulação e captação pelas células. O oleato de paclitaxel associado à LDE mostrou-se estável na circulação sanguínea e apresentou tempo de meia vida maior e a depuração plasmática menor do que a formulação comercial, além de se concentrar mais no tecido neoplásico da mama. Os resultados permitem sugerir que essa associação pode se constituir em uma estratégia útil no tratamento de mulheres portadoras de câncer da mama.

Palavras chaves: Carcinoma ductal de mama, Paclitaxel/farmacocinética, Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Receptores LDL

SUMMARY

PIRES, LA. **Use of a lipidic emulsion as vehicle of paclitaxel in systemic therapy of breast cancer.** São Paulo, 2006. Dissertation for Mastership. University of São Paulo School of Medicine.

INTRODUCTION: Studies had shown that, after the injection of LDE in the circulation of women with breast cancer, it was more concentrate in neoplastic tissue than in the normal tissue. Recently, studies had proven that the LDE-paclitaxel oleate association is steady, less toxic and with more therapeutical activity when compared with the commercial paclitaxel in animals. The present study was designed to verify the stability of this association in the circulation, its capacity in concentrating in the neoplastic tissue and to determine the plasma kinetics of the association compared to that of paclitaxel isolated.

METHODS: To determine the pharmacokinetic parameters, [^3H]-paclitaxel oleate associated to LDE labeled with [^{14}C]-cholesterol oleate was intravenously injected into three patients and [^3H]-commercial paclitaxel into two patients 24 hours before the surgical procedure. All the patients had breast cancer. Blood samples were collected during 24 hours. Radioactivity was quantified in a scintillation solution and the pharmacokinetic parameters were calculated by compartmental analysis. Specimens of tumoral and normal breast were excised during the surgery and submitted to a radioactive counting.

RESULTS: Fractional clearance rate of LDE and of the paclitaxel oleate were similar ($0,0296 \pm 0,0264$ and $0,0182 \pm 0,0186$, respectively, $p=0,5742$). The uptake of both [^{14}C]-LDE and [^3H]-paclitaxel oleate by breast malignant tissue was two and three fold greater than that of the normal breast tissue. The paclitaxel oleate plasma half-life (h) was greater than the commercial paclitaxel ($T_{1/2} = 18,97 \pm 7,7$ and $7,34 \pm 0,40$) and the total plasma clearance (L/h) of paclitaxel oleate was lesser than the commercial ($\text{CL}=1,51 \pm 0,18$ and $7,95 \pm 4,32$).

CONCLUSION: Most of the drug was restrained in the microemulsion until its removal from the circulation and captation by the cells. The paclitaxel oleate associated to LDE is stable in the bloodstream and has greater plasma half-life and lesser clearance than those for commercial paclitaxel. In addition, the association could be concentrated more in malignant breast tissue. The results allow to suggest that this association can consist in a useful strategy in the treatment of women with breast cancer.

Key words: Ductal breast neoplasms, Paclitaxel/pharmacokinetics, LDL Lipoproteins, LDL Receptors

1 - INTRODUÇÃO

Na última década, a prevalência de câncer de mama tem crescido de forma constante em quase todas as populações. Nos países ocidentais, é o câncer mais comum nas mulheres, sendo responsável por 18% de todas as mortes por câncer (American Cancer Society, 1998).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão mais de 470 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Brasil - Ministério da Saúde, 2006).

Em 2006 são esperados mais de 230 mil casos novos para o sexo masculino e 235 mil para o feminino. Estima-se que o câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (19 mil)(Brasil - Ministério da Saúde, 2006).

Entretanto, apesar do aumento da incidência, a taxa de mortalidade em muitos países ocidentais tem diminuído desde 1989, em grande parte

como consequência de novas técnicas diagnósticas e melhores regimes terapêuticos (Kaplan e Wingard, 2000; Sant et al., 2001).

O aumento mais proeminente na incidência de câncer de mama ao longo dos últimos 20 anos tem ocorrido nas mulheres com mais de 50 anos, embora o prognóstico nesta faixa etária esteja melhorando de maneira constante. Entretanto, nos casos de câncer de mama avançado, o prognóstico permanece ruim, com taxa de sobrevida relativa em 5 anos de aproximadamente 20% (SEER, Cancer Statistics Review, 1998).

O câncer de mama avançado, usualmente definido como doença metastática ou inoperável, é essencialmente incurável. Diminuir o crescimento do tumor, prolongar a sobrevida e aliviar os sintomas, possibilitando tratamento paliativo efetivo e melhoria da qualidade de vida, são os atuais objetivos do tratamento (Winer et al., 2001).

Constitui, a quimioterapia, tratamento de escolha nas pacientes que apresentam receptores hormonais negativos, doença refratária ao tratamento hormonal ou naquelas em que é necessária resposta terapêutica rápida. No entanto, um dos maiores problemas com o uso de fármacos antineoplásicos é a falta de especificidade às células alvo, o que pode causar efeitos adversos, por vezes graves, devido à destruição de células normais do organismo. Tal fato pode acarretar diminuição da dose do

fármaco, comprometendo pois, a sua ação terapêutica.

A veiculação seletiva dos fármacos para as células tumorais faz com que haja diminuição dos efeitos para as demais células do organismo. É importante analisar e identificar diferenças qualitativas e quantitativas nos processos metabólicos, entre outras características, das células tumorais em comparação às células normais. Estas diferenças podem ser aproveitadas para aumentar a eficiência na destruição das células tumorais, preservando assim as células normais. Entre as estratégias sugeridas, e que tem sido testada, encontra-se o uso de lipoproteínas como transportadoras plasmáticas de quimioterápicos (Filipowska., et al., 1992; Versluis et al., 1996). As lipoproteínas constituem complexos formados por proteínas e lípidos e são responsáveis pelo transporte de lípidos insolúveis na circulação sanguínea.

LIPOPROTEÍNAS E LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

A estrutura básica das lipoproteínas é composta por um centro lipídico apolar (triglicérides e éster de colesterol) revestido por fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas (Jackson et al., 1976).

As lipoproteínas, de acordo com as suas características físicas e

composição química são classificadas em quatro grandes grupos: 1) os quilomícrons; as maiores partículas lipoprotéicas e as menos densas, devido à alta proporção de lípidos (até 99%); 2) as lipoproteínas de muito Baixa densidade (VLDL), com maior proporção de proteína; 3) as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em ésteres de colesterol, e 4) as lipoproteínas de alta densidade (HDL) que são as menores e mais densas lipoproteínas (Goodman, Gilman, 2003).

A LDL é uma lipoproteína constituída de um núcleo apolar de ésteres de colesterol (aproximadamente 45-50% do peso lipídico) e um resíduo de triglicérides (3-9%), estabilizado por uma monocamada de fosfolípidos (16-25%) que também contém colesterol livre (5-8%). É o produto final de degradação da VLDL e tem meia vida de 2 a 3 dias, sendo carreadora de 2/3 do colesterol plasmático total em indivíduos normais.

Tem como função fisiológica o transporte do colesterol necessário para a síntese de membranas de células em divisão e para a produção de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e nas gônadas, entre outras (Goodman, Gilman, 2003).

A depuração plasmática de partículas de LDL é mediada essencialmente pelos receptores de LDL. As apoproteínas promovem estabilidade estrutural para as lipoproteínas e funcionam como ligantes nas

interações lipoproteínas-receptor ou são co-fatores nos processos enzimáticos que regulam o metabolismo da lipoproteína. A apo-B100, a única apoproteína da LDL é responsável pela ligação da LDL ao seu receptor. O fígado expressa um grande complemento de receptores LDL (rLDL) e remove cerca de 75% de toda a LDL do plasma (Dietschy et al., 1993). Entretanto, quase todos os tecidos do organismo expressam rLDL. Esses receptores encontram-se em regiões específicas, depressões da membrana celular denominados “coated pits”, que são revestidas por proteínas denominadas clatrin. Após a interação das lipoproteínas com os receptores, essa região sofre invaginação, formando vesículas endocíticas. O envoltório de clatrina dissocia-se e ocorre fusão de várias vesículas formando os endossomos. A diminuição do pH nos endossomos promove o desligamento do complexo receptor-LDL com o retorno do receptor à superfície celular. Segue-se a fusão de lisossomos com a vesícula e a degradação dos seus componentes (Goldstein et al., 1979).

