

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Uso combinado de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão
lipídica no tratamento do câncer

Iara Fabricia Kretzer

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Uso combinado de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica no tratamento do câncer

Iara Fabricia Kretzer

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

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

K92u Kretzer, Iara Fabricia
 Usos combinados de sinvastatina e paclitaxel associado à
 nanoemulsão lipídica no tratamento do câncer / Iara Fabricia
 Kretzer. -- São Paulo, 2011.
 130p.

 Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
 Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
 e Toxicológicas.

 Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

 1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Câncer : Quimioterapia
 3. Nanotecnologia I. T. II. Maranhão, Raul Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Iara Fabricia Kretzer

Uso combinado de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica no tratamento do câncer

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2011.

DEDICATÓRIA

"Inestimável é o valor do sentimento que faz um homem e uma mulher se amarem com paixão, imaginação e ternura; desconhecê-lo é uma grande desventura."

Bertrand Russell

Dedico este trabalho ao meu marido **Fernando**, meu grande amor! Serei eternamente grata por todo o seu amor, pela compreensão, pelos abraços reconfortantes, pelas lágrimas enxugadas e pelo sorriso mais lindo do mundo. Sem você, nada disso seria possível.

"É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais."

Coelho Neto

Dedico este trabalho também aos meus queridos pais **Norberto e Leonida**. Pelo apoio e confiança em todas as horas. Por todo amor e toda torcida. Por sempre me ensinarem a viver, a acreditar em mim e a correr atrás dos meus sonhos. A vocês, todo o meu amor e gratidão...

AGRADECIMENTOS

.

"A gratidão é a memória do coração."

Jean Baptiste Massieu

*"Uma mulher é como um saquinho de chá, você nunca saberá quão forte
ele é até que ele esteja na água quente"*

Eleanor Roosevelt

Às minhas amadas irmãs **Lara** e **Sara**, exemplos de vida. Por terem me ensinado cada uma do seu jeito o significado de trabalho dedicado e perseverança. Obrigada pelo incentivo e afeto que ultrapassaram as barreiras da distância e me ajudaram a seguir em frente.

"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você."

Ralph Waldo Emerson

Aos eternos amigos **Araceli, Getúlio, Cristiane e Michelly**. Por toda cumplicidade ao longo de todos estes anos, pela felicidade que vocês me trazem, pela força que vocês me dão, e simplesmente, por fazerem de mim uma pessoa melhor.

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Sabino

Às companheiras de trabalho e queridas amigas **Thaís, Débora, Fabíola e Fátima.**

Por serem incentivadoras e cúmplices. Por toda indispensável ajuda, dedicação e carinho. Pelo lindo presente que é a vossa amizade. Vocês estarão sempre em meu coração.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de seu diretor, Professor Doutor Jorge Mancini Filho.

À Comissão de Pós Graduação (CPG) da FCF-USP em nome de sua presidente, Professora Doutora Bernadette Franco.

À Comissão Coordenadora de Programa (CCP) do Programa de Pós Graduação do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, em nome da Professora Doutora Primavera Borelli.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas (FBC) da FCF-USP, em nome da Professora Doutora Marina Baquerizo Martinez.

Ao meu orientador, Professor Titular Raul Cavalcante Maranhão, pela confiança depositada em mim, pelas oportunidades e por investir no meu crescimento e formação.

Ao Doutor Durvanei Augusto Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Departamento de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, por sempre manter as portas abertas, pela paciência, pelos ensinamentos e pela indispensável dedicação na co-orientação deste trabalho.

Ao professor Doutor Ricardo Ambrósio Fock do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, por sua receptividade e valiosa contribuição na realização das análises do perfil hematológico dos animais.

Às professoras Dottoras Lígia Ferreira Gomes e Elsa Masae Mamizuka do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da FCF-USP, pelas oportunidades, por acreditarem no meu potencial e por sempre se mostrarem disponíveis quando na necessidade de qualquer ajuda.

Ao professor Doutor Celso Spada do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelas oportunidades, pelas portas abertas e por ter me incentivado a entrar nesta jornada.

Aos companheiros de pós-graduação e funcionários do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR), pelo apoio, atenção e incentivo. A convivência com vocês foi uma experiência além de agradável, inesquecível.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Departamento de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, pela inestimável ajuda, amizade e bom humor.

À Claudete Valduga, Sheila Loyolla e Elaine Tavares, que sempre estiveram prontas para me dar dicas, conselhos e muito incentivo.

À funcionária da Secretaria do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR Cristiane Cagnin, pela amizade, disposição e ajuda.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, Ana Maria Dias Dantas, Sueli Providelo, Edna Batista Lima e Maria Auxiliadora Lima, pela paciência, competência, disposição e indispensável auxílio profissional.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da FCF-USP, Elaine Ychico, Edilson Feitosa e Jorge de Lima, pela preciosa atenção, por toda ajuda e pelas dúvidas esclarecidas.

À Penélope e Sophia, pelo amor incondicional e por me ensinarem todos os dias que as coisas mais simples podem trazer muita felicidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e apoio financeiro.

Aos membros da banca julgadora, pela atenção dispensada na avaliação deste trabalho.

*"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

RESUMO

KRETZER, Iara Fabricia. **Uso combinado de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica no tratamento do câncer.** 2011. 130p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Uma nova alternativa para o tratamento do câncer foi proposta em estudos anteriores, consistindo no uso de uma nanoemulsão lipídica como transportadora de agentes quimioterápicos às células neoplásicas. A redução da toxicidade da quimioterapia promovida pelo direcionamento específico de quimioterápicos às células tumorais nos levou a testar o potencial de aplicação do sistema de nanopartículas lipídicas na terapêutica combinada do paclitaxel com a sinvastatina, um agente hipolipemiante que pode ser empregado como coadjuvante no tratamento do câncer. Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação de células de melanoma B16F10, camundongos C57BL/6J receberam pela via intraperitoneal soluções de oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 μ mol/kg (Nano-paclitaxel), formulação comercial do paclitaxel 17,5 μ mol/kg, nanoemulsão lipídica (Nanoemulsão) e solução salina (Controle). A sinvastatina 50mg/kg/dia foi administrada por gavagem do 11° ao 19° dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com o Nano-paclitaxel (Nano-paclitaxel + Sinva), no grupo tratado com a formulação comercial do paclitaxel (Paclitaxel + Sinva) e como monoterapia (Sinva). Camundongos Balb-c saudáveis receberam os mesmos tratamentos para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos diferentes tratamentos. A terapia combinada Nano-paclitaxel + Sinva apresentou toxicidade negligível em comparação com a terapia combinada Paclitaxel + Sinva que provocou perda de peso e mielossupressão nos animais. Nos animais portadores de tumor, o tratamento Nano-paclitaxel + Sinva inibiu 95% do crescimento tumoral, comparado à inibição de 44% promovida pelo tratamento Paclitaxel + Sinva. Além disso, apenas 37% dos animais portadores de melanoma submetidos ao tratamento com Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram metástases, em contraste com 90% dos tratados com Paclitaxel + Sinva. A probabilidade de sobrevivência também foi maior nos camundongos tratados com o Nano-paclitaxel + Sinva em comparação aos tratados com Paclitaxel + Sinva. A análise de amostras de tumores por citometria de fluxo mostrou que somente nos grupos de animais tratados com Sinva, Nano-paclitaxel ou com a combinação Nano-paclitaxel + Sinva houve aumento na expressão de p21 em comparação ao grupo Controle. Da mesma forma, apenas nos grupos Sinva e Nano-paclitaxel + Sinva houve redução na expressão de ciclina D1 em comparação ao grupo Controle. O teste de viabilidade celular com rodamina 123 mostrou despolarização da membrana mitocondrial com redução no número de células tumorais viáveis em todos os grupos de tratamentos em comparação aos grupos Nanoemulsão e Controle. A avaliação histológica dos tumores demonstrou que os grupos Nanoemulsão e Controle apresentaram alta densidade de células tumorais,

diferentemente dos demais grupos de tratamento e que apenas os tumores do grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram aumento na presença de fibras de colágeno tipo I e III. Em comparação ao grupo Controle, os tumores dos grupos Sinva, Paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel e Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram redução na expressão imunohistoquímica de ICAM, MCP-1 e MMP-9 sendo que o grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentou a menor porcentagem de área marcada positivamente para a MMP-9. A terapia combinada com Nano-paclitaxel + Sinva é menos tóxica e mais efetiva na inibição do crescimento tumoral do que a mesma terapia com a formulação comercial do paclitaxel.

Palavras-Chave: Nanoemulsão lipídica. Terapia alvo. Paclitaxel. Sinvastatina. Tratamento do câncer.

ABSTRACT

KRETZER, Iara Fabricia. **Combined use of simvastatin and paclitaxel associated to a lipidic nanoemulsion in cancer treatment.** 2011. 130p. Thesis (Doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

In previous studies we have proposed a novel approach for cancer treatment consisting of the use of a lipid nanoemulsion as a vehicle to direct chemotherapeutic agents to neoplastic cells. Reduction of chemotherapy toxicity promoted by specific targeting of antineoplastic agents to tumor cells led us to test the application of the lipidic nanoparticle system in combined treatment with paclitaxel and simvastatin, a cholesterol-lowering drug that can be used as coadjuvant in cancer treatment. On days 11, 14 and 19 after B16F10 melanoma cells inoculation, C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with paclitaxel oleate associated to the lipidic nanoemulsion 17.5 $\mu\text{mol/kg}$ (Nano-paclitaxel), commercial formulation of paclitaxel 17.5 $\mu\text{mol/kg}$, lipidic nanoemulsion (Nanoemulsion) or saline solution (Control). Simvastatin 50 mg/kg/day was administered by gavage from days 11 to 19 after tumor inoculation in one group of animals treated with Nano-paclitaxel (Nano-paclitaxel + Simva), in the group treated with commercial formulation of paclitaxel (Paclitaxel + Simva) and as monotherapy (Simva). Evaluation of possible toxic effects of the treatments was accessed in healthy Balb-c mice. Combined therapy with Nano-paclitaxel + Simva showed negligible toxicity as compared with the combination of Paclitaxel + Simva which resulted in animal weight loss and myelosuppression. In tumor-bearing animals, treatment with Nano-paclitaxel + Simva resulted in a remarkable tumor growth inhibition rate of 95%, compared to a 44% inhibition rate promoted by treatment with Paclitaxel + Simva. Moreover, only 37% of melanoma bearing animals treated with Nano-paclitaxel + Simva developed metastasis, in contrast to 90% of those treated with Paclitaxel + Simva. Survival rates were also higher in mice treated with Nano-paclitaxel + Simva in comparison to Paclitaxel + Simva treated animals. Analysis of tumor samples by flow cytometry showed that only animals treated with Simva, Nano-paclitaxel or Nano-paclitaxel + Simva increased the expression of p21 in comparison to Control group. Also, tumors from animals treated with Simva or Nano-paclitaxel + Simva presented a decrease in the expression of cyclin D1 in comparison to Control group. Cell viability test with rhodamine 123 showed mitochondrial membrane depolarization with reduction of tumor viable cells in all treatment groups in comparison to Nanoemulsion and Control groups. The histological study revealed that in contrast to drugs treated groups, tumors from Nanoemulsion and Control groups presented high tumor cell density and only Nano-paclitaxel + Simva treated animals presented tumors with increased presence of collagen fibers I and III. In comparison to Control group, tumors from groups Simva, Paclitaxel + Simva, Nano-paclitaxel and Nano-paclitaxel + Simva showed a reduction in immunohistochemical expression of ICAM, MCP-1 and MMP-9 and the group

Nano-paclitaxel + Simva presented the lowest percentage of area positively stained for MMP-9. Combined therapy with Nano-paclitaxel + Simva was less toxic and more effective in promoting tumor growth inhibition than the same combined therapy with the commercial formulation of paclitaxel.

Keywords: Lipidic nanoemulsion. Drug targeting. Paclitaxel. Simvastatin. Cancer treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Probabilidade de sobrevivência de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	53
Figura 2 - Variação de peso em camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	55
Figura 3 - Aspecto físico de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	56
Figura 4 - Leucócitos de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	57
Figura 5 - Plaquetas de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	59
Figura 6 - Hemácias de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	60
Figura 7 - Hemoglobina de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	61
Figura 8 - Hematócrito de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	61
Figura 9 - Alanina aminotransferase (ALT) de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	63

Figura 10 - Aspartato aminotransferase (AST) de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	63
Figura 11 - Creatinina de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	64
Figura 12 - Creatinofosfoquinase (CK) de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	65
Figura 13 - Massa tumoral em camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10	66
Figura 14 - Representação da evolução da massa tumoral em camundongos C57BL/6J no 31º dia após a inoculação das células de melanoma B16F10	67
Figura 15 - Variação de peso em camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10	68
Figura 16 - Probabilidade de sobrevida de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma	69
Figura 17 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10	70
Figura 18 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com a nanoemulsão lipídica	71
Figura 19 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com sinvastatina	72

Figura 20 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	72
Figura 21 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com a terapia combinada com sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel	73
Figura 22 - Aspectos macroscópicos observados nas necropsias de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	74
Figura 23 - Desenvolvimento de metástases em camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	75
Figura 24 - Leucócitos de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	76
Figura 25 - Plaquetas de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	78
Figura 26 - Hemácias de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	79
Figura 27 - Hemoglobina de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	80
Figura 28 - Hematócrito de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	80
Figura 29 - Viabilidade celular determinada a partir do potencial elétrico mitocondrial de células obtidas do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	81

Figura 30 - Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial de células obtidas do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	82
Figura 31 - Expressão da proteína p27 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	83
Figura 32 - <i>Dot-plot</i> representativo da expressão de p27 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	84
Figura 33 - Expressão da proteína p21 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	85
Figura 34 - <i>Dot-plot</i> representativo da expressão de p21 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	85
Figura 35 - Expressão da proteína ciclina D1 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	86
Figura 36 - <i>Dot-plot</i> representativo da expressão de ciclina D1 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	87
Figura 37 - Células tumorais no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J,,,,,,.....	88
Figura 38 - Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J corados com hematoxilina-eosina	89
Figura 39 - Presença de colágeno I e III no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	90
Figura 40 - Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J corados com picrosirius red	91

Figura 41 - Expressão de ICAM no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	92
Figura 42 - Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BI/6J marcados com anticorpo anti-ICAM	93
Figura 43 - Expressão de MMP9 no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	94
Figura 44 - Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BI/6J marcados com anticorpo anti-MMP9	95
Figura 45 - Expressão de MCP-1 no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	96
Figura 46 - Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BI/6J marcados com anticorpo anti-MCP-1	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de tratamento para avaliação de toxicidade	45
Tabela 2 - Grupos de tratamento para avaliação de atividade antitumoral em camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10	47
Tabela 3 - Diferencial de leucócitos do sangue periférico de camundongos Balb-c tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	58
Tabela 4 - Atividade antitumoral em camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com a terapia combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica	66
Tabela 5 - Mortalidade de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10	69
Tabela 6 - Diferencial de leucócitos do sangue periférico de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
apo B-100	apolipoproteína B-100
apoE	apolipoproteína E
AST	aspartato aminotransferase
CDKs	quinases ciclina-dependentes
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEUAIB	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
CK	creatinofosfoquinase
DL50	dose letal mediana
DMT	dose máxima tolerada
EUA	Estados Unidos da América
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FPP	farnesil pirofosfato
GGPP	geranil-geranil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
H.E.	hematoxilina-eosina
HCL	ácido clorídrico
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1

ICT	inibição do crescimento tumoral
IL-8	interleucina 8
IMF	intensidade média de fluorescência
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LMA	leucemia mielóide aguda
MCP-1	proteína quimiotática monocítica-1
MMP-9	metaloproteinase de matriz-9
Nanoemulsão	nanoemulsão lipídica rica em colesterol
Nano-paclitaxel	oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg)
Nano-paclitaxel + Sinva	oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg) e sinvastatina (50mg/kg)
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ODNR	N-oleil-daunorubicina
Paclitaxel + Sinva	formulação comercial do paclitaxel (17,5 µmol/kg) e sinvastatina (50mg/kg)
PBS	tampão salina fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
rLDL	receptores de lipoproteína de baixa densidade
RNAi	ácido ribonucleico de interferência
Rod123	rodamina 123
rpm	rotações por minuto

Salina	solução salina 0,9%
Sinva	sinvastatina (50mg/kg)
T/C	relação entre a massa tumoral do animal tratado com a massa tumoral do animal controle
T-C	índice de retardamento do crescimento do tumor
Tris	base Tris(hidroxilamina)aminometano
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 NANOEMULSÃO LIPÍDICA RICA EM COLESTEROL	31
1.2 PACLITAXEL	33
1.3 ESTATINAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	35
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL	42
4.1.1 Animais	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol	43
4.2.2 Associação de oleato de paclitaxel à nanoemulsão lipídica	44
4.2.3 Avaliação da toxicidade dos tratamentos em camundongos Balb-c	44
4.2.3.1 Parâmetros hematológicos	45
4.2.3.2 Parâmetros bioquímicos	46
4.2.4 Avaliação de atividade antitumoral dos tratamentos no melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J	46
4.2.4.1 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos	46

4.2.4.2 Administração dos fármacos	47
4.2.4.3 Crescimento tumoral, variação de peso e probabilidade de sobrevida	48
4.2.4.4 Desenvolvimento de metástases	48
4.2.4.5 Parâmetros hematológicos	48
4.2.4.6 Potencial elétrico da membrana mitocondrial das células do tumor	49
4.2.4.7 Expressão dos marcadores de checagem do ciclo celular p27, p21 e ciclina D1 nas células do tumor	49
4.2.4.8 Análises histopatológicas dos tumores	50
4.2.4.8.1 <i>Expressão de ICAM(CD54), MMP-9 e MCP-1 no tumor</i>	51
4.2.5 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	53
5.1 TOXICIDADE	53
5.1.1 Probabilidade de sobrevida	53
5.1.2 Variação de peso	54
5.1.3 Parâmetros hematológicos	56
5.1.3.1 Leucócitos	56
5.1.3.2 Plaquetas	59
5.1.3.3 Eritrograma	59
5.1.4 Parâmetros bioquímicos.....	62

5.1.4.1 Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase	62
5.1.4.2 Creatinina	64
5.1.4.3 Creatinofosfoquinase	64
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL	65
5.2.1 Crescimento tumoral	65
5.2.2 Variação de peso	67
5.2.3 Probabilidade de sobrevida	68
5.2.4 Desenvolvimento de metástases	70
5.2.5 Parâmetros hematológicos	75
5.2.5.1 Leucócitos	75
5.2.5.2 Plaquetas	78
5.2.5.3 Eritrograma	79
5.2.6 Potencial elétrico da membrana mitocondrial das células do tumor	81
5.2.7 Expressão dos marcadores de checagem do ciclo celular p27, p21 e ciclina D1 nas células do tumor	83
5.2.8 Análises histopatológicas dos tumores	87
5.2.8.1 Expressão de ICAM no tumor	92
5.2.8.2 Expressão de MMP-9 no tumor	94
5.2.8.3 Expressão de MCP-1 no tumor	96

6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	128

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o entendimento dos mecanismos genético-moleculares implicados na gênese e na progressão de tumores permitiu o delineamento de novas estratégias para o tratamento do câncer. Neste cenário, o uso de regimes terapêuticos com múltiplos fármacos representa um avanço significativo no tratamento desta doença, pois possibilita o ataque a diferentes partes dos processos metabólicos das células tumorais aumentando, portanto, a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células cancerosas e reduzindo o desenvolvimento de resistência celular aos agentes quimioterápicos.

As abordagens recentes de complementação da quimioterapia convencional envolvem o emprego de agentes que atuam no microambiente tumoral alterando a dinâmica do crescimento dos tumores. Estas terapias inovadoras incluem o uso de agentes antiangiogênicos (BLUMENSCHNEIN et al., 2011; O'MALLEY et al., 2011; SANTOS; GOMEZ; RAEZ, 2011), modificadores de perfis de expressão gênica com oligonucleotídeos *antisense* de ácido ribonucleico de interferência (RNAi) (HOLT et al., 2011), inibidores de metaloproteinases (MANELLO; TONTI; PAPA, 2005; GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2011), inibidores de tirosina quinase (TKI) (PAPAETIS; SYRIGOS, 2009; ABOU-ALFA et al., 2010; PEMMARAJU et al., 2011), inibidores de citocinas pró-inflamatórias (IVANOV et al., 2011; CHAULET et al., 2011) e inibidores de quinases ciclina-dependentes (CDKs) (HEATHCOTE et al., 2010; DANHIER et al., 2010; ZULEHNER et al., 2011).

A dificuldade da combinação de diferentes fármacos para o tratamento do câncer se dá pelo acúmulo dos efeitos adversos de cada fármaco o que limita esta modalidade terapêutica. No intuito de minimizar os efeitos tóxicos da terapia combinada, opta-se pela redução da dose administrada de cada fármaco, ou pelo aumento do intervalo entre os ciclos de tratamento. Entretanto, estas modificações podem reduzir o número de células tumorais mortas em cada ciclo de tratamento e desta forma, reduzir a eficácia de terapias combinadas (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005).

Neste contexto, o aprimoramento da quimioterapia convencional através de estratégias que reduzam os efeitos adversos de agentes antineoplásicos é uma medida importante para a eficácia das terapias combinadas. Estas estratégias incluem sistemas de terapia alvo que se baseiam no direcionamento dos fármacos

aos tecidos neoplásicos melhorando a seletividade e especificidade do tratamento. Sistemas de terapia alvo incluem o uso de transportadores de fármacos como polímeros (ZHANG; FENG, 2006; ZHANG et al., 2010; MILANE; DUAN; AMIJI, 2011), emulsões lipídicas (MARANHÃO, et al., 1994; LUNDBERG, 1994; KAN et al., 1999; RENSEN et al., 2001; LUNDBERG et al., 2003), e lipossomas (SENGUPTA et al., 2001; MAMOT et al., 2003; FUJIMURA et al., 2006; HENEY et al., 2010; KOUDELKA et al., 2010).

1.1 NANOEMULSÃO LIPÍDICA RICA EM COLESTEROL

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é uma nanopartícula lipídica que transporta a maior parte do colesterol circulante no plasma humano. Através da proteína apolipoproteína B-100 (apo B-100) a LDL se liga a receptores específicos situados na superfície da membrana plasmática celular e é internalizada no citoplasma em vesículas que se fundem aos lisossomas (BROWN; GOLDSTEIN, 1986).

A estrutura lipídica da LDL pode ser produzida artificialmente em laboratório e estas nanopartículas lipídicas artificiais simulam o comportamento da LDL (GINSBURG; SMALL; ATKINSON, 1982). Em estudos prévios, Maranhão et al. (1992, 1993, 1997) demonstraram que uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol tem metabolismo semelhante ao da LDL nativa tanto em ratos, quanto em humanos. A nanoemulsão lipídica não possui proteínas em sua constituição, porém, no compartimento plasmático entra em contato com as lipoproteínas naturais e adquire apolipoproteínas, como a apolipoproteína E (apoE). A apoE modula o metabolismo da nanoemulsão lipídica servindo de ponte para sua ligação ao receptor de LDL (rLDL) e conseqüente captação pelas células (MARANHÃO et al., 1993).

A observação de que células neoplásicas apresentam superexpressão de receptores de LDL (HO et al., 1978) levou à hipótese de que a nanoemulsão lipídica poderia ser usada como transportadora de quimioterápicos, concentrando-os nos tecidos neoplásicos através da endocitose mediada pelos receptores de LDL (MARANHÃO et al., 1992).

Esta hipótese foi testada em estudo com pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) onde se verificou que a nanoemulsão lipídica foi removida com maior velocidade nestes pacientes do que nos pacientes do grupo controle. Além disso,

este estudo mostrou uma maior captação da nanoemulsão lipídica em áreas da medula óssea com infiltrado de células leucêmicas (MARANHÃO et al., 1994). Experimentos posteriores também confirmaram a captação e concentração da nanoemulsão lipídica no carcinoma de ovário (ADES et al., 2001) e no carcinoma de mama (GRAZIANI et al., 2002; MENDES et al., 2009).

A nanoemulsão lipídica foi então testada como transportadora dos quimioterápicos carmustina (MARANHÃO, et al., 2002; TEIXEIRA; CURI; MARANHÃO, 2004), paclitaxel (RODRIGUES, et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; DIAS et al., 2007; PIRES et al., 2009), etoposide (VALDUGA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2005; LO PRETE et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006) e daunorrubicina (TEIXEIRA et al., 2008; CONTENTE, 2011).

Quando incorporada à nanoemulsão lipídica, a carmustina apresentou diminuição dos seus efeitos adversos em pacientes com câncer em estágio avançado (MARANHÃO, et al., 2002) e promoveu inibição do crescimento do tumor de Walker 256 em ratos (TEIXEIRA; CURI; MARANHÃO, 2004).

A associação da nanoemulsão lipídica com o paclitaxel preservou a atividade citotóxica do fármaco e mostrou que sua dose máxima tolerada (DMT) em camundongos foi maior do que a DMT da formulação comercial do quimioterápico (RODRIGUES, et al., 2002). Com o objetivo de melhorar a estabilidade e taxa de incorporação do paclitaxel à nanoemulsão lipídica, o fármaco foi modificado quimicamente visando o aumento de sua lipofilicidade. A associação do derivado oleato de paclitaxel à nanoemulsão lipídica apresentou-se estável e não reduziu a ação citotóxica do quimioterápico. Além disso, a dose letal mediana (DL50) em camundongos foi cerca de dez vezes inferior à do fármaco comercial e a inibição do crescimento tumoral em camundongos foi superior quando comparado à formulação comercial do paclitaxel (RODRIGUES et al., 2005). A associação nanoemulsão-oleato de paclitaxel também foi testada em pacientes com tumores de ovário, endométrio, cérvix uterina e mama comprovando a captação do quimioterápico nos tecidos neoplásicos (DIAS et al., 2007; PIRES et al., 2009) com redução dos efeitos adversos observados com o uso do paclitaxel comercial (PIRES et al., 2009).

Nos estudos envolvendo o etoposide, o aumento da taxa de associação do fármaco à nanoemulsão lipídica também foi obtido pelo aumento da lipofilicidade da molécula com a obtenção do derivado oleato de etoposide (VALDUGA et al., 2003). Ensaio em camundongos mostraram que, além da redução da DMT, a preparação

nanoemulsão-oleato de etoposide teve maior efeito antitumoral quando comparada ao etoposide comercial (LO PRETE et al., 2006). Em ensaios clínicos com pacientes com câncer de ovário, Azevedo et al. (2005) observaram que a captação do oleato de etoposide associado à nanoemulsão lipídica pelo tecido tumoral foi quatro vezes superior ao tecido ovariano contralateral normal. Em outro estudo, Pinheiro et al. (2006) demonstraram que pacientes com linfoma tiveram a doença estabilizada durante o tratamento com o oleato de etoposide associado à nanoemulsão lipídica, sem a observação de efeitos adversos.

A incorporação da daunorrubicina à nanoemulsão lipídica também foi otimizada através da derivatização do fármaco e formação do oleato de daunorrubicina (TEIXEIRA et al., 2008). O tratamento de camundongos com a associação da N-oleil-daunorrubicina (ODNR) à nanoemulsão lipídica levou a redução da cardiotoxicidade promovida pela daunorrubicina comercial (TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA, et al., 2008). Além disso, Contente (2011) demonstrou que a associação nanoemulsão-ODNR foi mais eficaz na redução do crescimento do tumor melanoma B16F10 em camundongos do que a formulação comercial da daunorrubicina.

Os estudos com a nanoemulsão lipídica rica em colesterol demonstraram que este é um sistema promissor para o transporte de agentes quimioterápicos, com potencial de revolucionar o tratamento das neoplasias malignas.

1.2 PACLITAXEL

O paclitaxel é um fármaco extraído a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia* e sua atividade antitumoral foi detectada pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos da América (EUA) em 1962. A forma pura deste fármaco foi obtida em 1967 e sua estrutura foi descrita pela primeira vez apenas em 1971 (WANI et al., 1971). A disponibilização deste quimioterápico para o mercado farmacêutico foi inicialmente dificultada pelo suprimento limitado da árvore *Taxus brevifolia* e pela baixa solubilidade da sua molécula em água. Em meados dos anos 80 foi encontrada uma solução para o escasso suprimento do paclitaxel a partir do desenvolvimento de um método de produção semi-sintética. Neste caso, o fármaco foi obtido a partir de um precursor

não citotóxico extraído das folhas e de outros componentes de teixos mais abundantes, como o *Taxus baccata* (HORWITZ, 1992).

O paclitaxel tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de mama, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma de células não-pequenas de pulmão, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi associado com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOWER, 1990).

O mecanismo de ação do paclitaxel envolve a inibição da mitose através da polimerização da tubulina e conseqüente estabilização dos microtúbulos (MANFREDI; PARNES; HORWITZ, 1982; MANFREDI; HORWITZ, 1984; ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOWER, 1990). Os microtúbulos são essenciais para a manutenção da forma celular, transporte de organelas dentro das células e formação do fuso mitótico durante a divisão celular. A polimerização da tubulina promovida pelo paclitaxel gera microtúbulos disfuncionais e dessa forma, o ciclo celular é bloqueado na fase G₂M, impedindo a divisão celular (MANFREDI; PARNES; HORWITZ, 1982; MANFREDI; HORWITZ, 1984; HORWITZ et al., 1986; ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOWER, 1990).

