**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Cinética Plasmática e captação da associação de uma
microemulsão rica em colesterol ao quimioterápico
oleato de etoposídeo em pacientes com câncer de
ovário**

CAROLINA HEITMANN MARES AZEVEDO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

**São Paulo
2004**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Azevedo, Carolina Heitmann Mares
A994c Cinética plasmática e captação da associação de uma
microemulsão rica em colesterol ao quimioterápico oleato
de etoposídeo em pacientes com câncer de ovário / Carolina
Heitmann Mares Azevedo. -- São Paulo, 2004.
59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

I. Lipídio : Bioquímica clínica 2. Agente antineoplástico:
Quimioterapia I. T. II. Maranhão, Raul Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Carolina Heitmann Mares Azevedo

**Cinética Plasmática e captação da associação de uma
microemulsão rica em colesterol ao quimioterápico
oleato de etoposídeo em pacientes com câncer de
ovário**

Comissão Julgadora

Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

Orientador

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

DEDICATÓRIA

A Deus, porque sem Ele nada disto existiria... E se existe, deve ser para compreendermos que todo nosso esforço para com a ciência não pode perder o referencial principal: amor por tudo que fazemos.

Aos meus amados pais, Celestino e Elza, à minha irmã Kika pelos ensinamentos de vida, amor, amizade e acima de tudo respeito, por sempre estarem ao meu lado acreditando em mim apesar da distância.

Ao Flávio, meu grande amor, que me fez acreditar que não existem coincidências na vida e que para tudo existe um tempo, um momento e um período a ser compreendido e vivido.

AGRADECIMENTOS

A todos que me fizeram acreditar nas palavras de Richard Bach em “***Nada é por acaso***”

“Não é o desafio que define quem somos nem o que somos capazes de ser, mas sim como enfrentamos esse desafio; podemos incendiar as ruínas ou construir através delas, passo a passo, um caminho que nos leve à liberdade”

E a entender,

“Que nossa própria identidade só existe na medida em que nos convertemos em objeto da nossa própria reflexão, de nossa visão interna que só nos vemos completamente enquanto espelhados pelo olhar do outro... de Vera Stringuini, em *Amar Amando*”.

- Ao Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão pela perseverança obstinada, oportunidade e apoio na minha formação científica com seu exemplo profissional.
- Ao Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho, meu agradecimento pela oportunidade, aprendizado, agilidade na realização deste estudo, além de se mostrar sempre solícito no decorrer de minhas necessidades.
- À Dra. Sílvia Graziani pela colaboração e incentivo no início desse trabalho.
- À Dra. Claudete Justina Valduga, pela co-orientação, pela importante participação na minha formação profissional e pessoal com seus ensinamentos, pela seriedade com que conduz sua atividade científica, além da valorosa e inestimável amizade e apoio constante.
- À Dra. Débora Garcia Rodrigues, Dra. Denise Carmona Fernandes e Dra. Carmem Vinagre, meu agradecimento e admiração pelo incentivo e críticas no período da realização deste trabalho e, pelo apoio pessoal e amizade.
- Ao Amigo Ricardo Couto, meu agradecimento pela boa vontade e disposição em ajudar-me durante todas as etapas deste estudo.
- Às minhas amigas Janaina Bezerra e Ana Lo Prete pelo companheirismo em todas as etapas desse trabalho, pela amizade e pelo apoio nas horas mais difíceis.
- A toda equipe do Laboratório de Metabolismo de Lípides em especial a Rosângela Amâncio, Renato Barboza, Débora Deus e Mônica.
- Ao Marcos Machado pelo apoio na fase final dessa Dissertação.
- À equipe de enfermagem do Departamento de Ginecologia do HC-FMUSP pelo constante auxílio técnico, em especial a enfermeira Sandra.

Enfim, com respeito e admiração meu agradecimento por todas as pacientes que aceitaram participar deste estudo, pela confiança, pelo carinho particular adquirido e principalmente pelo sacrifício pessoal.

Minha profunda Gratidão.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	1
Metabolismo da LDL.....	5
LDL e câncer.....	7
Microemulsão lipídica artificial (LDE)	10
Etoposídeo.....	14
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	21
4. Casuística, Material e Métodos.....	23
4.1. Casuística.....	24
4.2. Materiais.....	25
4.3. Métodos.....	25
<i>Preparação da microemulsão LDE marcada com ^{14}C-oleato de</i> <i>colesterol.....</i>	25
<i>Associação do $[^3\text{H}]$-oleato de etoposídeo à $[^{14}\text{C}]$-LDE.....</i>	27
<i>Estabilidade da associação $[^{14}\text{C}]$LDE-$[^3\text{H}]$oleato de etoposídeo (ensaíos</i> <i>in vitro)</i>	27
<i>Determinações Bioquímicas Séricas.....</i>	28
<i>Determinação da cinética plasmática da associação $[^{14}\text{C}]$LDE-</i> <i>$[^3\text{H}]$oleato de etoposídeo em pacientes.....</i>	28
<i>Análise da cinética dos componentes marcados radioativamente: $[^{14}\text{C}]$-</i> <i>oleato de colesterol e $[^3\text{H}]$-oleato de etoposídeo.....</i>	29
<i>Procedimento cirúrgico e obtenção dos fragmentos.....</i>	30

<i>Extração de lípides – captação Tecidual de $[^{14}\text{C}]$-LDE x $[^3\text{H}]$ - oleato de etoposídeo.....</i>	30
<i>Análise da farmacocinética do oleato de etoposídeo.....</i>	31
5. Análise estatística.....	32
6. Resultados.....	34
6.1. Estabilidade da associação $[^{14}\text{C}]$ LDE- $[^3\text{H}]$ oleato de etoposídeo.....	35
6.2. Determinações Bioquímicas.....	36
6.3. Cinética plasmática da associação LDE- oleato de etoposídeo em pacientes.....	38
6.4. Captação Tecidual da associação $[^{14}\text{C}]$ LDE- $[^3\text{H}]$ oleato de etoposídeo..	40
6.5. Médias dos Parâmetros Farmacocinéticos do oleato de etoposídeo associado à microemulsão.....	43
7. Discussão.....	44
8. Conclusão.....	51
9. Referências bibliográficas.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo Lipídico

Figura 2: Estrutura da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

Figura 3: Estrutura da Podofilotoxina e seus derivados de uso clínico.

Figura 4: Síntese do oleato de etoposídeo e isomerização da forma *trans* para *cis*-lactona do oleato de etoposídeo.

Figura 5: Diálise da LDE- oleato de etoposídeo.

Figura 6: Decaimento plasmático da microemulsão marcada, [^{14}C]-LDE.

Figura 7: Decaimento plasmático da Microemulsão [^{14}C]-LDE e do [^3H]- oleato de etoposídeo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das pacientes estudadas com Carcinoma de Ovário.

Tabela 2: Concentrações plasmáticas dos lípides e apoproteínas.

Tabela 3: Resultado da captação tecidual da [^{14}C]-LDE.

Tabela 4: Médias descritivas da captação (cpm/g) de ^{14}C -LDE dos ovários das pacientes e comparação entre tumor e ovário normal.

Tabela 5: Resultado em cpm/grama da captação tecidual de [^3H]- oleato de etoposídeo.

Tabela 6: Médias descritivas da captação (cpm/g) de [^3H]- oleato de etoposídeo dos ovários das pacientes e comparação entre tumor e ovário normal.

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos do oleato de etoposídeo associado à LDE.

LISTA DE ABREVIATURAS

APO	Apolipoproteína
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LDL-R	Receptor de LDL ou Receptor B/E
PH	Potencial hidrogeniônico
HMG CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril Co A redutase
ACAT	Acil Co A: colesterol aciltransferase
LMA	Leucemia mielocítica aguda
LMC	Leucemia mielocítica crônica
LDE	Emulsão rica em colesterol
VP 16-213	Etoposídeo
PBS	Tampão Fosfato
c.p.m.	Contagens por minuto
UI	Unidade internacional
TFR	Taxa Fracional de Remoção
IC 50	Índice de citotoxicidade 50 %
CL	Clearance