LDL E CÂNCER

Nos tumores malignos, onde há proliferação celular acelerada, a necessidade aumentada de colesterol e de outros lípidos para a síntese de

membranas celulares pode resultar em expressão aumentada de rLDL. Isso permite maior captação de LDL pelas células neoplásicas, fornecendo os lípides necessários à duplicação celular. O incremento do número de receptores é um fenômeno intenso, podendo superar várias vezes o número de receptores das células normais, o que seria responsável pelas baixas concentrações de colesterol encontradas em várias doenças neoplásicas. Em 1978, Ho et al. observaram aumento da atividade do rLDL nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), em relação às células mononucleares de indivíduos sadios, de 3 a 100 vezes maior.

Em 1981, Gal et al. mostraram que células da linhagem neoplásica (carcinomas de vagina e cervical e adenocarcinoma de endométrio) expressavam cerca de 15 a 30 vezes mais rLDL do que as células da linhagem normal (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais da glândula endometrial).

Em 1992, comparou-se a captação de LDL entre células de tumores pulmonares e de tecido pulmonar normal adjacente, com LDL marcada radioativamente. Verificou-se haver elevação no tecido tumoral em até três vezes, comparativamente ao pulmão normal (Vitols et al, 1992).

O aumento de expressão de rLDL poderia ser explicado pelo fato de

que as células neoplásicas, por apresentarem rápida proliferação, exigiriam demanda maior de colesterol e de fosfolípidos para a síntese de novas membranas celulares. Em tese, essa necessidade, seria suprida por síntese endógena ou pela degradação de lipoproteínas de baixa densidade do plasma, o que explicaria o aumento de rLDL e a hipocolesterolemia encontrada em algumas neoplasias (Henrikson et al, 1989; Budd, Ginsberg, 1986).

Vários estudos revelaram haver alterações no metabolismo lipídico de pacientes com câncer. Alguns mostraram relação entre a diminuição nos níveis de colesterol plasmático e o evoluir da doença (Pekkanen et al., 1999; Iribarren et al., 1995). Outros, compararam a hipocolesterolemia observada em pacientes com câncer com indivíduos normais (Barclay et al., 1995; Bases e Krakoff, 1965; Nydegger e Butter, 1972). Ainda, demonstrou-se normalização dos níveis plasmáticos de colesterol em pacientes com câncer após tratamento e remissão da doença (Hungria et al., 1995; Niendorf et al., 1995).

LDL COMO AGENTE DIRECIONADOR DE FÁRMACOS

A possibilidade de se utilizar a LDL como agente direcionador de

fármacos para as células neoplásicas foi estudada por vários pesquisadores (Rudling et al., 1983; Lundberg, 1987; Samadi-Baboli et al., 1993; Xiao et al., 1999). Seu uso baseou-se em três hipóteses que envolvem propriedades inerentes da partícula de LDL e do seu receptor.

Assim, a LDL seria capaz de transportar fármacos lipofílicos que podem ter efeito citotóxico; a internalização do fármaco na LDL protegeria-o contra o ataque de biomoléculas plasmáticas e água e, o fármaco incorporado à LDL teria maior concentração nas células neoplásicas que apresentam aumento de expressão de rLDL em relação às células normais.

Contudo, a obtenção de LDL humana em altas concentrações consiste em procedimento de alta complexidade, além de existir a possibilidade de se transmitir doenças infecciosas, visto que a mesma seria isolada do soro humano.

Além disso, a incorporação de um fármaco na partícula de LDL pode resultar na perda da apoB-100 e, conseqüentemente, da capacidade de ligação aos rLDL, além de poder alterar ou até mesmo quebrar a sua estrutura (Rensen et al., 1997).

MICROEMULSÃO LIPÍDICA ARTIFICIAL (LDE)

Em 1993, Maranhão et al. demonstraram que uma microemulsão lipídica com composição semelhante à da LDL humana sem a parte protéica (LDE), ligava-se aos rLDL e era captada pelas células.

Apesar de a LDE não ter proteína, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais e adquire, entre outras, a apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. A apo E é útil para a LDE ligar-se ao receptor, sendo depois captada pela célula (Maranhão et al., 1993).

Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (Maranhão et al., 1997).

A LDE tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural (Hirata et al., 1999), isto porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 da LDL natural.

Do que se conhecia sobre o comportamento da LDE, levantou-se a hipótese de que a LDE pudesse substituir a LDL natural como veículo para direcionar fármacos antineoplásicos para os tecidos malignos, evitando atingir órgãos e tecidos normais (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1994). Desse modo, os agentes antineoplásicos seriam incorporados à LDE;

a microemulsão seria injetada na circulação, onde iria adquirir a apo E e ligar-se preferencialmente aos rLDL das células neoplásicas, onde estes receptores encontram-se em número muito maior do que nas células normais.

Esta hipótese foi primeiramente comprovada em pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA). Verificou-se que a LDE era removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA do que nos controles. Em contrapartida, após serem tratados com esquemas quimioterápicos convencionais e terem remissão completa da doença, a remoção plasmática da LDE tornava-se mais lenta, normalizando-se. Esses achados mostravam que as células de LMA, com receptores em número muito maior, provocavam remoção acelerada da microemulsão. Quando estas foram destruídas pela quimioterapia, a remoção se normalizava. Neste trabalho, também demonstrou-se a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de células de LMA de maneira direta, por meio de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio^{99m}. Neste experimento comprovou-se que 70% da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas (Maranhão et al., 1994).

Recentemente, confirmou-se a captação e concentração da LDE em tumores sólidos. Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e

de mama revelaram que a LDE se concentrava mais nos tecidos neoplásicos. No câncer de ovário, a captação foi, em média, 10 vezes maior do que no tecido normal (Ades et al., 2001). Já no carcinoma de mama foi 4,5 vezes maior do que a do tecido mamário normal (Graziani et al., 2002). Estes experimentos comprovam, portanto, que é possível direcionar um veículo feito artificialmente para o tecido neoplásico.

Em seguida, pode-se caracterizar a incorporação à LDE de um quimioterápico de ação antineoplásica, de natureza lipofílica, a carmustina. Estudou-se a estabilidade do complexo e a integridade química do fármaco após a incorporação, determinando-se a sua biodistribuição e toxicidade em rato (Maranhão et al., 2002). A associação com a carmustina não alterou o direcionamento da LDE para os seus sítios de ligação específicos e, por estudos de incubação com células normais e de linhagens neoplásicas, demonstrou-se que ela não perdia a sua ação citotóxica (Maranhão et al., 2002).

Estudos clínicos de fase I com a preparação de LDE-carmustina demonstraram efeito anti-tumoral com melhora importante na qualidade de vida de pacientes com mieloma múltiplo e em outros tipos de tumores avançados, como de ovário e de mama, além da diminuição de efeitos colaterais, onde quantidades acima de 150 % da dose máxima

convencional (200 mg/m²), resultaram em toxicidade mínima (Maranhão, dados não publicados).

Em um grupo de pacientes com mieloma múltiplo ainda não tratados foi possível avaliar a ação terapêutica do complexo LDE-Carmustina, na dose de 180 mg/m² de superfície corpórea. Além da nítida melhora clínica dos seis pacientes, os níveis de imunoglobulina M, secretada pelas células do mieloma, decresceram em mais de 60%, sem que tenham ocorrido efeitos colaterais importantes (Hungria et al., 2004).