O mecanismo preciso pelo qual a estabilização dos microtúbulos leva a apoptose das células não está totalmente esclarecido (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005), porém, sabe-se que alterações nos microtúbulos podem induzir a expressão do gene supressor de tumores p53 e de reguladores do ciclo celular como o p21/Waf-1, um inibidor de quinases ciclina-dependentes (CDKs). De fato, a apoptose induzida pelo paclitaxel pode ocorrer por dois mecanismos distintos, via independente de p53 e via dependente de p53 com acúmulo de células na fase G₁ do ciclo celular (WOODS et al., 1995; TISHER et al., 1995). Além disso, a apoptose induzida pelos taxanos também foi relacionada à inativação de membros da família de genes Bcl-x_L/Bcl-2, conhecidos por sua atividade antiapoptótica (GANANSIA-LEYMARIE; BISCHOFF; BERGERAT, 2003).

Os principais efeitos adversos do paclitaxel são a neurotoxicidade e a neutropenia. A neutropenia surge em aproximadamente 7 a 10 dias após o início do tratamento, regride em até 21 dias (ROWINSKY; DONEHOWER, 1991; PAZDUR et al., 1993; ROWINSKY, 1997; MICHAUD; VALERO; HORTOBAGYI, 2000) e sua gravidade está relacionada ao tempo em que a concentração plasmática do fármaco fica em torno de 0,05 µmol/L (GIANNI et al., 1995). Desta forma, a neutropenia é

mais grave em esquemas de infusão prolongada (EISENHOWER et al.,1994; GELDERBLOM et al.,2002).

Outros efeitos adversos do tratamento com o paclitaxel estão relacionados à toxicidade promovida pelo veículo da formulação. Por ser praticamente insolúvel em água, a formulação comercial do paclitaxel (Taxol[®]) é solubilizada em partes iguais de etanol e do surfactante Cremophor EL[®], um derivado poli-oxetilado de óleo de rícino (ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOWER, 1990; VAN ZUYLEN; VERWEIJ; SPARREBOOM, 2001).

O Cremophor EL[®] é comumente utilizado para a solubilização de compostos lipofílicos, porém, a quantidade necessária deste surfactante para solubilizar o paclitaxel é maior do que aquela necessária em outros compostos como a ciclosporina e o teniposide (O'DWYER et al., 1986; SINGLA; GARG; AGGARWAL, 2002). Os efeitos adversos relacionados ao uso do Cremophor EL[®] incluem reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, vasodilatação, dispnéia, letargia e hipotensão (WEISS et al., 1990; ROWINSKY; CAZENAVE; DONEHOWER, 1990; LIEBMANN; COOK; MITCHELL, 1993).

Tendo em vista os problemas associados ao uso do Cremophor EL[®] na formulação do paclitaxel, novas formulações deste fármaco estão sendo desenvolvidas. Estas formulações incluem o uso de veículos ou transportadores de fármacos como emulsões (SIMAMORA et al., 1998; RODRIGUES et al., 2002; LUNDBERG et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005), lipossomas (SAMPEDRO et al., 1993; SHARMA; STRAUBINGER, 1994; KOUDELKA et al., 2010), ciclodextrinas (SHARMA; BALASUBRAMANIAN; STRAUBINGER, 1995), polímeros (WALTER et al., 1994; WINTERNITZ et al., 1996; ZHANG; FENG, 2006) e proteínas (SPARREBOOM; BAKER; VERWEIJ, 2005).

1.3 ESTATINAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

As estatinas são agentes inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase que bloqueiam a biossíntese de colesterol (ENDO et al., 1977; CRESSMAN et al., 1988; COLLINS et al., 2003).

As estatinas são eficazes no tratamento da hipercolesterolemia tanto na diminuição da concentração sérica de colesterol total (cerca de 35%), como na diminuição de colesterol de LDL (cerca de 45%). No entanto, estes agentes têm

capacidade limitada na redução de triglicérides (cerca de 10%) e no aumento de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL, cerca de 5%) (TULENKO; SUMNER, 2002).

Funcionalmente, as estatinas podem ser classificadas pela sua hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, o que as distingue em grupos capazes de reduzir eventos cardíacos independentemente de suas atividades hipolipemiantes e anti-ateroscleróticas (ICHIHARA; SATOH, 2002). As estatinas hidrofílicas como a pravastatina não penetram nas bicamadas lipídicas e são internalizadas nos hepatócitos via transportadores aniônicos (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001; PARKER et al., 2003). Em contraste, as estatinas lipofílicas como a lovastatina, sinvastatina e fluvastatina, atravessam diretamente as membranas celulares e apresentam além dos efeitos de redução de colesterol, efeitos pleiotrópicos (ICHIHARA; SATOH, 2002).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas dependem da ativação de algumas proteínas que interferem em importantes vias de sinalização celular. Essas vias são relacionadas a genes que condicionam a síntese de citocinas inflamatórias, fatores de coagulação, ou a maior expressão de óxido nítrico (McFARLANE; MUNIYAPPA; FRANCISCO, 2002). Desta forma, as estatinas promovem efeitos antiinflamatórios, melhoram o balanço da hemostasia e a recuperação da vasorreatividade dependente do endotélio (O'DRISCOLL; GREEN; TAYLOR, 1997; LAUFS; LIAO, 1998; McFARLANE; MUNIYAPPA; FRANCISCO, 2002; LIAO; LAUFS, 2004; DULAK; JÓZKOWICZ, 2005).

Ao inibirem a enzima HMG-CoA redutase, as estatinas inibem a formação de mevalonato, precursor de geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Estes compostos atuam na regulação do ciclo celular e são responsáveis pela isoprenilação das proteínas intracelulares Ras e Rho (KELVIN et al., 2003; DULAK; JÓZKOWICZ, 2005).

As proteínas Ras e Rho regulam a tradução de receptores de membrana responsáveis pela transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação e apoptose. Tendo em vista que as estatinas inibem a isoprenilação e conseqüentemente, a ativação das proteínas intracelulares Ras e Rho, e que os genes que codificam estas proteínas encontram-se mutados em diversos tumores como pâncreas, cólon, pulmão e leucemia (BOS, 1989; SUWA et al., 1998; VAN GOLEN et al., 2000; JOHNSON et al., 2001; KUSAMA et al., 2003; KONDO et al.,

2004), levantou-se a hipótese de que as estatinas podem ser úteis na prevenção e tratamento do câncer (NARISAWA et al., 1994; SOMA et al., 1995; WONG et al., 2002; KELVIN et al., 2003; KAUSHAL et al. 2003; HINDLER et al., 2006).

Estudos demonstraram que as estatinas induzem apoptose e inibem o crescimento de diversas linhagens de células tumorais como melanoma (SOMA et al., 1995; DEMIERRE et al., 2005; SHELLMAN et al., 2005; SAITO et al., 2008), glioma (SOMA et al., 1995; KOYUTURK; ERSOZ; ALTIOK, 2004), neuroblastoma (GIRGERT et al. 1999), cólon (CHO; KIM; KIM, 2008), mama (CAMPBELL et al., 2006), linfoma (TRESCKOW et al., 2007) e linhagens de células leucêmicas (DIMITROULAKOS et al., 2001; YANG et al., 2008).

As estatinas promovem o bloqueio do ciclo celular na fase G₁S acompanhada do aumento dos inibidores de quinases ciclina-dependentes (CDKs) p21/Waf-1 e p27KIP que atuam na regulação do ciclo celular (LEE et al., 1998; DENOYELLE et al., 2001; WACHTERSHAUSER et al., 2001; SAITO et al., 2008).

O mecanismo de indução de apoptose pelas estatinas parece ser resultado da depleção da isoprenilação de proteínas Ras e Rho pelo GPP (XIA et al., 2001; KELVIN et al., 2003). DENOYELLE et al. (2003) confirmaram a inibição das vias de sinalização RhoA/ROCK e Rho/AKT após o tratamento de células de câncer de mama com cerivastatina. Este estudo também demonstrou que as células tratadas com a estatina apresentaram redução de ciclina D1 e da metaloproteinase 9 (MMP-9) e aumento do inibidor de CDKs p21/Waf-1. Além disso, a redução da proteína antiapoptótica Bcl-2 e o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax também foram associados aos mecanismos de indução de morte celular promovido pelas estatinas (AGARWAL et al.; 1999; KELVIN et al., 2003).

Outros efeitos da ação das estatinas em células tumorais estão relacionados às alterações na adesão celular e diminuição da capacidade metastática das células (COLLISSON et al., 2003; KELVIN et al., 2003; GLYNN et al., 2008). Estes efeitos também foram demonstrados por TAKEDA et al. (2007) ao tratar células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço com a sinvastatina. O estudo demonstrou que o tratamento com sinvastatina resultou em mudanças na adesão das células à matriz extracelular através da inativação da integrina β 1 reduzindo, portanto, o potencial de invasão das células tumorais.

Os efeitos das estatinas em células tumorais levantaram a hipótese de que seu uso combinado com agentes antineoplásicos poderia aumentar a eficácia da

terapia antitumoral através da soma dos efeitos de cada fármaco ou por sinergismo entre eles (KELVIN et al., 2003). De fato, as estatinas levaram ao aumento da indução de apoptose e da atividade antitumoral de fármacos como carmustina, cisplatina, 5-fluorouracil, doxorubicina e paclitaxel (SOMA et al., 1995; ILISKOVIC; SINGAL, 1997; AGARWAL et al., 1999; HOLSTEIN; HOHL, 2001; FELESZKO et al., 1998; FELESZKO et al., 2000; FELESZKO et al., 2002).

No entanto, a terapia combinada com estatinas e fármacos antineoplásicos deve considerar a possibilidade de aumento dos seus efeitos adversos como miopatia, rabdomiólise e hepatotoxicidade (TOBERT, 1988; FARMER; TORRE-AMIONE, 2000; MARON; FAZIO; LINTON, 2000; BAKER; TARNOPOLSKY, 2001; KELVIN et al., 2003; HINDLER et al., 2006). Estes efeitos tóxicos são dose-dependentes e pelo fato das estatinas serem substratos das enzimas CYP3A4 e CYP2C9, as interações com outros fármacos metabolizados por estas enzimas podem potencializar seus efeitos adversos (KELVIN et al., 2003; JACOBSON, 2004; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006). A incidência da miopatia, por exemplo, pode aumentar em até cinco vezes quando as estatinas são coadministradas com outros fármacos como fibratos, bloqueadores de canais de cálcio, ciclosporina, agentes antifúngicos e drogas antiretrovirais (MALTZ; BALOG; CHEIGH, 1999; OMAR; WILSON, 2002; FICHTENBAUM et al., 2002; LEWIN; NAPPI; TAYLOR, 2002; ASBERG, 2003; SKAUKAT et al., 2003; JACOBSON, 2004; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006).

As estatinas têm sido demonstradas como fármacos potenciais para o tratamento do câncer devido aos seus efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e de inibição de invasão do tumor. Desta forma, seu uso como adjuvante da quimioterapia representa uma abordagem promissora para o tratamento do câncer.

2 JUSTIFICATIVA

A terapia combinada é uma estratégia terapêutica que visa utilizar medicamentos que atuam em diferentes passos dos processos metabólicos das células, possibilitando dessa forma, a destruição de uma maior quantidade de células tumorais. Neste contexto, vários estudos têm chamado a atenção para o uso promissor de estatinas combinadas com agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer (SOMA et al., 1995; THIBAUT et al., 1996; FELESTKO et al., 1998; BOUTERFA et al., 2000; DENOYELLE et al., 2001; DIMITROULAKOS et al., 2001; KELVIN et al., 2003).

A maioria dos ensaios clínicos com estatinas para tratamento do câncer fazem o uso contínuo destes fármacos em doses baixas para redução do risco de aparecimento dos seus efeitos colaterais, incluindo rabdomiólise, miopatia, e hepatotoxicidade (HINDLER et al., 2006). Esta conduta leva em conta que os efeitos debilitantes da quimioterapia e do próprio tumor fazem com que os pacientes com câncer tenham maior risco de sofrerem os efeitos adversos das estatinas. Além disso, estes pacientes geralmente fazem uso concomitante de outros fármacos como a ciclosporina, que é conhecida por interferir no metabolismo hepático das estatinas através do citocromo P-450, aumentando portanto, seus efeitos tóxicos (ASBERG, 2003; KELVIN et al., 2003; HINDLER et al., 2006; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006). Assim, o uso combinado de estatinas com agentes antitumorais deve ser feito com cautela, em especial no caso do uso combinado da sinvastatina, substrato da enzima CYP3A4, com o paclitaxel que é metabolizado por esta enzima.

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstramos que a associação de agentes quimioterápicos à nanoemulsão lipídica rica em colesterol concentrou estes fármacos nos tecidos neoplásicos, aumentando a eficácia dos mesmos (MARANHÃO et al., 2002; TEIXEIRA; CURI; MARANHÃO, 2004; AZEVEDO et al., 2005; LO PRETE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2005; KRETZER, 2007; MENDES et al., 2009; PIRES et al., 2009; CONTENTE, 2011). O direcionamento específico da quimioterapia às células tumorais, promovido pela nanoemulsão lipídica, reduziu drasticamente os efeitos adversos observados com o uso da formulação comercial de agentes antineoplásicos como o paclitaxel (RODRIGUES et al., 2005; PIRES et al., 2009). Esta redução de toxicidade nos levou a testar o potencial de aplicação do sistema de nanopartículas lipídicas na

terapêutica combinada de sinvastatina com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica.

3 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da terapia antitumoral combinada de sinvastatina com paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica em camundongos com implante de melanoma B16F10.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos tóxicos da administração combinada da sinvastatina com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica em comparação com a administração da sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel e com a monoterapia com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica;
- Comparar a eficácia da terapia antitumoral combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica com a terapia combinada com sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel;
- Comparar a eficácia da terapia antitumoral combinada com sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica com a monoterapia com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os lípides trioleína, oleato de colesterol e colesterol utilizados na produção das emulsões, foram adquiridos da Nu-Check Prep. (Elysian, EUA). A fosfatidilcolina foi obtida da Lipid Products (Surrey, Inglaterra). A sinvastatina (Zocor[®]) foi adquirida da Merck Sharp & Dohme (Campinas, Brasil). O paclitaxel foi adquirido da Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, EUA), o óleo de castor polietoxilado (Cremophor[®] EL) e demais solventes orgânicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

Os equipamentos utilizados foram: disruptor de células ultrasônico Branson Ultrasonic Corporation (Danbury, EUA), ultracentrífuga com rotor Beckman SW41 (Beckman Coulter Inc., Brea, EUA), analisador de potencial zeta e de distribuição de tamanho de partículas Laser Scattering Zeta PALS[®] - Zeta Potential Analyser (Brookhaven Instruments Co, Holtsville, EUA), contador de células hematológicas automatizado HemoCounter ABCVet[®] (Horiba ABX, Irvine, EUA), agitador vórtex Thermolyn[®] 37600 mixer, centrífuga de tubos Eppendorf (Hamburg, Alemanha), citômetro FACScalibur[®] (Becton & Dickinson, San Jose, EUA), câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal[®] (Dako, Carpinteria, EUA), microscópio Nikon Eclipse 80i acoplado com câmera digital Nikon (Tóquio, Japão), analisador de parâmetros bioquímicos automatizado Roche Hitachi Modular[®] Analytics P800 (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA).

4.1.1 Animais

Nos experimentos de avaliação toxicológica dos tratamentos propostos foram utilizados camundongos Balb-c fêmeas, com peso médio de 20g e com aproximadamente dois meses de idade.

Para os estudos com o tumor de melanoma B16F10 foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6J fêmeas, com peso médio de 20g e com aproximadamente dois meses de idade.

Os camundongos foram cedidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Os animais durante o procedimento experimental foram

mantidos no biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, temperatura constante de 20°C, água filtrada e esterilizada, e ração Purina® esterilizada *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAIB) do Instituto Butantan (Protocolo CEUAIB nº 638/09) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF-USP (Protocolo CEEA nº 246).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol

A nanoemulsão lipídica foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg; Small e Atikson (1982), modificada por Maranhão et al. (1993). Em um frasco foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína, e 0,5 mg de colesterol livre, dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). A mistura de lípides foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37°C) e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas, a 4°C, para a remoção total dos resíduos de solventes. A seguir, foram adicionados 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, e a suspensão de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante três horas, sob atmosfera de nitrogênio e com temperatura variando entre 51 e 55°C. A irradiação ultrassônica foi realizada com uma potência de 125 watts, em modo contínuo de operação por um disruptor de células Branson, modelo B 450, equipado com ponta de titânio com 1 cm de diâmetro.

Ao término da irradiação ultrassônica a nanoemulsão lipídica foi purificada por ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 30 minutos, 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 duas horas, a 4°C, após adição de brometo de potássio sólido, para ajustar a densidade em 1,210 g/mL. Do sobrenadante foram removidos 2,0 mL, os quais contêm a fração das partículas de tamanho e composição desejados.

A nanoemulsão lipídica foi dialisada utilizando-se 4,0 mL de tampão estéril TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, e saco de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA), por 16 horas, a 4°C, para a total remoção dos sais de brometo

de potássio utilizados na etapa final de purificação. A nanoemulsão lipídica foi então submetida à esterilização por filtração em filtros com poros de 0,2 μ de diâmetro (Millipore, São Paulo, SP).

Todo o procedimento de preparo da nanoemulsão lipídica foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical para evitar a contaminação por microorganismos.

4.2.2 Associação do oleato de paclitaxel à nanoemulsão lipídica

O derivado do paclitaxel, oleato de paclitaxel, modificado como descrito anteriormente (Rodrigues et al., 2005), foi associado à nanoemulsão lipídica numa razão 10:1 em massa de lípidos e fármaco. O paclitaxel foi dissolvido em etanol, sob agitação, até completa solubilização para posterior adição da nanoemulsão lipídica à solução de oleato de paclitaxel. A incorporação foi realizada por irradiação ultrassônica por 40 minutos com temperatura variando entre 50 e 55°C. As preparações foram realizadas no mesmo dia dos respectivos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 μ m.

4.2.3 Avaliação da toxicidade dos tratamentos em camundongos Balb-c

Nos dias 1, 4 e 9, camundongos Balb-c fêmeas sem tumor receberam pela via intraperitoneal soluções de oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 μ mol/kg (19 mg/kg), paclitaxel 17,5 μ mol/kg (15 mg/kg), nanoemulsão lipídica e solução salina 0,9%. A sinvastatina 50 mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 1° até o 9° dia de experimento, em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 22 dias e os animais foram pesados a cada dois dias durante este período.

Tabela 1 – Grupos de tratamento para avaliação de toxicidade

Grupo	Tratamento	Dia de administração	Via de administração	Número de animais
Controle	Solução salina	1, 4 e 9	Intraperitoneal	10
	Solução salina	1 ao 9	Oral	
Nanoemulsão	Nanoemulsão lipídica	1, 4 e 9	Intraperitoneal	10
Sinva	Sinvastatina (50mg/kg)	1 ao 9	Oral	10
Paclitaxel + Sinva	Formulação comercial do paclitaxel (17,5 µmol/kg)	1, 4 e 9	Intraperitoneal	10
	Sinvastatina (50mg/kg)	1 ao 9	Oral	
Nano-paclitaxel	Oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg)	1, 4 e 9	Intraperitoneal	10
Nano-paclitaxel + Sinva	Oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg)	1, 4 e 9	Intraperitoneal	10
	Sinvastatina (50mg/kg)	1 ao 9	Oral	

4.2.3.1 Parâmetros hematológicos

O perfil hematológico dos animais foi determinado em cinco datas distintas durante 24 dias: nos dias posteriores à administração da quimioterapia (2, 5 e 10), e nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento dos animais pós-quimioterapia (17° e 24° dia). As amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo submandibular dos camundongos de acordo com os protocolos do *National Institutes of Health*, EUA (ARAC, 2010).

As amostras foram processadas em equipamento HemoCounter ABCVet® no Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP. Foram realizadas as contagens de leucócitos totais, plaquetas e hemácias, além da determinação da concentração de hemoglobina e da porcentagem do hematócrito dos animais. A contagem diferencial de leucócitos foi

feita em extensão sanguínea corada com o corante May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (1947).

4.2.3.2 Parâmetros bioquímicos

Com a finalidade de se avaliar a presença de possíveis efeitos tóxicos do uso combinado da sinvastatina como coadjuvante da quimioterapia com o paclitaxel em alguns órgãos como fígado, músculos e rins, mensuramos a atividade plasmática das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinofosfoquinase (CK) e a concentração plasmática de creatinina.

O plasma dos animais foi obtido a partir de amostras de sangue periférico coletadas nos dias posteriores à administração da quimioterapia (5 e 10), e finalmente, nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento dos animais pós-quimioterapia (17° e 24° dia).

As amostras de plasma foram processadas em equipamento automatizado Roche Hitachi Modular[®] Analytics P800 no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. A atividade das enzimas ALT, AST e CK foi determinada pelo método cinético automatizado e a concentração de creatinina foi determinada pelo método colorimétrico cinético.

4.2.4 Avaliação de atividade antitumoral no melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J

4.2.4.1 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos

Aproximadamente 100 μ L de solução tampão salina fosfato (PBS) contendo 5×10^4 células de melanoma B16F10 viáveis foram injetadas subcutaneamente na região dorsal previamente depilada de camundongos C57BL/6J fêmeas.

A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se o corante azul de trypan, o qual cora o núcleo celular das células inviáveis.

Após a implantação do tumor, os animais foram observados a cada 72 horas e o crescimento tumoral foi acompanhado até o diâmetro médio de 0,5 cm, sem a

presença de ulcerações ou necroses. Os tumores puderam ser visualizados macroscopicamente entre o 10º e o 14º dia após a inoculação das células de melanoma.

4.2.4.2 Administração dos fármacos

Nos 11º, 14º e 19º dias após a inoculação do melanoma B16F10, foram injetadas intraperitonealmente soluções de oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 µmol/kg (19 mg/kg), formulação comercial do paclitaxel 17,5 µmol/kg (15 mg/kg), nanoemulsão lipídica e solução salina 0,9%. A sinvastatina 50 mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11º até o 19º dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

Tabela 2 – Grupos de tratamento para avaliação de atividade antitumoral

Grupo	Tratamento	Dia de administração	Via de administração	Número de animais
Controle	Solução salina	11, 14 e 19	Intraperitoneal	23
	Solução salina	11 ao 19	Oral	
Nanoemulsão	Nanoemulsão lipídica	11, 14 e 19	Intraperitoneal	17
Sinva	Sinvastatina (50mg/kg)	11 ao 19	Oral	13
Paclitaxel + Sinva	Formulação comercial do paclitaxel (17,5 µmol/kg)	11, 14 e 19	Intraperitoneal	13
	Sinvastatina (50mg/kg)	11 ao 19	Oral	
Nano-paclitaxel	Oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg)	11, 14 e 19	Intraperitoneal	16
Nano-paclitaxel + Sinva	Oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 µmol/kg)	11, 14 e 19	Intraperitoneal	13
	Sinvastatina (50mg/kg)	11 ao 19	Oral	

4.2.4.3 Crescimento tumoral, variação de peso e probabilidade de sobrevivida

A atividade antitumoral da terapia combinada com sinvastatina e com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica foi avaliada a partir de protocolo estabelecido pelo *National Cancer Institute*, EUA (PLOWMAN et al., 1997).

O peso dos animais e o crescimento da massa tumoral foram avaliados três vezes por semana com auxílio de um paquímetro até o 31º dia após o início do experimento. Observações diárias da taxa de sobrevivida dos animais foram realizadas até o 60º dia de experimentação.

Para tumores implantados por via subcutânea, a massa do tumor é estimada a partir do seu diâmetro, sendo calculada de acordo com a expressão (GERAN et al., 1972; PLOWMAN et al., 1997):

$$\text{Massa Tumoral (mg)} = \text{Comprimento (mm)} \times [\text{largura (mm)}]^2 / 2$$

4.2.4.4 Desenvolvimento de metástases

Após a morte dos animais, realizou-se necropsia para a coleta de tumores dorsais, identificação de lesões internas macroscópicas e registro fotográfico.

A partir das observações das necropsias dos animais foi possível a determinação do percentual de camundongos que desenvolveram nódulos metastáticos em todos os grupos de tratamento.

4.2.4.5 Parâmetros hematológicos

O perfil hematológico dos animais portadores de melanoma B16F10 foi determinado em seis datas distintas durante 34 dias: um dia antes da implantação do tumor (valor basal), nos dias posteriores à administração da quimioterapia (12, 15 e 20), e finalmente, nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento do perfil hematológico pós-quimioterapia (27º e 34º dia).

As amostras de sangue periférico foram colhidas e processadas conforme descrito no item 4.2.3.1.

4.2.4.6 Potencial elétrico da membrana mitocondrial das células do tumor

Três camundongos de cada grupo de tratamento foram sacrificados por deslocamento cervical, 48 horas após do fim dos tratamentos dos animais, para a coleta dos tumores dorsais.

A viabilidade celular foi estimada a partir da determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células dos tumores coletados. Esta análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda a rodamina 123 (Rod123) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA).

Os tumores foram macerados em PBS e a suspensão celular obtida foi filtrada. Em seguida, foi adicionada solução de álcool-RNAase e a amostra foi centrifugada por dez minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* celular adicionou-se tampão FACSFLOW[®] (Becton & Dickinson – BD, San Jose, EUA). Para cada 100 µL de suspensão celular contendo 10⁶ células, utilizou-se 5 µL do reagente rodamina 123 (5 mg/mL).

As amostras foram analisadas com o sistema de citometria de fluxo FACScalibur[®] (Becton & Dickinson – BD, San Jose, EUA) no canal FL1-H (515-530 nm). Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos para cada amostra utilizando-se o programa CellQuest[®]. Os dados foram analisados nos programas WinMDI 2.8[®] e os resultados reportados como intensidade média de fluorescência (IMF).

4.2.4.7 Expressão dos marcadores de checagem do ciclo celular p27, p21 e ciclina D1 nas células do tumor

A expressão das proteínas p27, p21 e ciclina D1 foi determinada em células de tumores dorsais de melanoma B16F10 coletados conforme descrito no item 4.2.4.6.

Foram preparados macerados dos tumores em PBS, filtragem da suspensão celular obtida, adição de solução de álcool-RNAase e centrifugação da amostra conforme descrito no item 4.2.4.6. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* celular adicionou-se tampão FACSFLOW[®] (Becton & Dickinson – BD, San Jose, EUA) e 10 µL de Triton X-100 (0,1%) para permeabilização das células. Em seguida, para cada 100 µL de suspensão celular contendo 10⁶ células adicionou-se 1 µg dos anticorpos

primários específicos para p27, p21 e ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA). As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C, lavadas com tampão FACSFlow[®], centrifugadas por dez minutos a 2.000 rpm e ressuspensas em tampão FACSFlow[®]. Para cada 100 µL de suspensão celular contendo 10⁶ células, adicionou-se 1 µg de anticorpo secundário anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA). Após a lavagem das células com tampão FACSFlow[®] (Becton & Dickinson – BD, San Jose, EUA) e posterior centrifugação por dez minutos a 2.000 rpm, adicionou-se às amostras solução de paraformaldeído 1%.

As amostras foram analisadas com o sistema de citometria de fluxo FACScaliburR[®] (Becton & Dickinson – BD, San Jose, EUA) no canal FL1-H (515-530 nm). Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos para cada amostra utilizando-se o programa CellQuestR[®]. Os dados foram analisados nos programas WinMDI 2.8[®] e os resultados reportados como porcentagem de células positivas.

4.2.4.8 Análises histopatológicas dos tumores

Os tumores dorsais dos camundongos foram coletados conforme descrito no item 4.2.4.4 e imersos em solução tamponada de formalina 10%. As amostras foram embebidas em parafina para posterior realização de cortes histológicos de 5 µm e montagem das lâminas histológicas. A desparafinização das lâminas foi feita com três banhos em xilol de 10 minutos cada, seguidos de três banhos em etanol absoluto, dois banhos em solução de etanol 95% e um banho em solução de etanol 75%.

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H.E.) e com picrossirus red. Fotomicrografias de três campos por amostra, em aumento de 200x, foram feitas com câmera digital acoplada em microscópio Nikon 80i (Tóquio, Japão). As fotomicrografias foram analisadas com o software de análise de imagens NIS-Elements 3.2 AR (Nikon, Tóquio, Japão) para quantificação da celularidade tumoral nos cortes histológicos corados com H.E. e da porcentagem de área de fibras de colágeno tipo I e III coradas pelo picrossirus red em cada campo.