Vdss	Volume de Distribuição
T1/2	Tempo de meia vida
mSv	Milisievert

RESUMO

C. H. M. Azevedo. **Cinética plasmática e captação da associação de uma microemulsão rica em colesterol ao quimioterápico oleato de etoposídeo em pacientes com câncer de ovário.** São Paulo, 2004. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Previamente foi relatado a associação do oleato de etoposídeo à uma microemulsão rica em colesterol (LDE) que é captada por células malignas que superexpressam receptores da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL). A associação do fármaco é estável, sua atividade antiproliferativa é preservada e há uma redução da toxicidade em animais. Dando continuidade, esse trabalho tem como objetivo investigar a cinética plasmática da associação LDE: oleato de etoposídeo e ainda verificar se a associação do fármaco à LDE modifica a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas com aumento dos receptores, determinando a captação de ambos os componentes nos tecidos acometidos pelo tumor comparado com o tecido equivalente normal. O [^3H]oleato de etoposídeo associado à LDE marcada radioativamente com [^{14}C] oleato de colesterol, foi injetado intravenosamente em 14 pacientes com câncer de ovário ($50,6 \pm 7,5$ anos), 24 horas antes da cirurgia. Amostras de sangue foram coletadas no período de 24 horas para determinar a curva de decaimento plasmático da associação. A radioatividade presente nas alíquotas do plasma foi determinada usando solução cintiladora e a Taxa Fracional de Remoção (TFR) foi calculada através de uma análise compartimental. Amostras de tecido ovariano com tumor e sem tumor foram coletadas durante a cirurgia, onde foi dado início ao procedimento de extração lipídica para determinação da radioatividade. A TFR da LDE e do oleato de etoposídeo foram similares (0,0881 e 0,1722 respectivamente, $P= 0,2422$). A média da captação tecidual de ambos [^{14}C]-LDE e [^3H]-oleato de etoposídeo por tecido maligno de ovário foi quatro vezes maior quando comparado com o tecido contralateral sem a doença (captação da LDE= 448 ± 184 e 143 ± 51 e a captação do oleato de etoposídeo foi de 346 ± 75 e 103 ± 56 , respectivamente). O resultado indica que maior quantidade do fármaco fica retido na partícula da microemulsão, sendo removida da circulação e internalizada pelas células. Em adição foi mostrado que a associação LDE: oleato de etoposídeo teve habilidade de se concentrar nos tecidos malignos de ovário. Contudo, a associação pode ser usada para direcionar e concentrar o oleato de etoposídeo nas células malignas de ovário.

ABSTRACT

C. H. M. Azevedo. **Plasma kinetics and Uptake of a Cholesterol-rich Microemulsion (LDE) Associated to Etoposídeo Oleate by neoplastic Ovarian Tissues.** São Paulo, 2004. Faculty of Pharmaceutical Sciences, USP.

Background: Previously we reported the association of etoposídeo oleate to a cholesterol-rich microemulsion (LDE) that is taken up by malignant cells that overexpress low-density lipoprotein (LDL) receptors. The association of the drug is stable, preserves the anti-proliferative activity of the drug and reduces the toxicity to animals. In order to investigate the plasma kinetics of the association LDE:etoposídeo oleate and to verify whether the complex has the ability to concentrate in malignant ovarian cancer we performed the following analysis. **Methods:** [^3H]etoposídeo oleate associated to LDE labeled with [^{14}C]-Cholesteryl Oleate (CO) was intravenously injected into 10 patients with cancer of ovary ($50,6 \pm 7,5$ yr.) 24 h before the surgery. Blood samples were collected over the 24 h period to determine the plasma decay curves of the complex labels. Radioactivity present in plasma aliquots was determined in a scintillation solution and the plasma fractional clearance rate (FCR) was calculated by compartmental analysis. Specimens of tumors and normal ovaries excised during the surgery were collected for lipid extraction, separation by thin layer chromatography and radioactive counting. **Results:** Fractional clearance rate (FCR) of LDE and of the drug were similar ($0,0881$ e $0,1722$, respectively, $P = 0.2422$). The mean of the uptake of both [^{14}C]-LDE and [^3H]-etoposídeo oleate by malignant tissue of ovary was three fold greater when compared with that of the contralateral normal ovaries (LDE uptake = 448 ± 184 and 143 ± 51 and etoposídeo oleate uptake = 346 ± 75 and 103 ± 56 , respectively). **Conclusions:** Our results indicate that most of the drug is retained in the microemulsion particles until its removal from the circulation and internalization by the cells. In addition, we showed that the association LDE:etoposídeo oleate has the ability to concentrate in malignant ovarian tissues. Therefore, the complex can be used to direct and concentrate etoposídeo against malignant ovarian cells.

Apesar dos avanços na medicina e de seu sucesso no combate de muitas doenças, o tratamento e o controle de alguns tipos de neoplasias, em especial dos tumores ginecológicos continuam sendo um grande desafio. Um dos maiores problemas do tratamento das doenças neoplásicas malignas com fármacos citotóxicos, é a falta de especificidade das mesmas à célula alvo, ocasionando vários efeitos adversos, muitas vezes graves, conseqüentes à destruição das células normais do organismo. Esta característica peculiar dos quimioterápicos cria limitações quanto à administração da dose do fármaco, que quando alterada compromete a resposta terapêutica.

A veiculação seletiva dos fármacos para as células tumorais faz com que haja uma diminuição dos efeitos para as demais células do organismo, com isso, é importante analisar e identificar diferenças qualitativas e quantitativas nos processos metabólicos, entre outras características, das células tumorais comparadas às células normais. Estas diferenças, podem ser aproveitadas para aumentar a eficiência na destruição das células tumorais, preservando assim as células normais. Uma das estratégias sugeridas e que têm sido testadas é o uso de lipoproteínas como transportadores plasmáticos de quimioterápicos (FILIPOWSKA., *et al.*, 1992 e VERSLUIS *et al.*, 1996). Estas, são complexos formados por proteínas e lípides responsáveis pelo transporte de lípides insolúveis na circulação sangüínea. 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 características físicas e composição química são classificadas em quatro grandes grupos: Os quilomícrons, que são as

maiores partículas lipoprotéicas e as menos densas, devido a alta proporção de lípidos (até 99%); as Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade (VLDL), com maior proporção de proteína; as Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), são ricas em ésteres de colesterol e são a principal forma de distribuição de colesterol aos vários tecidos, onde é necessário para síntese de membranas e hormônios. As Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) que são as menores e mais densas lipoproteínas. A LDL é o maior transportador de colesterol do organismo, representando cerca de 70 % do total de colesterol plasmático (VITOLS *et al.*, 1987).

As VLDL são responsáveis pelo transporte dos triglicérides do fígado para os tecidos extra-hepáticos. São sintetizadas pelas células do parênquima hepático e contém apo B-100. Na circulação recebem por transferência da HDL apo C e apo E. A VLDL sofre ação da lipase lipoprotéica que hidrolisa os triglicérides, liberando glicerol, ácidos graxos e apo C. A lipoproteína resultante é denominada VLDL remanescente ou lipoproteína de densidade intermediária (IDL). A IDL pode ser removida pelo fígado através de receptores de LDL (LDL-R) ou permanecer na circulação, sendo posteriormente convertida por lipólise à LDL. Na figura 1 é esquematizado o metabolismo lipídico.

Figura 1: Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas

METABOLISMO DA LDL

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%) (Fig. 2). A LDL 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.

Figura 2: Estrutura da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

A LDL tem como função fisiológica o transporte do colesterol necessário para a síntese de membranas de células em divisão e para a síntese de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e nas gônadas. A catabolização da LDL ocorre através de interação com receptores específicos de alta afinidade que reconhecem a apoB-100, denominados receptores B/E. Estes receptores podem estar presentes em células hepáticas e extra-hepáticas, sendo que o fígado é o principal órgão

responsável pela captação da LDL (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). Após a ligação da LDL com o receptor, ocorre uma invaginação (endocitose), formando a vesícula endocítica. O envoltório de clatrina se rompe e as várias vesículas se fundem formando os endossomos. Nos endossomos, devido a uma diminuição de pH, o complexo receptor-LDL é desfeito e o receptor B/E retorna à superfície celular. Os endossomos se fundem aos lisossomos e então os componentes da LDL são degradados pelas enzimas lisossomais. As apolipoproteínas são degradadas a aminoácidos, o colesterol éster a colesterol e os triglicérides a ácidos graxos livres, monoglicerídeos e glicerol (BROWN *et al.*, 1981).

O colesterol proveniente da degradação do colesterol éster pode ser utilizado no metabolismo intracelular ou ser reesterificado através da ação de uma enzima celular, acil Co A: colesterol aciltransferase (ACAT) para ser armazenado.

O colesterol produzido pelo catabolismo da LDL exerce um feedback negativo, inibindo sua própria biossíntese através da supressão da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase. Ativa a esterificação do colesterol, proporcionando seu armazenamento no citoplasma celular na forma de gotículas de gordura. Além disso, inibe a síntese do próprio receptor da LDL, interrompendo a captação de LDL e evitando a sobrecarga de colesterol pelas células quando expostas a LDL. Quando o nível de colesterol está diminuído, a célula aumenta a síntese de receptores e consequentemente aumenta a síntese de colesterol, mantendo o nível de colesterol intracelular através desse mecanismo de retroalimentação negativa (BROW; GOLDSTEIN, 1986).

A regulação do receptor de LDL é o principal fator controlador da sua concentração. Devido à remoção deficiente da lipoproteína provocada por defeitos no receptor específico ou na apo B, que dificultam a captação celular da partícula, a

LDL tende a acumular-se no plasma, podendo sofrer modificações em sua composição lipídica ou protéica e passar a ser reconhecida por outro tipo de receptor denominado de “scavenger” ou de varredura. Esses estão presentes em células do sistema retículo endotelial como macrófagos, que quando tornam-se sobrecarregados de colesterol esterificado, tornam-se células espumosas, componentes clássicos do processo de aterogênese. Em modelos animais e em seres humanos, estima-se que 33 a 66% da LDL plasmática sejam degradados via receptor de LDL e o restante, via receptor “scavenger” ou outros mecanismos ainda não elucidados (BROW; GOLDSTEIN, 1990).