Valduga et al., em 2003, avaliaram a associação de etoposide com a LDE, em ratos, quanto à estabilidade físico-química, à toxicidade e a atividade citotóxica contra uma linhagem de células neoplásicas específicas. Demonstraram que a associação é estável, com preservação da atividade citostática do fármaco, além de baixa toxicidade nesses animais.

A estabilidade da associação LDE-etoposide foi também avaliada em mulheres com carcinoma de ovário (Azevedo et al., 2005), mostrando que a maior parte do fármaco se mantém nas partículas da microemulsão até a remoção da circulação e internalização pelas células além de mostrar, também, maior concentração no tecido ovariano neoplásico do que no tecido normal.

PACLITAXEL

Esse composto, isolado pela primeira vez da casca do teixo ocidental em 1971 (Wani et al., 1971), exibe ações farmacológicas peculiares como inibidor da mitose, diferindo dos alcalóides da vinca, visto que promove a formação de microtúbulos, em vez de inibi-la.

O paclitaxel liga-se especificamente à subunidade β -tubulina dos microtúbulos e parece antagonizar a desorganização dessa proteína-chave citoesquelética, o que resulta no aparecimento de feixes de microtúbulos e estruturas aberrantes derivadas de microtúbulos nas células tratadas. Segue-se, então, a interrupção da mitose.

É um quimioterápico com grande espectro de ação anti-tumoral quando usado como monoterapia ou em combinação com outros agentes (Crown e O'leany, 2000). Tem sido extensivamente utilizado no tratamento do carcinoma avançado de mama, ovário, cabeça e pescoço e pulmão. Haveria, ao que parece, efeito dose-resposta (Eisenhauer et al., 1994; Nabholz et al., 1996), com tentativas de se manter doses do fármaco próximas à dose máxima tolerada (Nabholz et al., 1996).

Muitos esquemas de administração do medicamento já foram estudados, cada um demonstrando um perfil de toxicidade ligeiramente

diferente. As infusões curtas, de 1 a 3 horas, têm a neuropatia periférica como fator dose limitante, enquanto as infusões longas ou contínuas produzem maior incidência de neutropenia (Eisenhauer et al., 1994; Smith et al., 1999; Wiernik et al., 1987; Socinski et al., 1998). Outros efeitos colaterais comuns incluem alopecia, mucosites, mialgias e náuseas.

Na preparação para uso clínico (Taxol®; Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), o veículo utilizado para solubilização é o Cremophor-EL (Dorr et al., 1994). Este parece ser o responsável pelas reações importantes de hipersensibilidade nos pacientes, como hipotensão, taquicardia e dispnéia, que geralmente ocorrem durante a sua infusão e atingem 25 a 30% dos pacientes tratados (Weiss et al., 1990; Rowinsky e Donehower, 1995). O Cremophor pode também contribuir para os efeitos tóxicos crônicos do paclitaxel, como a neuropatia periférica (Windebank et al., 1994).

Para minimizar a incidência e a gravidade destas reações, a pré-medicação com os bloqueadores de histamina 1 e 2, assim como com os glicocorticóides (em geral a dexametasona), têm sido empregada (Finley et al., 1994). No entanto, os efeitos colaterais cumulativos da dexametasona podem resultar na descontinuação do tratamento.

Recentemente, a associação LDE-oleato de paclitaxel foi testada em animais em comparação com o fármaco em sua formulação comercial. Os

resultados mostraram ser a associação estável. Experimentos de competição em cultura de células neoplásicas com LDL nativa revelaram que o oleato de paclitaxel e a LDE entram nas células juntos através da via do receptor de LDL. Além disso, a sua tolerabilidade em camundongos foi grande. Outrossim, a eficácia terapêutica da referida associação foi maior do que a do paclitaxel comercial isolado, comprovada pela maior redução do crescimento tumoral, aumento na sobrevida e na taxa de cura dos ratos tratados (Rodrigues et al., 2005).

ASSOCIAÇÃO LDE-OLEATO DE PACLITAXEL

Pesquisas preliminares mostraram que, após a injeção de LDE na corrente sangüínea de mulheres com de câncer de mama, a LDE encontra-se mais concentrada no tecido neoplásico da mama do que no tecido normal. Mais recentemente, estudos pré-clínicos revelaram que a preparação LDE-oleato de paclitaxel é estável, com toxicidade diminuída e atividade terapêutica aumentada em comparação ao paclitaxel isolado em camundongos.

À vista desses resultados, é necessária a realização de estudos cinéticos em pacientes, a fim de verificar se ocorre a dissociação do

complexo LDE-oleato de paclitaxel na circulação, se a cinética plasmática é semelhante para os dois componentes e se os parâmetros farmacocinéticos do fármaco se alteram, em relação ao uso do fármaco em sua formulação comercial.

É preciso ainda verificar se a associação do paclitaxel à LDE modifica a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas com aumento dos receptores em comparação ao respectivo tecido normal e também, se a LDE tem a propriedade de concentrar o fármaco no tumor.

2 - OBJETIVOS

- 1) Avaliar a captação tumoral da associação LDE-oleato de paclitaxel em pacientes com carcinoma da mama;
- 2) Determinar a estabilidade da associação LDE-oleato de paclitaxel na circulação plasmática;
- 3) Comparar os parâmetros farmacocinéticos do paclitaxel associado à LDE com os do fármaco isolado.

3 - MÉTODOS

3.1 - Casuística

Cinco pacientes voluntárias, portadoras de carcinoma de mama e com indicação de procedimento cirúrgico, foram selecionadas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (Anexo 1).

Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento pós-informado (Anexo 2).

O presente estudo foi previamente aprovado pela 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.

3.1.1 - Critérios de Inclusão

- 1) Pacientes portadoras de carcinoma da mama invasivo, diagnosticado por biópsia ou citologia.

- 2) Performance Status 0, 1 ou 2 pelo ECOG.
- 3) Idade $\geq$ 18 anos.
- 4) Sexo feminino.
- 5) Assinatura do termo de consentimento pós-informado.
- 6) Pacientes em idade fértil utilizando método contraceptivo, não hormonal, aprovado.

3.1.2 - Critérios de Exclusão

- 1) Pacientes com metástase cerebral.
- 2) Pacientes com arritmia cardíaca grau 2 ou maior.
- 3) Pacientes com neoplasia maligna invasiva prévia (exceto carcinomas espinocelular ou basocelular de pele) ou infecções ativas.
- 4) Pacientes em idade fértil que não praticam métodos de contracepção efetivos.
- 5) Grávidas.
- 6) Pacientes em fase de aleitamento materno.

3.2 - Características das pacientes

A Idade das pacientes, o diagnóstico anatomopatológico e o estadiamento estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Idade das pacientes, exame anatomopatológico e estadiamento patológico das pacientes estudadas

Paciente	Idade	Exame Anatomopatológico	Estadiamento
1	56	Carcinoma Ductal Invasivo da mama G2	pT2pN0
2	62	Carcinoma Ductal Invasivo da mama G1	pT4bpN1a
3	67	Carcinoma Ductal Invasivo da mama G3	pT2pN1a
4	58	Carcinoma Ductal Invasivo da mama G2	pT2pN0
5	58	Carcinoma Invasivo da mama G3	pT4bpNx

3.3 - Metodologia

Todas as pacientes foram admitidas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do HCFMUSP. Na véspera da cirurgia, foram coletadas amostras de sangue para a determinação do perfil lipídico.

Vinte e quatro horas antes do procedimento cirúrgico, três pacientes

receberam paclitaxel oleato associado à LDE e outras duas paclitaxel em sua formulação comercial, marcados radioativamente, por via intravenosa.

Após a aplicação, também foram colhidas amostras de sangue, em intervalos pré-determinados, para determinação da curva de decaimento plasmático da emulsão, do paclitaxel oleato e do paclitaxel comercial, durante 24 horas.

Por ocasião do ato cirúrgico, nas pacientes que receberam a emulsão, foram coletadas amostras de tecido mamário neoplásico e de tecido mamário normal.