4.2.4.8.1 Expressão de ICAM (CD54), MMP-9 e MCP-1 no tumor

Para realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas dos cortes histológicos foram previamente desparafinizadas conforme descrito no item 4.2.4.8 e submetidas ao processo de recuperação de antígeno por calor úmido e pressão em câmara de pressão (Pascal[®], Dako, Carpinteria, EUA) com tampão citrato 10 mM, pH 6,0. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através de quatro banhos, de cinco minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com a incubação das lâminas com soro fetal bovino diluído em PBS, por uma hora em câmara úmida com temperatura de 37°C. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4°C com os anticorpos primários anti-ICAM/CD54 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) título 1:100, anti-MMP-9 (Abcam, Cambridge, EUA) título 1:100 e anti-MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) título 1:10. O sistema de detecção utilizado foi o polímero Superpicture[®] (Dako, Carpinteria, EUA) e as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, EUA) e contra-coradas com hematoxilina de Harris.

Os cortes histológicos foram analisados em microscopia óptica e fotomicrografias de três campos por amostra, em aumento de 200x, foram feitas com câmera digital acoplada ao microscópio Nikon 80i (Tóquio, Japão). As fotomicrografias foram analisadas com o software de análise de imagens NIS-Elements 3.2 AR (Nikon, Tóquio, Japão) para quantificação da porcentagem da área marcada com o cromógeno DAB em cada campo fotografado. A expressão de cada antígeno nos tumores dos diferentes grupos de tratamento foi calculada a partir da média da porcentagem da área marcada em todos os campos medidos para cada corte histológico.

4.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância simples (One way ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni para comparação dos grupos de tratamento com uma variável, ou pela análise de variância (Two way ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, para comparação dos grupos de tratamento com duas variáveis. A probabilidade de sobrevida foi analisada com curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. O

desenvolvimento de metástases foi analisado com teste exato de Fisher calculado a partir de tabelas de contingência. Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.0. Os níveis críticos para significância foram de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TOXICIDADE

5.1.1 Probabilidade de sobrevida

A Figura 1 representa as curvas de probabilidade de sobrevida dos animais tratados com solução salina (Controle), nanoemulsão lipídica (Nanoemulsão), sinvastatina (Sinva), sinvastatina e paclitaxel comercial (Paclitaxel + Sinva), oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (Nano-paclitaxel) e sinvastatina e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (Nano-paclitaxel + Sinva). Os animais do grupo Paclitaxel + Sinva apresentaram probabilidade de sobrevida reduzida em comparação aos demais grupos ($p < 0,0001$). Como mostrado na Figura 1, 54% dos animais deste grupo morreram até o quarto dia de experimento, antes mesmo da administração da segunda dose do tratamento. No final do período experimental a taxa de sobrevivência foi de apenas 36% no grupo Paclitaxel + Sinva, 91% no grupo Nano-paclitaxel e de 100% para os demais grupos de tratamento.

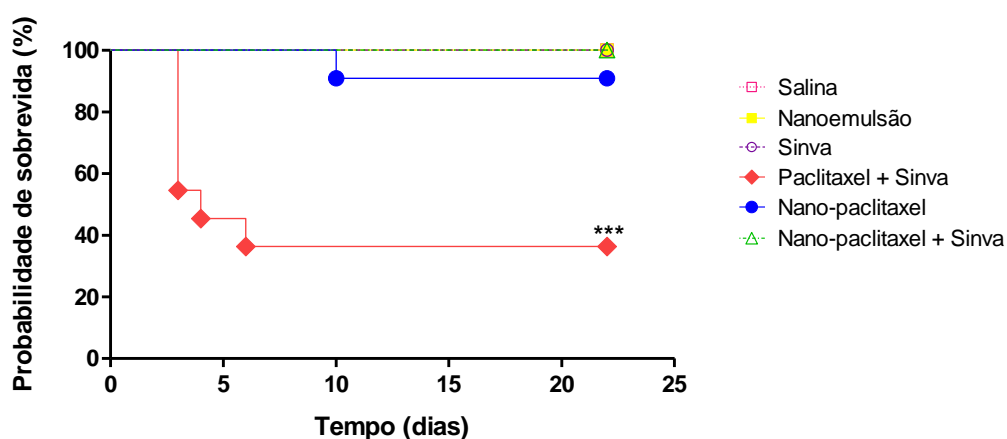


Figura 1. Probabilidade de sobrevida de camundongos Balb-c tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1° até 9° dia de experimento. Os animais foram observados diariamente por 22 dias ($n = 10$). *** Paclitaxel + Sinva vs todos os grupos ($p < 0,0001$).

5.1.2 Variação de peso

A variação de peso dos animais está representada na Figura 2 e observa-se a perda de peso acentuada no grupo tratado com a combinação de sinvastatina com o paclitaxel em sua formulação comercial. Os animais deste grupo perderam em média 6,4% do seu peso corpóreo inicial após a administração da primeira dose de quimioterapia, e 12,7% após a segunda dose de quimioterapia (Figura 2A). Após a última administração de quimioterapia, os animais do grupo Paclitaxel + Sinva apresentaram redução de peso de 12,4% em relação ao seu peso inicial (Figura 2B). Em contraste, os camundongos dos demais grupos de tratamentos ganharam peso ao longo do experimento (Figura 2A). No fim do tratamento o ganho de peso foi de 3,4% no grupo Nano-paclitaxel + Sinva, 2,2% no Nano-paclitaxel, 1,2% no grupo Sinva, 1,3% no grupo Nanoemulsão, e 1,4% no grupo Controle (Figura 2B).

Fotos ilustrativas dos aspectos macroscópicos dos animais no dia posterior ao fim dos tratamentos estão representadas na Figura 3.

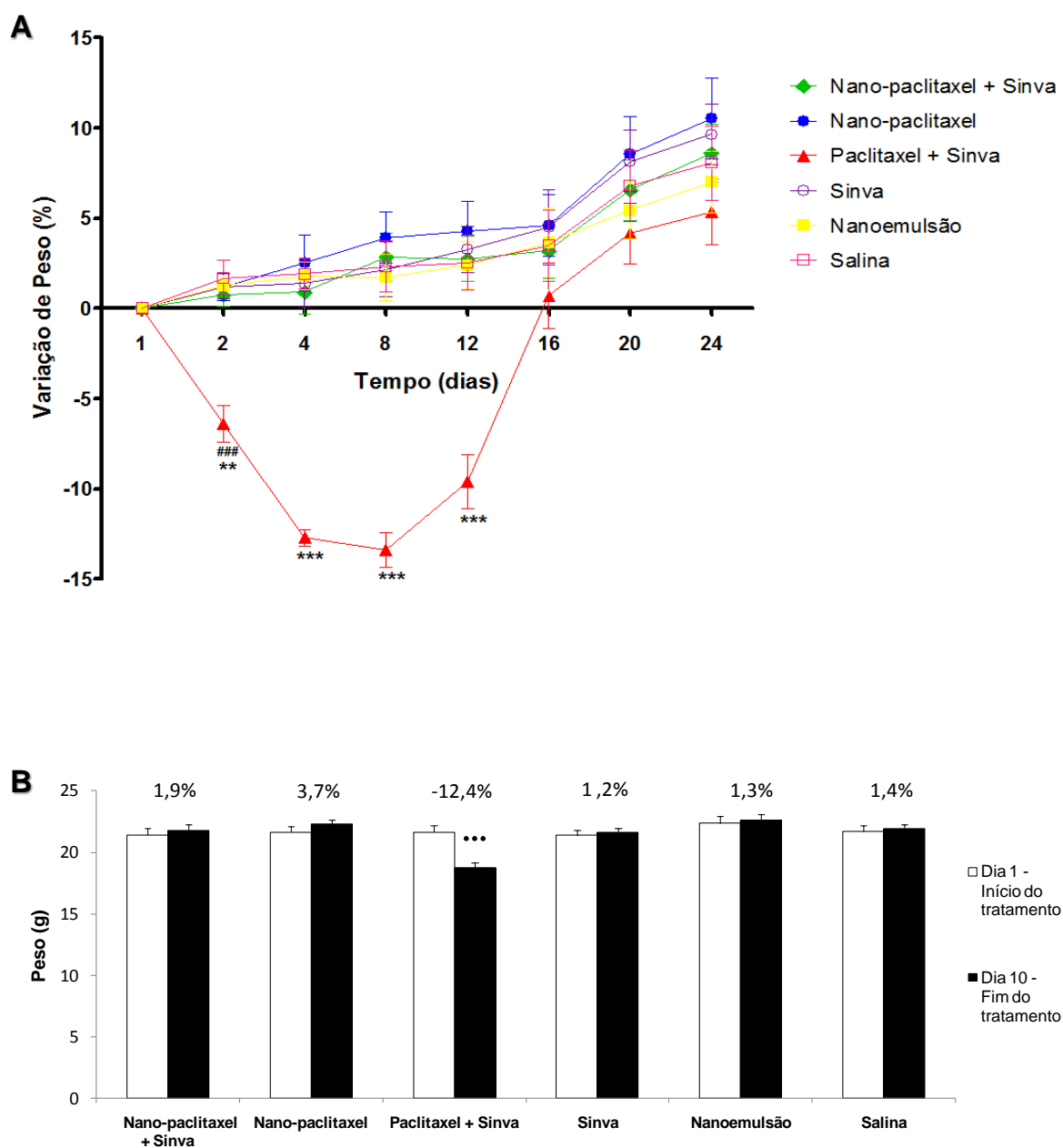


Figura 2. Variação de peso de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. **A)** ** Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Nano-paclitaxel e vs Sinva ($p < 0,01$); ### Paclitaxel + Sinva vs Nanoemulsão e vs Salina ($p < 0,001$); *** Paclitaxel + Sinva vs todos os grupos ($p < 0,001$). **B)** ... Paclitaxel + Sinva vs todos os grupos ($p < 0,001$). Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 10$).

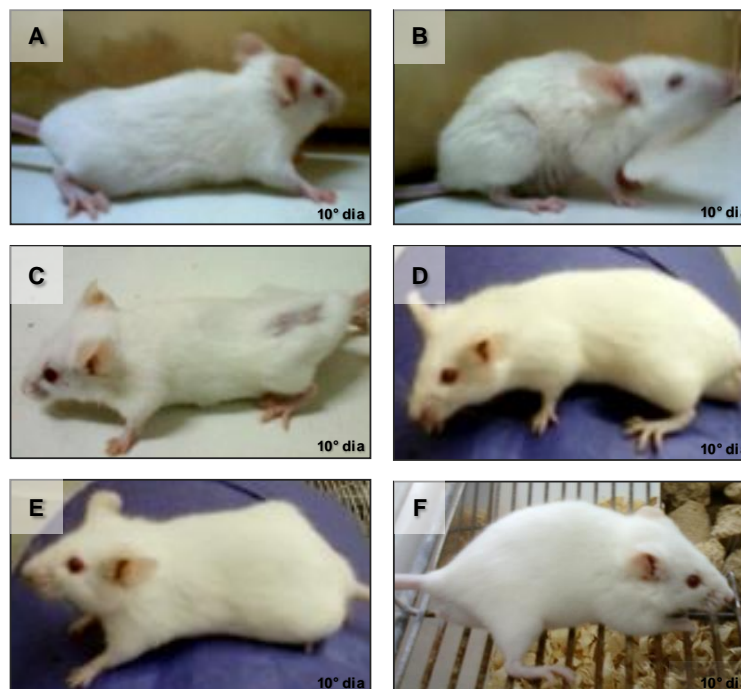


Figura 3. Aspecto físico de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg **(A)**; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg **(B)**; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ **(C)**; sinvastatina 50 mg/kg **(D)**; nanoemulsão lipídica **(E)** e solução salina **(F)**. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1° até 9° dia de experimento.

5.1.3 Parâmetros hematológicos

Para a avaliação do perfil hematológico dos animais foram realizadas cinco coletas de amostras de sangue periférico em um período de 24 dias: nos dias posteriores à administração da quimioterapia (2, 5 e 10), e finalmente, nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento dos animais pós-quimioterapia (17° e 24° dia).

5.1.3.1 Leucócitos

A Figura 4 representa o número de leucócitos dos animais durante o período experimental. Não houve alteração no número de leucócitos induzida pelo tratamento nos grupos Sinva, Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel quando comparados ao grupo Controle. Em contraste, é evidente a leucopenia induzida pelo tratamento combinado com sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel. Nos dias subseqüentes à administração da quimioterapia (dias 2, 5 e 10) este tratamento induziu a redução no número de leucócitos em comparação ao grupo Controle em

68% (Figura 4A), 87% (Figura 4B) e 44% (Figura 4C), respectivamente ($p < 0,001$). Nota-se que nas semanas posteriores ao fim do tratamento ocorreu o retorno à normalidade do número de leucócitos neste grupo (Figura 4D e E).

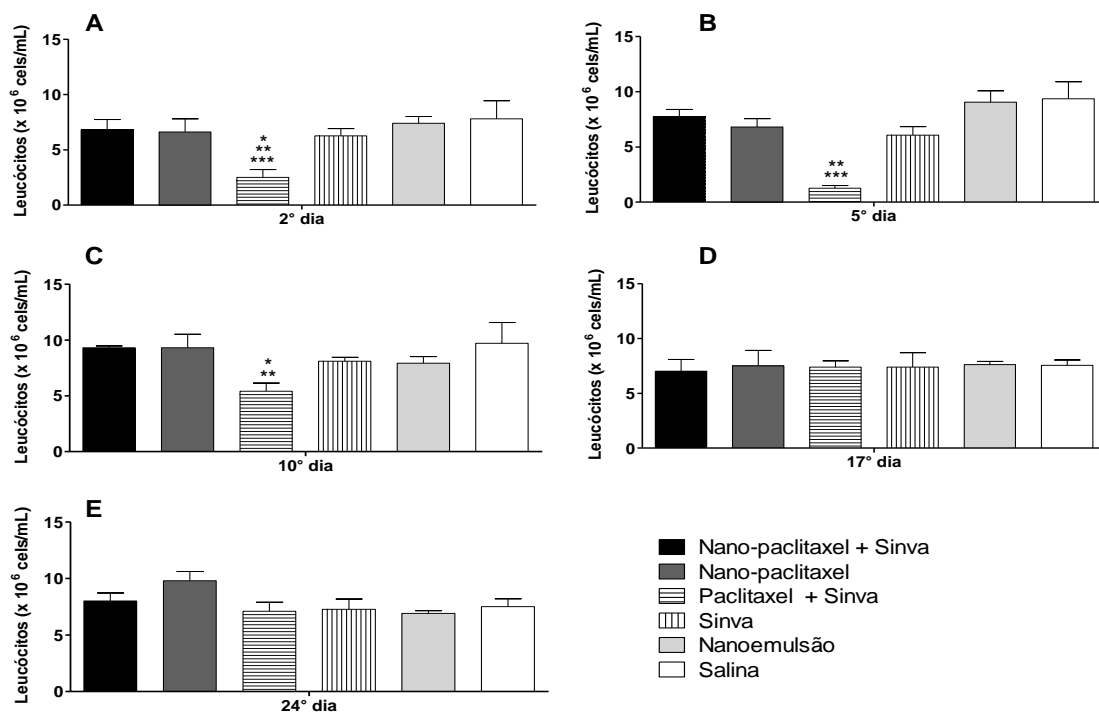


Figura 4. Leucócitos de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$). **A)** *** Paclitaxel + Sinva vs Salina ($p < 0,001$); ** Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nanoemulsão ($p < 0,01$); * Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$). **B)** ** Paclitaxel + Sinva vs Sinva ($p < 0,01$); *** Paclitaxel + Sinva vs demais grupos ($p < 0,001$). **C)** * Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$); ** Paclitaxel + Sinva vs Salina ($p < 0,01$).

Na Tabela 3 está representada a contagem diferencial de leucócitos dos animais. No 17^o dia de experimento, o grupo Paclitaxel + Sinva apresentou aumento na porcentagem de neutrófilos em comparação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Da mesma forma, houve nesta data uma redução no porcentual de células mononucleares nos animais do grupo Paclitaxel + Sinva em comparação aos grupos Controle ($p < 0,05$), Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$), Nano-paclitaxel ($p < 0,01$), Sinva ($p < 0,01$) e Nanoemulsão ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Diferencial de leucócitos do sangue periférico de camundongos Balb-c

Grupos	Tempo (dias)	Neutrófilos (%)	Bastonetes (%)	Eosinófilos (%)	Mononucleares (%)
Nano-paclitaxel + Sinva	2	18,0 ± 4,0	0	1,7 ± 0,7	80,0 ± 4,0
	5	14,0 ± 3,1	0	2,7 ± 0,3	83,3 ± 3,3
	10	15,7 ± 3,4	0	2,0 ± 0,6	82,3 ± 3,5
	17	12,7 ± 5,2	0	1,3 ± 0,9	86,0 ± 6,1
	24	16,0 ± 4,0	0	3,0 ± 0,6	81,0 ± 3,5
Nano-paclitaxel	2	21,0 ± 4,0	0	2,3 ± 0,9	77,0 ± 4,0
	5	24,3 ± 7,0	0	0,3 ± 0,3	75,3 ± 6,7
	10	15,3 ± 0,7	0,7 ± 0,7	3,0 ± 1,0	81,0 ± 1,0
	17	10,3 ± 3,3	0	0,7 ± 0,3	89,0 ± 3,1
	24	15,0 ± 2,1	0	1,0 ± 0,6	84,0 ± 2,3
Paclitaxel + Sinva	2	33,0 ± 10,0 ****	0	0	67,0 ± 10,0
	5	9,0 ± 3,0	2,0 ± 1,6	0,4 ± 0,5	90,5 ± 3,5
	10	30,0 ± 17,2	0	1,1 ± 0,1	67,2 ± 19,0
	17	34,5 ± 4,5 ******	0	0,5 ± 0,4	65,0 ± 4,1 ****
	24	29,5 ± 1,2	0	1,5 ± 0,4	69,0 ± 0,8
Sinva	2	15,0 ± 3,0	0	1,7 ± 0,7	84,0 ± 3,0
	5	11,0 ± 1,2	0	1,0 ± 1,0	88,0 ± 2,1
	10	13,7 ± 0,7	0	1,3 ± 0,9	85,0 ± 1,5
	17	6,7 ± 1,5	0	2,0 ± 0,6	91,3 ± 1,2
	24	11,0 ± 2,6	0	3,0 ± 1,0	86,0 ± 2,6
Nanoemulsão	2	15,0 ± 3,0	0	3,3 ± 2,0	82,0 ± 3,0
	5	14,7 ± 3,5	0	2,0 ± 1,0	83,3 ± 3,7
	10	17,3 ± 3,0	0	3,0 ± 0,6	79,7 ± 2,9
	17	12,3 ± 2,4	0	1,3 ± 0,9	86,3 ± 2,2
	24	16,0 ± 2,5	0	3,3 ± 0,7	80,7 ± 1,9
Salina	2	21,0 ± 2,0	0	3,3 ± 0,9	76,0 ± 2,0
	5	12,7 ± 3,3	0	0,3 ± 0,3	87,0 ± 3,0
	10	18,7 ± 4,7	0	4,3 ± 1,2	77,0 ± 3,6
	17	14,3 ± 3,0	0	1,7 ± 1,7	84,0 ± 2,1
	24	23,0 ± 4,4	0	3,0 ± 1,5	74,0 ± 4,5

Nos dias 1, 4 e 9 os animais receberam pela via intraperitoneal soluções de nano-paclitaxel 17,5 µmol/kg + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 µmol/kg; paclitaxel comercial 17,5 µmol/kg + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1° até 9° dia de experimento. Resultados expressos em média ± erro padrão (n = 5).

(*) p < 0,05 vs Nano-paclitaxel + Sinva; (■) p < 0,05 vs Salina; (◆) p < 0,05 vs Nanoemulsão; (###) p < 0,01 vs Nano-paclitaxel; (++) p < 0,01 vs Sinva; (◆◆) p < 0,01 vs Nanoemulsão; (**) p < 0,01 vs Nano-paclitaxel + Sinva; (****) p < 0,001 vs Sinva.

5.1.3.2 Plaquetas

A toxicidade do tratamento com sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel também foi refletida na contagem de plaquetas dos animais (Figura 5). Nos dias subseqüentes à administração da quimioterapia (2, 5 e 10), o grupo Paclitaxel + Sinva apresentou redução no número de plaquetas em comparação ao grupo Controle em 40% ($p < 0,001$), 33% ($p < 0,01$) e 25% ($p < 0,05$), respectivamente.

Por outro lado, não houve toxicidade induzida pelo tratamento nos grupos Sinva, Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel quando comparados ao grupo Controle.

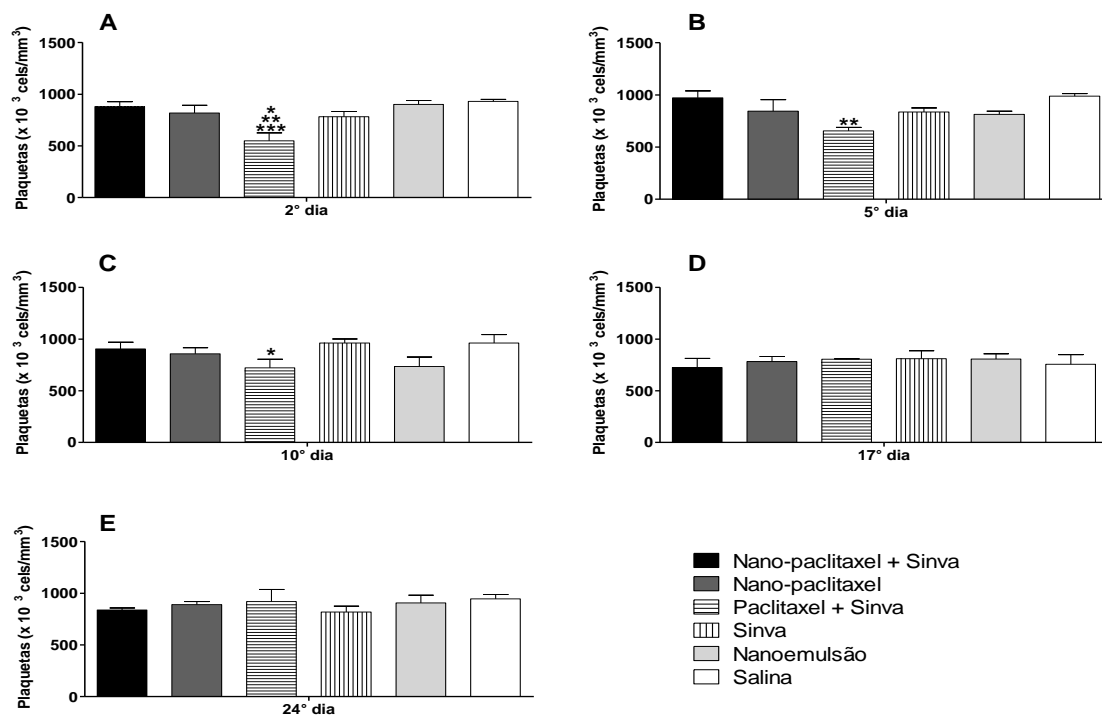


Figura 5. Plaquetas de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$). **A)** *** Paclitaxel + Sinva vs Salina e Nanoemulsão ($p < 0,001$); ** Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$); * Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$). **B)** ** Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Salina ($p < 0,01$). **C)** * Paclitaxel + Sinva vs Nano-paclitaxel, vs Sinva e vs Salina ($p < 0,05$).

5.1.3.3 Eritrograma

As Figuras 6, 7 e 8 representam os valores obtidos para o eritrograma dos animais após os tratamentos com sinvastatina combinada com paclitaxel associado

à nanoemulsão lipídica, paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, sinvastatina combinada com o paclitaxel comercial, sinvastatina, nanoemulsão lipídica e solução salina. Não foram encontradas alterações indicativas de toxicidade induzida pelos tratamentos na contagem do número de hemácias (Figura 6), na concentração de hemoglobina (Figura 7) e na porcentagem do hematócrito (Figura 8).

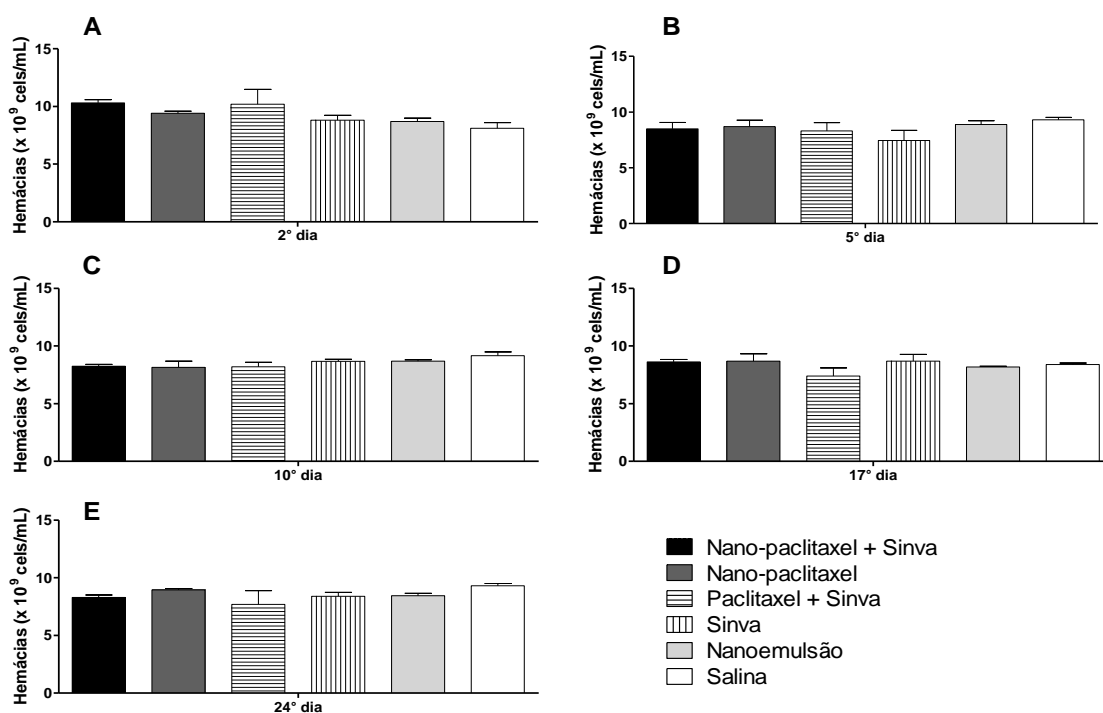


Figura 6. Hemácias de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1° até 9° dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$).

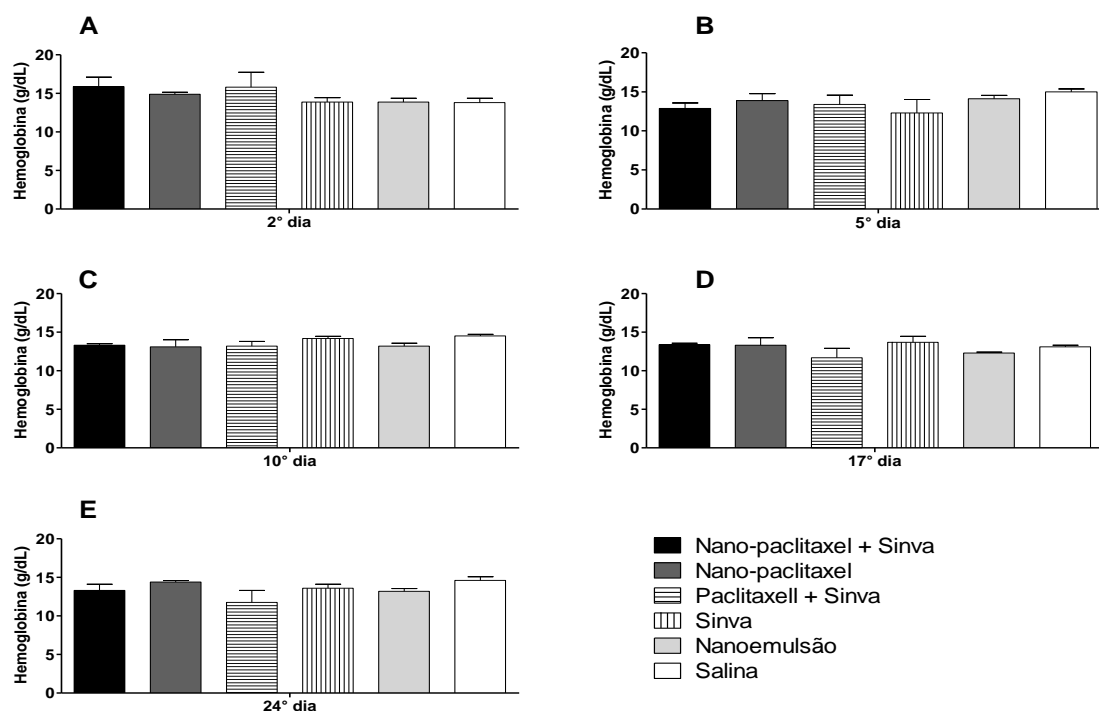


Figura 7. Hemoglobina de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5).