LDL e CÂNCER

Há algumas décadas foram observadas as primeiras evidências de alterações no metabolismo de lípidos em pacientes com câncer. Os mecanismos envolvidos nessas alterações são complexos e não estão totalmente elucidados. As células malignas diferem das células normais em seu metabolismo lipídico, principalmente devido ao controle da expressão do receptor da LDL. O aumento do número de receptores de LDL nas células neoplásicas é um fenômeno muito intenso, ou seja, podendo superar em 3 a 100 vezes o número de receptores das células normais, sendo ainda o responsável pelas baixas concentrações de colesterol que são encontradas em várias doenças neoplásicas (HO *et al.*, 1978).

Em 1978, foram evidenciadas uma maior captação e metabolização de LDL em pacientes com leucemia mieloide aguda *in vivo*. Neste experimento, foi injetada uma solução de LDL marcada com ^{125}I , onde após recuperação da radioatividade

injetada, foi demonstrado uma captação de três a 100 vezes maior nas células leucêmicas, quando comparada às células de indivíduos saudáveis (Ho *et al.*, 1978).

Em 1990, foi avaliada a atividade de captação de LDL em tumores cerebrais primários e metastáticos, removidos cirurgicamente e comparados com tecido cerebral normal adjacente. O estudo foi feito por meio de incubação de macerados homogeneizados de tumor e de cérebro normal com LDL marcada com ^{125}I . A taxa de LDL foi significativamente maior no tecido tumoral em comparação com o tecido normal (RUDLING *et al.*, 1990).

Em 1992, foi comparada a captação de LDL entre células de tumores pulmonares e de tecido pulmonar normal adjacente, para isso, foi injetada LDL marcada radioativamente em pacientes com tumores de pulmão sem tratamento prévio e que seriam submetidos à cirurgia. Foi medida a radioatividade no plasma, no tumor e no tecido normal mostrando uma elevação no tecido tumoral de até três vezes, quando comparada ao pulmão normal. Observou-se que dois pacientes com tumores localmente avançados apresentaram remoção plasmática mais rápida da LDL e alta captação pelas células tumorais (VITOLS *et al.*, 1992).

Em 1995, foi observada também uma diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total e de LDL em pacientes com mieloma múltiplo (HUNGRIA *et al.*, 1995).

Em 1996, foi estudado o metabolismo da LDL e seu papel na distribuição seletiva de fármacos antineoplásicos usando como modelo ratos portadores de melanoma B-16. Foi mostrado que a solução de LDL marcada radioativamente é absorvida pela célula tumoral por meio de reação mediada por receptores na qual a degradação intracelular da lipoproteína envolve a participação de lisossomas (VERSLUIS *et al.*, 1996).

Normalmente, os esquemas convencionais de quimioterapia utilizados no tratamento do câncer, provocam toxicidade acentuada em diversos órgãos, tendo como consequência principalmente, náuseas, vômitos, cefaléia e perda de apetite. Essa toxicidade está relacionada à falta de especificidade dos agentes antineoplásicos pelas células tumorais. O aumento da seletividade às células tumorais pode ser obtido através de associações de agentes antineoplásicos a transportadores, que são captados preferencialmente pelas células tumorais.

A descoberta destes fatos levou à hipótese de que a LDL poderia ser usada como transportadora de fármacos na quimioterapia do câncer (MOSLEY *et al.*, 1981), já que as células neoplásicas podem ter grande afeição pela lipoproteína, comparada às células normais. No entanto, apesar dos excelentes resultados em estudos "*in vitro*", o uso deste sistema ficou restrito às experiências de laboratório. A possibilidade de se utilizar LDL como um veículo direcionador de fármacos para as células neoplásicas tem sido explorada por vários autores (GAL *et al.*, 1981, RUDLING *et al.*, 1983, MASQUELIER, M. *et al.*, 1986, LUNDBERG, 1987, CHRIS DE SMIDT P. *et al.*, 1990, SAMADI-BABOLI, M. *et al.*, 1993).

Contudo, a obtenção de LDL humana é um procedimento de alta complexidade. Além da possibilidade de se contrair doenças infecciosas como hepatite e AIDS. Além disso, a associação de quimioterápicos à LDL pode causar um desarranjo na sua estrutura ou a perda da apolipoproteína que se encontra ligada a mesma.

Uma alternativa ao uso de LDL humana seria a utilização de emulsões lipídicas artificiais com estrutura semelhante e com a propriedade de se ligar aos receptores da LDL.

MICROEMULSÃO LIPÍDICA ARTIFICIAL (LDE)

Em 1987, foram iniciados estudos visando reproduzir o metabolismo da LDL através de uma microemulsão com composição lipídica semelhante à da LDL natural (LDE), mas sem a parte protéica da lipoproteína (MARANHÃO *et al.*, 1993). O objetivo do estudo seria o uso da LDE na investigação da hipercolesterolemia relacionada à aterosclerose.

É importante ressaltar que a LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor através da sua única proteína, a apo B100. Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO *et al.*, 1997).

No entanto, a partícula artificial LDE tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural (HIRATA *et al.*, 1999). Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B100 da LDL natural.

Os resultados em rato mostraram que a LDE apresentava cinética plasmática semelhante à da LDL natural, sugerindo que estivesse sendo captada pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação. A LDE não tem proteína, mas, ao ser injetada na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. A apo E serve então de ponte para a LDE ligar-se ao receptor, sendo assim captada pela célula (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Em outras experiências, a LDE foi injetada em indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia (MARANHÃO *et al.*, 1997). Nesta situação, o defeito básico consiste em receptores B e E defeituosos, o que resulta em captação deficiente da LDL e seu acúmulo no plasma. Nestes pacientes a LDE foi removida muito lentamente da circulação, confirmando o comportamento esperado e mostrando o potencial da microemulsão como instrumento para investigação das dislipidemias.

Como mencionado anteriormente, o aumento da expressão dos receptores de LDL nas células neoplásicas já foi observado por vários autores. Isto se deve à maior demanda de lípidos para síntese de novas membranas para atender à proliferação celular exagerada característica das neoplasias. Daí, a célula multiplica os receptores para receber a LDL que proporciona o aporte desses lípidos. A descoberta de que a LDE se liga aos receptores da LDL abriu a possibilidade do seu uso no tratamento do câncer.

Com os elementos disponíveis sobre o comportamento da LDE, foi levantada a hipótese de que a LDE pudesse substituir a LDL natural como veículo para direcionar os quimioterápicos para os tecidos malignos, evitando órgãos e tecidos normais (MARANHÃO *et al.*, 1993 e MARANHÃO *et al.*, 1994).

Os quimioterápicos seriam incorporados à LDE; a microemulsão seria injetada na circulação, onde iria adquirir a apo E e ligar-se preferencialmente aos receptores para LDL das células neoplásicas onde estes receptores estão em número muito maior comparativamente às células normais. Desta forma a LDE iria dirigir-se preferencialmente à célula neoplásica, aumentando a eficiência do tratamento quimioterápico e ao mesmo tempo reduzindo os seus efeitos colaterais devastadores. Esta hipótese foi comprovada em pacientes com leucemia mielocítica

aguda (LMA). Verificou-se 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 quimioterápicos 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 microemulsão. Quando foram destruídas pela quimioterapia, a remoção era normalizada. Naquele trabalho, também mostrou-se a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de células LMA de maneira direta, através de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio^{99m}. Trata-se de uma experiência de "targeting" sem precedentes na literatura, já que, conforme demonstraram os estudos cinéticos 70% da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas. (MARANHÃO *et al.*, 1994).

Em outras experiências foram confirmadas a captação e concentração da LDE em tumor sólido. Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama mostraram que a LDE se concentra nos tecidos neoplásicos. Em câncer de ovário, por exemplo, a captação da LDE foi em média 10 vezes maior do que no tecido normal (ADES *et al.*, 2001), enquanto que em carcinoma de mama, a captação tumoral foi 4,5 vezes, em média, maior do que a do tecido mamário normal (GRAZIANI *et al.*, 2002)

Em experimentos *in vitro* com daunorrubicina associada à LDE (associação LDE-daunorrubicina) houve morte de 46,7 % das células blásticas neoplásicas e 20,2 % das células normais da medula óssea, demonstrando especificidade da associação para as células neoplásicas (DORLHIAC-LACER *et al.*, 2001).

Recentemente utilizou-se a LDE como veículo do quimioterápico paclitaxel (RODRIGUES *et al.*, 2002). A associação LDE-Paclitaxel apresentou uma alta taxa

de incorporação e citotoxicidade seis vezes menores do que o Taxol[®], que é a apresentação do fármaco utilizado comercialmente. Esse efeito citotóxico ocorre devido à ausência do surfactante Cremophor EL, que é usado como veículo do Paclitaxel na forma comercial. A toxicidade letal dessa associação em ratos foi dez vezes menor que a do Taxol[®].