3.3.1 - Determinações bioquímicas séricas

Antes da administração da associação LDE-oleato de paclitaxel ou do paclitaxel isolado, foram realizadas as seguintes determinações bioquímicas: colesterol total (CT) e frações (VLDL, LDL e HDL) e triglicérides (TG), em amostras de soro obtidas após 12-14 horas de jejum. Os triglicérides e o colesterol foram determinados pelo método colorimétrico-enzimático, utilizando-se, respectivamente, os kits comerciais GPO/PAP e CHOD/PAP, ambos da Roche (Basiléia, Suíça). O nível de HDL foi medido pelo mesmo método, após precipitação da LDL e VLDL com ácido fosfotungstico e íons

de magnésio. A concentração de VLDL foi calculada pela relação $VLDL = TG/5$; a de LDL foi calculada pela aplicação da fórmula de Friedewald et al (1972): $LDL = \text{Colesterol Total} - (VLDL + HDL)$.

Os valores de colesterol total e suas frações e de triglicérides estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Perfil lipídico das pacientes estudadas

Paciente (nº)	Perfil lipídico (mg/dl)				
	Triglicérides	Col Total	HDL	LDL	VLDL
1	244	245	44	152	49
2	163	171	43	95	33
3	289	209	47	104	58
4	74	153	44	94	15
5	178	187	58	93	36

Valores de referência

(mulheres > 18 anos) Triglicérides < 200

Col Total < 200

HDL > 40

LDL < 130

VLDL < 40

Triglicérides

Colesterol total

HDL = Lipoproteína de Alta Densidade

LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

VLDL = Lipoproteína de muito Baixa Densidade

3.3.2 - Preparo da associação LDE-oleato de paclitaxel

3.3.2.1 - Preparação da microemulsão LDE marcada com [¹⁴C]-oleato de colesterol

A microemulsão LDE foi preparada a partir da mistura de 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, dissolvidos em clorofórmio/etanol (2:1 v/v). Os lípides puros trioleína (TG), oleato de colesterol (CO), colesterol (CL) e fosfatidilcolina (FL) utilizados na produção das emulsões a partir de soluções-estoque, foram adquiridos da Nu-Check Prep (Elisian, EUA). A fosfatidilcolina foi obtida da Lipid Products (Surrey, Inglaterra).

Os lípides foram pipetados em frasco de vidro, onde se adicionaram 740 kBq do isótopo [¹⁴C]- oleato de colesterol. A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37 °C) e mantida em dessecador a vácuo, por 16 h, a 4 °C, para a remoção total dos solventes residuais. Adicionaram-se 10 ml de solução tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0. A suspensão de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55 °C. A

irradiação ultrassônica foi realizada a 125 watts de potência, em modo contínuo de operação por um disruptor de Branson, modelo B 450 (Arruda Ultrassom, São Paulo, SP), equipado com ponta de titânio com 1 cm de diâmetro.

As emulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrifuga Sorvall, modelo OTD Comb, Wilmington) durante 30 min., a 35.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante da solução (1,0 ml), contendo partículas que flutam em densidade de 1,006 g/ml, foi retirado e descartado. O volume restante foi submetido a nova ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 2 h, a 4 °C, após adição de brometo de potássio sólido para ajustar a densidade em 1,21 g/ml. Do sobrenadante foram removidos 2,0 ml, os quais contêm a fração das partículas de tamanho e composição desejados.

A microemulsão purificada foi dialisada, utilizando-se 4,0 ml 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. a 4 °C, para a total remoção do brometo de potássio utilizado na etapa final de purificação. A microemulsão obtida foi esterilizada por filtração utilizando filtros com poros de 0,2 µ de diâmetro (Maranhão et al., 1993).

Todo o procedimento de preparo das emulsões foi efetuado em

câmara de fluxo laminar vertical, para evitar a contaminação por microorganismos. Essas emulsões foram submetidas a testes de esterilidade na Seção de Bacteriologia do Laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e de pirogenicidade “in vivo” no Instituto de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo.

3.3.2.2 - Síntese do Oleato de Paclitaxel

O oleato de paclitaxel foi sintetizado em duas etapas a partir de uma adaptação do método de Lundberg (1994):

a) Preparação do cloreto de oleíla

Foram dissolvidos 378 mg (1,34 mmol) de ácido oléico em diclorometano, aos quais adicionaram-se 35 µL (4,02 mmol) de cloreto de oxalila dissolvido em diclorometano, sob atmosfera de nitrogênio. Secou-se o solvente e o produto foi imediatamente utilizado.

b) Reação entre cloreto de oleíla e paclitaxel

O cloreto de oleíla então preparado foi dissolvido em 10 mL de acetonitrila anidra e, à temperatura ambiente, adicionou-se rapidamente sobre esta solução uma mistura de 1 g (1,11 mmol) de paclitaxel e 32 µL (3,17 mmol) de trietilamina dissolvidos em 50 mL de acetonitrila anidra. O [³H]-Paclitaxel foi adquirido da Moravek Radiochemicals (Brea, CA).

Em seguida, deixou-se a mistura sob agitação por 45 minutos. Lavou-se a fase orgânica com solução de HCl 0,5N, depois com água e, por último, com uma solução de cloreto de sódio. O produto foi seco com sulfato de magnésio e filtrado. O solvente foi removido em rotaevaporador. Obteve-se assim um sólido ligeiramente amarelado, ao qual adicionou-se lentamente uma mistura de 1:10 de diclorometano/hexano sob agitação. Obteve-se então um precipitado branco, que foi filtrado e lavado com hexano anidro e seco a vácuo. O paclitaxel modificado foi denominado de oleato de paclitaxel.

3.3.2.3 - Incorporação de oleato de paclitaxel à LDE

Solução contendo 1,8 mL de LDE marcada radioativamente com [^{14}C]- oleato de colesterol foi adicionada a 0,2 mL de solução de [^3H]-oleato de paclitaxel em etanol. A incorporação foi realizada por sonicação por 30 minutos com temperatura variando entre 50 e 55 °C em banho de água. As preparações foram feitas no mesmo dia dos respectivos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 μm .

3.3.3 - Determinação da cinética plasmática da associação LDE-oleato de paclitaxel e do paclitaxel em sua formulação comercial

Os estudos do comportamento cinético da associação LDE- oleato de paclitaxel e do paclitaxel em sua formulação comercial foram efetuados em tempos pré- determinados durante as 24 h do protocolo de pesquisa.

Antes do procedimento, foram puncionadas duas veias, de membros superiores diferentes, com catéter “butterfly”. Foram injetados 2,0 mL de [^3H]- oleato de paclitaxel associado à [^{14}C]-LDE ou [^3H]- paclitaxel nas pacientes, com a finalidade de estudar a remoção plasmática do componente lipídico oleato de colesterol e do oleato de paclitaxel, como também do paclitaxel comercial.

Após a injeção, amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em tubos de ensaio contendo heparina (50 UI/mL de sangue) nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm, e a radioatividade presente em alíquotas de 1,0 mL de plasma em cada um dos tempos de coleta foi medida utilizando-se 7 mL de solução cintiladora (PPO:dimethyl-POPOP:Triton X-100:tolueno, 5 g:0,5 g:333 mL:667 mL) em contador Beta (Liquid Scintillation Analyser, 1600^{TR} Tri-Carb, PACKARD), sob utilização do software Plus Versão 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de ¹⁴C e ³H das amostras.

Foram traçadas curvas de remoção plasmática dos componentes radioativos e calculadas as taxas fracionais de remoção (TFR) dos mesmos, com a utilização de um programa desenvolvido para análise de cinética (Mesquita,1994).

3.3.4 - Obtenção dos fragmentos da mama

As três pacientes que receberam a emulsão foram submetidas a mastectomia e foram retirados fragmentos de aproximadamente 1 cm³ de tecido mamário neoplásico, evitando-se a periferia do tumor, em decorrência

do processo inflamatório local que pode ocorrer ou áreas de necrose tumoral, e também de tecido mamário normal. Os materiais foram acondicionados em tubos de ensaio estéreis, com solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9 %).