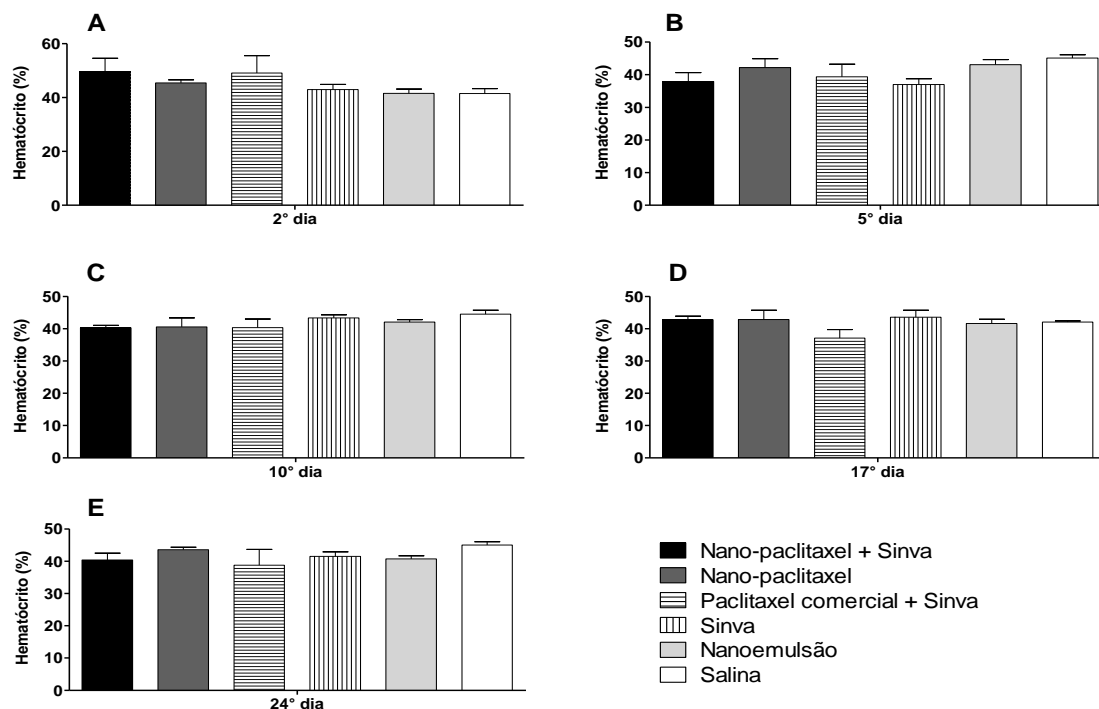


Figura 8. Hematócrito de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5).

5.1.4 Parâmetros bioquímicos

Para análise dos parâmetros bioquímicos dos animais utilizou-se amostras de plasma obtidas nos dias posteriores à administração da quimioterapia (5 e 10), e finalmente, nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento dos animais pós-quimioterapia (17° e 24° dia).

5.1.4.1 Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase

As Figuras 9 e 10 representam a atividade plasmática das enzimas ALT e AST após o tratamento dos animais. Uma semana após o fim dos tratamentos, os grupos Paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel apresentaram aumento na atividade de ALT (Figura 9C) e AST (Figura 10C) em comparação aos grupos Sinva ($p < 0,01$) e Controle ($p < 0,05$).

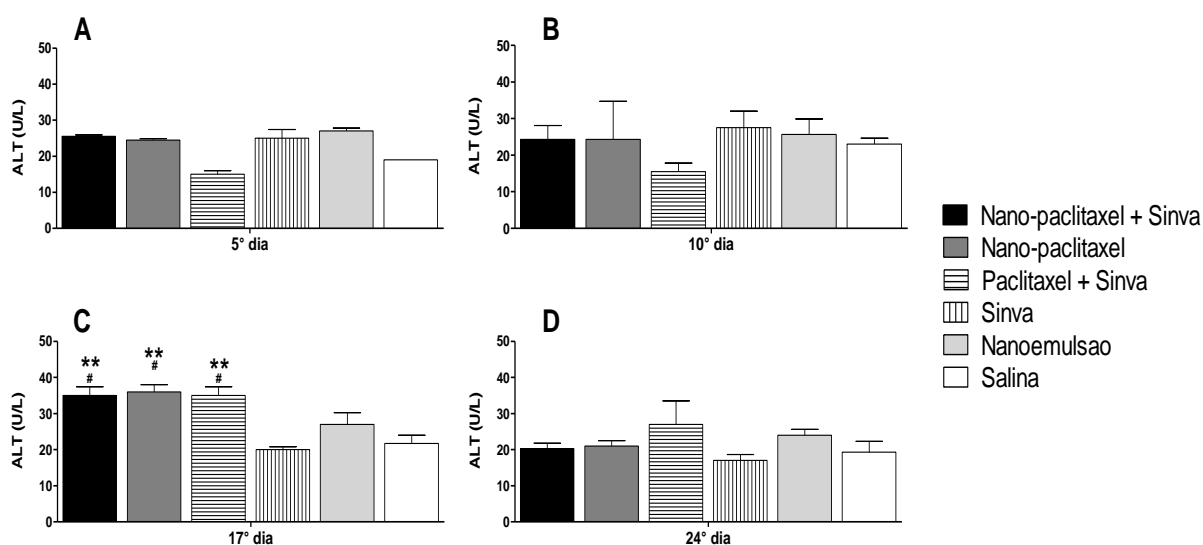


Figura 9. Alanina aminotransferase (ALT) de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5). **C)** ** vs Sinva (p<0,01); # vs Salina (p<0,05).

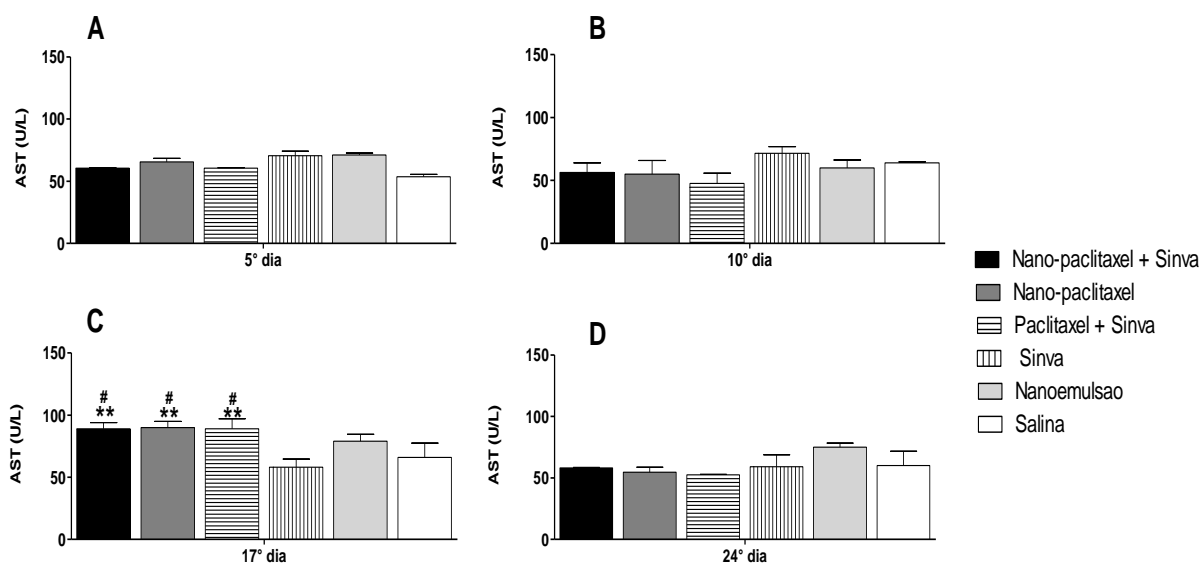


Figura 10. Aspartato aminotransferase (AST) de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5). **C)** ** vs Sinva (p<0,01); # vs Salina (p<0,05).

5.1.4.2 Creatinina

A Figura 11 mostra as concentrações plasmáticas de creatinina dos grupos Nano-paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel, Paclitaxel + Sinva, Sinva, Nanoemulsão e Controle nos dias 5, 10, 17 e 24. Não foram encontradas alterações indicativas de toxicidade induzida pelos tratamentos.

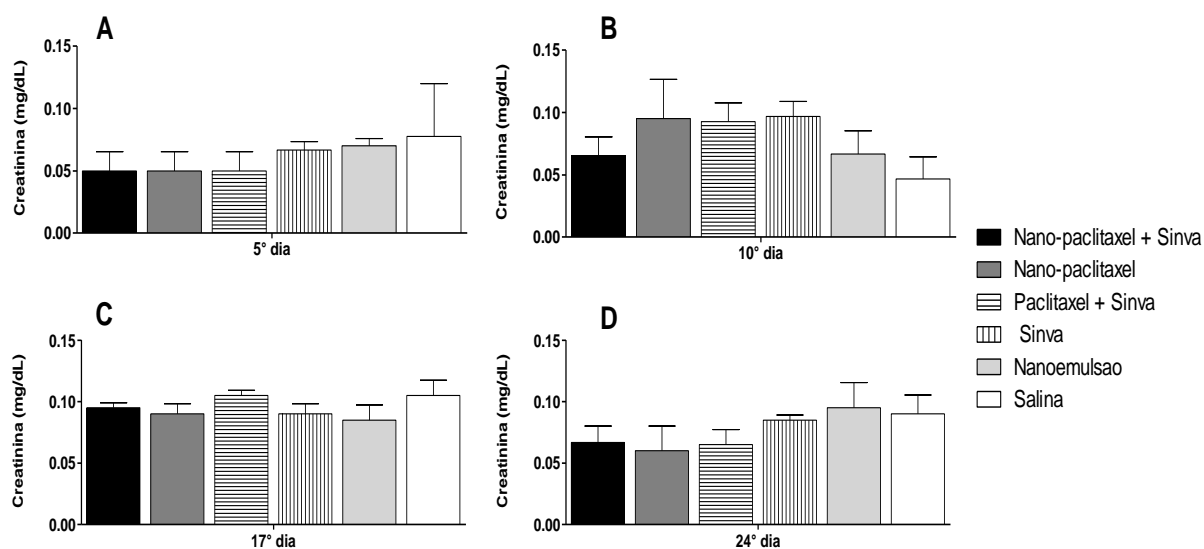


Figura 11. Creatinina de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 μ mol/kg + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 μ mol/kg; paclitaxel comercial 17,5 μ mol/kg + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1^o até 9^o dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5).

5.1.4.3 Creatinofosfoquinase

A atividade plasmática da enzima creatinofosfoquinase dos camundongos tratados com sinvastatina combinada com paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, sinvastatina combinada com o paclitaxel comercial, sinvastatina, nanoemulsão lipídica e solução salina está representada na Figura 12. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos tratamentos.

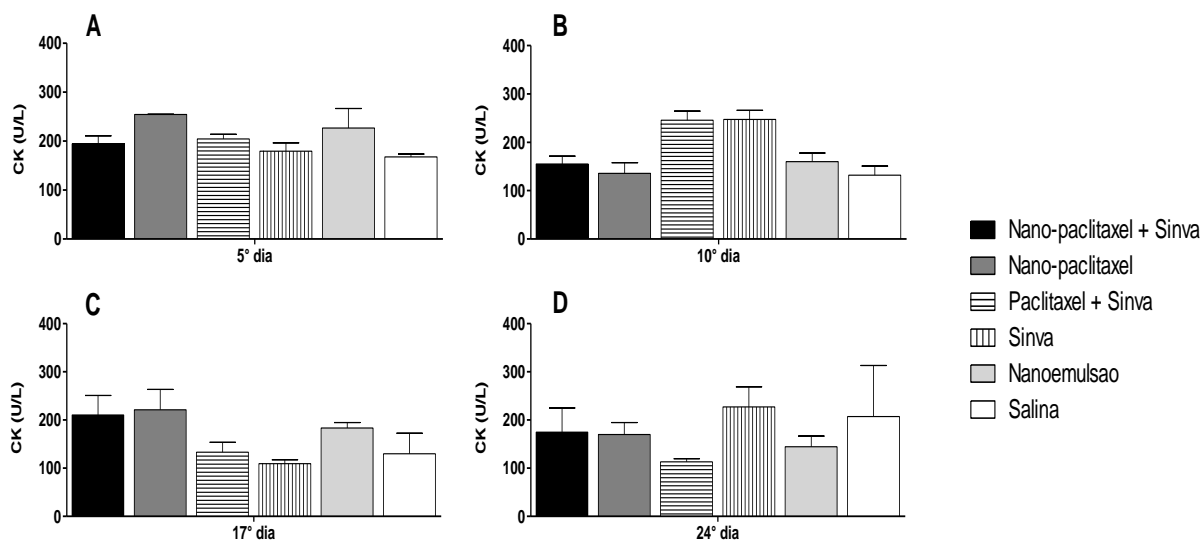


Figura 12. Creatinofosfoquinase (CK) de camundongos Balb-c tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 1, 4 e 9. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 1º até 9º dia de experimento. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

5.2.1 Crescimento tumoral

A Figura 13 e a Tabela 4 ilustram os efeitos dos tratamentos na evolução do crescimento do tumor de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J.

As curvas de crescimento do tumor indicam que não houve diferença entre o grupo Controle e os grupos Sinva e Nanoemulsão no último dia de observação (Figura 13B). O grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentou a maior inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$), seguido dos grupos Nano-paclitaxel ($p < 0,001$) e Paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$) (Figura 13).

Fotografias representativas dos tumores no 31º dia após o implante das células de melanoma nos animais são mostradas na Figura 14.

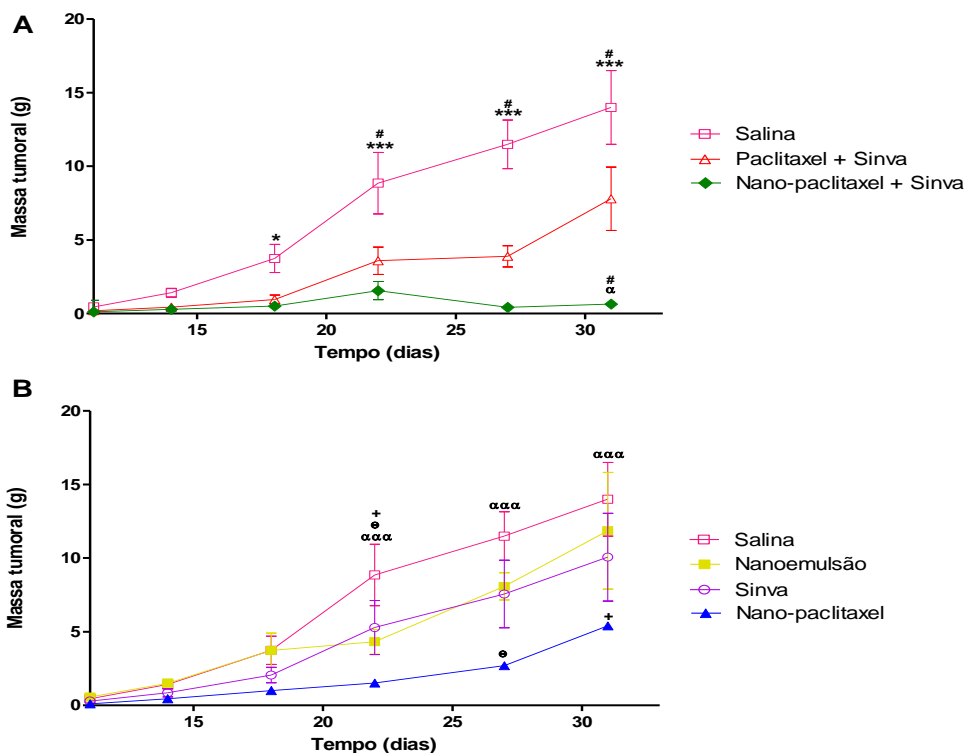


Figura 13. Massa tumoral em camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com solução salina (n = 20), nanoemulsão lipídica (n = 14), sinvastatina 50 mg/kg/dia (n = 10), sinvastatina 50 mg/kg/dia e paclitaxel comercial 17,5 μ mol/kg (n = 10), oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 μ mol/kg (n = 13), e sinvastatina 50 mg/kg/dia e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 μ mol/kg (n = 10). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. **A**) *** vs Nano-paclitaxel +Sinva (p<0,001); * vs Nano-paclitaxel + Sinva (p<0,05); # vs Paclitaxel +Sinva (p<0,05); α vs Nano-paclitaxel (p<0,05). **B**) $\alpha\alpha\alpha$ vs Nano-paclitaxel (p<0,001); \ominus vs Sinva (p<0,05); + vs Nanoemulsão (p<0,05).

Tabela 4 - Atividade antitumoral em camundongos portadores de melanoma B16F10

Grupos	% T/C ¹ 31° dia	% ICT ² 31° dia	T-C ³ (dias)
Salina	--	--	--
Nanoemulsão	85	15	0
Sinva	72	28	2
Paclitaxel + Sinva	56	44	5
Nano-paclitaxel	39	61	5
Nano-paclitaxel + Sinva	5	95	9

Nos dias 11, 14 e 19 os animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 μ mol/kg e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 μ mol/kg. A sinvastatina 50 mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11° até 19° dia de experimento.

(1) %T/C = (Média da massa tumoral dos animais tratados/Média da massa tumoral dos animais controles) x 100.

(2) % ICT (Inibição do crescimento tumoral) = 100 – (%T/C).

(3) T – C (Índice de retardamento do crescimento do tumor) = tempo médio estimado para o grupo tratado (T) e o controle (C) alcançar um tamanho predeterminado (> 1g).

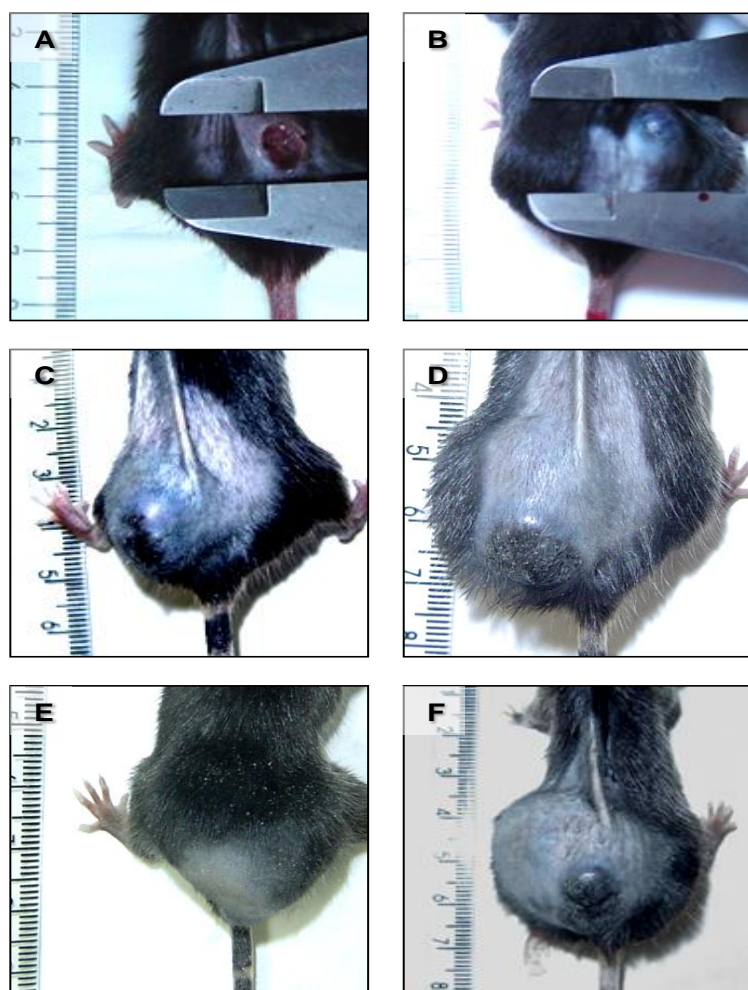


Figura 14. Representação da evolução da massa tumoral em camundongos C57BL/6J no 31º dia após a inoculação das células de melanoma B16F10. Os animais foram tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (A); nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ (B); paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (C); sinvastatina 50 mg/kg (D); nanoemulsão lipídica (E) e solução salina (F). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19. A sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11º até o 19º dia de experimento.

5.2.2 Variação de peso

O peso corpóreo e a massa tumoral dos camundongos foram acompanhados a partir da data de início do tratamento dos tumores implantados (11º dia) até o 31º dia de experimento. Do peso corpóreo total no dia 31, subtraímos o valor estimado da massa tumoral, distinguindo-se, portanto, o peso final do animal nesta data. A Figura 15 mostra o porcentual de variação do peso dos animais dos diferentes grupos estimado através da relação entre o peso final e o peso do animal na data do início do experimento. Os grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel apresentaram uma pequena perda de peso de 6% e 2%, respectivamente. Estes

valores contrastam com a grande perda de peso dos grupos Paclitaxel + Sinva (27%), Sinva (29%), Nanoemulsão (28%) e Controle (32%).

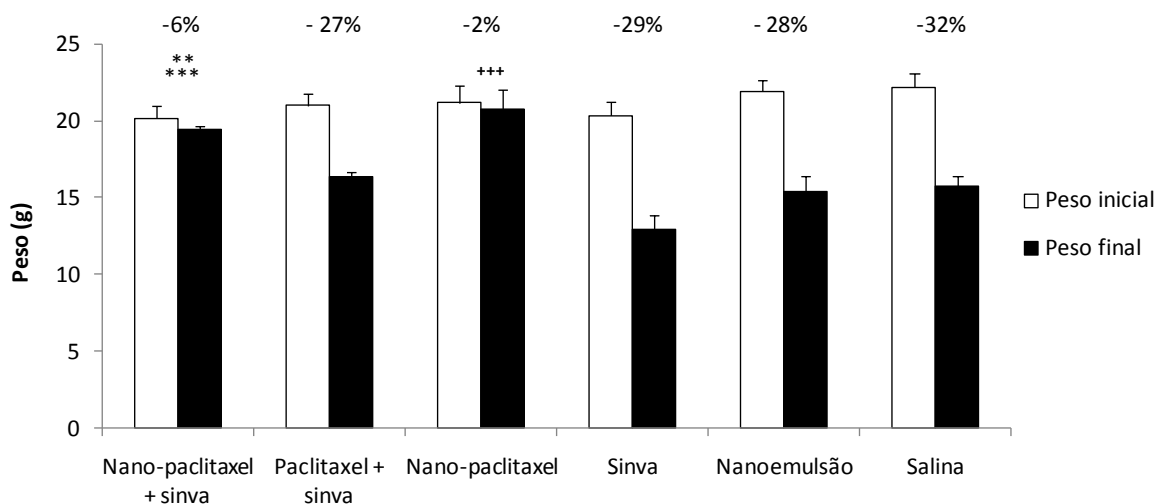


Figura 15. Variação de peso em camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com soluções de nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Peso inicial = peso no 11º dia (\square) e peso final = peso no 31º dia - massa tumoral (\blacksquare). Resultados expressos em média \pm erro padrão (n= 10). *** vs Salina (p< 0,001); ** vs Paclitaxel + Sinva, vs Sinva e vs Nanoemulsão (p< 0,01); +++ vs demais grupos (p< 0,001).

5.2.3 Probabilidade de sobrevida

A probabilidade de sobrevida dos camundongos com implante do melanoma B16F10 foi avaliada no período de 60 dias e as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier estão representadas na Figura 16.

Somente os animais dos grupos Nano-paclitaxel e Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram aumento na taxa de sobrevida em comparação ao grupo Controle (p<0,01). No 35º dia de experimento, a porcentagem de morte dos camundongos dos grupos Controle, Nanoemulsão, e Sinva atingiu 100%, enquanto que 44% dos animais do grupo Nano-paclitaxel, 40% dos animais do grupo Nano-paclitaxel + Sinva e apenas 10% dos animais do grupo Paclitaxel + Sinva permaneceram vivos.

Na Tabela 5 são mostradas as taxas de mortalidade dos animais no 35º dia de experimento e o tempo necessário para a morte de 50% dos camundongos nos diferentes grupos de tratamentos.

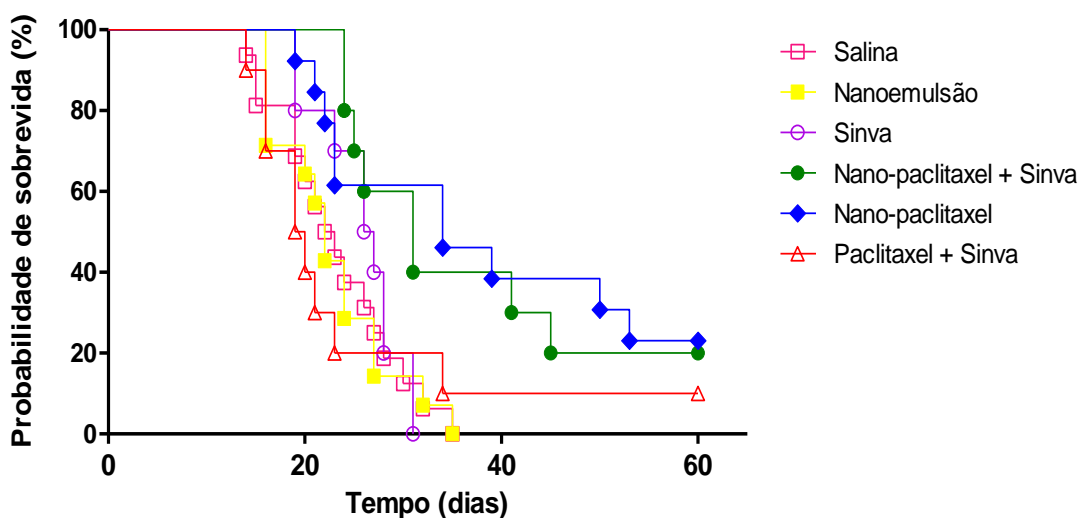


Figura 16. Probabilidade de sobrevivência de camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg/dia; oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; sinvastatina 50 mg/kg/dia e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e sinvastatina 50 mg/kg/dia e paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. Os animais foram observados diariamente por 60 dias ($n = 10$ a 15 , $p < 0,01$).

Tabela 5 – Mortalidade de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma B16F10

Grupos	Mortalidade 35° dia (%) ¹	Tempo (dias) ²
Salina	100%	22
Nanoemulsão	100%	22
Sinva	100%	26
Paclitaxel + Sinva	90%	19
Nano-paclitaxel	56%	34
Nano-paclitaxel + Sinva	60%	31

Nos dias 11, 14 e 19 os animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50 mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11° até 19° dia de experimento.

(1) Taxa de mortalidade dos animais no 35° dia após o implante do tumor.

(2) Tempo estimado para morte de 50% dos animais.

5.2.4 Desenvolvimento de metástases

As Figuras 17 a 22 ilustram as necropsias realizadas nos animais dos grupos Controle, Nanoemulsão, Sinva, Nano-paclitaxel, Paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel + Sinva.

Os animais do grupo Controle apresentaram tumor em estágio avançado, sendo nítida a disseminação e agressividade do melanoma (Figura 17A). Nos animais deste grupo foram encontrados nódulos metastáticos distribuídos no pulmão (Figura 17B), fígado (Figura 17E), além de metástases ganglionares no mediastino, linfonodos axilares e inguinais superficiais (Figura 17A), para-aórticos (Figura 17F) e renais.

A Figura 17 C e D mostra em detalhe a vascularização próxima ao linfonodo axilar.

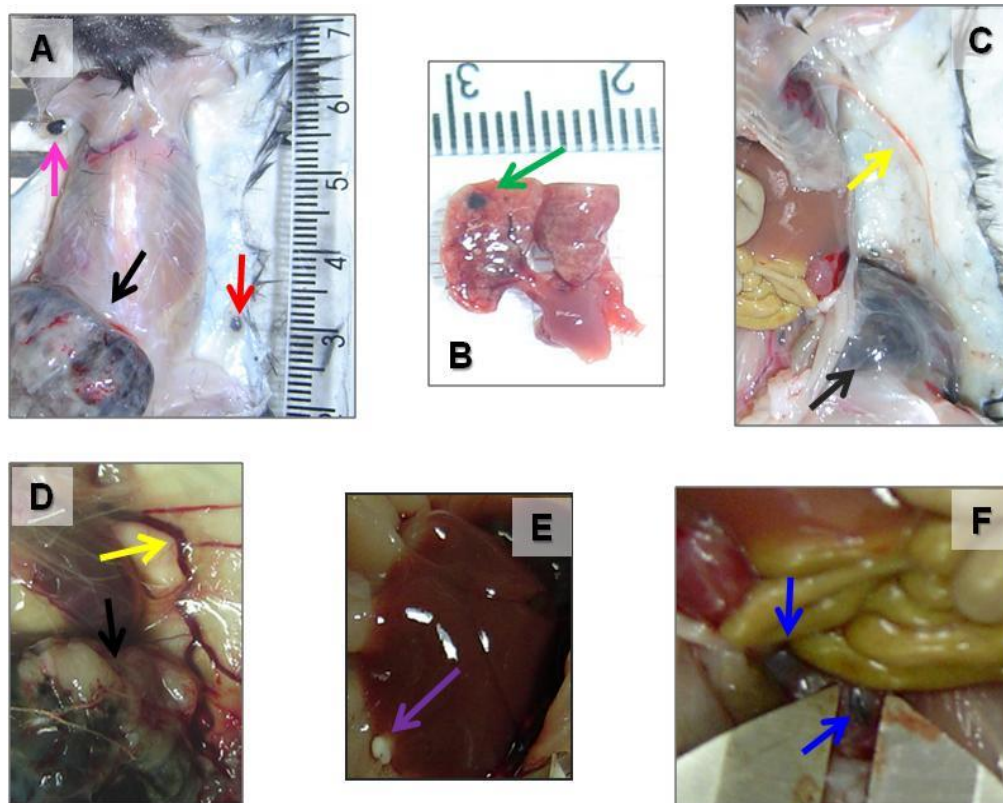


Figura 17. Camundongos portadores de melanoma B16F10. **A)** Tumor em estágio avançado (→) e metástases nos linfonodos axilar (→) e inguinal superficial (→). **B)** Metástase pulmonar (→). **C)** e **D)** Tumor (→) com vascularização próxima aos linfonodos axilares e inguinais superficiais (→). **E)** Metástase hepática (→). **F)** Metástases nos linfonodos para-aórticos (→).