Posteriormente, foi caracterizada a incorporação à LDE de um quimioterápico de ação antineoplásica, de natureza lipofílica: a carmustina. Foi estudada 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). Foi verificado que a associação com a carmustina não altera o direcionamento da LDE para os seus sítios de ligação específicos. Através de estudos de incubação com células normais e de linhagens neoplásicas, verificou-se que quando complexada à LDE, a carmustina não perde a sua ação citotóxica (MARANHÃO *et al.*, 2002).

O tratamento convencional com carmustina, fármaco do grupo das nitrosuréias, causa sistematicamente toxicidade grau III, principalmente leucopenia e plaquetopenia, acentuada e tardia. Esses efeitos são cumulativos, de tal forma que a administração continuada do fármaco é limitada. O seu uso também pode levar a fibrose pulmonar e insuficiência renal. Os estudos em pacientes com tumor sólido avançado, resistentes ao tratamento convencional com carmustina mostraram que a associação deste fármaco com a LDE diminui drasticamente os efeitos colaterais da quimioterapia (MARANHÃO *et al.*, 2002). Neste estudo com escalonamento de dose, os autores chegaram a administrar até 2 vezes (400 mg/m² de superfície corpórea) o nível máximo de dose da quimioterapia convencional (de 150 a 200/m²), em intervalos mais curtos (de 4 em 4 semanas),

contra intervalos de 6 em 6 semanas na quimioterapia convencional, sem que graus importantes de toxicidade tivessem sido atingidos.

Subseqüentemente, em um grupo de pacientes com mieloma múltiplo ainda não tratados, foi possível aquilatar melhor a ação terapêutica do complexo LDE-Carmustina, administrado em dose de 180 mg/m² de superfície corpórea do fármaco. Além da nítida melhora clínica da amostragem de seis pacientes, os níveis de imunoglobulina M, secretada pelas células do mieloma, marcador bioquímico mais importante da doença, decresceram em mais de 60%, sem que tenha havido efeitos colaterais importantes. (HUNGRIA *et al.*, 2004).

Atualmente, estudos vêm sendo desenvolvidos com oleato de etoposídeo associado à partícula de microemulsão. Foi mostrado que o índice de citotoxicidade para a linhagem celular H 292, foi em torno de duas vezes menor do que a formulação comercial, sendo que essa diferença é atribuída à toxicidade do veículo. (VALDUGA *et al.*, 2003)

ETOPOSÍDEO

O Etoposídeo é um derivado semi-sintético do princípio ativo podofilotoxina, extraída da planta mandrágora (*Podophyllum peltatum*). É um quimioterápico de ação antineoplásica, de natureza lipofílica, do grupo das epipodofilotoxinas. Este apresenta significativa atividade terapêutica em vários neoplasmas humanos, incluindo leucemia pediátrica, carcinomas de células de pulmão pequena, tumores testiculares, doença de Hodgkin e linfomas de grandes células (GOODMAN, 1998).

O Etoposídeo tem peso molecular de 588 g/mol e é quimicamente descrito como 4'-o-dimetil-1-(4,6-o-etilideno-β-d-glicopiranosil) epipodofilotoxina e conhecido como VP 16-213. É muito solúvel em metanol e clorofórmio, pouco solúvel em etanol, álcool e éter. Apresenta-se mais miscível em água quando combinado a solventes orgânicos. Devido a essa característica, o etoposídeo é encontrado na forma comercial na formulação por: 20mg de etoposídeo, 2,0 mg de ácido cítrico, 30mg de álcool benzílico, 80mg de polissorbato modificado (Tween 80), 650 mg de polietilenoglicol 300 e 30,5 % (v/v) de etanol. A estabilidade do etoposídeo em soluções é variável, dependendo da concentração de sais e do pH. É mais estável em pH 5,0 e em soluções mais ácidas é degradado em aglicona.

Na figura 3 estão representadas as estruturas da podofilotoxina (**1**) e seus congêneres em uso clínico, os fármacos etoposídeo (**2a**), fosfato de etoposídeo (**2b**) e teniposide (**2c**).

Figura 3. Estrutura da Podofilotoxina e seus derivados de uso clínico.

O Etoposídeo tem como mecanismo de ação a formação de um complexo ternário com a topoisomerase II e DNA, o qual resulta na quebra dos dois filamentos de DNA. O reparo da quebra que normalmente se segue à ligação de topoisomerase ao DNA é inibido pelo fármaco. A enzima permanece ligada à extremidade livre do filamento quebrado de DNA, levando a propagação de quebras do DNA e conseqüente morte celular. Este efeito é acentuado nas fases S (síntese de DNA) e G₂ (intervalo pré-mitótico) do ciclo celular, quando as células se tornam mais sensíveis ao etoposídeo. (GOODMAN,1998).

A principal toxicidade do etoposídeo é a mielosupressão relacionada a dose. Granulocitopenia é predominante.

Vários trabalhos já foram publicados no que diz respeito a farmacocinética do etoposídeo. Estudos mostram que após a administração intravenosa do fármaco, o mesmo apresenta um decaimento biexponencial plasmático (PETER *et al.*, 1987). O etoposídeo apresenta-se com uma meia vida na fase de eliminação ($t_{1/2\beta}$) em torno de 6 horas, um volume de distribuição (Vdss) de 7 a 17 L/m² em adultos e um clearance total (CL) variável entre 15 e 35 mL /min/m². Aproximadamente 20 a 45% do etoposídeo é excretado na urina como droga inalterada, indicando que o rim é o responsável pelo maior papel na excreção do fármaco (PETER *et al.*, 1987).

De acordo com PFLUGER, a correlação entre os parâmetros clínicos e a farmacocinética do etoposídeo é extremamente valiosa. Como exemplo, um trabalho realizado por ele em 1993, demonstrou uma influência de alguns desses parâmetros na disposição do etoposídeo, como a idade e disfunção renal, onde em pacientes mais velhos, o volume de distribuição (Vdss), a área sobre a curva (AUC) e o tempo de meia vida ($t_{1/2\beta}$) apresentaram-se mais elevados do que em pacientes mais jovens, enquanto o clearance (CL) foi minimamente alterado (PFLUGER *et al.*,1993).

Com o intuito de diminuir os efeitos colaterais do etoposídeo, estudos com a utilização de transportadores vem sendo desenvolvidos. exemplo disso a distribuição de fármacos lipossomais tem sido um atrativo enfoque para o alvo de agentes antineoplásicos, como os tumores sólidos (GABIZONA *et al.*; 1985). De fato em 1998, foi demonstrado que a longa circulação de lipossomas estabilizados poderiam aumentar a eficácia antitumor e reduzir a toxicidade do etoposídeo (SENGUPTA *et al.*; 1998). Esse mesmo grupo de trabalho relatou recentemente que a incorporação de lipossomas catiônicos do etoposídeo aumentou a eficácia antitumor e reduziu a toxicidade do mesmo, em comparação com a formulação parenteral convencional (SENGUPTA *et al.*; 2000). Foi demonstrado também que a encapsulação em lipossomas catiônicos, de fato, aumenta o tempo de clearance do etoposídeo e a AUC, indicando com isso um maior tempo na circulação.

A associação do etoposídeo à LDE é facilitada por um processo de modificação química do quimioterápico (introdução do grupo oleíla) (Fig. 4). Essa modificação promove um aumento na taxa de incorporação do fármaco à partícula, em relação ao não modificado, visto que o etoposídeo comercial apresentou uma taxa de incorporação de 56% contra 98% do oleato de etoposídeo. Além disso, quando associado à LDE, o fármaco é protegido da isomerização da forma *trans* (forma ativa) para a forma *cis* (inativa) (Fig. 4). A isomerização ocorre em pH básico, ou levemente básico, daí a presença do ácido cítrico na preparação comercial. A associação é estável em meio aquoso e a estabilidade pós-preparação tem uma duração de 6 dias. A taxa de dissociação da partícula é de 10% nesse período. Os resultados de incubação com células indicam a associação LDE- oleato de etoposídeo tem atividade antiproliferativa sobre células da linhagem neoplásica NCI H292 (VALDUGA *et al.*, 2003).

Figura 4. Síntese do oleato de etoposídeo e isomerização da forma *trans* para *cis*- lactona do oleato de etoposídeo.

Os ensaios de toxicidade animal indicaram que a toxicidade do etoposídeo associado à LDE é quatro vezes menor que a da preparação comercial. (VALDUGA *et al.*, 2003).

Trabalhos anteriores realizados com a associação da LDE- carmustina e LDE-Paclitaxel demonstraram que a LDE é um veículo promissor para o direcionamento de fármacos de ação antineoplásica, diminuindo a toxicidade dos mesmos .