As cirurgias foram realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3.5 - Extração de lípides – Captação tecidual da associação LDE-oleato de paclitaxel

Os fragmentos obtidos durante os procedimentos cirúrgicos foram colocados imediatamente em um recipiente com solução fisiológica gelada, até a chegada ao Laboratório de Lípides - InCor, onde foi realizado o procedimento de extração de lípides pelo método de Folch (Folch et al., 1957).

Os fragmentos foram macerados e transferidos para tubos grandes (20x160), onde foram adicionados 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio e deixados em repouso “*overnight*” a 4 °C. As amostras foram filtradas; lavadas com 2,5 mL de clorofórmio (2x) e foram adicionados 7 mL de água bidestilada. A fase sobrenadante foi aspirada à vácuo e então descartada.

Adicionaram-se 4 mL de “Clear Folch” (CHCl_3 / MEOH/ H_2O , na proporção de 3:48:47); a mistura foi deixada mais uma vez em repouso “overnight” à temperatura ambiente e novamente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio (N_2), dissolvidas em solução de FOLCH e transferidas para tubos menores, lavando-se várias vezes, agitando-se bem o tubo de extração e mais uma vez seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 500 μL de solução de FOLCH em gelo. Os componentes marcados da associação LDE-oleato de paclitaxel foram separados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de silicagel 60H (Sigma S-6628), onde foram aplicados 100 μL de amostra. A solução hexano/éter etílico/ácido acético, na proporção 70:30:1, foi utilizada como fase móvel. As placas foram reveladas com iodo sublimado, demonstrando as áreas das bandas referentes à fração lipídica e ao oleato de paclitaxel. As faixas correspondentes às bandas de interesse foram removidas para frascos de cintilação e adicionados 7 mL de solução cintiladora para análise.

3.3.6 - Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel e do paclitaxel em sua formulação comercial

Os parâmetros farmacocinéticos do fármaco associado à LDE e da sua formulação comercial foram calculados usando um modelo multicompartimental por meio de um software de computador (PK Solutions, Ashland, OH). O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado utilizando-se uma equação bi-exponencial obtida a partir do log da concentração plasmática em função do tempo. A área sob a curva (AUC) total foi determinada usando o método linear do trapezóide com extrapolação ao infinito. O clearance total (Cl) no plasma foi obtido dividindo-se a dose pela AUC. O volume da distribuição (V_{ss}) foi estimado graficamente pelas medidas trapezoidais da área total.

3.3.7 - Análise estatística

Utilizou-se o teste de Mann-Whitney foi utilizado para análise dos dados da taxa fracional de remoção. Todos os valores foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão. Em todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 - RESULTADOS

4.1 - Cinética plasmática da associação LDE-oleato de paclitaxel

A Figura 1 mostra a cinética de remoção plasmática do [^3H]- oleato de paclitaxel associado ao [^{14}C]- oleato de colesterol-LDE de três pacientes. (Figuras 1a, 1b e 1c). Em todas, ambos os componentes marcados apresentaram comportamento cinético semelhante.

Figura 1a: Decaimento plasmático de [^3H]-oleato de paclitaxel (■) associado ao [^{14}C]-oleato de colesterol-LDE (●), injetados por via intravenosa, na paciente 1. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

Figura 1b: Decaimento plasmático de [^3H]-oleato de paclitaxel (■) associado ao [^{14}C]-oleato de colesterol-LDE (●), injetados por via intravenosa, na paciente 2. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

Figura 1c: Decaimento plasmático de [³H]-oleato de paclitaxel (■) associado ao [¹⁴C]-oleato de colesterol-LDE (●), injetados por via intravenosa, na paciente 3. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

A Figura 2 mostra a cinética de remoção plasmática do [³H]- oleato de paclitaxel associado ao [¹⁴C]- oleato de colesterol-LDE das três pacientes estudadas. A partir dela foi calculada a taxa fracional de remoção da LDE ($0,0296 \pm 0,0264$) e do oleato de paclitaxel ($0,0182 \pm 0,0186$). Não houve diferença significativa entre elas ($p = 0,5742$). Isso demonstra haver uma cinética semelhante entre ambos os componentes, o que indica que o

fármaco foi removido juntamente com a microemulsão da circulação.

Figura 2: Decaimento plasmático de [^3H]-oleato de paclitaxel (■) associado ao [^{14}C]-oleato de colesterol-LDE (●), injetados por via intravenosa. Amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3 pacientes).

4.2 - Cinética plasmática do paclitaxel comercial

A Figura 3 mostra a cinética de remoção plasmática do [^3H]-paclitaxel das pacientes que receberam apenas a formulação comercial (Fig 3a e 3b). Nas duas, a cinética de remoção plasmática foi similar; observa-se que 2 horas após a injeção intravenosa de paclitaxel, menos de 40% do fármaco encontrava-se na circulação e, no final de 24 horas, menos de 10%.

Figura 3a: Decaimento plasmático de [^3H]-paclitaxel (●), injetado por via intravenosa, na paciente 4. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

Figura 3b: Decaimento plasmático de $[^3\text{H}]$ -paclitaxel (●), injetado por via intravenosa, na paciente 5. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

Na Figura 4 faz-se a comparação entre o decaimento plasmático de $[^3\text{H}]$ -oleato de paclitaxel associado ao $[^{14}\text{C}]$ -oleato de colesterol-LDE e do $[^3\text{H}]$ -paclitaxel em sua formulação comercial. São mostradas as curvas das cinco pacientes. Observa-se que as formulações apresentam comportamento diferente no que se refere à velocidade de remoção plasmática. Nas duas pacientes onde foi administrada apenas a formulação comercial, nota-se que a velocidade de remoção foi maior do que com a

associação, permanecendo, portanto, menos tempo na circulação. Verifica-se também que, ao final de 24 horas, a quantidade do fármaco comercial que ainda permanece na circulação é muito pequena, enquanto na associação com LDE, ao redor de 50% do fármaco ainda pode ser determinado na circulação.

Figura 4: Decaimento plasmático de [^3H]-oleato de paclitaxel (♦▲■) associado ao [^{14}C]-oleato de colesterol-LDE nas três pacientes e do paclitaxel em sua formulação comercial (X*) em duas pacientes. Amostras de 5 ml de sangue foram coletadas, centrifugadas e a radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

4.3 - Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel e do paclitaxel comercial

Os parâmetros farmacocinéticos, tempo de meia vida ($t_{1/2}$), “clearance” plasmático (Cl), área sob a curva (AUC) e volume de distribuição (Vss) estão representados nas Tabelas 3 e 4.

Nota-se que o oleato de paclitaxel associado à microemulsão modificou os parâmetros farmacocinéticos, comparativamente à sua formulação comercial. A associação do fármaco aumentou o tempo de meia vida ($18,97 \pm 7,7$ horas e $7,34 \pm 0,40$ horas) e diminuiu sua depuração plasmática ($1,51 \pm 0,18$ (L/h) e $7,95 \pm 4,32$ (L/h)), indicando haver maior tempo da associação na circulação plasmática.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel

Paciente (nº)	T _{1/2} (h)	AUC mg/h/L	Vss (L)	CL (L/h)
1	11,26	1,53	22,51	1,38
2	19,00	1,20	47,60	1,73
3	26,67	1,45	55,18	1,43
Média ± desvio padrão	18,97 ± 7,70	1,39 ± 0,17	41,76 ± 17,09	1,51 ± 0,18

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos do paclitaxel comercial

Paciente (nº)	T _{1/2} (h)	AUC mg/h/L	Vss (L)	CL (L/h)
4	7,63	2,45	53,94	4,89
5	7,06	1,09	112,24	11,01
Média ± desvio padrão	7,34 ± 0,40	1,77 ± 0,96	83,09 ± 41,22	7,95 ± 4,32

4.4 - Extração de lípides – Captação tecidual da associação LDE-oleato de paclitaxel

A Tabela 5 mostra os resultados da quantificação da captação radioativa (em contagens por minuto / grama) da LDE e do oleato de paclitaxel nos tecidos normal e tumoral mamário. A Tabela 6 ilustra a razão entre a captação tecidual da LDE e do fármaco entre ambos os tecidos. Essa razão foi calculada usando-se a seguinte equação:

$$\frac{\text{radioatividade por grama de tecido tumoral}}{\text{radioatividade por grama de tecido mamário normal}}$$

Os resultados mostram que tanto a LDE como o fármaco concentraram-se 2,5 a 3 vezes mais no tecido tumoral do que no tecido mamário normal.