Os tumores dos animais do grupo Nanoemulsão mostraram-se semelhantes aos tumores dos animais do grupo Controle (Figura 18). Foram encontradas metástases hepáticas (Figura 18B), pulmonares (Figura 18E), na região do retroperitônio (Figura 18C), além de nódulos metastáticos nos linfonodos inguinais superficiais (Figura 18D), axilares, para-aórticos (Figura 18F) e renais.

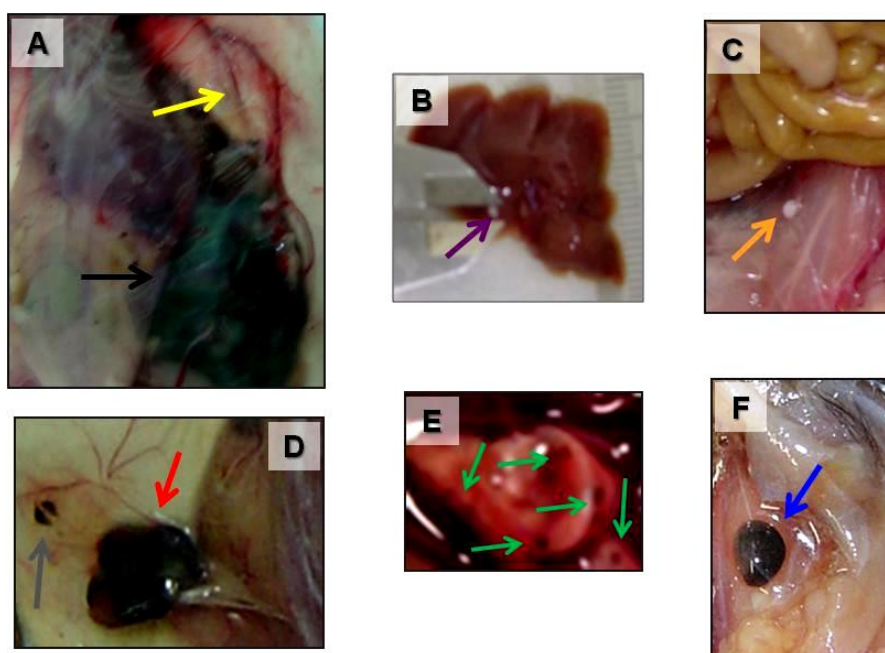


Figura 18. Camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com a nanoemulsão lipídica. **A)** Tumor em estágio avançado (→) com intensa vascularização próxima aos linfonodos axilares e inguinais superficiais (→). **B)** Metástase hepática (→). **C)** Metástase retroperitoneal (→). **D)** Inóculo do tumor (→) e tumor com metástase no linfonodo inguinal (→). **E)** Metástases pulmonares (→). **F)** Metástase em linfonodo para-aórtico (→).

No grupo tratado com a sinvastatina destacou-se a intensa vascularização próxima aos linfonodos axilares e inguinais (Figura 19B e C), além da presença de nódulos metastáticos nos mesmos órgãos descritos nos grupos Controle e Nanoemulsão (Figura 19).

A necropsia dos animais do grupo Nano-paclitaxel revelou uma presença discreta de vasos próximos aos linfonodos axilares e inguinais (Figura 20A e B) e metástases distribuídas no pulmão e gânglios do mediastino, para-aórticos (Figura 20C), renais, axilares e inguinais superficiais (Figura 20B).

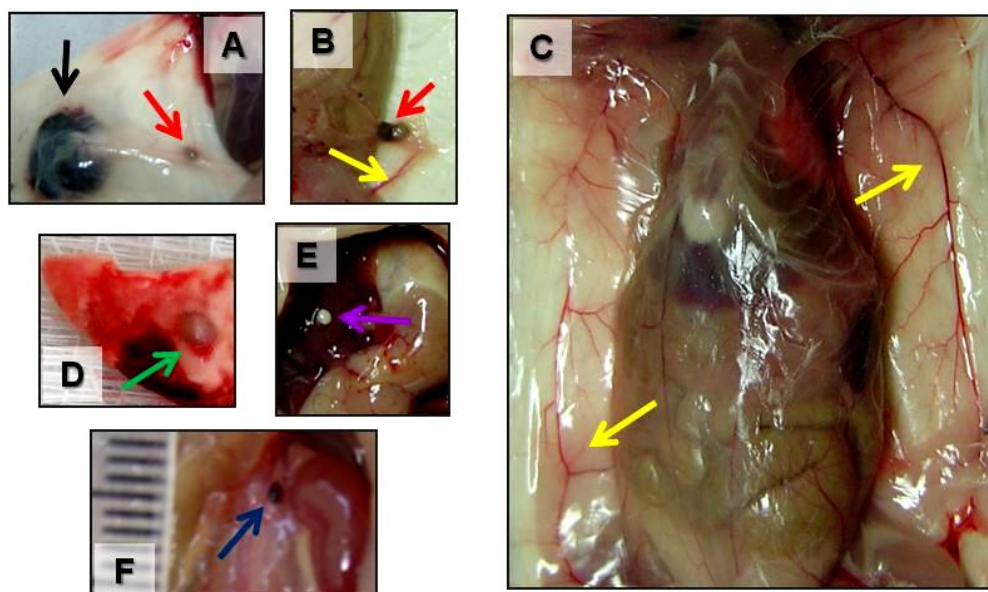


Figura 19. Camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com sinvastatina (50 mg/kg) diariamente do 11° até 19° dia após a inoculação do tumor. **A)** Tumor (→) e metástase no linfonodo inguinal superficial (→). **B)** Metástase no linfonodo inguinal superficial (→) e vascularização próxima ao linfonodo (→). **C)** Região dorsal altamente vascularizada (→). **D)** Metástase pulmonar (→). **E)** Metástase hepática (→). **F)** Metástase em linfonodo renal (→).

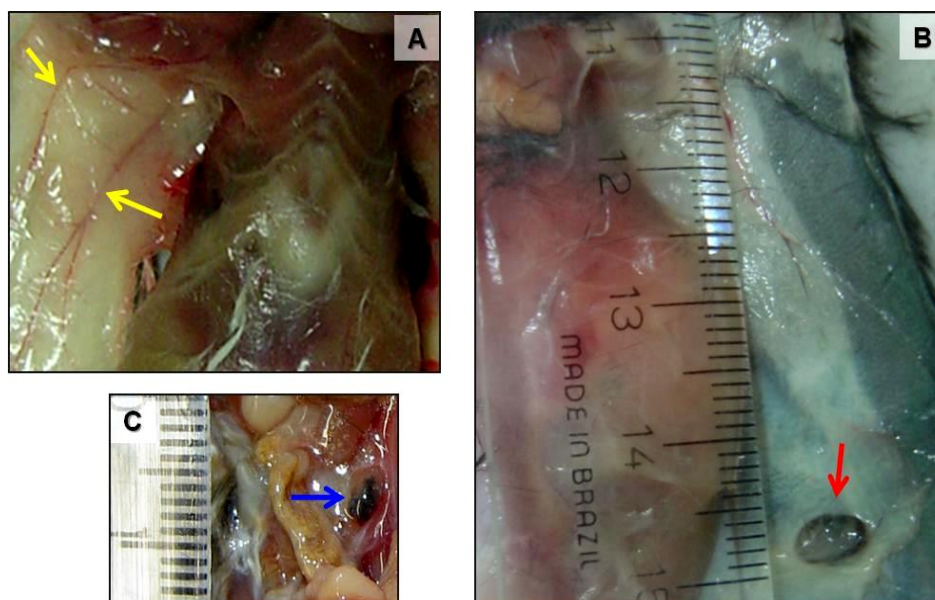


Figura 20. Camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 $\mu\text{mol/kg}$) nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor. **A)** Vascularização próxima aos linfonodos axilares e inguinais superficiais (→). **B)** Metástase no linfonodo inguinal superficial (→) e região dorsal pouco vascularizada. **C)** Metástase em linfonodo para-aórtico (→).

Nos camundongos do grupo Paclitaxel + Sinva foram encontrados nódulos metastáticos distribuídos no fígado (Figura 21B), pulmão (Figura 21E) e nos linfonodos axilares, inguinais superficiais (Figura 21D e F) e para-aórticos (Figura 21C). Foi observada intensa vascularização próxima aos gânglios axilares e inguinais superficiais (Figura 21A).

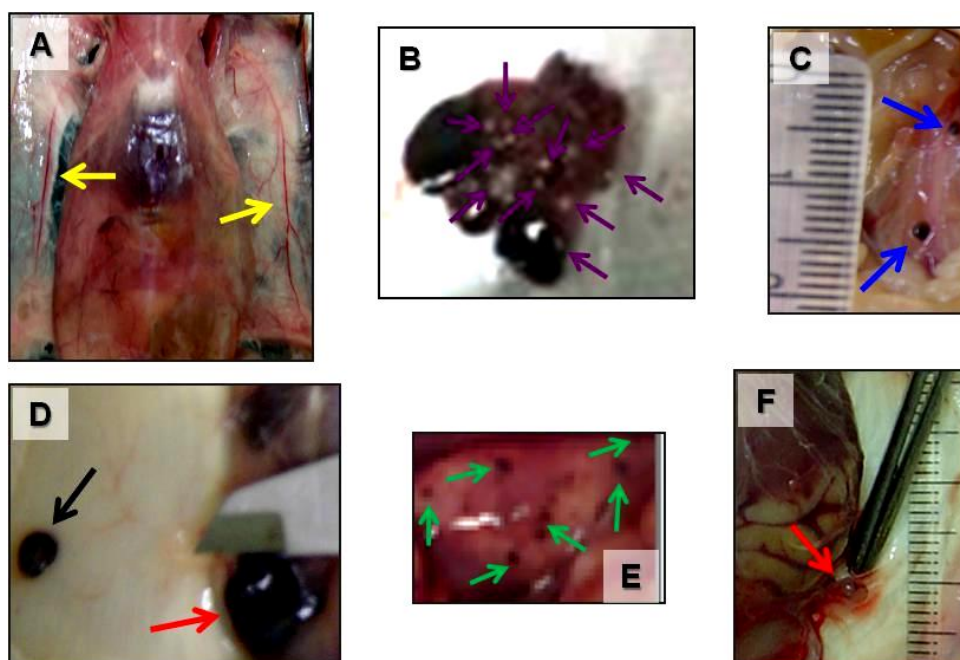


Figura 21. Camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com sinvastatina (50 mg/kg) e a formulação comercial do paclitaxel (17,5 $\mu\text{mol/kg}$). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor e a sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até o 19^o dia de experimento. **A)** Região dorsal altamente vascularizada (\rightarrow). **B)** Metástases hepáticas (\rightarrow). **C)** Metástases em linfonodos para-aórticos (\rightarrow). **D)** Tumor (\rightarrow) e metástase no linfonodo inguinal superficial (\rightarrow). **E)** Metástases pulmonares (\rightarrow). **F)** Metástase no linfonodo inguinal superficial (\rightarrow).

A Figura 22 ilustra a necropsia de animais do grupo Nano-paclitaxel + Sinva. A vascularização próxima aos linfonodos foi discreta (Figura 22A e B). A maioria dos animais apresentou sítios metastáticos apenas nos linfonodos inguinais superficiais (Figura 22B), porém, metástases em linfonodos axilares, para-aórticos (Figura 22C) e no pulmão (Figura 22D) também foram observadas.

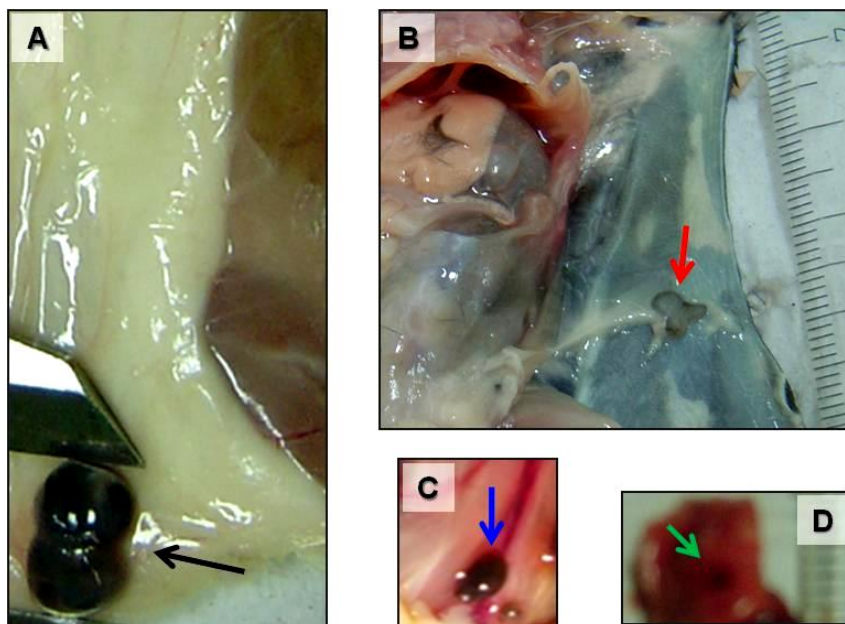


Figura 22. Camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com sinvastatina (50 mg/kg) e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica (17,5 $\mu\text{mol/kg}$). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor e a sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até o 19^o dia de experimento. **A)** Tumor localizado apenas na região do inoculo (\rightarrow) e região dorsal pouco vascularizada. **B)** Metástase no linfonodo inguinal superficial (\rightarrow) e região dorsal pouco vascularizada. **C)** Metástase em linfonodo para-aórtico (\rightarrow). **D)** Metástase pulmonar (\rightarrow).

A Figura 23 representa o porcentual de camundongos que desenvolveram nódulos metastáticos em todos os grupos de tratamento. Os grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel foram os únicos que inibiram o aparecimento de sítios metastáticos em comparação ao grupo Controle ($p < 0,01$). Enquanto que 90% dos animais do grupo Paclitaxel + Sinva apresentaram nódulos metastáticos, apenas 37% dos animais do grupo Nano-paclitaxel + Sinva desenvolveram metástases ($p < 0,05$). Todos os animais dos grupos Controle e Sinva apresentaram nódulos metastáticos e 78% dos animais do grupo Nanoemulsão desenvolveram metástases.

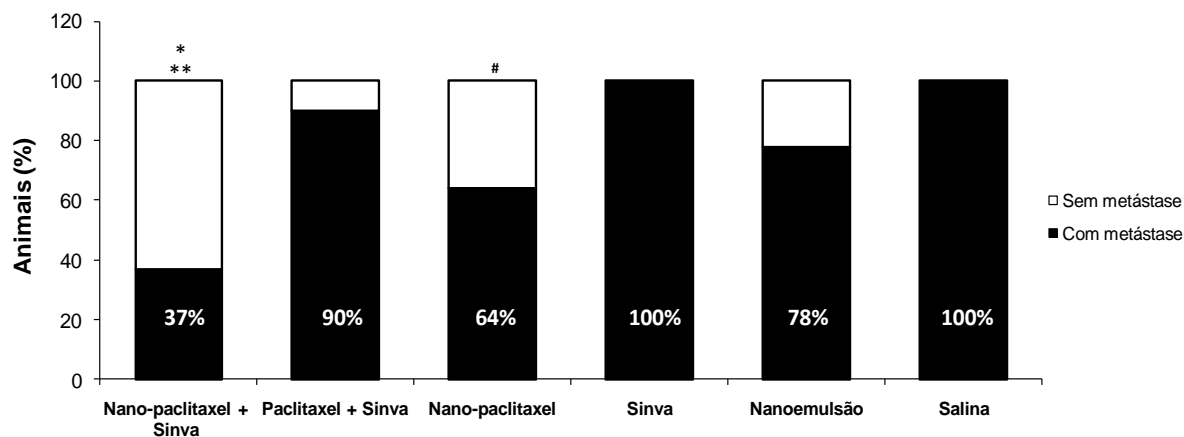


Figura 23. Desenvolvimento de metástases em camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; e solução salina. (■) Animais com metástases, (□) animais sem metástases (n = 8 a 10). ** vs Salina (P < 0,01); * vs Paclitaxel + Sinva (p < 0,05); # vs Salina (p < 0,05).

5.2.5 Parâmetros hematológicos

Para a avaliação do perfil hematológico dos animais portadores de melanoma B16F10 foram realizadas seis coletas de amostras de sangue periférico em um período de 34 dias: um dia antes da implantação do tumor (valor basal), nos dias posteriores à administração da quimioterapia (12, 15 e 20), e finalmente, nas duas semanas após o fim do tratamento para acompanhamento do perfil hematológico pós-quimioterapia (27° e 34° dia).

5.2.5.1 Leucócitos

A Figura 24 representa o número de leucócitos dos camundongos portadores de melanoma B16F10 em função do tempo. Não houve toxicidade induzida pelos tratamentos nos grupos Sinva, Nano-paclitaxel e Nano-paclitaxel + Sinva quando comparados ao grupo Controle. Diferentemente dos demais tratamentos, o grupo Paclitaxel + Sinva apresentou redução no número de leucócitos em relação ao grupo Controle de 59% (p > 0,001), 79% (p > 0,001), 47% (p > 0,05), 62% (p > 0,001) e 49% (p > 0,05) nos dias 12, 15, 20, 27 e 34, respectivamente (Figura 24).

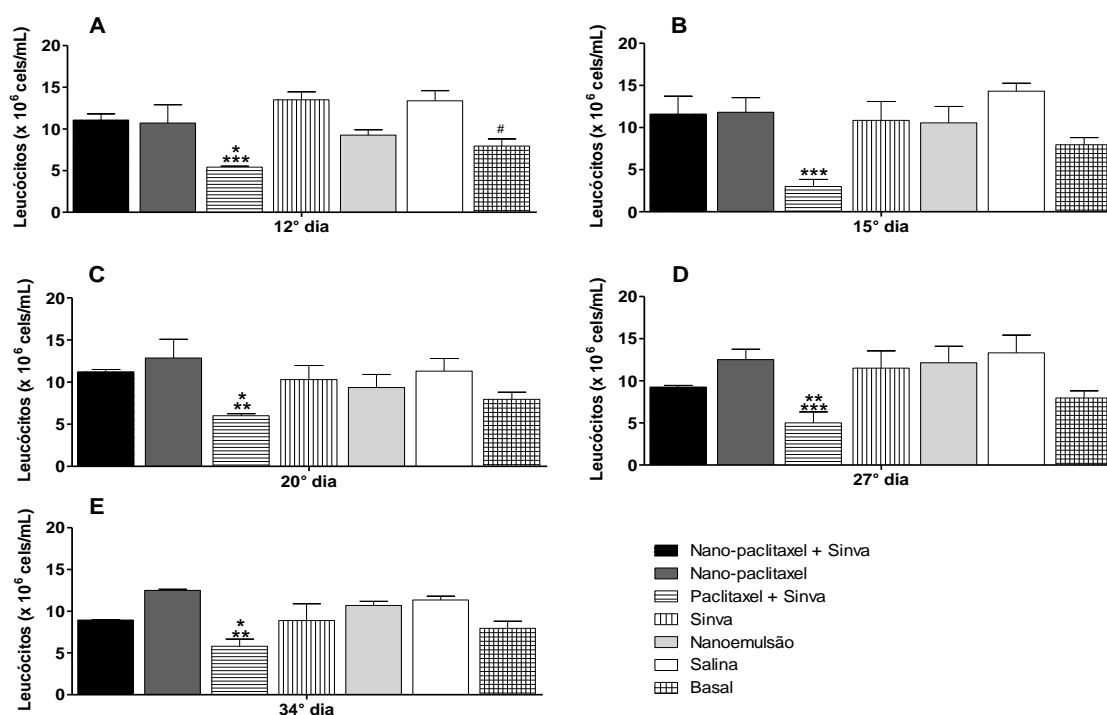


Figura 24. Leucócitos de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Basal = média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$). **A)** *** vs Salina e vs Sinva ($p < 0,001$); * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$); # vs Salina e vs Sinva ($p < 0,05$). **B)** *** vs demais grupos ($p < 0,001$). **C)** ** vs Nano-paclitaxel ($p < 0,01$); * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Salina ($p < 0,05$); **D)** *** vs Nano-paclitaxel e vs Salina ($p < 0,001$); ** vs Sinva e vs Nanoemulsão ($p < 0,01$). **E)** ** vs Nano-paclitaxel ($p < 0,01$); * vs Salina ($p < 0,05$).

A contagem diferencial de leucócitos dos animais portadores de tumor está representada na Tabela 6. Em comparação ao grupo Controle, o percentual de células mononucleares foi menor nos grupos Paclitaxel + Sinva (dia 20, $p < 0,01$) e Nano-paclitaxel (dia 34, $p < 0,05$). Da mesma forma, estes grupos apresentaram percentual de neutrófilos maiores do que o grupo Controle. O grupo Paclitaxel + Sinva teve seu maior aumento no dia 20 ($p < 0,001$) e o Nano-paclitaxel no dia 34 ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Diferencial de leucócitos do sangue periférico de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10

Grupos	Tempo (dias)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Bastonetes (%)	Mononucleares (%)
Basal¹	0	13,1 ± 3,0	4,0 ± 1,0	0,3 ± 0,2	82,6 ± 3,1
	12	12,0 ± 1,0	2,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5	85,2 ± 1,0
	15	23,0 ± 10,5	2,7 ± 0,9	0	74,3 ± 10,8
Nano-paclitaxel + Sinva	20	21,0 ± 7,0	1,0 ± 0,5	0	78,0 ± 6,6
	27	25,3 ± 3,3	0	0	74,7 ± 3,3
	34	26,5 ± 6,1	0,5 ± 0,4	0	73,0 ± 5,7
	12	17,0 ± 1,0	2,0 ± 0,5	0	79,0 ± 1,0
Nano-paclitaxel	15	10,7 ± 2,4	3,7 ± 0,7	0	85,7 ± 1,8
	20	28,7 ± 12,4	1,7 ± 1,2	0	69,7 ± 11,6
	27	14,7 ± 4,5	0,3 ± 0,3	0	85,0 ± 4,6
	34	45,0 ± 10,6 [▪]	1,5 ± 1,2	0	53,5 ± 11,9 ^{♦ ▪}
Paclitaxel + Sinva	12	32,0 ± 12	0,8 ± 0,48	0	67,2 ± 12,0
	15	6,0 ± 3,5	0,3 ± 0,3	0	93,7 ± 3,8
	20	46,5 ± 9,6 ^{+ ♦♦ ***}	0	0	53,5 ± 11,6 ^{* + ♦♦ **}
	27	34,5 ± 9,4	1,5 ± 0,4	0	64,0 ± 9,0
	34	38,5 ± 4,5	1,5 ± 0,4	0	60,0 ± 4,1
Sinva	12	13,0 ± 2,0	2,5 ± 0,5	0	81,5 ± 1,0
	15	10,3 ± 1,3	4,7 ± 1,2	0	85,0 ± 2,5
	20	18,0 ± 1,6	2,5 ± 1,0	0	79,5 ± 1,2
	27	37,3 ± 14,9	1,7 ± 1,2	0	61,0 ± 13,9 [#]
	34	41,5 ± 12,7	0,5 ± 0,4	0	58,0 ± 4,1 [♦]
Nanoemulsão	12	17,0 ± 5,0	1,5 ± 0,5	0	80,5 ± 4,0
	15	10,5 ± 3,5	6,0 ± 3,0	0	83,5 ± 0,5
	20	12,5 ± 2,9	2,5 ± 2,0	0	85,0 ± 5
	27	15,5 ± 1,2	2,0 ± 0,8	0	82,5 ± 2,0
	34	20,5 ± 6,1	2,5 ± 0,4	0	82,0 ± 1,6
Salina	12	17,0 ± 5,0	2,0 ± 0,5	0	79,0 ± 4,0
	15	12,7 ± 1,9	3,7 ± 0,7	0	83,7 ± 2,3
	20	9,0 ± 2,5	3,5 ± 1,2	0	87,5 ± 3,7
	27	20,0 ± 7,4	2,5 ± 0,4	0	77,5 ± 7,8
	34	16,0 ± 3,3	4,0 ± 1,6	0	80,0 ± 1,6

Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, os animais receberam pela via intraperitoneal soluções de nano-paclitaxel 17,5 µmol/kg; paclitaxel comercial 17,5 µmol/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. A sinvastatina 50 mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11° até 19° dia de experimento. Resultados expressos em média ± erro padrão (n = 5).

(1) Média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor.

(*) p < 0,05 vs Nano-paclitaxel + Sinvastatina; (**) p < 0,05 vs Salina; (*) p < 0,05 vs Nano-paclitaxel; (♦) p < 0,05 vs Nanoemulsão; (†) p < 0,05 vs Sinvastatina; (♦♦) p < 0,01 vs Nanoemulsão; (**) p < 0,01 vs Salina; (***) p < 0,001 vs Salina.

5.2.5.2 Plaquetas

Na avaliação das plaquetas (Figura 25) ficou clara a relação existente entre o crescimento da massa tumoral e o aumento do número de plaquetas visto que o grupo Controle desenvolveu trombocitose com o passar do tempo. Os grupos Sinva, Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel mantiveram valores semelhantes ao valor basal da contagem de plaquetas. Em contraste, no 34° dia de experimento, o aumento no número de plaquetas em relação à contagem basal alcançou 91% no grupo Controle ($p < 0,01$), 76% no grupo Paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$) e 67% no grupo Nanoemulsão ($p < 0,05$).

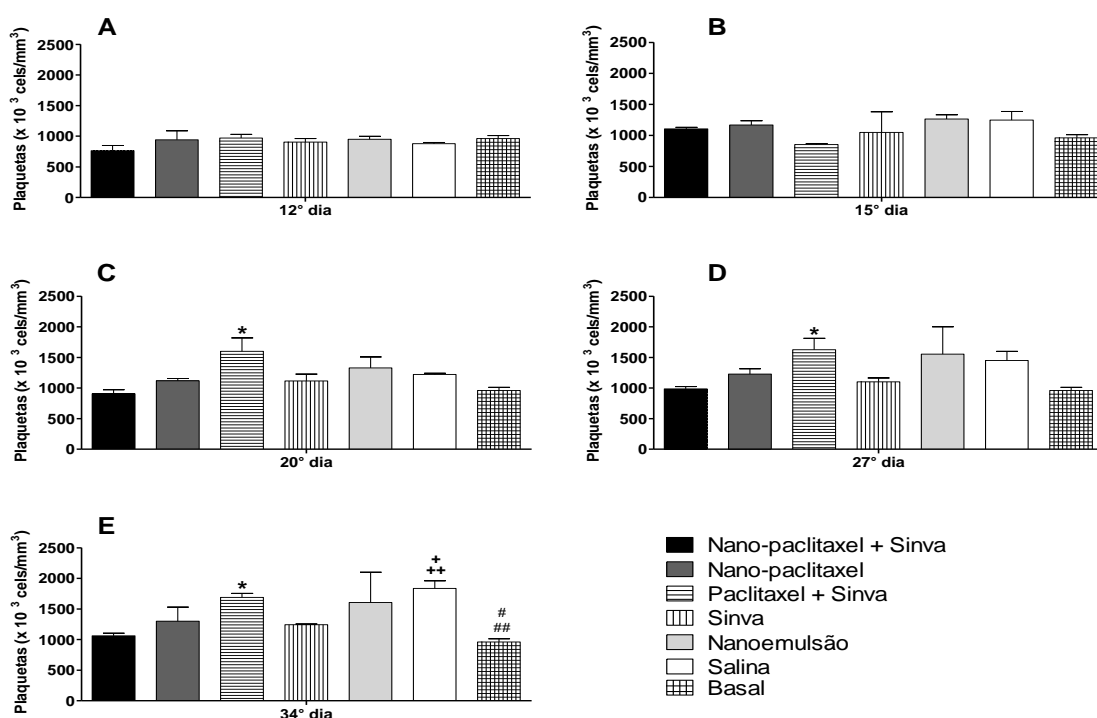


Figura 25. Plaquetas de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Basal = média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5). **C)** * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Basal ($p < 0,05$). **D)** * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Basal ($p < 0,05$). **E)** * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Basal ($p < 0,05$). ++ vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$); + vs Sinva ($p < 0,05$); ## vs Salina ($p < 0,01$); # vs Nanoemulsão e vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$).

5.2.5.3 Eritrograma

As Figuras 26, 27 e 28 representam o eritrograma dos animais após os tratamentos com sinvastatina combinada com paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, sinvastatina combinada com o paclitaxel comercial, sinvastatina, nanoemulsão lipídica e solução salina. A contagem do número de hemácias (Figura 26), a concentração de hemoglobina (Figura 27) e a porcentagem do hematócrito (Figura 28), ilustram claramente o surgimento de anemia induzida pelo crescimento do tumor em todos os grupos de tratamento.