Em estudos recentes verificou-se que a taxa de incorporação do etoposídeo à LDE apresentou-se baixa. Tendo em vista o eventual uso clínico da preparação, a lipofilicidade do fármaco foi aumentada pela introdução do grupo oleíla, obtendo-se assim o oleato de etoposídeo, que possibilitou um aumento da taxa de incorporação para 98%. Neste mesmo experimento, demonstrou-se que a ação citotóxica do oleato de etoposídeo associado à LDE, foi aproximadamente duas vezes menor em comparação com a forma comercial do fármaco, e, além disso, a modificação química não alterou o efeito citotóxico do fármaco. (VALDUGA *et al.*, 2003).

Diante desses resultados, torna-se necessária a realização de estudos cinéticos, tanto *in vitro* quanto em pacientes, a fim de verificar se ocorre a dissociação do complexo LDE- oleato de etoposídeo e se a cinética plasmática é semelhante para os dois componentes. É necessário ainda, verificar se a associação do fármaco à LDE modifica a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas com aumento dos receptores, determinando a captação de ambos os componentes nos tecidos acometidos pelo tumor comparado com o tecido equivalente normal.

- Avaliar a estabilidade da associação [^{14}C]LDE-[^3H]oleato de etoposídeo através de estudos de diálise.
- Determinar a cinética plasmática de ambos os componentes da associação [^{14}C]LDE-[^3H]oleato de etoposídeo em pacientes portadores de câncer de ovário, assim como, determinar os parâmetros farmacocinéticos do fármaco.
- Avaliar a captação da associação [^{14}C]LDE-[^3H]oleato de etoposídeo nos tecidos acometidos pela doença em comparação com o tecido equivalente normal.

4.1- CASUÍSTICA

14 pacientes provenientes da Enfermaria da Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com câncer de ovário, foram submetidas ao estudo de cinética plasmática da associação LDE-oleato de etoposídeo. Todas assinaram termo de consentimento aprovado pela Comissão de Ética da Instituição, após receberem informação verbal sobre o estudo de que estavam participando (Tab. 1).

Tabela 1. Características das pacientes estudadas com Carcinoma de Ovário.

PACIENTE	IDADE (anos)	PESO (Kg)	ALTURA (m)	IMC (Kg/m ²)
J.X.O.S	47	64	1,64	23
E.O	47	64	1,64	23
M.N	56	53	1,56	21
E.P	55	48	1,53	20
P.S	54	76	1,60	29
M.B.C.A	42	68	1,59	26
B.A.S	46	43	1,50	19
N.B	56	56	1,60	21
A.S.M	60	47	1,55	19
D.C.N.F	39	76	1,60	29
R.S.S	51	53	1,56	21
H.M.P	54	48	1,53	20
N.P.O	49	61	1,60	23
S.N.P	62	56	1,60	21
Média ± DP	51 ± 7.4	58 ± 10	1.57 ± 0.04	22 ± 3.1

IMC- Índice de Massa Corpórea

4.2- MATERIAIS

Os lípides puros trioleína (TG), oleato de colesterol (CO) e 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).

Toda a vidraria utilizada nesse experimento foi submetida à esterilização à seco (180°C/1,5h) e à vapor (120°C/20min). O material plástico e de borracha foi submetido à esterilização por exposição à luz ultravioleta por 12 h. Todo esse procedimento foi realizado pelo Setor de Esterilização do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor), visando garantir a injeção nos participantes, de preparação estéril e apirogênica.

4.3- MÉTODOS

Preparação da microemulsão LDE marcada com ^{14}C -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 foram pipetados em frasco de vidro, onde se adicionou 740 kBq do isótopo [^{14}C]- oleato de colesterol. A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37 °C) e mantida em dessecador à 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 lípidos 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 1 cm de diâmetro.

As emulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrífuga 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 1,006 g/ml, foi retirado e descartado. O volume restante foi submetido à 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 2,0ml 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.

Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado 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 pirogenicidade "in vivo" no Instituto de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo.

Associação do [^3H]-oleato de etoposídeo à [^{14}C]-LDE

A LDE foi adicionada à solução de oleato de etoposídeo em etanol 10 %, em relação ao volume de LDE. A incorporação foi feita por co-incubação sob irradiação ultra-sônica durante 40 min., e a fração do fármaco que não se associou a LDE foi separada por centrifugação. Após esse procedimento o material foi submetido a uma filtração utilizando filtro de 0,22 μ , estando pronto para injeção.

A LDE já foi utilizada em vários grupos de pacientes não acarretando nenhum risco aos mesmos. A dose radioativa injetada, em termos de proteção radiológica, é várias vezes menor do que o correspondente a exposição resultante dos vários procedimentos de medicina nuclear. É válido ressaltar que a dose equivalente é de 0,04 mSv, podendo ser injetada até 0,5 mSv.

Estabilidade da associação [^{14}C] LDE-[^3H]oleato de etoposídeo (ensaios in vitro)

A associação LDE- oleato de etoposídeo, com marcação radioativa de ^3H no oleato de etoposídeo e ^{14}C no oleato de colesterol da LDE, foi dialisada (SeamL ess cellulose tubing – Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) contra plasma para avaliar a dissociação do fármaco da partícula de microemulsão. Três proporções lípides/fármaco (5:1, 10:1 e 20:1, m/m) foram utilizadas no experimento, com o objetivo de obter a melhor preparação. Foi usado 1,0 mL da associação [^{14}C]LDE-[^3H]oleato de etoposídeo dialisado contra 20 mL de plasma, sob agitação magnética, por 24 h à 37 °C.

Amostras de 5 μ L da associação foram coletados nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 e 24h e a radioatividade foi medida por cintilador beta (Packard), utilizando-se 7,0 mL de solução cintiladora (PPO: dimethyl-POPOP: Triton X-100: tolueno, 5 g: 0,5 g: 333 mL:667 mL).

Determinações Bioquímicas Séricas

Foram determinadas, antes da administração da microemulsão associada, as seguintes determinações bioquímicas: colesterol total (CT) e frações (VLDL, LDL e HDL), triglicérides (TG), apoA-I e apoB em amostras de soro obtidas após 12-14 horas de jejum, pelos métodos de SIEDEL *et al.*, (1981). O colesterol e suas frações foram determinados pelo método colorimétrico-enzimático (CHOD/PAP). Os triglicérides foram determinados pelo método enzimático automatizado e as após por imunoturbidimetria.

Determinação da cinética plasmática da associação [14 C]LDE-[3 H]oleato de etoposídeo em pacientes

Os estudos do comportamento cinético da associação LDE- oleato de etoposídeo foram realizados em tempos pré- determinados durante as 24 h do protocolo de pesquisa. Inicialmente, os pacientes encontravam-se em dieta leve, pré- operatório, mas no decorrer do protocolo de estudo foram permitidas refeições a critério médico.

Antes do procedimento foram canuladas duas veias, de membros superiores diferentes com catéter "butterfly". Foram injetados 2,0 mL de [3 H]- oleato de

etoposídeo associado à [^{14}C]-LDE, nas pacientes, com a finalidade de estudar a remoção plasmática do componente lipídico oleato de colesterol e do oleato de etoposídeo. 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 e 30 min. e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h. 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 Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de ^{14}C 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).

Análise da cinética dos componentes marcados radioativamente: [^{14}C]- oleato de colesterol e [^3H] oleato de etoposídeo.

A curva de remoção plasmática do [^{14}C]- oleato de colesterol e do [^3H]- oleato de etoposídeo apresentou perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial seguido de um decaimento mais lento.

A taxa fracional de remoção (TFR) do ^{14}C e do ^3H , foi determinada por análise compartimental, utilizando-se o programa Anacomp versão 3.11 (MESQUITA, 1994).

Procedimento cirúrgico e obtenção dos fragmentos

As pacientes foram submetidas à cirurgia indicada, de acordo com o órgão ginecológico acometido pela doença e baseado nos procedimentos de rotina. Foi avaliada a captação do ^{14}C e ^3H , correspondentes a LDE e ao oleato de etoposídeo nos fragmentos, que habitualmente são retirados sempre que indicados.

As cirurgias foram de rotina do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Extração de lípides - captação Tecidual de [^{14}C]-LDE x [^3H] - oleato de etoposídeo

Os fragmentos obtidos durante os procedimentos cirúrgicos, foram colocados imediatamente em um recipiente com solução fisiológica gelada, até a chegada ao Laboratório de Lípidos - InCor, onde foi realizado procedimento de extração de lípidos.

Os fragmentos foram limpos em condições adequadas sobre placa de gelo, em seguida pesado (mg), e então macerados de forma que ficassem com o aspecto pastoso. A extração foi feita pelo método de FOLCH (FOLCH *et al.*, 1957), ou seja, os fragmentos foram transferidos para tubos grandes (20x160) onde foram adicionados 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio e deixados em repouso “overnight” à 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. Foram adicionados 4 mL de “Clear Folch” (CHCl_3 /

MEOH/ H₂O, na proporção de 3:48:47); deixados 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 (N₂), dissolvidas em solução de FOLCH e transferidas para tubos menores, lavando 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 etoposídeo, foram separados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de silicagel 60H (Sigma S-6628), onde foram aplicados 100 µL de amostra. 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 etoposídeo. As faixas correspondentes às bandas de interesse foram removidas para frascos de cintilação e adicionados 7 mL de solução cintiladora para análise.