Tabela 5: Resultado em cpm/grama da captação tecidual de [^3H]- oleato de paclitaxel e [^{14}C]-LDE administrado nas pacientes.

Paciente (nº)	Tecido Tumoral		Tecido Normal	
	[^{14}C] – LDE	[^3H]- oleato de paclitaxel	[^{14}C] – LDE	[^3H]-oleato de paclitaxel
1	1202	2919	575	1271
2	255	154	149	65
3	583	328	146	70
Média $\pm$ Padrão	680 $\pm$ 480,89	1133,66 $\pm$ 1548,59	290 $\pm$ 246,82	468,66 $\pm$ 694,84

Tabela 6: Razão da captação de [^3H]- oleato de paclitaxel e [^{14}C]-LDE em tecido tumoral mamário.

Paciente (nº)	Tecido Tumoral/Normal	
	[^{14}C] – LDE	[^3H]- oleato de paclitaxel
1	2,09	2,29
2	1,71	2,36
3	3,99	4,67
Média $\pm$ Desvio padrão	2,59 $\pm$ 1,22	3,10 $\pm$ 1,35

5 - DISCUSSÃO

No tratamento quimioterápico das neoplasias malignas, maior atenção tem sido dada no desenvolvimento de sistemas de carreamento de fármacos para aplicação sistêmica com o objetivo de aumentar a seletividade dos agentes, com conseqüente aumento da concentração nos sítios de doença e diminuição da toxicidade.

O paclitaxel é um dos mais efetivos quimioterápicos antineoplásicos. Em neoplasias malignas da mama, tem indicação como tratamento adjuvante de primeira linha nas pacientes com linfonodos positivos seqüencialmente ao tratamento com antraciclinas, bem como no de doença metastática associado à antraciclina ou após a falha da mesma. É relativamente insolúvel em água, necessitando de um veículo para sua solubilização, como o Cremophor-EL. Nos últimos 10 anos tornou-se um dos agentes mais utilizados em decorrência do seu mecanismo de ação único. Entretanto, em virtude do mecanismo de resistência e da ocorrência de toxicidade, principalmente a neuropatia periférica, seu uso fica limitado.

O veículo de solubilização do paclitaxel, o cremophor-EL, influencia na toxicidade, na farmacocinética e na atividade antitumoral do fármaco (Schuurhuis et al., 1990; Sparreboom et al., 1996; Sparreboom et al., 1999;

Gelderblom et al., 2001). Do mesmo modo, o cremophor-EL, por si só, está relacionado à neuropatia periférica, um dos efeitos colaterais mais importantes do paclitaxel (Weiss et al., 1990; Rowinsky et al., 1993).

Daí o interesse no desenvolvimento de sistemas de carreamento de fármacos que podem melhorar o seu índice terapêutico, aumentando sua atividade, diminuindo toxicidade e alterando suas propriedades farmacológicas.

As evidências de que as células neoplásicas apresentam aumento de receptores de LDL (Ho et al., 1978) fizeram com que vários autores investigassem a possibilidade de utilizar a LDL como veículo de quimioterápicos, aumentando a seletividade de fármacos antineoplásicos na terapia do câncer (Masquelier et al., 1986; Lundberg, 1987; Vitols et al., 1992; Masquelier et al., 2000). Entretanto, a dificuldade de obtenção da LDL, principalmente pela necessidade de isolamento do soro humano e a dificuldade para manipulação e armazenamento da mesma, dificultou o seu desenvolvimento.

A utilização de emulsões artificiais que se comportam “in vivo” como a LDL natural representou uma das alternativas propostas por alguns autores (Ginsburg et al., 1982; Halbert et al., 1984; Owens et al., 1995).

A investigação do uso da microemulsão LDE como direcionador de

agentes antineoplásicos foi proposta, inicialmente, após a confirmação de que a mesma se concentrava preferencialmente em tecidos neoplásicos (Maranhão et al., 1994), após ser injetada na circulação de pacientes. Os resultados mostraram que a microemulsão é reconhecida pelos receptores celulares da LDL e por eles removidos para o interior da célula (Redgrave e Maranhão, 1985; Maranhão et al., 1993 e 1997).

Graziani (1995) estudou 18 pacientes portadoras de carcinoma de mama avançado, onde a LDE marcada com Tecnécio 99 foi administrada por via intravenosa. Verificou haver hipercaptação do traçador radioativo nas áreas do tumor primário e nas metástases. Esses achados confirmaram que o tumor maligno da mama tem maior capacidade de captar a emulsão LDE do que os demais tecidos do organismo humano.

Igreja (2000) analisou 14 mulheres, todas portadoras de neoplasia maligna da mama, que tinham indicação de tratamento cirúrgico. Demonstrou que, após a injeção intravenosa de LDE marcada radioativamente 24 horas antes do procedimento cirúrgico e submetidas à contagem de radioatividade, a captação achava-se aumentada de 4 a 5 vezes no tecido tumoral em comparação com o tecido normal.

Maranhão (2002) observou que a incorporação à LDE de um quimioterápico, a carmustina, não alterou o direcionamento da LDE para os

seus sítios de ligação específicos e que a carmustina não perdeu sua ação citotóxica.

Azevedo (2005) avaliou pacientes com neoplasia maligna de ovário que seriam submetidas à cirurgia. Nelas foi injetada, por via intravenosa, a associação de LDE com um fármaco, no caso o etoposide, ambos marcados radioativamente, 24 horas antes da cirurgia. Demonstrou que a maior parte do fármaco ficava retida na microemulsão até a sua remoção da circulação, sendo, portanto, uma associação estável. Registrou também maior concentração da associação no tecido ovariano neoplásico do que no tecido ovariano normal.

Entretanto, quando o paclitaxel era associado à LDE e incubada com o plasma, cerca de 40% do fármaco se dissociava da microemulsão após curto período (Maranhão, dados não publicados).

A estratégia então utilizada para se aumentar a estabilidade do sistema foi o acoplamento do fármaco ao ácido oléico (Rodrigues et al, 2005). Tal fato não interferiu no seu mecanismo de ação, o que foi demonstrado pela comparação da citotoxicidade com o fármaco comercialmente disponível em cultura de células tumorais NCI-H292.

Tanto a toxicidade aguda quanto a crônica da associação LDE-oleato de paclitaxel e do fármaco em sua formulação comercial foram determinadas

em camundongos. Observou-se redução significativa na dose letal 50 para a associação, em parte provavelmente pela retirada do Cremophor da formulação ou pela nova biodistribuição do fármaco.

A atividade antitumoral da formulação foi avaliada comparativamente com a apresentação comercial em experimentos de modulação do crescimento tumoral, mostrando que a associação LDE-oleato de paclitaxel foi mais efetiva em retardar o crescimento tumoral (Rodrigues et al., 2005).

Com o intuito de averiguar se a associação do oleato de paclitaxel à LDE modificaria a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas, nosso trabalho analisou a captação de ambos os componentes da associação nos tecidos normal e neoplásico. Observou-se pela análise dos resultados que após a administração intravenosa da associação, em todas as pacientes, a concentração tanto da LDE quanto do oleato de paclitaxel foi maior no tecido neoplásico do que no tecido mamário normal. Esses resultados indicam que a associação do fármaco à partícula não alterou a sua propriedade de se concentrar nas células neoplásicas.