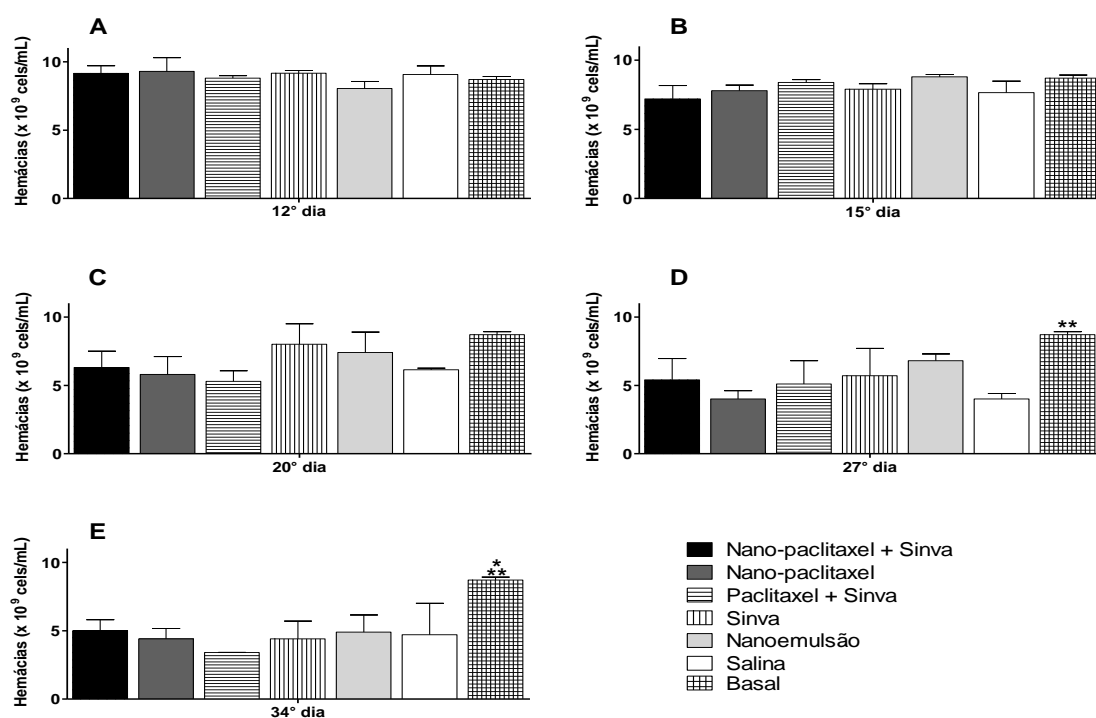


Figura 26. Hemácias de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Basal = média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5). **D)** ** vs Nano-paclitaxel e vs Salina ($p < 0,01$). **E)** ** vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$). * vs Nano-paclitaxel, vs Sinva, vs Nanoemulsão e vs Salina ($p < 0,05$).

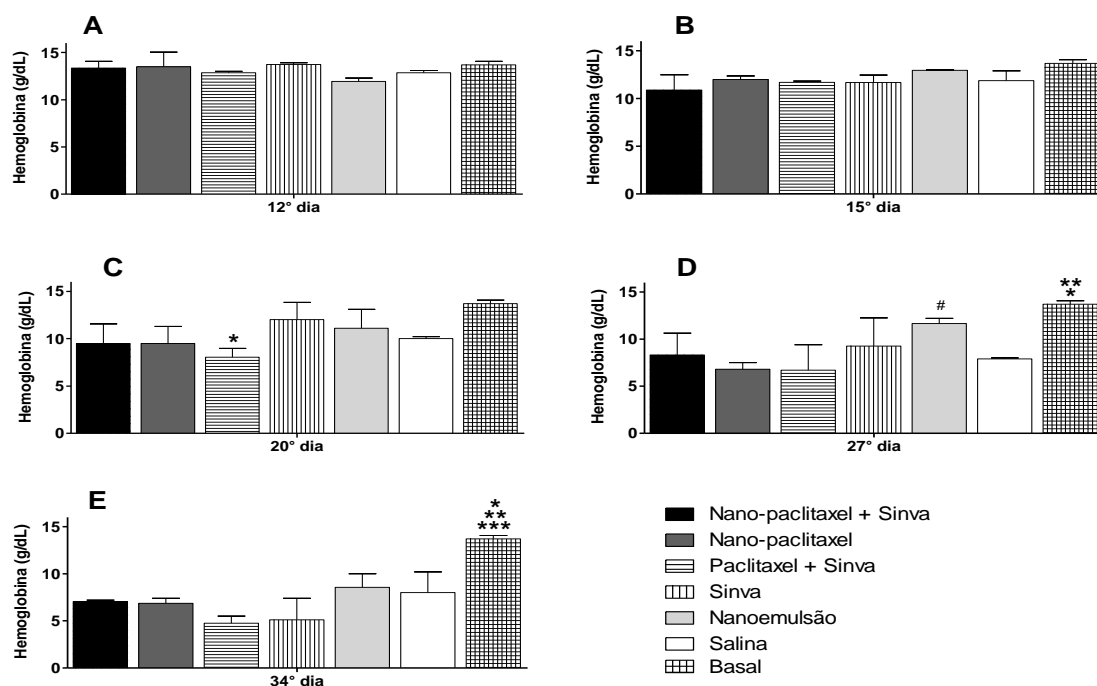


Figura 27. Hemoglobina de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Basal = média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5). **C)** * vs Basal (p<0,05). **D)** # vs Paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel (p<0,05); * vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Salina (p<0,05); ** vs Nano-paclitaxel e vs Paclitaxel + Sinva (p<0,01). **E)** *** vs Paclitaxel + Sinva e vs Sinva (p<0,001); ** vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel (p<0,01); * vs Nanoemulsão e vs Salina (p<0,05).

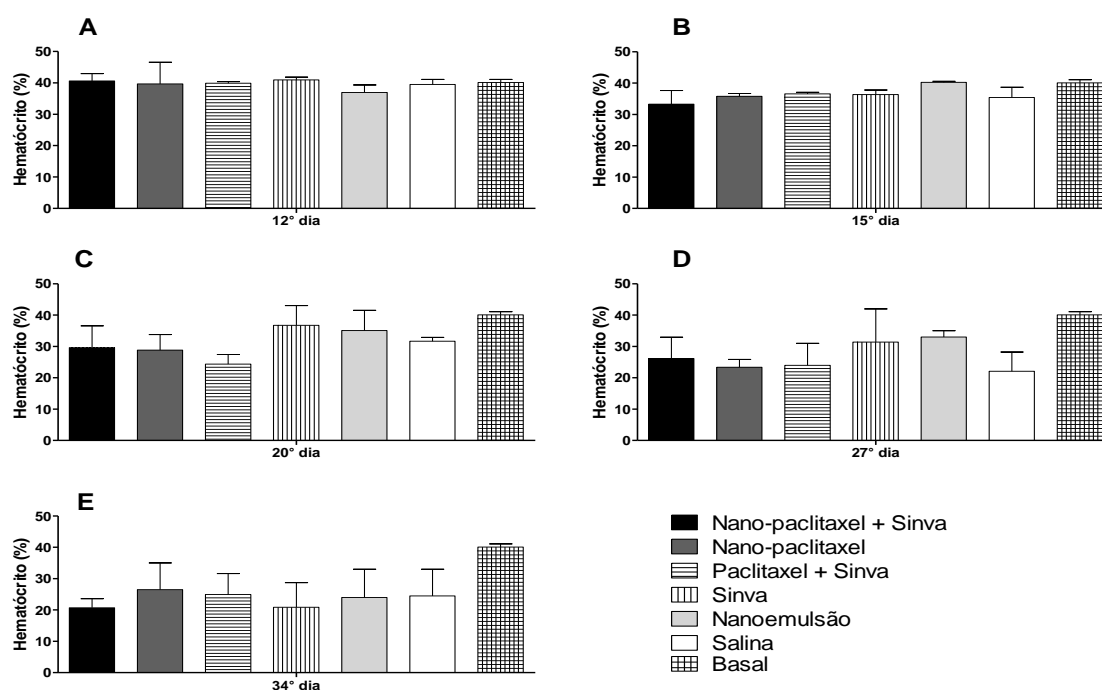


Figura 28. Hematócrito de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Basal = média dos valores obtidos em amostras de sangue coletadas antes do implante do tumor. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 5).

5.2.6 Potencial elétrico da membrana mitocondrial das células do tumor

A viabilidade celular foi estimada a partir da determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial das células do melanoma B16F10 coletadas 48 horas após o fim dos tratamentos dos animais. Esta análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda fluorescente a rodamina 123 (Rod123).

A Figura 29 mostra a porcentagem de células viáveis e não viáveis nas amostras de tumores dos animais dos diferentes grupos de tratamento. Os grupos Controle e Nanoemulsão apresentaram as maiores proporções de células viáveis com potencial elétrico, 87% e 94%, respectivamente (Figura 29). Em contraste, as proporções de células viáveis foram de 30% no grupo Sinva, 23% no grupo Paclitaxel + Sinva, 20% no grupo Nano-paclitaxel, e 14% no grupo Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$).

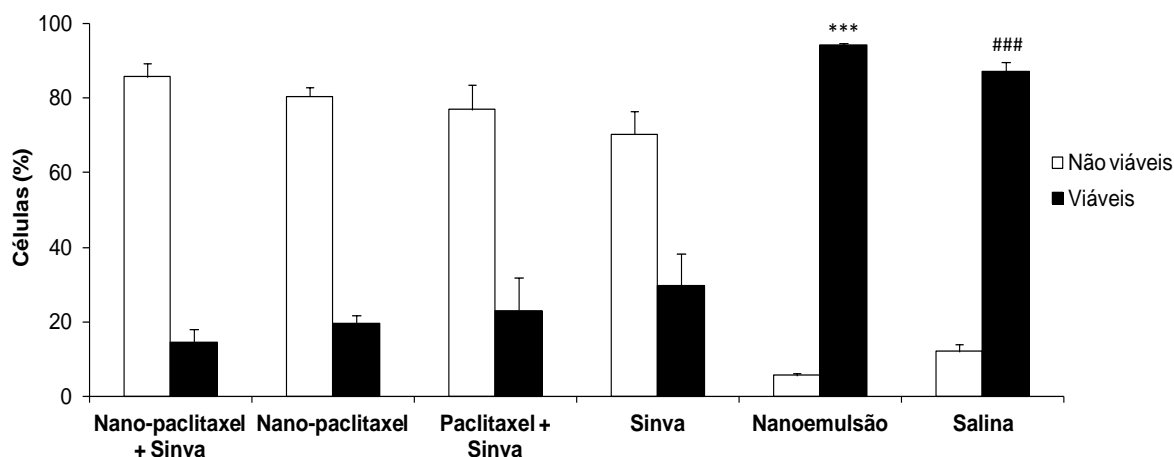


Figura 29. Viabilidade celular determinada a partir do potencial elétrico mitocondrial de células obtidas do tumor melanoma B16F10 marcadas com Rodamina 123. O tumor foi implantado em camundongos C57BL/6J e os animais foram tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; sinvastatina 50 mg/kg; nanoemulsão lipídica e solução salina. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 3$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Nano-paclitaxel, vs Paclitaxel + Sinva e vs Sinva ($p < 0,001$). ### vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Nano-paclitaxel, vs Paclitaxel + Sinva e vs Sinva ($p < 0,001$).

A Figura 30 mostra os histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das células tumorais. Nota-se a despolarização da membrana interna das mitocôndrias caracterizada pela redução de fluorescência da Rod123 nos

grupos Sinva, Paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel e finalmente, Nano-paclitaxel + Sinva.

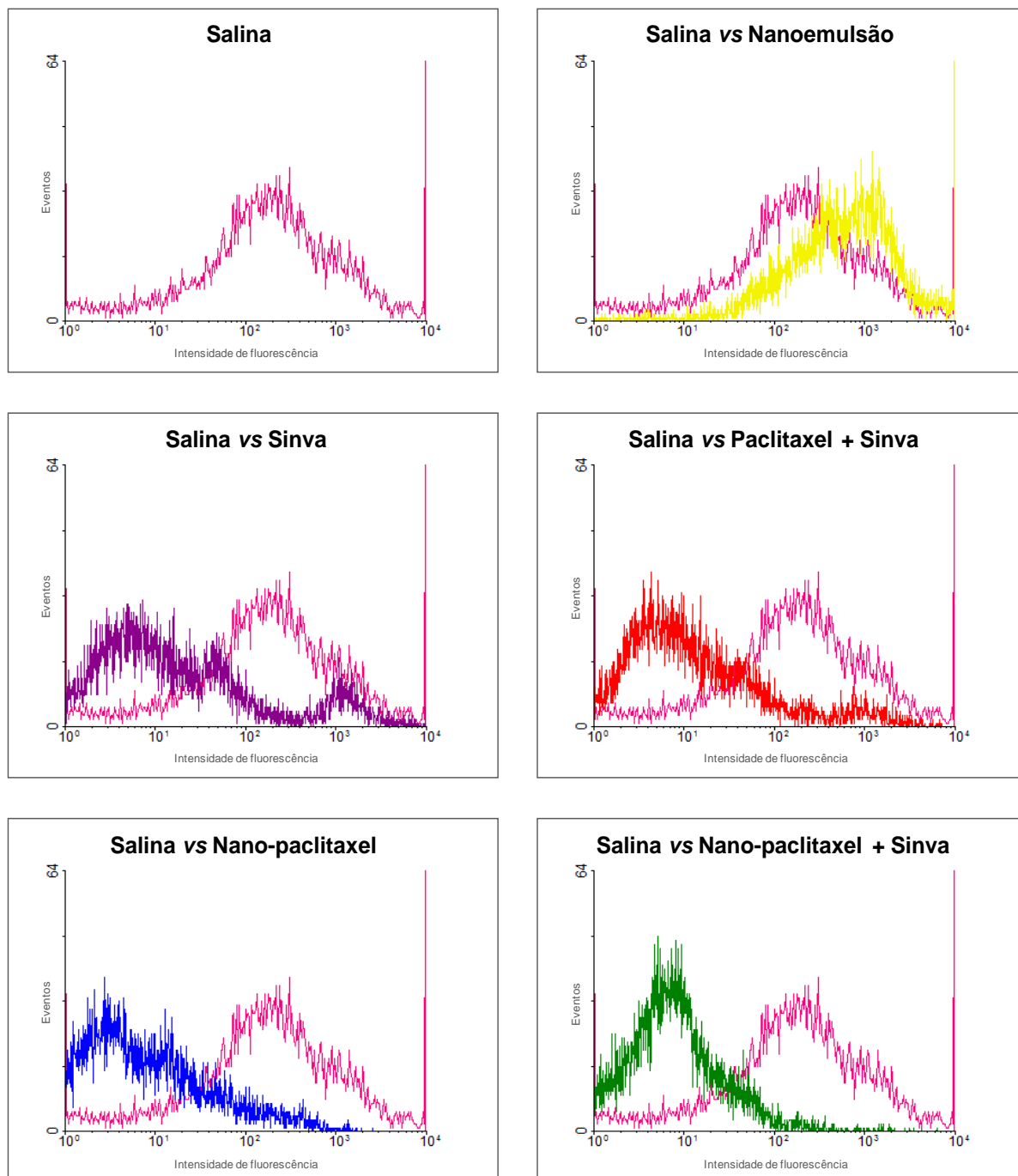


Figura 30. Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial de células obtidas do tumor melanoma B16F10 marcadas com Rodamina 123. O tumor foi implantado em camundongos C57BL/6J e os animais foram tratados com nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (■); nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ (■); paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (■); sinvastatina 50mg/kg (■); nanoemulsão lipídica (■) e solução salina (■).

5.2.7 Expressão dos marcadores de checagem do ciclo celular p27, p21 e ciclina D1 nas células do tumor

As Figuras 31 e 32 representam a expressão da proteína p27 nos tumores 48 horas após o fim dos tratamentos dos animais com solução salina, nanoemulsão lipídica, sinvastatina, sinvastatina e paclitaxel comercial, paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, e sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica. Não foi encontrada diferença estatística para a porcentagem de células com expressão de p27 entre os grupos de tratamento.

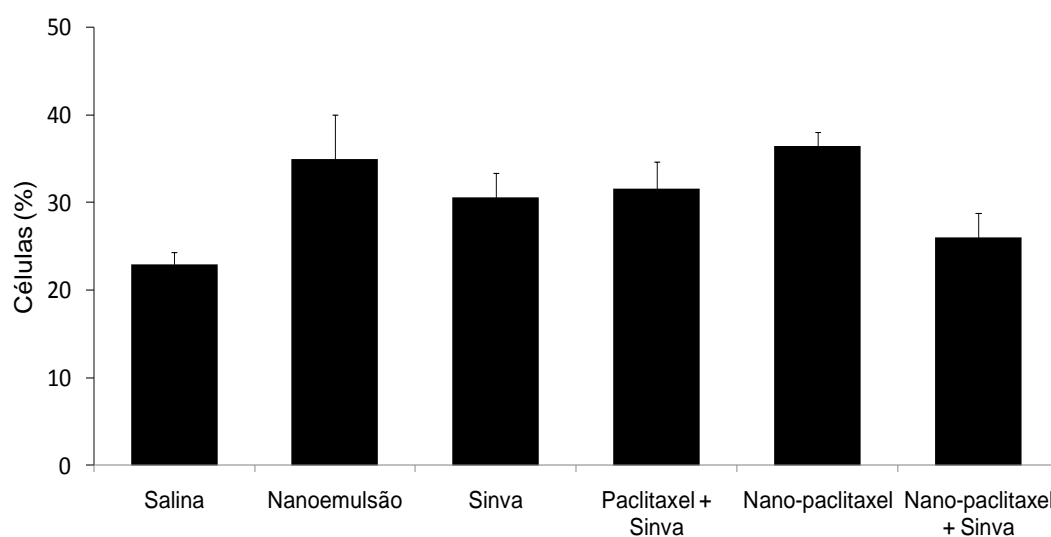


Figura 31. Expressão da proteína p27 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 μ mol/kg + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 μ mol/kg e nano-paclitaxel 17,5 μ mol/kg + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 3).

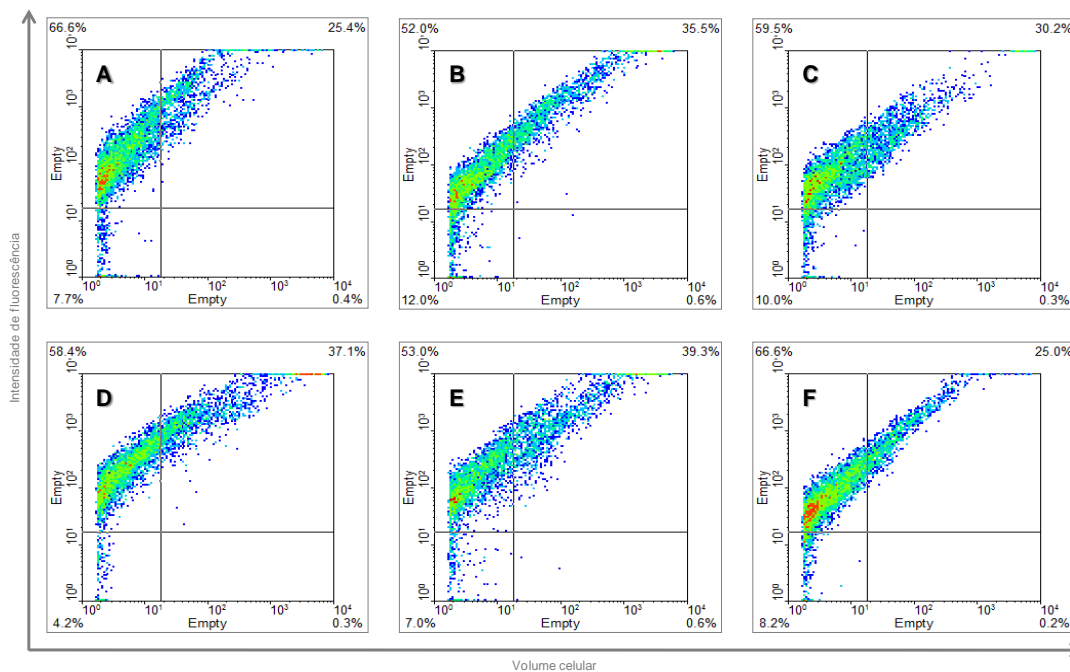


Figura 32. *Dot-plot* representativo da expressão de p27 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J tratados com: solução salina (**A**); nanoemulsão lipídica (**B**); sinvastatina 50 mg/kg (**C**); paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (**D**); nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ (**E**) e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (**F**). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor e a sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até o 19^o dia de experimento.

A expressão da proteína p21 em amostras de tumores foi determinada por citometria de fluxo 48 horas após o fim dos diferentes tratamentos dos animais portadores de melanoma (Figuras 33 e 34). Foi observado aumento na porcentagem de células com expressão da p21 somente nos grupos Nano-paclitaxel + Sinva (32%, $p < 0,001$), Sinva (30%, $p < 0,01$) e Nano-paclitaxel (27%, $p < 0,05$) em comparação ao grupo Controle (16%). Em comparação aos grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Sinva, o grupo Paclitaxel + Sinva apresentou menor porcentagem de células com expressão da p21 (20%, $p < 0,05$).

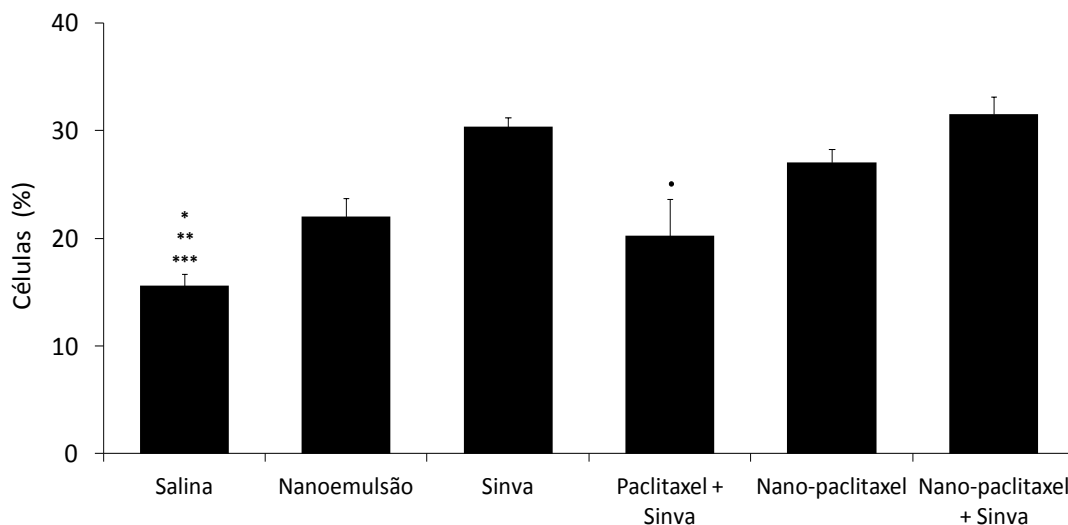


Figura 33. Expressão da proteína p21 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 3$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$); ** vs Sinva ($p < 0,01$); * vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$); • vs Sinva e vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$).

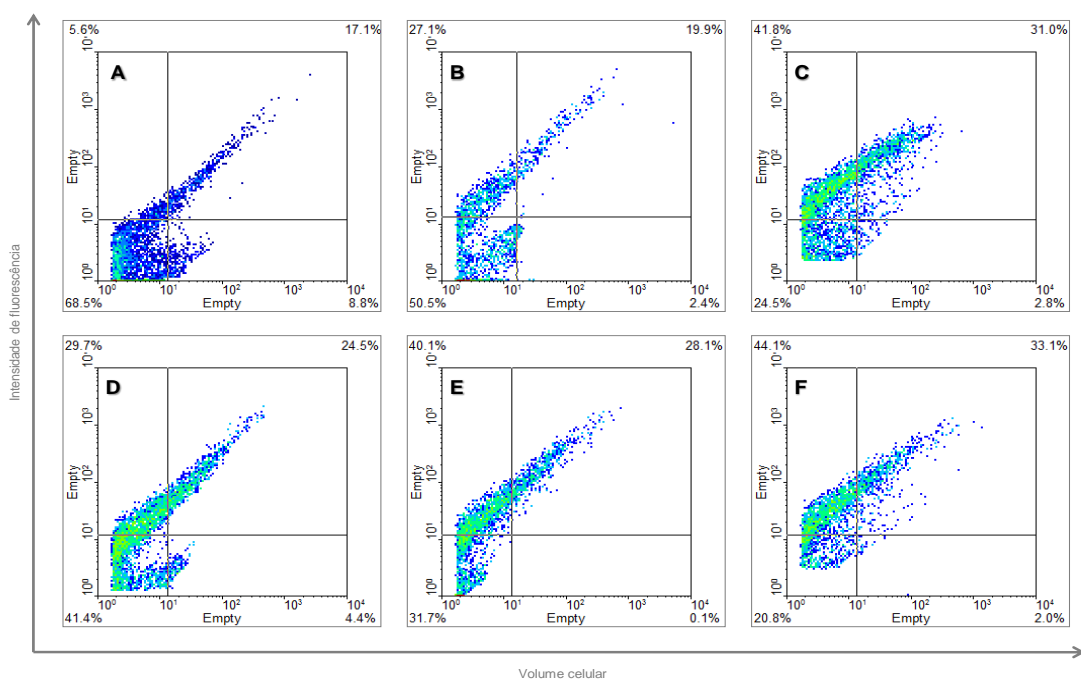


Figura 34. Dot-plot representativo da expressão de p21 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J tratados com: solução salina (A); nanoemulsão lipídica (B); sinvastatina 50 mg/kg (C); paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (D); nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ (E) e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg (F). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor e a sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11º até o 19º dia de experimento.

A avaliação da expressão da proteína indutora do ciclo celular ciclina D1 está representada nas Figuras 35 e 36. A Figura 35 mostra que os grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Sinva apresentaram redução na porcentagem de células com expressão da ciclina D1 em comparação ao grupo Controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). O grupo tratado apenas com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica mostrou uma maior porcentagem de células com expressão da ciclina D1 (27%) do que os grupos Nano-paclitaxel + Sinva (16%) e Sinva (17%) ($p < 0,05$), porém não diferiu do grupo Controle (28%).

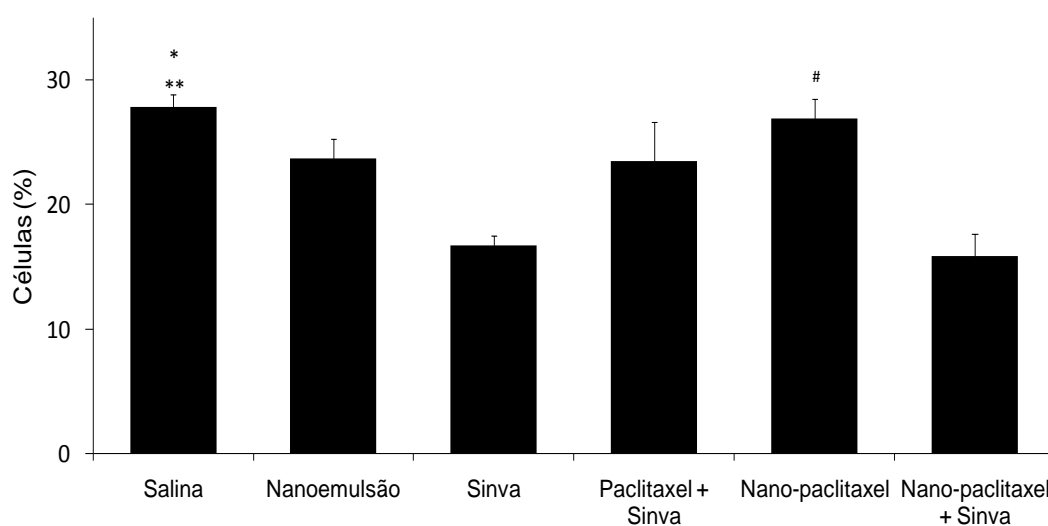


Figura 35. Expressão da proteína ciclina D1 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 3$). ** vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$); * vs Sinva ($p < 0,05$); # vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Sinva ($p < 0,05$).