Análise da farmacocinética do oleato de etoposídeo

Os parâmetros farmacocinéticos: tempo de meia vida ($t_{1/2}$), 'clearance' plasmático (Cl) e volume de distribuição (Vdss) foram calculados utilizando-se um software de modelo multicompartimental (Software PK solutions, Ashland , OH).

As variáveis foram representadas por média $\pm$ desvio médio.

Foi utilizado o teste One Way ANOVA Analyses of Variance para análise da cinética *in vitro*.

A análise dos dados, onde se comparou dois grupos nos experimentos de cinética plasmática, foi feita utilizando o teste Graph Pad Instat Versão 3.01.

O teste Mann-Whitney, foi utilizado para analisar os resultados de captação, quando as amostras se apresentaram como não paramétrica. Quando as amostras se mostravam paramétricas, foi utilizado o test t.

6.1. Estabilidade da associação [^{14}C] LDE-[^3H] oleato de etoposídeo

A estabilidade da associação da LDE- oleato de etoposídeo, foi determinada através de diálise contra plasma, e foram usadas três diferentes proporções lípides/fármaco (m/m), com a finalidade de determinar a preparação mais estável. A proporção 10:1 (m/m) foi a preparação mais estável, em relação as outras preparações (5:1 e 20:1). Interessante ressaltar que a proporção 20:1 foi a preparação que obteve menor estabilidade. A Figura 5 mostra a dissociação do fármaco em relação à LDE em diferentes proporções de lípides/fármaco (m/m).

Figura 5. Diálise de 1.0 mL de LDE-oleato de etoposídeo contra 20 mL de plasma humano. A associação [^{14}C]LDE-[^3H]oleato de etoposídeo foi preparada em diferentes proporções (lípides/fármaco – m/m): 5:1 (●), 10:1 (■) e 20:1 (▲).

6.2- Determinações Bioquímicas

A Tabela 2 mostra as concentrações plasmáticas dos lípides e apoproteínas das pacientes submetidas à cinética plasmática e captação da associação [^{14}C]LDE-[^3H]-oleato de etoposídeo.

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de lípidos e apoproteínas das pacientes submetidas ao estudo.

Paciente	CT (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	TG (mg/dl)	APO AI (g/l)	APOB (g/l)
J.X.O.S **	203	31	119	33	166	1.10	1.07
E.O	138	41	99	23	100	1.01	1.02
M.N	140	34	102	17	88	1.05	0.99
P.S	200	32	97	21	89	1.06	0.95
E.P	156	41	88	39	140	1.04	0.78
M.B.C.A **	139	42	101	20	100	1.01	0.98
B.A.S **	118	25	89	17	74	0.74	0.56
N.B *	140	41	171	30	148	1.02	0.92
A.S.M *	209	28	127	39	199	1.07	1.23
D.C.N.F *	132	42	70	20	100	1.29	0.56
R.S.S *	176	29	124	22	113	1.00	0.89
H.M.P	145	41	89	15	77	1.06	0.62
N.P.O *	215	28	126	30	153	1.07	1.16
S.N.P **	217	30	102	16	80	1.08	0.80
Média ± DP	166 ± 38.7	34.7 ± 6.8	107.8 ± 28	24.2 ± 8.2	116 ± 42	1.04 ± 0.13	0.88 ± 0.24

* Pacientes em que foi medida somente a captação de ^{14}C LDE.

** Pacientes em que foi medida tanto a captação de ^{14}C LDE, quanto de ^3H oleato de etoposídeo.

CT- Colesterol Total; **HDL-** Lipoproteína de Alta Densidade; **LDL-** Lipoproteína de Baixa Densidade; **VLDL-** Lipoproteína de Densidade Muito Baixa; **TG-** Triglicerídeos; **APO AI-** Apolipoproteína AI; **APO B-** Apolipoproteína B.

6.3 - Cinética plasmática da associação LDE- oleato de etoposídeo em pacientes

A figura 6 mostra o decaimento plasmático da microemulsão [^{14}C]LDE- oleato de etoposídeo em duas diferentes proporções lípides/fármaco (5:1 e 10:1). Analisando-se as duas primeiras horas após a injeção, foi observado que as duas preparações apresentaram comportamento diferente no que se refere a velocidade de remoção plasmática. A preparação 5:1 apresentou maior velocidade de remoção em relação a 10:1 ($P= 0,0397$), indicando que esta última permanece por mais tempo na circulação.

Figura 6. Decaimento plasmático da microemulsão marcada, [^{14}C]LDE, nas proporções lípides/fármaco (m/m) 10:1 (■) e 5:1 (●).

Em virtude de a proporção 10:1 permanecer por mais tempo na circulação, ela foi escolhida para avaliar se ambos os componentes marcados [^{14}C]-LDE e [^3H]-oleato de etoposídeo apresentavam comportamento cinético semelhante. A Figura 7 evidencia que apesar do fármaco possuir taxa fracional de remoção maior em relação à LDE (0,0881 e 0,1722 respectivamente, $P= 0,2422$), não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as taxas o que indica o acompanhamento do fármaco à partícula de microemulsão. Desta forma, esta preparação se mostrou adequada para dar continuidade aos experimentos de captação tecidual.

Figura 7: Decaimento plasmático da Microemulsão [^{14}C]-LDE (■) e do fármaco [^3H]-oleato de etoposídeo (●).

6.4 - Captação Tecidual da associação [^{14}C] LDE-[^3H] oleato de etoposídeo

As tabelas a seguir apresentam os valores de radioatividade (em contagens por minuto/grama), quantificando a captação de ambos os componentes da associação, nas amostras de tecido ovariano obtidos das pacientes. A captação no tecido tumoral, tanto da [^{14}C]-LDE quanto do [^3H]- oleato de etoposídeo ($P=0,0020$ e $P=0,0021$ respectivamente), foi quatro vezes maior quando comparada com o tecido equivalente sem a doença, na mesma paciente.

Tabela 3: Resultado em cpm/grama da captação tecidual da [^{14}C]-LDE administrada nas pacientes.

Paciente	Tecido Tumoral	Ovário contralateral sem a doença
J.X.O.S	490	204
M.B.C.A	694	156
B.A.S	350	158
N.B	560	205
A.S.M	224	194
D.C.N.F	538	85
R.S.S	396	94
N.P.O	144	112
S.N.P	704	63
Média $\pm$ DP	448 $\pm$ 184	143 $\pm$ 51

Tabela 4. Médias descritivas da captação (cpm/g) de ^{14}C -LDE dos ovários das pacientes e comparação entre tumor e ovário normal.

Ovário	Média $\pm$ D.P	Mínimo	Máximo
Normal (n=9)	143 $\pm$ 51	63	205
Tumor (n=9)	448 $\pm$ 184	144	704

Tabela 5. Resultado em cpm/grama da captação tecidual de [^3H]- oleato de etoposídeo administrado nas pacientes.

Paciente	Tecido Tumoral	Ovário contralateral sem a doença
J.X.O.S	422	157
M.B.C.A	385	146
B.A.S	249	64
S.N.P	330	46
Média $\pm$ DP	346 $\pm$ 75	103 $\pm$ 56

Tabela 6. Médias descritivas da captação (cpm/g) de [^3H]- oleato de etoposídeo dos ovários das pacientes e comparação entre tumor e ovário normal.

Ovário	Média $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
Normal (n=4)	103 $\pm$ 56	46	157
Tumor (n=4)	346 $\pm$ 75	249	422

6.5 - Médias dos Parâmetros Farmacocinéticos do oleato de etoposídeo associado à microemulsão (Tab. 5).

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos do oleato de etoposídeo associado à LDE.

Parâmetros farmacocinéticos	Oleato de etoposídeo associado à microemulsão
$T_{1/2\beta}$ (h)	19
V_{dss} (L/kg ⁻¹)	17
Cl (mL/kg ⁻¹ .h ⁻¹)	10,46

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 a seletividade de fármacos antineoplásicos na quimioterapia do câncer (MASQUELIER *et al.*, 1986; LUNDBERG *et al.*, 1987; VITOLS *et al.*, 1990; MASQUELIER *et al.*, 2000)

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

A utilização de emulsões artificiais com características semelhantes à LDL sem o domínio protéico é uma das alternativas propostas por alguns autores como alternativa ao emprego da LDL (GINSBURG *et al.*, 1982, HALBERT *et al.*, 1984 e OWENS *et al.*, 1995).

Vários estudos foram realizados por Maranhão e colaboradores à respeito da utilização da LDE como ferramenta para avaliar o metabolismo lipídico da LDL. 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.* 1986, 1993 e 1997). A partir dos dados evidenciados, descritos na literatura sobre o comportamento da LDE, captada seletivamente por linhagens neoplásicas que expressam aumento dos receptores de LDL, fez com

abrisse caminho para utilizar essa microemulsão como carreadora de fármacos no tratamento de neoplasias.