Outro importante pré-requisito para se alcançar um sistema de carregamento efetivo é que o complexo fármaco-carreador seja estável na circulação.

Previamente foi demonstrado que após a associação LDE-oleato de

paclitaxel ter sido injetada na circulação de camundongos portadores de tumores de melanoma B16, a maior parte do oleato de paclitaxel permaneceu de modo estável associado à LDE.

Para se verificar se ocorre a dissociação do oleato de paclitaxel da partícula de LDE e se a cinética plasmática dos dois componentes era semelhante, realizou-se análise comparativa entre as taxas fracionais de remoção da microemulsão e do fármaco marcados radioativamente. Os resultados revelaram que não houve diferença entre as taxas, mostrando que existe semelhança entre a cinética de ambos os componentes e, portanto, provável acompanhamento do fármaco à microemulsão.

Outro aspecto importante de nosso estudo foi demonstrar se a associação do paclitaxel à LDE resultaria numa alteração dos parâmetros farmacocinéticos do fármaco quando comparado à sua formulação isolada.

A compreensão da cinética do ciclo celular é essencial para o uso apropriado da geração atual de antineoplásicos. O paclitaxel bloqueia a formação do fuso mitótico na fase M, sendo ativo apenas contra células que se encontram em processo de divisão. A destruição da célula depende tanto das concentrações do fármaco quanto da duração da exposição da célula (Goodman, Gilman, 2003).

Wilson et al., em 1994 relataram taxas de respostas mais

significativas em pacientes com câncer de mama com infusões de maior duração (96 horas).

Em 1999, Smith et al., comparando pacientes com neoplasia maligna de mama tratadas com paclitaxel em infusão de 3 horas ou de 24 horas, mostraram índices de resposta maior com a infusão mais prolongada (54% x 44%), porém sem diferença em termos de sobrevida.

De modo contrário, Winer et al. observaram que o aumento da dose de paclitaxel (175mg/m² até 250mg/m²) não resultou em aumento nas taxas de resposta ou de sobrevida.

A análise dos parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel associado à microemulsão, comparados com o da formulação comercial, demonstrou que a associação do fármaco aumentou o seu tempo de meia vida em 2,5 vezes e diminuiu a depuração plasmática. Esses dados sugerem que, na mesma dosagem, a associação do paclitaxel à LDE se mantém na circulação por um período de tempo mais prolongando.

Assim, com a possibilidade do fármaco ficar mais tempo na circulação, aumentando o tempo de exposição às células neoplásicas, é possível ocorrer maior destruição dessas células.

Devido à associação LDE-oleato de paclitaxel ser menos tóxica do que a formulação comercial e por ter a habilidade de se concentrar mais nos

sítios neoplásicos, o presente estudo constitui uma promissora estratégia para o tratamento dos tumores malignos da mama.

6 - CONCLUSÕES

- 1) A associação LDE-oleato de paclitaxel concentrou-se, em média, três vezes mais no tecido neoplásico mamário do que no tecido normal.
- 2) A associação LDE-oleato de paclitaxel mostrou-se estável na circulação plasmática.
- 3) A associação de paclitaxel à LDE mantém-se por mais tempo na circulação plasmática quando comparada com a formulação isolada.

7 – ANEXOS

ANEXO 1

Paciente (nº)	Iniciais	Registro
1	MVA	2776557-H
2	IPC	13604450-D
3	CPP	13617697-K
4	MTPG	77070547-F
5	MAS	13658188-D

ANEXO 2

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

(Obrigatório Para Pesquisas em Seres Humanos – Resolução nº 1 de 13/06/1998 – CNS)

I-Identificação do Paciente

Nome: _____
RGHC _____ Data _____
Nascimento: ____/____/____
Endereço _____
Bairro _____
Cidade _____ Estado _____
CEP _____ Telefone _____

II-Responsável **Grau de parentesco:** _____
Nome: _____
RG _____ Data _____
Nascimento: ____/____/____
Endereço _____
Bairro _____
Cidade _____ Estado _____
CEP _____ Telefone _____

III -Dados Sobre o Protocolo de Pesquisa Científica

- 1- Título do Protocolo: **Uso de uma emulsão lipídica que se liga aos receptores da LDL como veículo do paclitaxel na terapia sistêmica do carcinoma de mama metastático.**
- 2- Unidade do HCFMUSP: Clínica de Ginecologia e Laboratório de Pesquisa do Instituto do Coração da FMUSP
- 3- Pesquisador:
Prof. Associado Roberto Hegg
Cargo: Prof. Associado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo: 21824
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Cargo: Diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípides do INCOR-HCFMUSP Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo: 20122
- 4- Avaliação do Risco da Pesquisa: Risco baixo

III- Objetivos da Pesquisa

O objetivo da pesquisa é utilizar um tipo de “colesterol” que normalmente existe no nosso organismo, só que este é fabricado no laboratório: para levar um tipo de droga: “Paclitaxel” direto contra o tumor (no caso contra o câncer de mama) fazendo com que ele vá o mínimo possível aos demais órgãos do corpo humano.

O objetivo deste estudo é avaliar o comportamento dessa emulsão de colesterol na circulação sanguínea e sua captação em tecidos tumorais e não tumorais.

Não há viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Prof. Dr. Raul C. Maranhão – (11) 30695108 / 30695574

Declaro que após ter sido convenientemente esclarecida pelo pesquisador, conforme registro nos itens acima, consinto em participar, na qualidade de paciente, do projeto de pesquisa referido acima.

61

8 – REFERÊNCIAS *

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a protein free lipid emulsion by normal and neoplastic ovarian tissue. *Gynecol Oncol*. 2001;82:84-7.

American Cancer Society. Cancer facts and figures 1998 [online] Available from: http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_1998.asp?sitearea=STT&level=1 [apr 2006]

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;97:178-82.

Barklay M, Escher GC, Kaufman RJ, Kidder ED, Petrmann ML. Human plasma lipoproteins in normal women and in women advanced carcinoma of breast. *Cancer*. 1995;8:253-60.

Bases RE, Krakoff IH. Studies of serum cholesterol levels in leukemia. *J Reticuloendothel Soc*. 1965;85:8-14.

Brasil. Ministério da Saúde. Estimativas de câncer do INCA. Brasília: Instituto Nacional de Câncer; 2006

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

- Budd D, Ginsberg H. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Cancer*. 1986;58:1361-5.
- Crown J, O'Leary M. The taxanes: an update. *Lancet*. 2000;355:1176-8.
- Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. 1993;34:1637-59.
- Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann. Pharmacother*. 1994;28:S11-S4.
- Eisenhauer EA, Ten Bokkel HWW, Swenerton KD, Gianni L, Myles J, Van Der Burg MEL, Kerr I, Vermorken JB, Buser K, Colombo N, Bacon M, Santabarbara P, Onetto N, Winograd B, Canetta R. European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. *J Clin Oncol*. 1994;12:2654-66.
- Filipowska D, Filipowski T, Morelowska B, Kazanowska W, Laudanski T, Lapinjoki S, Akerlund M, Breeze A. Treatment of cancer patients with a low-density-lipoprotein delivery vehicle containing a cytotoxic drug. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;29:396-400.
- Finley RS, Rowinsky EK. Patient care issues: the management of paclitaxel-related toxicities. *Ann Pharmacother*. 1994;28:S27-S30.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.

- Friedewald WT, Levy RI, Fredricson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultra centrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
- Gal D, Macdonald PC, Porter JC, Simpson ER. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoprotein metabolism. *Int J Cancer*. 1981;28:315-9.
- Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*. 2001;37:1590-8.
- Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions os phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1982;57:8216-27.
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 1979;279:679-85.
- Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, Interamericana Editores; 2003.
- Graziani SR. *Captação de uma microemulsão lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelo carcinoma de mama*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1995.
- 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;85:493-7.
- Halbert GW, Stuart JFB, Florence AT. The incorporation of lipide-soluble

antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. *Int J Pharmacol.* 1984;21:219-32.