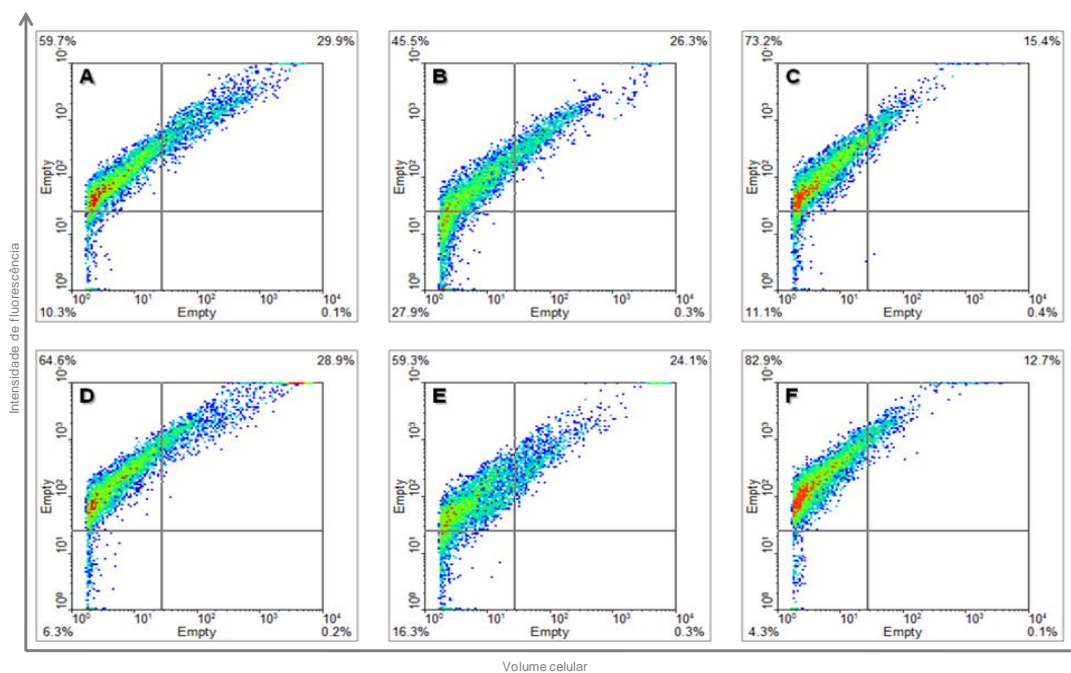


Figura 36. Dot-plot representativo da expressão de ciclina D1 em amostras do tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J tratados com: solução salina (A); nanoemulsão lipídica (B); sinvastatina 50 mg/kg (C); paclitaxel comercial 17,5 µmol/kg + sinvastatina 50 mg/kg (D); nano-paclitaxel 17,5 µmol/kg (E) e nano-paclitaxel 17,5 µmol/kg + sinvastatina 50 mg/kg (F). Os animais receberam a quimioterapia pela via intraperitoneal nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor e a sinvastatina foi administrada por gavagem diariamente do 11º até o 19º dia de experimento.

5.2.8 Análises histopatológicas dos tumores

As análises histológicas do grupo Controle mostraram tumores com grande número de células neoplásicas e depósito de pigmento melanótico no interior das células e nos espaços intersticiais (Figura 38). As fibras de colágeno tipo I e III dos tumores deste grupo mostraram-se fracamente coradas, demonstrando diminuição da arquitetura da rede fibrilar (Figuras 39 e 40).

Os cortes histológicos dos tumores do grupo Nanoemulsão evidenciaram grande número de células neoplásicas (Figuras 37 e 38) com estroma semelhante ao do grupo Controle com poucas fibras de colágeno (Figuras 39 e 40).

A Figura 38 mostra que os tumores dos grupos Sinva e Paclitaxel + Sinva apresentam áreas de necrose, fibrose e presença de células tumorais mortas. De fato, o tratamento dos animais apenas com sinvastatina, ou com a combinação de sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel levou à redução da densidade de células tumorais em relação aos grupos Controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$,

respectivamente) e Nanoemulsão ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença na presença de fibras de colágeno nos tumores destes grupos (Figuras 39 e 40).

A inibição do crescimento tumoral do grupo Nano-paclitaxel + Sinva foi evidenciada pela pequena densidade celular e presença de extensas áreas de necrose e fibrose observadas nos cortes histológicos (Figura 38). O tratamento dos animais com a combinação de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica reduziu drasticamente a população de células tumorais e aumentou a presença de fibras de colágeno no tecido tumoral em comparação aos demais tratamentos (Figuras 37 e 39). A Figura 40 ilustra a intensa deposição de fibras de colágeno nas amostras de tumores deste grupo.

O tratamento dos animais apenas com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica levou à redução da população de células tumorais em comparação aos grupos Controle ($p < 0,001$), Nanoemulsão ($p < 0,001$), Sinva ($p < 0,01$) e Paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$). Porém, neste caso, não houve aumento significativo na deposição de fibras de colágeno no tecido tumoral em comparação aos demais grupos (Figuras 39 e 40).

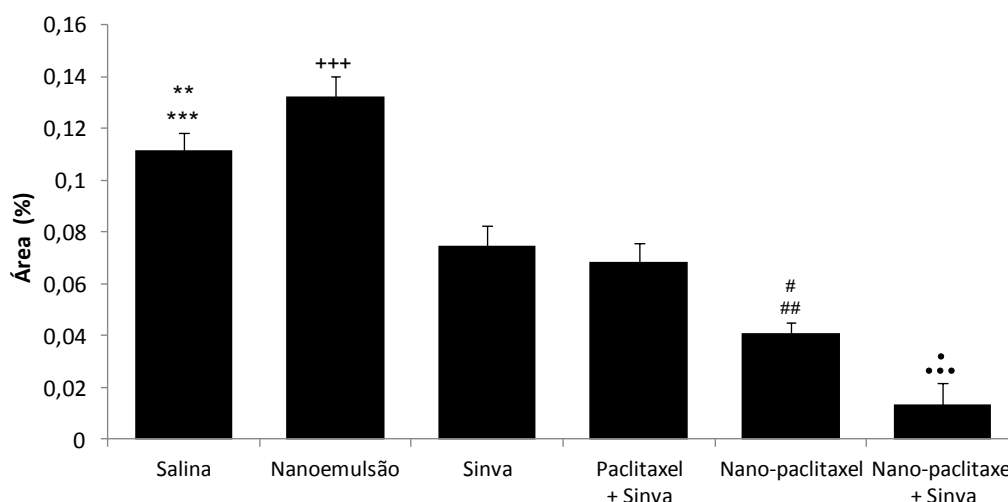


Figura 37. Células tumorais no melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 6$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); ** vs Sinva ($p < 0,01$); +++ vs Sinva, vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); ## vs Sinva ($p < 0,01$); # vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,05$); • vs Sinva e vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$); * vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$).

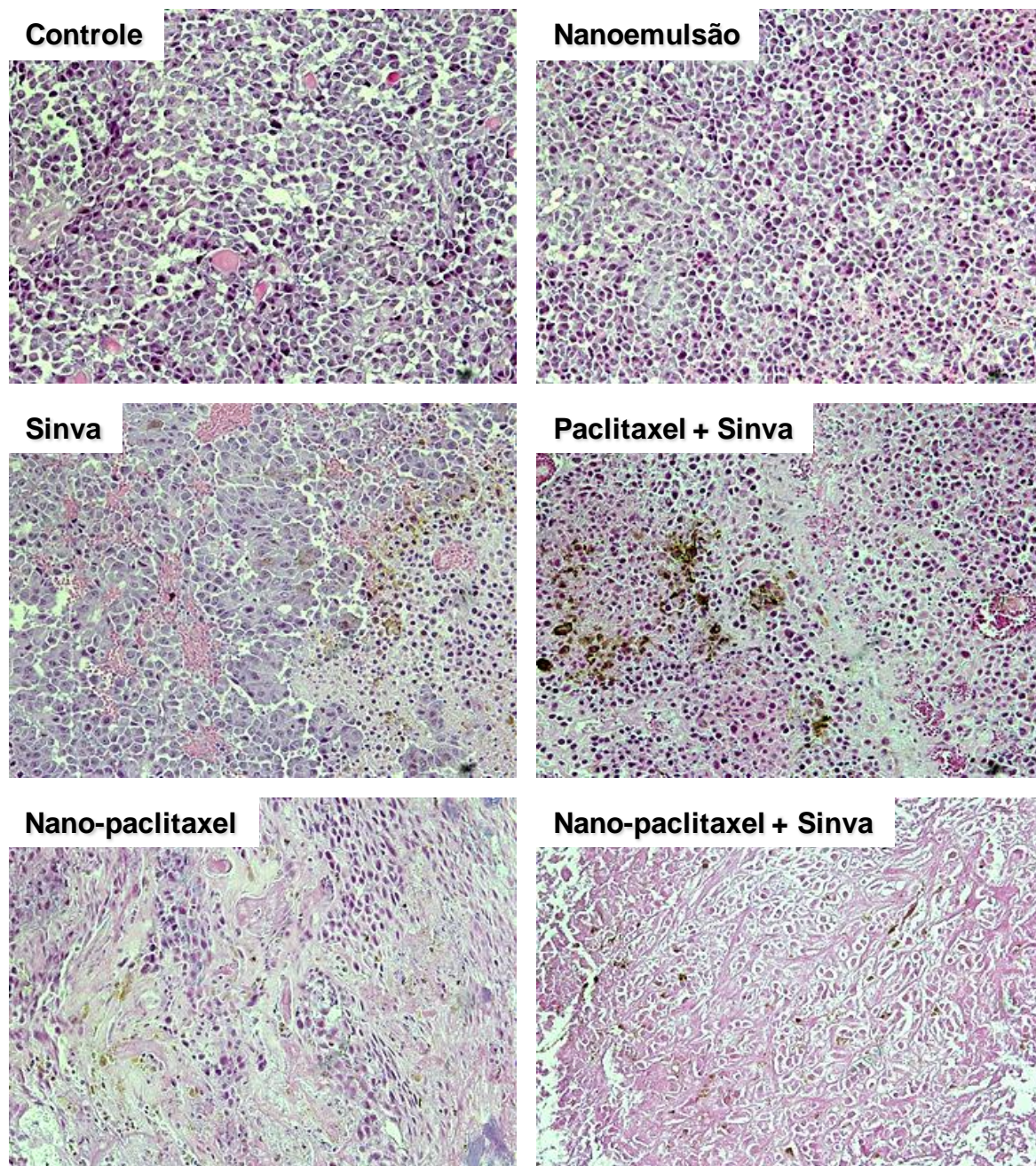


Figura 38. Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J corados com hematoxilina-eosina (aumento de 200x). Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até 19^o dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

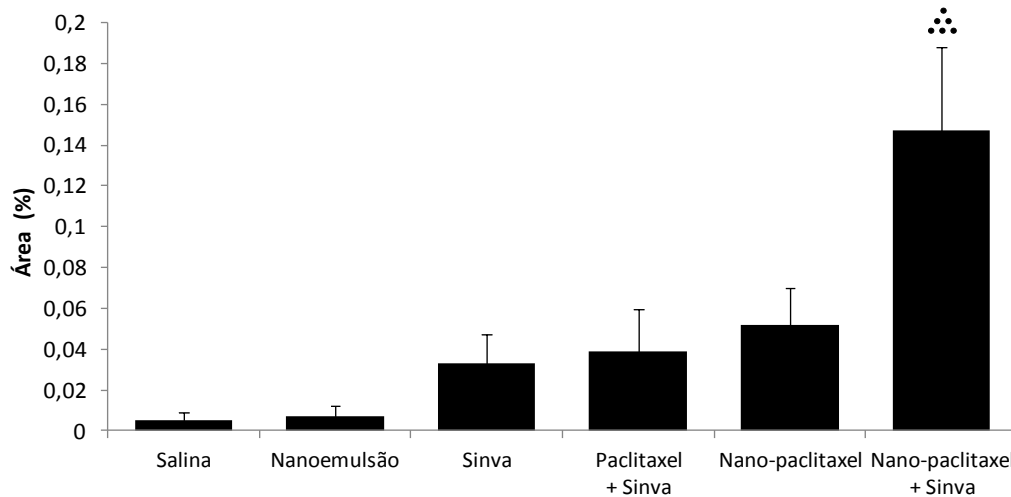


Figura 39. Presença de colágeno I e III no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão (n = 6). *** vs Salina e vs Nanoemulsão ($p < 0,001$); ** vs Sinva e vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$); • vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$).

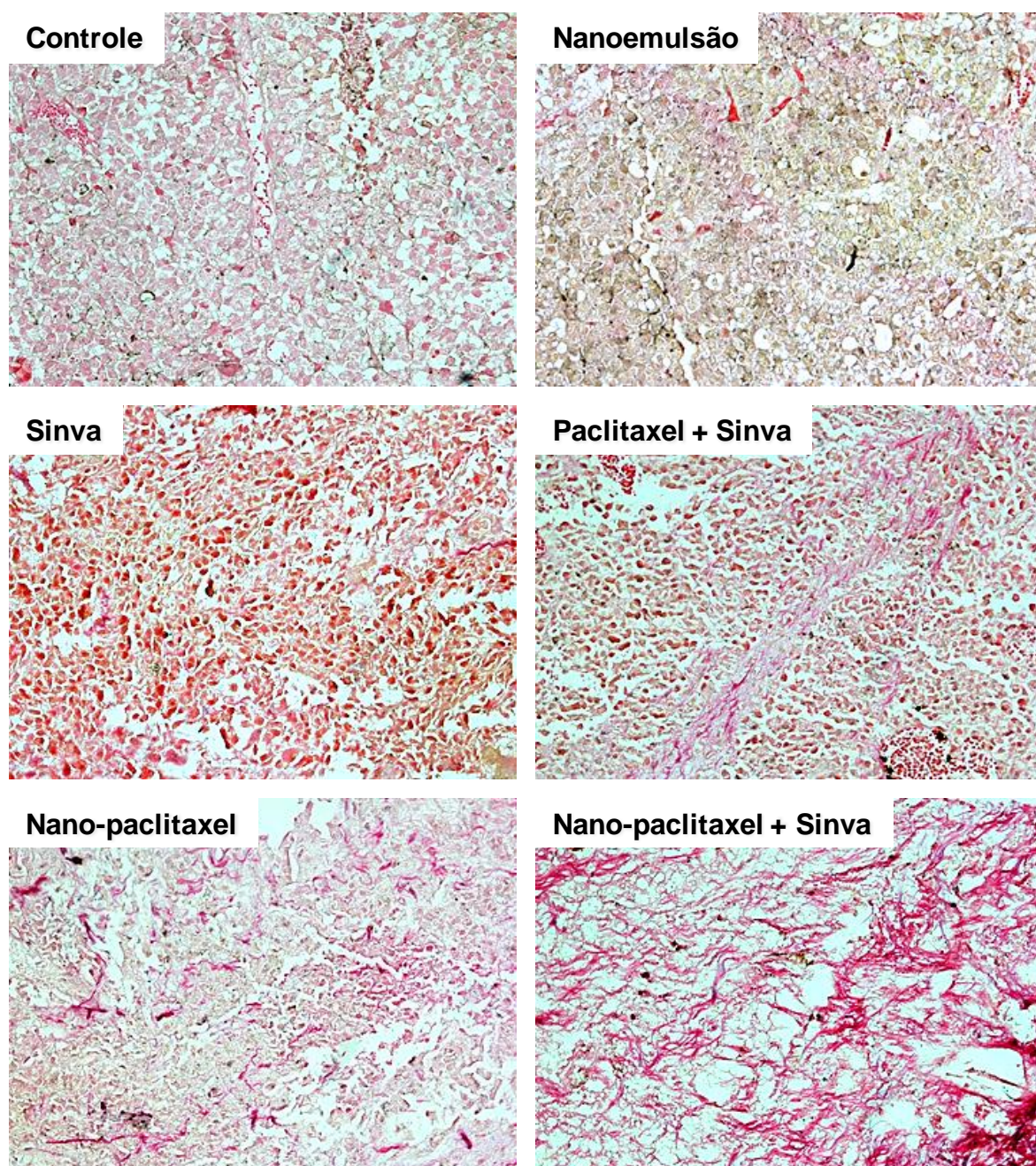


Figura 40. Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J corados com picosirius red (aumento de 200x). Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11° até 19° dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

5.2.8.1 Expressão de ICAM no tumor

A expressão de ICAM no tumor foi estimada através de reações de imunohistoquímica e a Figura 41 representa os valores médios da porcentagem de área marcada positivamente para a proteína. Em comparação ao grupo Controle, os grupos Sinva ($p < 0,05$), Paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$), Nano-paclitaxel ($p < 0,001$) e Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$) apresentaram redução na expressão de ICAM. Entretanto, a redução na expressão de ICAM observada no grupo tratado apenas com a nanoemulsão lipídica não foi estatisticamente significativa.

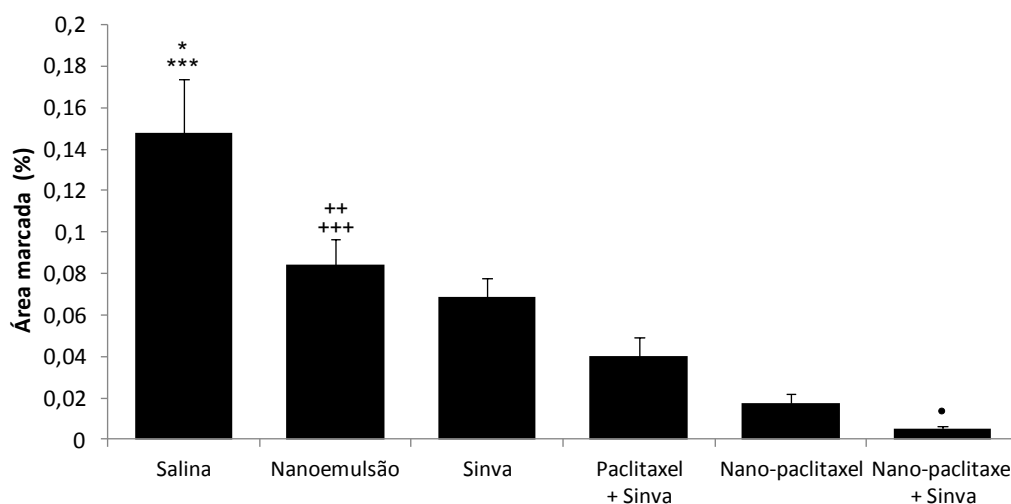


Figura 41. Expressão de ICAM no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 6$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); * vs Sinva ($p < 0,05$); +++) vs Nano-paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$); ++ Nano-paclitaxel ($p < 0,01$); • vs Sinva ($p < 0,05$).

A Figura 42 mostra fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 marcado com anticorpo anti-ICAM nos diferentes grupos de tratamento.

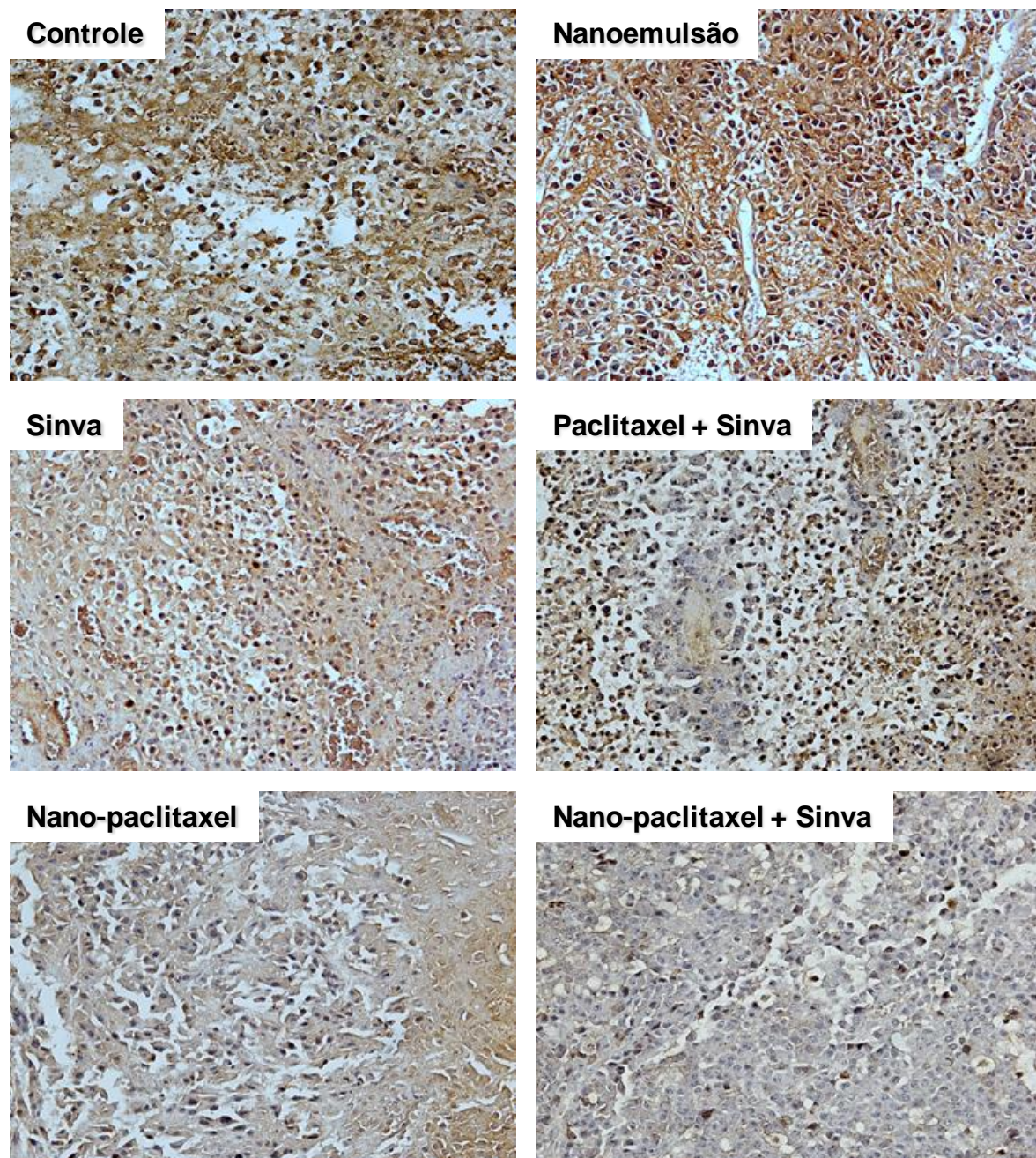


Figura 42. Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J marcados com anticorpo anti-ICAM (aumento de 200x). Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11° até 19° dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

5.2.8.2 Expressão de MMP-9 no tumor

Os valores médios da porcentagem de área marcada positivamente para a MMP-9 no melanoma B16F10 estão representados na Figura 43. Em comparação ao grupo Controle, foi observada redução na expressão da metaloproteinase nos grupos Nano-paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel, Sinva, e Paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$). Em comparação aos grupos de tratamento Paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$), Nano-paclitaxel ($p < 0,05$) e Sinva ($p < 0,05$), o grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentou a menor porcentagem de área marcada positivamente para MMP-9.

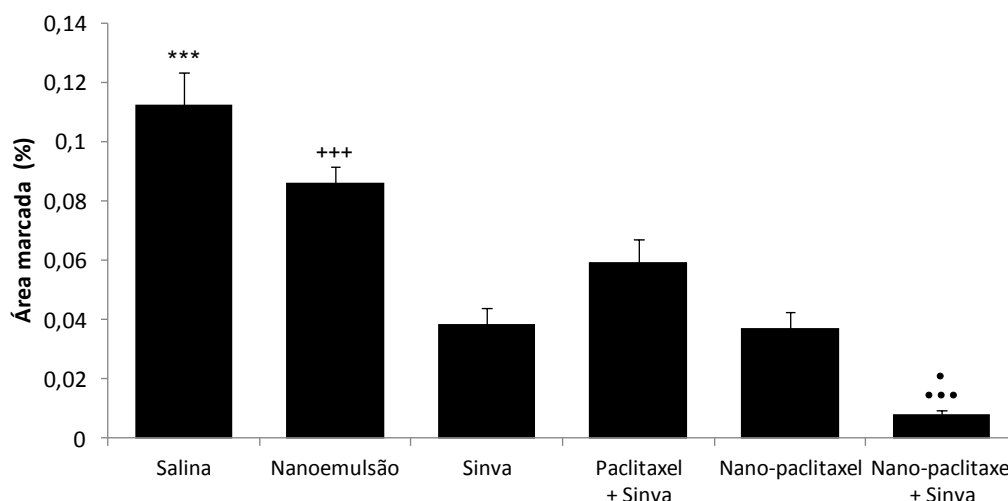


Figura 43. Expressão de MMP-9 no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 6$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Paclitaxel + Sinva, vs Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); +++ vs Sinva, vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); • vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,001$); • vs Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,05$).

Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 marcado com anticorpo anti-MMP-9 nos diferentes grupos de tratamento são mostradas na Figura 44.

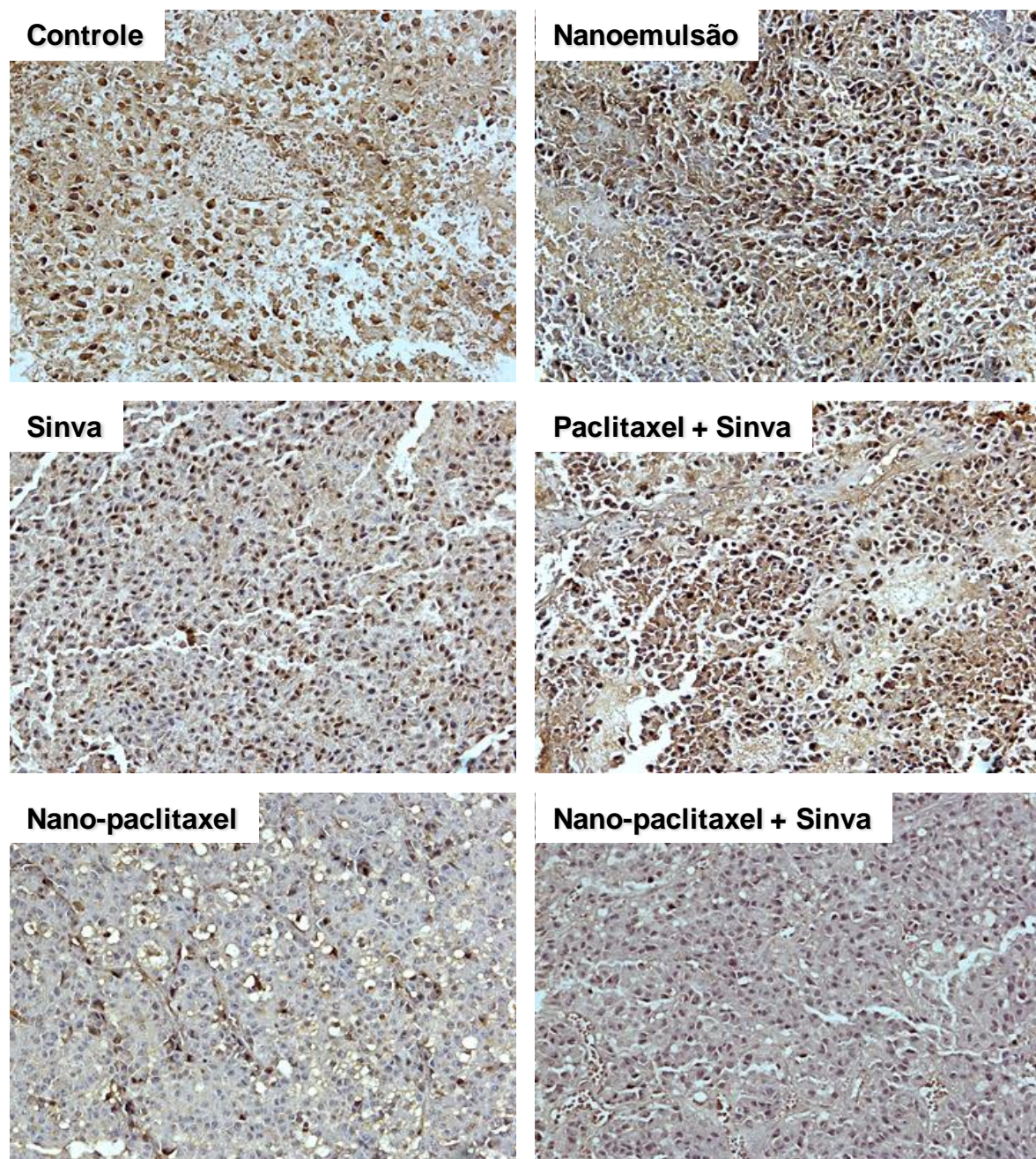


Figura 44. Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J marcados com anticorpo anti-MMP-9 (aumento de 200x). Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até 19^o dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

5.2.8.3 Expressão de MCP-1 no tumor

A expressão da quimiocina MCP-1 no melanoma B16F10 está representada nas Figuras 45 e 46. A Figura 45 representa os valores médios da porcentagem de área marcada positivamente para a quimiocina e mostra que os grupos de tratamento Sinva, Paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel e Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram drástica redução na expressão de MCP-1 em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Este efeito não foi observado no grupo tratado apenas com a nanoemulsão lipídica.