A exemplo de fármacos utilizados, destacam-se aqui o paclitaxel e a carmustina, que após serem associados à LDE, obtiveram uma diminuição de toxicidade (RODRIGUES et al; 2002; MARANHAO et al; 2002).

O fármaco utilizado nesse estudo foi o etoposídeo, que foi associado à partícula de microemulsão, com a finalidade de obter melhora na terapêutica do fármaco. Em estudos anteriores desenvolvidos com essa associação, foi observado que, tendo uma baixa taxa de incorporação, sua estrutura foi modificada pela introdução de um grupo oleíla (passando a ser chamado de oleato de etoposídeo), processo utilizado para torná-lo mais lipofílico. É importante ressaltar que essa modificação química não alterou sua citotoxicidade e, além disso, elevou de 50 para aproximadamente 98 % a taxa de incorporação à 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 preparação comercial. Além disso, a associação apresentou toxicidade animal em torno de 5 vezes menor que a preparação comercial (VALDUGA et al., 2003).

Dando prosseguimento a esses experimentos, o presente estudo teve como objetivo a realização de estudos cinéticos, tanto *in vitro* quanto em pacientes, a fim de verificar se ocorre a dissociação do oleato de etoposídeo da partícula de LDE e se a cinética plasmática é semelhante para os dois componentes. Foi necessário ainda, verificar se a associação do fármaco à LDE modificaria a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas com aumento dos

receptores, determinando a captação de ambos os componentes nos tecidos acometidos pelo tumor comparado com o tecido equivalente normal.

A estabilidade da associação LDE- oleato de etoposídeo, foi determinada através de diálise contra plasma, para isso foram usadas três proporções diferentes de lípides/fármaco (*m/m*) (5:1, 10:1 e 20:1). Através destas comparações esperava-se obter a preparação mais estável. Observou-se que a dissociação do oleato de etoposídeo da LDE foi de 26% na proporção 5:1, 6% na proporção 10:1 e 27% na proporção 20:1, na primeira hora. A partir das 6 horas foi alcançado um equilíbrio, onde o percentual de dissociação foi de: 58% na proporção 5:1, 47 % na 10:1 e de 60 % na 20:1.

O empacotamento do fármaco é baseado no tamanho da molécula e seu arranjo espacial, assim como nas interações químicas com os demais componentes no interior da partícula, o que produz uma maior ou menor estabilidade da associação. É interessante ressaltar que a proporção 20:1 foi a preparação que apresentou menor estabilidade. Provavelmente esta partícula de microemulsão com menor proporção de fármaco em seu interior, deixa espaços vazios o que concerne menor estabilidade à partícula como um todo.

Na proporção 5:1, a maior parte do fármaco se dissocia da partícula nas primeiras seis horas. Provavelmente nesta concentração o número de moléculas encaixadas nos espaços intermoleculares do interior da microemulsão está em excesso, ocasionando maior velocidade de saída nessas primeiras horas. Em experimentos anteriores foi observada a estabilidade da associação por 120 h. Durante esse período, a saída do fármaco foi de 10% nas primeiras 24 h, indicando que a partícula atinge um equilíbrio e que a massa de fármaco eliminada

provavelmente foi o que se encontrava em excesso (Fernandes, 2002 - Dissertação de Mestrado).

A proporção 10:1 parece ter o melhor balanço entre a quantidade de fármaco e os espaços intermoleculares no interior da partícula, sendo assim, considerada a formulação com melhor estabilidade.

A cinética plasmática de ambos os componentes da associação [^{14}C]-LDE e [^3H]- oleato de etoposídeo foi realizada em pacientes sem alterações importantes no perfil lipídico, visto que, esse tipo de alteração pode influenciar a cinética plasmática da LDE. Em pacientes com hipercolesterolemia familiar, a cinética plasmática da LDE é mais lenta quando comparada a indivíduos normais (ROLAND et al., 1992). É válido ressaltar que a idade é outro fator que pode interferir na cinética da microemulsão. Em pacientes com idade avançada, foi observada a diminuição dos receptores dessa lipoproteína, fazendo com que a cinética da LDE também fosse mais lenta nesse grupo de pacientes, comparado com indivíduos mais jovens (PINTO et al., 2001).

Na análise da associação [^{14}C]-LDE - oleato de etoposídeo nas pacientes com câncer de ovário, a cinética foi mais rápida na proporção lípides/fármaco 5:1 (*ml/ml*), em relação à 10:1. Este comportamento indica que a LDE permanece por mais tempo na circulação na proporção 10:1, o que mimetiza os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* através de diálise, confirmando assim a sua melhor preparação. Estatisticamente não houve diferença entre as proporções nos ensaios *in vitro* ($P=0.361$). Já na cinética plasmática, houve diferença entre as duas preparações (5:1 e 10:1) com o valor de $P=0,0397$.

Posteriormente, foi realizada uma análise comparativa entre as taxas fracionais de remoção (TFR) da microemulsão marcada radioativamente com [^{14}C]-

CE e do fármaco marcado com ^3H da associação LDE- oleato de etoposídeo (0,0880 e 0,1722 respectivamente). Esse resultado mostrou que existe semelhança entre a cinética de ambos os componentes, indicando um possível acompanhamento do fármaco à partícula de microemulsão. Não houve diferença entre as taxas fracionais de remoção ($P=0,2422$).

Como descrito por Ades, em 2001, os tumores de ovário apresentaram captação aumentada de LDL, resultados esses, demonstrados pelo aumento da captação da microemulsão lipídica (LDE) pelos tumores malignos, quando comparados a ovários contralaterais sem a doença (ADES et al;2001). E com o intuito de averiguar se a associação do oleato de etoposídeo à LDE modificaria a propriedade da microemulsão de se concentrar nas células neoplásicas, esse trabalho avaliou também a captação de ambos os componentes da associação [^{14}C] LDE- [^3H] oleato de etoposídeo nos fragmentos (ovário), acometidos pelo tumor em comparação com o tecido equivalente sem tumor. A recuperação dos lípides radioativos nos fragmentos com e sem tumor indicam que ocorreu captação tecidual significativa do fármaco e da LDE. Houve captação quatro vezes maior, tanto da [^{14}C]-LDE quanto do [^3H]- oleato de etoposídeo ($P=0,0020$ e $P=0,0021$ respectivamente), com diferença significativa no tecido tumoral em relação ao tecido equivalente sem a doença. É válido ressaltar, que a grande variedade histológica dos tumores, impossibilita um resultado seguro, necessitando uma avaliação no metabolismo dessas diferentes formas.

Esses resultados indicam que a associação do fármaco à partícula não altera sua propriedade de se concentrar na células neoplásicas, abrindo possibilidades bastante excitantes para pesquisas futuras no tratamento do câncer.

Vários trabalhos disponibilizam informações no que se refere aos parâmetros farmacocinéticos do fármaco. Resultados esses que tem como valores médios: Volume de distribuição (V_d) de 7 a 17 L/m², Clearance (Cl) de 15 a 35 mL /min/ m², e tempo de meia vida β ($t_{1/2\beta}$) de 4 a 8 horas (PIAZZA *et al.*, 1984; PETER I. *et al.*, 1987; K.-H. PFLUGER *et al.*, 1993;). A análise dos parâmetros farmacocinéticos do oleato de etoposídeo associado à microemulsão, nos permite dizer que a associação do fármaco à microemulsão aumentou seu tempo de meia vida de 8 para 19 horas. Esse aumento do $t_{1/2\beta}$ possibilita que o fármaco fique mais tempo em circulação, podendo aumentar o seu tempo de exposição nas etapas do ciclo da célula neoplásica, resultando com isso uma maior morte dessas células. Isso indica que a associação do oleato de etoposídeo à microemulsão, provavelmente aumenta o índice terapêutico do fármaco.