Henriksson P, Ericsson S, Stege R, Ericsson M, Rudling M, Berglund L, Angelin B. Hypocholesterolaemia and increased elimination of low-density lipoproteins in metastatic cancer of the prostate. *Lancet.* 1989;2:1178-80.

Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1437:53.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 1978;52:1099-104.

Hungria VT, Chiattoni CS, Barros JC, Latrilha MC, Pileggi F, Chamone DAF, Maranhão RC. Plasma lipids and apolipoproteins in multiple myeloma patients. *Blood.* 1995;86:836.

Hungria VT, Latrilha MC, Rodrigues DG, Bydlowski SP, Chiattoni CS, Maranhão RC. Metabolism of cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53:51-60.

Igreja FAF. *Estudo da captação tumoral de uma emulsão lipídica em pacientes portadoras de carcinoma da mama.* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Iribarren C, Reed DM, Chen R, Yano K, Dwyer JH. Low serum cholesterol

and mortality. Which is the cause and which is the effect? *Circulation*.1995;92:2396-405.

Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev*. 1976;56:259-316.

Kaplan RM, Wingard DL. Trends in breast cancer incidence, survival, and mortality. *Lancet*. 2000;356:592-3.

Lundberg B. Preparation of drug- low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res*. 1987;47:4105-8.

Lundberg BB. Preparation of drug-carrier emulsions stabilized with phosphatidylcholine-surfactant mixture. *J Pharm Sci*. 1994;83:72-5.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Pileggi FJC, Chamone DAF. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Res*. 1992;25:1003-7.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso MTB, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. *Lipids*. 1993;28:691-6.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, 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;54:4660-6.

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 receptors. *Lipids*. 1997;32:627-33.

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 Chem Pharmacol*. 2002;49:487-98.

Masquelier M, Vitols S, Peterson C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: *in vivo* fate of drug-human low density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Res*. 1986;46:3842-47.

Masquelier M, Vitols S, Palsson M, Mars U, Larson BS, Peterson CO. Low density lipoprotein as a carrier of cytostatics in cancer chemotherapy: study of stability of drug-carrier complexes in blood. *J Drug Target*. 2000;8:155-64.

Mesquita CH. *Análise compatimental auxiliar*. São Paulo: Institutos de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN); 1994.

Nabholtz JM, Gelmon K, Bontenbal M, Spielmann M, Catimel G, Conte P, Klaassen U, Namer M, Bonnetterre J, Fumoleau P, Winograd B. Multicenter randomized comparative study of two doses of paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14:1858-67.

Niendorf A, Nagele H, Gerding D, Meyer-Pannwitt U, Gebhardt A. Increased LDL receptor mRNA expression in colon cancer is correlated with a rise in plasma cholesterol levels after curative surgery. *Int J Cancer*. 1995;61:461-4.

Nydegger UE, Butler RE. Serum lipoprotein levels in patients with cancer. *Cancer Res.* 1972;32:1756-60.

Owens MD, Baillie G, Halbert GW. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int J Pharm.* 1995;228:109-17.

Pekkanen J, Nissinen A, Vartanen B, Salonen JL, Punsar S, Karnoven MJ. Changes in serum cholesterol levels and mortality, a 30-follow-up, the finish cohorts of seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1999;139:155-65.

Redgrave TG, Maranhao RC. Metabolism of protein -free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochimi Biophys Acta.* 1985;835:104-12.

Rensen PC, Schiffelers RM, Versluis AJ, Bijstbosch MK, Van Kuijk-Meuwessen ME, Van Berkel TJ. Human recombinant apolipoprotein E-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol Pharmacol.* 1997;52:445-55.

Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibanez OCM, 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;55:565-76.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Eng J Med.* 1995;332:1004-14.

Rowinsky EK, Chaudhry V, Cornblath DR, Donehower RC. neurotoxicity of Taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1993;15:107-15.

Rudling MJ, Collins VP, Peterson CO. Delivery of Aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res.* 1983;43:4600-5.

Samadi-Baboli M, Favre G, Canal P, Soula G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. *Br J Cancer.* 1993;68:319-26.

Sant M, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Gatta G, Micheli A, Verdecchia A, Faivre J, Hakulinen T, Coebergh JW, Martinez-Garcia C, Forman D, Zappone A. Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer.* 2001;37:1659-67.

SEER. Cancer Statistics Review, 1973-1998. [online] 1998. Available from: <http://www.seer.cancer.gov/Publications/CSR1973>. [apr 2006]

Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Pinedo HM, Van Heijningen TH, Van Kalken CK, Vermorken JB, Spoelstra EC, Lankelma J. The polyoxyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance. *Br J Cancer.* 1990;62:591-4.

Smith RE, Brown AM, Mamounas EP, Anderson SJ, Lembersky BC, Atkins JH, Shibata HR, Baez L, Defusco PA, Davila E, Tipping SJ, Bearden JD, Thirlwell MP. Randomized trial of 3-hour *versus* 24-hour infusion of high-dose paclitaxel in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-26. *J Clin Oncol.* 1999;17:3403-11.

Socinski MA, Mudd PN, Radomski KM, Steagall A, Lawrence P, Bernard S,

- Letrent SP, Gonzalez P, Brouwer KLR. Phase I trial of a 96 h paclitaxel infusion with filgrastim support in refractory solid tumor patients. *Anticancer Drugs*. 1998;9:611-19.
- Sparreboom A, Van Tellingen O, Nooijen WJ, Beijnen JH. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. *Cancer Res*. 1996;56:2112-5.
- Sparreboom A, Van Zuylen L, Brouwer E, Loos WJ, De Bruijn P, Gelderblom H, Pillay M, Nooter K, Stoter G, Verweij J. Cremophor EL mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res*. 1999;59:1454-7.
- Valdulga 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;55:1615-22.
- Versluis AJ, Van Geel PJ, Oppelaar H, Van Berkel TJC, Bijsterbosch MK. Receptor mediated uptake of low density lipoprotein by b16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br J Cancer*. 1996;74:525-32.
- Vitols S, Peterson C, Larsson O, Holm P, Aberg B. Elevated uptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue in vivo. *Cancer Res*. 1992;52:6244-7.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971;93:2325-7.
- Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL,

Baker JR, Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*. 1990;8:1263-8.

Wiernik PH, Schwartz EL, Einzig A, Strauman JJ, Lipton RB, Dutcher JP. Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1987;5:1232-9.

Wilson WH, Berg SL, Bryant G, Wittes RE, Bates S, Fojo A, Steinberg SM, Goldspiel BR, Herdt J, O'Shaughnessy J. Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase I/II trial of 96-hour infusion. *J Clin Oncol*. 1994;12:1621-9.

Windebank AJ, Blexrud MD, De Groen PC. Potential neurotoxicity of the solvent vehicle for cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268:1051-6.

Winer EP, Berry DA, Woolf S, Duggan D, Kornblith A, Harris LN, Michaelson RA, Kirshner JA, Fleming GF, Perry MC, Graham ML, Sharp SA, Keresztes R, Henderson IC, Hudis C, Muss H, Norton L. Failure of higher-dose paclitaxel to improve outcome in patients with metastatic breast cancer: cancer and leukemia group B trial 9342. *J Clin Oncol*. 2004;22:2061-8.

Winer EP, Morrow M, Osborne CK, Harris J. Malignant tumors of the breast. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 1651-726.

Xiao W, Wang L, Ryan JM, Pater A, Liu H. Incorporation of na(125)I-labeled hexa-iodinated diglyceride analog into low-density lipoprotein and high specific uptake by cells of cervical carcinoma cell lines. *J Drug Target*. 1999;152:250-6.