Com os resultados obtidos no trabalho pudemos concluir que:

- Nos ensaios *in vitro* e nos ensaios em pacientes, a preparação 10:1 (m/m de lípides/fármaco), apresentou melhor comportamento em relação às outras preparações, indicando com isso, um maior tempo na circulação.
- Na cinética plasmática realizada em pacientes portadoras de câncer de ovário, os componentes (^{14}C -LDE e ^3H -oleato de etoposídeo) não apresentaram diferença significativa na velocidade de remoção plasmática, indicando portanto, que o fármaco acompanha a partícula de microemulsão.
- A captação pelos tumores malignos de ovário foi quatro vezes maior, tanto de ^{14}C LDE, quanto de ^3H oleato de etoposídeo, quando comparada a ovários contralaterais sem a doença, na mesma paciente. Esses achados justificam a importância da LDE como carreadora de quimioterápicos, frente às possibilidades terapêuticas advindas do seu emprego na medicina.
- A associação do oleato de etoposídeo à LDE comparado à sua formulação comercial, fez com que o mesmo aumentasse seu tempo na circulação sanguínea, com um possível aumento no seu índice terapêutico.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADES, A., CARVALHO, J. P., GRAZIANI, S. R., AMANCIO, R. F., SOUEN, J. S., PINOTTI, J. A., MARANHÃO, R. C. Uptake of a protein free lipid emulsion by normal and neoplastic ovarian tissue. *Gynecol. Oncol.*, 82: 84,(2001).
- ALEXOPOULOS,C.G., BLASTIOS,B., AVGERINOS,A . Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients. *Cancer .*, 60: 3065,(1987).
- BROW,M.S.; KOVANEN,P.T; GOLDSTEIN J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Scienc.*,e 212:628,(1981).
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.*, 232:34(1986).
- BROWN, MS, GOLDSTEIN, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science*; 191:150, (1976).
- CHEN, H.W; KANDUTSCH, A. AA; HEININGER, H.J. The role of cholesterol in malignancy. *Proc. Exp. Tumor Res* ; 22:275,(1978).
- FERNANDES, C.D. Estabilidade e citotoxicidade do quimioterápico etoposídeo incorporado a uma emulsão lipídica rica em colesterol. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2002.
- 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* ;29:396,(1992).
- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, (1957) 206:2443.
- GABIZON, A; GOREN, D.; FUKD, Z.; MESHORER, A .; BARENHOLZ, Y. Superior therapeutic activity of liposome- associated adriamycin in a murine metastatic tumor model. *Br. J. Cancer* ;51: 681,(1985).

- GAL, D., MACDONALD, P.C., PORTER, J.C., SIMPSON, E.R. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoprotein metabolism. *Cancer Res*; 28:315,(1981).
- GOODMAN, L.S., GILMAM, A., As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 9a Ed., McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, RJ-Brasil, **1996**; Silva, P., Farmacologia, 5ª ed., Guanabara Koogan, (1998), RJ.
- GRAZIANI, S.R. Captação de uma microemulsão lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelo carcinoma de mama. *Gynecologic Oncology* ;85: 493,(2002).
- HALBERT, G. W.; STUART, J. F. B.; FLORENCE, A T. The incorporation of lipide-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. *Int. J. Pharm.*; 21:219,(1984).
- HIRATA, R. D., HIRATA, M. H., MESQUITA, C. H., CESAR, T. B., MARANHÃO, R. C., Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim. Biophys. Acta*; 1437: 53,(1999).
- HO, Y. K., SMITH, R. G., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells, *Blood*; 52: 1099, (1978).
- HUNGRIA, T.T.M.; CHIATTONE, C.S.; BARROS, J.C.; LATRILHA, M.C.; PILEGGI, F.; CHAMONE, D.A. F.; MARANHÃO, R.C. Plasma lipids and apolipoproteins in multiple myeloma patients. *Blood* ;86: 836,1995).
- HUNGRIA, T.T.M.; LATRILHA, M.C.; RODRIGUES, D.G.; BYDLOWSKI, S.P.; CHIATTONE, C.S.; MARANHÃO, R. C. 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*; 53:51,(2004).

JACKSON, R. L.; MORRISETT, J. D.; GOTTO JR., A. M. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Ver* ;56-2:259,(1976).

K.-H. PFLUGER; M. HAHN; J.-B. HOLZ; L. SCHMIDT; P. KOHL. Pharmacokinetics of etoposídeo: correlation of pharmacokinetic parameters with clinical conditions. *Cancer Chemother. Pharmacol* ;31: 350,(1993).

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

MARANHÃO, R. C., CESAR, T. B., PEDROSO-MARIANI, S. R., HIRATA, M. H., MESQUITA, C. H., Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lipids*; 28: 691,(1993).

MARANHÃO, R. C., GARICOCHEA, B., SILVE, E. L. DORLHIAC-LLACER, P., CADENA, S. M. S., COELHO, I. J. C., MENEGHETTI, J. C., PILEGGI, F. J. C., CHAMONE, D. A. F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res*; 54:4660,(1994).

MARANHÃO, R. C., ROLAND, I. A., TOFFOLETTO, O., RAMIRES, J. A., GONÇALVES, R. P., MESQUITA, C. H., PILEGGI, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*; 32: 627,(1997).

MARANHAO, R. C., TERCYAK, A. M., REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein free emulsion models of lipoproteins. *Biochim. Biophys Acta*; 875: 247,(1996).

MASQUELIER, M., VITOLS, S., PALSSON, M.; PETERSON, C. Low density lipoprotein as a carrier of cytostatics in cancer chemotherapy: Study of drug-carrier complexes in blood. *Jornal of Drug Targeting* ;8: 155,(2000).

- 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* ;46: 3842,(1986).
- MESQUITA, C.H. Análise compartimental auxiliar. São Paulo: Institutos de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), [Publicações IPEN]; 1994.
- MOSLEY, S. T., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., FALCK, J. R., ANDERSON, R. G. W., Targeted Killing of Cultured Cells by Receptor-Dependent Photosensitization, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* ;78: 5717,(1981).
- OWENS M. D., BAILLIE G. HALBERT G.W., Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphipathic apoprotein B receptor sequences, 228:109(1995).
- PETER, I ;SLEVIN, M. The clinical pharmacology of etoposídeo and teniposide. *Clinical Pharmacokinetic* ;12:223, (1987).
- PIAZZA, E.; CATTANEO, M., T.; VARINI, M. Pharmacokinetic studies in lung cancer patients. *Cancer* ;54:1187,(1984).
- REDGRAVE, T.G.; MARANHÃO, R.C. Metabolism of protein -free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim. Biophys. Acta* ;835:104,(1985).
- RODRIGUES, D.G.; COVOLAN, C.C.; CORADI, S.T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R.C. Use of a Cholesterol- Rich Emulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as a Vehicle for Paclitaxel. *Int. J. Pharm* ;54: 765,(2002).
- RUDLING, M. J., COLLINS, V. P., PETERSON, C. O . Delivery of Aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res* ;43:4600,(1983).

- RUDLING, M. J., STAHLE, L., PETERSON, C. O. SKOOG, L. Content of low-density lipoprotein receptors in breast cancer tissue related to survival of patients. *Br. Med. J* ;292: 580,(1986).
- RUDLING, M.J., ANGELIN, B., PETERSON, C. O, COLLINS, V.P. Low-density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumours and its relation to the cholesterol requirement. *Cancer Res* ;50: 483,(1990).
- RUDLING, M.J., ANGELIN,B., PETERSON,C.O., COLLINS, V. P. Low density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumours and its relation to the cholesterol requirement. *Cancer Res* ;50:483,(1990).
- 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. Câncer* ;68:319,(1993).
- SAMADI-BABOLI, M., FAVRE,G., BERNADOU,J., BERG, D.,SOULA,G. Comparative study of the incorporation of ellipticine-esters into low density lipoprotein (LDL) and selective cell uptake of drug-LDL complex via the LDL receptor pathway in vitro. *Biocherr. Pharmacol* ;40:203,(1990).
- SENGUPTA, S.; TYAGI, P.; CHANDRA, S; KOCHUPILLAI, V.; GUPTA, S. K. Encapsulation in cationic liposomes enhances antitumor efficacy and reduces the toxicity of etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Pharmacology*; 760,(2000).
- SENGUPTA, S.; VELPANDIAN, T.; SAPRA, P.; SANYAL, M.; GUPTA, S. K. Etoposide encapsulated long circulating liposomes: improved antitumor efficacy with reduced adverse effects. *Naunyn Schmeide-berg's Arch Pharmacol* ;358,(1998).
- VALDUGA, C. J., FERNANDES, D. C., LO PRETE, A. C., AZEVEDO, C. H. M., RODRIGUES, D. G., MARANHÃO, R. C., Use of a Cholesterol-Rich Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposide, *J. Pharm. Pharmacol*, 2003.

- VERSLUIS, A.J., VAN GEEL, P.J., OPPELAAR, H., VAN BERKEL, T.J.C.,
BIJSTERBOSCH, M.K. Receptor mediated uptake of low density lipoprotein by
b16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br.J. Cancer* ;525,(1996).
- 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*
;52:6244,(1992).
- VITOLS, S., SODERBERG-REID,K., MASQUELIER, M., SJOSTROM, B.,
PETERSON,C. Low density lipoprotein for delivery of a water alkylating agent to
malignant cells. In vitro and in vivo studies of a drug lipoprotein. *Br. J. Cancer*;
62:724,(1990).
- VITOLS, S., ANGELIN, B., ERICSSON, S., GAHRTTON, G., JUÇIUSSON, G.,
MASQUELIER,M., PAUL,C., PETERSON,C., RUDLING,M., SODERBERGREID,
K., TIDEFELIER,U. Uptake of low density lipoproteins by human leukemic cells in
vivo; Relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for seletive
chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci* (1987)87:2598.metastatic tumor model. *Br. J.*
Cancer ;51: 681,(1985).