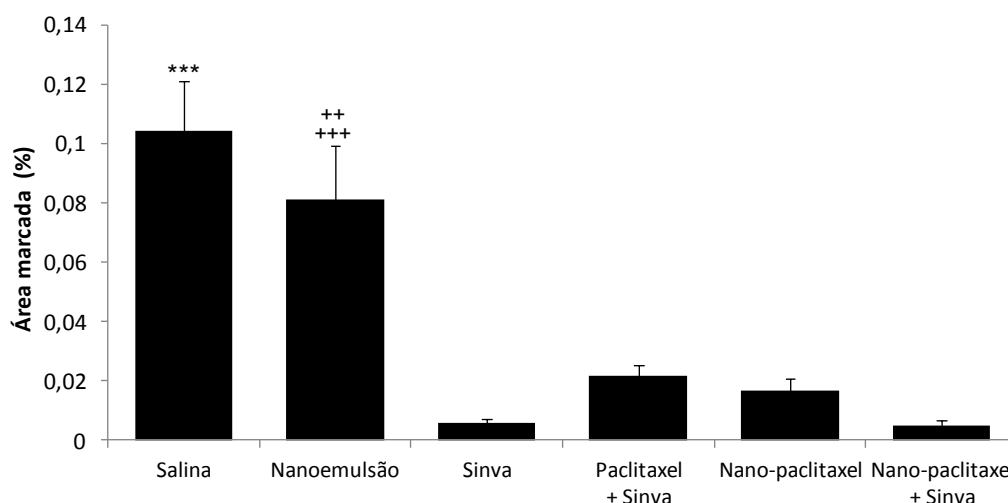


Figura 45. Expressão de MCP-1 no tumor dorsal melanoma B16F10 implantado em camundongos C57BL/6J. Os animais foram tratados com solução salina; nanoemulsão lipídica; sinvastatina 50 mg/kg; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg; nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$ + sinvastatina 50 mg/kg. Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n = 6$). *** vs Nano-paclitaxel + Sinva, vs Paclitaxel + Sinva, vs Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); +++ vs Sinva, vs Nano-paclitaxel + Sinva e vs Nano-paclitaxel ($p < 0,001$); ++ vs Paclitaxel + Sinva ($p < 0,01$).

A Figura 46 mostra fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 marcado com anticorpo anti-MCP-1 nos diferentes grupos de tratamento.

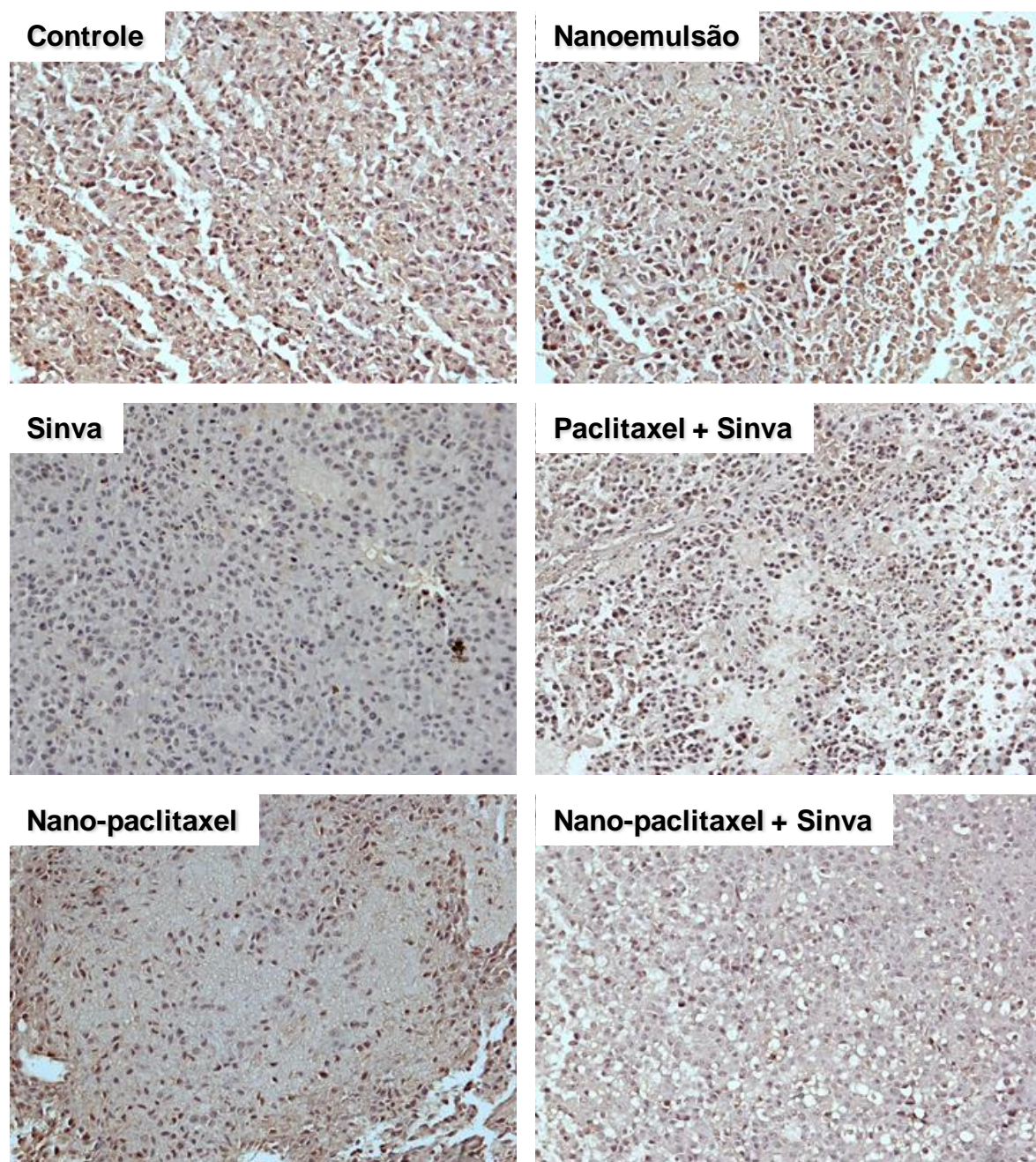


Figura 46. Fotomicrografias representativas do aspecto histológico do tumor melanoma B16F10 implantado em camundongos C57Bl/6J marcados com anticorpo anti-MCP-1 (aumento de 200x). Nos dias 11, 14 e 19 após a inoculação do tumor, animais receberam pela via intraperitoneal solução salina; nanoemulsão lipídica; paclitaxel comercial 17,5 $\mu\text{mol/kg}$; e nano-paclitaxel 17,5 $\mu\text{mol/kg}$. A sinvastatina 50mg/kg foi administrada por gavagem diariamente do 11^o até 19^o dia após a inoculação do tumor em um dos grupos de animais tratados com oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica lipídica, no grupo tratado com o paclitaxel comercial e como monoterapia.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo o uso do sistema de nanopartículas lipídicas como transportadoras de quimioterápicos foi testado na terapia combinada do agente antineoplásico paclitaxel com a sinvastatina.

Para elucidação dos possíveis efeitos tóxicos da terapia combinada com paclitaxel e sinvastatina realizou-se um estudo em camundongos sem tumor, e os fármacos foram administrados seguindo o mesmo esquema terapêutico do protocolo de avaliação de atividade antitumoral. Este estudo mostrou claramente que a combinação da sinvastatina com a formulação comercial do paclitaxel não foi tolerada, levando à acentuada perda de peso e morte da maioria dos animais antes do terceiro ciclo de tratamento. No entanto, verificou-se que os tratamentos com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica foram bem tolerados. Além disso, a eficácia do uso da nanoemulsão lipídica na redução dos efeitos adversos dos tratamentos foi evidenciada pela redução de mielotoxicidade observada nos grupos tratados com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica.

A redução dos efeitos tóxicos do paclitaxel demonstrada em nosso estudo está de acordo com resultados encontrados por Rodrigues et al. (2005) ao testar em camundongos, os efeitos deste quimioterápico associado à nanoemulsão lipídica. A redução marcante de toxicidade observada pode ser explicada pela alteração da biodistribuição do fármaco promovida por sua associação à nanoemulsão lipídica (RODRIGUES et al., 2005). Cabe ainda destacar que o Cremophor EL[®], veículo no qual o paclitaxel é solubilizado e administrado em sua forma comercial, apresenta toxicidade conhecida e sua substituição pela nanoemulsão lipídica é um fator importante na redução dos efeitos tóxicos do tratamento. A atenuação dos efeitos adversos do paclitaxel também foi descrita em estudos com outros sistemas transportadores de fármaco, tais como polímeros, proteínas e lipossomas (WALTER et al., 1994; SPARREBOOM; BAKER; VERWEIJ, 2005; VASSILEVA et al., 2007; ZHAO et al., 2009; KOUDELKA et al., 2010).

Um resultado que merece atenção é o da concentração das enzimas hepáticas AST e ALT. Apesar do discreto aumento destas enzimas em todos os grupos que receberam quimioterapia, os valores de AST e ALT encontrados neste estudo estão de acordo com os valores de referência destas enzimas para camundongos (FOSTER; SMALL; FOX, 1982; JACOBY; FOX, 1984). Este dado é de

grande importância tendo em vista que em estudos anteriores foi evidenciado que o fígado é o principal órgão de captação da nanoemulsão lipídica em camundongos com e sem tumor (RODRIGUES et al., 2005; FAVERO, 2007). A redução de hepatotoxicidade foi demonstrada em outros estudos realizados com a nanoemulsão lipídica. Em 2007, Favero mostrou que uma variação da nanoemulsão lipídica contendo 7-cetocolesterol não alterou as concentrações plasmáticas de AST e ALT e não provocou alterações morfológicas no fígado de camundongos C57BL/6J. Além disso, Maranhão et al. (2002) demonstraram que pacientes tratados com a carmustina associada à nanoemulsão lipídica apresentaram toxicidade hepática negligível, mesmo com a administração de altas doses do quimioterápico.

O tumor melanoma B16F10 é um dos modelos utilizados pelo NCI, EUA na avaliação da atividade antitumoral de novos agentes antineoplásicos (PLOWMAN et al., 1997). Por se tratar de um tumor com rápida proliferação celular (GERAN et al., 1972) e que apresenta expressão de rLDL (VERSLUIS et al., 1998; RODRIGUES et al., 2005), este modelo oncológico experimental foi escolhido para avaliação dos efeitos antitumorais de fármacos associados à nanoemulsão lipídica e tem sido amplamente utilizado em trabalhos realizados pelo grupo (RODRIGUES et al., 2005; LO PRETE et al., 2006; KRETZER, 2007; CONTENTE, 2011).

Os resultados obtidos no protocolo de avaliação de atividade antitumoral mostram a superioridade do tratamento combinando a sinvastatina com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica em inibir o crescimento do melanoma. De acordo com padrões estabelecidos pela divisão de tratamento do câncer do NCI, EUA, valores de T/C (relação entre a massa tumoral do grupo tratado e grupo controle), menores ou iguais a 42% são indicativos de atividade antitumoral significativa. Valores menores que 10%, indicam atividade antitumoral altamente significativa (PLOWMAN et al., 1997). Os resultados apresentados se enquadram nesses critérios, pois no 31º dia de experimento, o valor de T/C do grupo Nano-paclitaxel + Sinva foi de apenas 5%.

Outro parâmetro importante na avaliação da atividade antitumoral de fármacos é a probabilidade de sobrevivência dos animais portadores de tumor. Entin et al. (2003) reportaram que camundongos com melanoma B16 não tratados morrem em torno de 35 e 40 dias após a implantação do tumor. De fato, em nosso estudo 100% dos animais dos grupos Controle e Nanoemulsão morreram até o 35º dia após a implantação do tumor. Na comparação da porcentagem de sobrevivência entre

camundongos tratados com quimioterapia, houve melhora na taxa de sobrevivência dos animais dos grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel. É provável que o aumento na sobrevivência seja resultado da melhora na ação farmacológica do paclitaxel quando associado à nanoemulsão lipídica, assim como da baixa toxicidade desta preparação.

Um dado interessante deste trabalho provém dos resultados das necropsias dos animais. Nestes estudos, foi observado que o número de animais que apresentaram sítios metastáticos no grupo Nano-paclitaxel + Sinva foi muito menor do que no grupo Paclitaxel + Sinva. Da mesma forma, os animais tratados apenas com o nano-paclitaxel apresentaram redução no número de animais com nódulos metastáticos em comparação ao grupo Controle. Isto sugere que os tratamentos que utilizam a nanoemulsão lipídica como transportadora de quimioterápicos sejam mais efetivos na inibição do desenvolvimento ou na destruição de sítios metastáticos. De qualquer modo, este resultado é de extrema relevância e fundamenta a continuidade da pesquisa nesse campo.

Estudo realizado por Norton (1988) sugere que a menos que ocorra uma erradicação total das micrometástases, volumes residuais variantes produzirão uma resposta similar na probabilidade de sobrevivência de pacientes em cinco anos, tornando obscuras as principais diferenças na redução tumoral em programas terapêuticos diferentes. Esta informação reforça a idéia de que o menor número de animais com metástases no grupo Nano-paclitaxel + Sinva é um prognóstico favorável da eficácia terapêutica em longo prazo.

A análise do perfil hematológico dos animais é uma ferramenta útil na avaliação da presença de toxicidade relacionada ao tratamento ou inerente ao próprio tumor. A redução no número de leucócitos observada nos testes em camundongos sem tumor tratados com a formulação comercial do paclitaxel também foi evidenciada nos camundongos portadores de tumor. Porém, neste caso, não houve retorno à normalidade do número de leucócitos nas semanas posteriores ao final do tratamento, possivelmente por infiltração medular pelo tumor.

O aumento na porcentagem de neutrófilos observado no grupo Paclitaxel + Sinva pode ser explicado pela correlação entre o uso do paclitaxel comercial e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-8 (IL-8) (LEE et al., 1996; DUAN et al., 1999; COLLINS; LEE; TING, 2000; PENSON et al., 2000; PUSZTAI et al., 2004). É importante destacar que o melanoma também pode

secretar a IL-8 e que esta citocina pode modular a ligação entre as células tumorais e os neutrófilos. Desta forma, os neutrófilos podem servir de mediadores na ligação das células tumorais ao endotélio, favorecendo o processo de migração transendotelial e conseqüentemente, a metastatização do tumor (SLATTERY; DONG, 2003; DONG et al., 2005).

A avaliação do número de plaquetas nos animais portadores de tumor demonstrou claramente a relação existente entre a trombocitose e a evolução do tumor. O aumento do número de plaquetas é comum no câncer e pode ser resultado do aumento da liberação de trombopoetina por plaquetas ativadas, o que estimula a trombocitopoese (FOLMAN et al., 2000).

Existem evidências de que as plaquetas promovam a progressão tumoral e formação de metástases. Sabe-se que estas células protegem as células tumorais do sistema imune, facilitam a adesão de células tumorais ao endotélio vascular e liberam fatores de crescimento vascular, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e trombospondina (TAKEBAYASHI et al., 1996; QIAN; TUSZYNSKI, 1996; KIN et al., 1998; NIESWANDT et al., 1999; NASH et al., 2002). De fato, a trombocitose é associada ao aumento da concentração de VEGF no sangue de pacientes com câncer (SALVEN; ORPANA; JOENSUU, 1999) e esta correlacionada com um pior prognóstico e com a redução na sobrevida de pacientes com câncer cervical (LOPES et al., 1994), de pulmão (PEDERSEN; MILMAN, 1996), vulvar (LAVIE et al., 1999), hepático (HWANG et al., 2004), colorretal (KANDEMIR et al., 2005), renal (BENSALAH et al., 2006) e de ovários (LEE et al., 2011). Cabe salientar que no presente estudo não foi observada trombocitose nos animais dos grupos Nano-paclitaxel + Sinva e Nano-paclitaxel, e que ambos os tratamentos resultaram em aumento na sobrevida dos animais e na redução na porcentagem de animais com metástases. Em contraste, foi observada grande porcentagem de animais com metástases nos grupos Controle, Nanoemulsão e Paclitaxel + Sinva, fato que pode estar relacionado com a trombocitose presente nos animais destes grupos.

O eritrograma dos animais com melanoma revelou o surgimento de anemia induzida pelo tumor. De fato, a anemia é um quadro comum no câncer e sua etiologia é multifatorial, envolvendo mecanismos que podem estar relacionados com a perda de sangue, hemólise, infiltração medular, desnutrição, mielofibrose, infecção e inflamação (SPIVAK, 1994).

Além da avaliação macroscópica do crescimento tumoral nos animais, foi estudada também a viabilidade das células de melanoma extraídas de amostras do tumor após o fim dos tratamentos. Esta análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando como marcador a rodamina 123 (Rod123), uma sonda lipofílica catiônica fluorescente que se distribui no compartimento mitocondrial, emitindo fluorescência proporcional a quantidade absoluta de Rod123. A Rod123 permite a avaliação bioenergética da mitocôndria em células vivas, sendo assim, a redução de sua fluorescência é relacionada com a despolarização, ou seja, perda do potencial da membrana mitocondrial interna. A despolarização da membrana mitocondrial foi observada em todos os grupos de tratamento, em contraste com os grupos Controle e Nanoemulsão, demonstrando a indução de morte celular gerada pela quimioterapia combinada ou não à sinvastatina. Tendo em vista que o grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentou a menor massa tumoral, é possível que este tratamento tenha resultado em uma população de células residuais vivas em menor proporção do que nos demais tratamentos.

O efeito do uso da sinvastatina com a quimioterapia na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular também foi avaliado. A ciclina D1 é uma das proteínas envolvidas na transição da fase G₁ (quiescente), para a fase S (síntese) do ciclo celular e a sua superexpressão está correlacionada com tumores mamários, linfomas, câncer colorretal e melanomas (DONNELLAN; CHETTY, 1998; COUPLAND et al., 1998). Além de ser um promotor de proliferação, a ciclina D1 pode também funcionar como fator de sobrevivência para as células tumorais (INOHARA; KITAGAWA; KITANO, 1996; SAUTER et al., 2002). Em nosso estudo foi demonstrado que os grupos Sinva e Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram redução na porcentagem de células positivas para ciclina D1. Além disso, observou-se um aumento de células positivas para proteína inibidora de ciclina-quinases (CDKs) p21 nos tumores destes grupos de tratamento. A relação entre os efeitos antiproliferativos das estatinas com o aumento da p21 e redução da ciclina D1 já foram descritos na literatura e estão relacionados ao bloqueio do ciclo celular na fase G₁ promovido por estes fármacos (COLLISSON et al., 2003; UKOMADU; DUTTA, 2003; DENOYELLE et al., 2003; TAKEDA et al., 2007; SAITO et al., 2008). Neste contexto, cabe destacar que tratamento apenas com a sinvastatina não foi eficiente em reduzir o crescimento do melanoma, porém, seus efeitos antitumorais

podem ter se somado aos efeitos do paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, aumentando assim, a eficácia da quimioterapia.

Um resultado interessante foi a observação de que os grupos Sinva, Nano-paclitaxel e Nano-paclitaxel + Sinva apresentaram aumento da expressão da proteína p21 e não da proteína p27. É possível que o bloqueio do ciclo celular promovido por estes fármacos tenha envolvido a proteína p53, responsável pela regulação da p21. O estudo de Horiguchi et al. (2004) com a fluvastatina corrobora esta hipótese mostrando que o aumento da expressão de p21 foi acompanhado do aumento da p53 em células de câncer renal murino. No entanto, é importante lembrar que outros estudos afirmam que o aumento de p21 induzido pelas estatinas ocorre por vias independentes da p53 (LEE et al., 1998; RAO et al., 1998).

O protocolo de avaliação de atividade antitumoral utilizado neste estudo permitiu a observação da inibição do crescimento do melanoma e a melhora no estado físico dos animais quando utilizamos a nanoemulsão lipídica como transportadora do paclitaxel. No entanto, o melanoma possui um microambiente bastante complexo e de grande importância para sua progressão ou regressão. Desta forma, optou-se também pela realização de uma avaliação histopatológica das amostras dos tumores obtidas nas necropsias dos animais. Assim, foi possível a observação das diferenças na composição do tecido tumoral nos diferentes grupos de tratamento. Em contraste com os demais grupos de tratamento, o grupo Nano-paclitaxel + Sinva apresentou tumores com menor densidade de células tumorais e maior presença de fibras de colágeno I e III no estroma. Este é um dado importante visto que a degradação destas fibras pela ação de metaloproteinases é promovida pelo tumor e está relacionada com a progressão e invasão do câncer (AIROLA et al., 1999; WANDEL et al., 2000; WANDEL et al., 2002; LABROUSSE et al., 2004; VAN KEMPEN et al., 2008). Além disso, os tumores dos animais do grupo Nano-paclitaxel + Sinva também apresentaram a menor porcentagem de área positiva para MMP-9, enzima importante no processo de invasão do tumor e que degrada colágeno tipo I (LIABAKK et al., 1996; JOHNSEN et al., 1998; FROMIGUÉ; HAMIDOUCHE; MARIE, 2008).

Um aspecto importante observado nos tumores dos grupos de tratamento Nano-paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel, Paclitaxel + Sinva e Sinva foi a redução da porcentagem de área positiva para a quimiocina MCP-1 em comparação ao grupo Controle. Koga et al. (2008) mostraram que a MCP-1 expressa no melanoma está

correlacionada com o crescimento e com a vascularização do tumor. Estes efeitos ocorrem indiretamente devido a produção de VEGF e citocinas inflamatórias, como a IL-8, pelos macrófagos recrutados pela MCP-1 (KURODA et al., 2005; GAZZANIGA et al., 2007; KOGA et al., 2008).

A porcentagem de área positiva para a ICAM-1/CD54 nos tumores dos grupos de tratamento Nano-paclitaxel + Sinva, Nano-paclitaxel, Paclitaxel + Sinva e Sinva também foi menor do que nos tumores do grupo Controle. Moléculas de adesão, como a ICAM-1, são associadas à agressividade de tumores sólidos, como o melanoma. Adicionalmente, a presença de ICAM-1 no tumor está relacionada com a redução na sobrevida dos pacientes com melanoma (JOHNSON, 1999; LOCATELLI et al., 2011). Assim, tratamentos que promovem a redução na expressão de ICAM-1 são importantes para reduzir o crescimento tumoral, bem como o potencial metastático do melanoma. Neste contexto, a inibição da formação de geranylpirofosfato promovida pela sinvastatina, com conseqüente inibição da ativação da proteína intracelular Rho, resulta na inibição da expressão de ICAM-1 e redução da liberação de MMP-9 e MCP-1 pelas células endoteliais e macrófagos (HAN et al., 2005; VEILLARD et al., 2006; MONTECUCCO et al., 2009). Desta forma, é provável que estes efeitos da sinvastatina tenham contribuído para inibição do crescimento tumoral promovida pelo paclitaxel associado à nanoemulsão. Tendo em vista que as estatinas aumentam a expressão celular de receptores de LDL (ENDO et al., 1977; CRESSMAN et al., 1988) e que a entrada do nano-paclitaxel nas células se dá através destes receptores (RODRIGUES et al., 2005), o uso combinado da sinvastatina com o nano-paclitaxel pode ter favorecido a concentração do quimioterápico nas células tumorais, aumentando assim, a eficácia do tratamento.

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e demonstram que o direcionamento específico dos quimioterápicos às células tumorais promovido pela nanoemulsão lipídica viabiliza o uso da sinvastatina como coadjuvante na terapia combinada com o paclitaxel.

7 CONCLUSÕES

- O uso combinado da sinvastatina com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica reduz os efeitos adversos observados na terapia combinada com sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel;
- O uso da sinvastatina combinada com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica não aumenta os efeitos adversos da monoterapia com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica;
- A terapia combinada de sinvastatina e paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica apresentou maior atividade antitumoral do que a terapia combinada de sinvastatina e a formulação comercial do paclitaxel;
- O uso combinado da sinvastatina com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica aumentou a inibição do crescimento do melanoma quando comparada à monoterapia com o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica.

REFERÊNCIAS

ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J.S.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol. Oncol.*, v.81(1), p.84-87, 2001.

ABOU-ALFA, G.K.; JOHNSON, P.; KNOX, J.J.; CAPANU, M.; DAVIDENKO, I.; LACAVA, J.; LEUNG, T.; GANSUKH, B.; SALTZ, L.B. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *JAMA*, v.304(19), p.2154-2160, 2010.

AGARWAL, B.; BHENDWAL, S.; HALMOS, B.; MOSS, S.F.; RAMEY, W.G.; HOLT P.R. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.*, v.5, p.2223–2229, 1999.

AIROLA, K.; KARONEN, T.; VAALAMO, M.; LEHTI, K.; LOHI, J.; KARINIEMI A.L.; KESKI-OJA, J.; SAARIALHO-KERE, U.K. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer.*, v.80, p.733, 1999.

ARAC - ANIMAL RESEARCH ADVISORY COMMITTEE. **Guidelines for Survival Bleeding of Mice and Rats**. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2010. Disponível em: <<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/index.htm>>. Acesso em: 09 agosto 2010.

ASBERG, A. Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs: implications for organ transplant recipients. *Drugs*, v.63(4), p.367-378, 2003.

AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHAO, R.C. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.*, v.97, p.178-182, 2005.

BAKER, S.K.; TARNOPOLSKY, M.A. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspective. *Clin. Investig. Med.*, v.24, p.258–272, 2001.

BENSALAH, K.; LERAY, E.; FERGELOT, P.; RIOUX-LECLERCQ, N.; TOSTAIN, J.; GUILLÉ, F.; PATARD J.J. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol.*, v.175, p.859-863, 2006.

BLUMENSCHNEIN, G.R.JR.; KABBINAVAR, F.; MENON, H.; MOK, T.S.; STEPHENSON, J.; BECK, J.T.; LAKSHMAIAH, K.; RECKAMP, K.; HEI, Y.J.; KRACHT, K.; SUN, Y.N.; SIKORSKI, R.; SCHWARTZBERG, L. A phase II, multicenter, open-label randomized study of motesanib or bevacizumab in combination with paclitaxel and carboplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. on behalf of the Motesanib NSCLC Phase II Study Investigators. *Ann Oncol.*, 2011.

BOS, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, v.49, p.4682–4689, 1989.

BOUTERFA, H.L.; SATTELMAYER, V.; CZUB, S.; VORDERMARK, D.; ROOSEN, K.; TONN, J.C. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to down-regulation of proliferation and migrating in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res.*, v.20, p.2761-2771, 2000.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v.232, p.34-47, 1986.

CAMPBELL, M.J.; ESSERMAN, L.J.; ZHOU, Y.; SHOEMAKER, M.; LOBO, M.; BORMAN, E.; BAEHNER, F.; KUMAR, A.S.; ADDUCI, K.; MARX, C.; PETRICOIN, E.F.; LIOTTA, L.A.; WINTERS, M.; BENZ, S.; BENZ, C.C. Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res.*, v.66(17), p.8707-8714, 2006.

CHAULET, C.; CROIX, C.; ALAGILLE, D.; NORMAND, S.; DELWAIL, A.; FAVOT, L.; LECRON, J.C.; VIAUD-MASSUARD, M.C. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.*, v.21(3), p.1019-1022, 2011.

CHO, S.; KIM J.S.; KIM, J.M. Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. *Int. J. Cancer.*, v.123, p.951-957, 2008.

COLLINS, T.S.; LEE, L.F.; TING, J.P. Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through an NF- κ B- and AP-1-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother.*, v.49(2), p.78-84, 2000.

COLLINS, R.; ARMITAGE, J.; PARISH, S.; SLEIGH, P.; PETO, R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v.361, p.2005–2016, 2003.

COLLISSON, E.A.; KLEER, C.; WU, M.; DE, A.; GAMBHIR, S.S.; MERAJVER, S.D.; KOLODNEY, M.S. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther.*, v.2(10), p.941-948, 2003.

CONTENTE, T.C. **Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma nanoemulsão rica em colesterol: estudos de regressão tumoral e farmacocinética.** São Paulo, 2011. 128p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

CRESSMAN, M.D.; HOOGWERF, B.J.; MOODIE, D.S.; OLIN, J.W.; WEINSTEIN, C.E. HMG-CoA reductase inhibitors. A new approach to the management of hypercholesterolemia. *Cleve Clin J Med.*, v.55(1), p.93-100, 1988.

COUPLAND, S.E.; BECHRAKIS, N.; SCHÜLER, A.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; HUMMEL, M.; BORNFIELD N.; STEIN, H. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.*, v.82, p.961-970, 1998.

DANHIER, F.; UCAKAR, B.; MAGOTTEAUX, N.; BREWSTER, M.E.; PRÉAT, V. Active and passive tumor targeting of a novel poorly soluble cyclin dependent kinase inhibitor, JNJ-7706621. *Int J Pharm.*, v.392(1-2), p.20-28, 2010.

DEMIERRE, M.F.; HIGGINS, P.D.; GRUBER, S.B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S.M. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*, v. 5, p. 930-942, 2005.

DENOYELLE, C.; VASSE, M.; KÖRNER, M.; MISHAL, Z.; GANNÉ, F.; VANNIER, J.P.; SORIA, J.; SORIA, C. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*, v.22(8), p.1139-1148, 2001.

DENOYELLE, C.; ALBANESE, P.; UZAN, G.; HONG, L.; VANNIER, J.P.; SORIA, J.; SORIA, C. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cell Signal*, v.15, p.327-338, 2003.

DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology.** 7th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. CD-ROM.

DIAS, M.L.; CARVALHO, J.P.; RODRIGUES, D.G.; GRAZIANI, S.R.; MARANHÃO, R.C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.59(1), p.105-111, 2007.

DIMITROULAKOS, J.; THAI, S.; WASFY, G.H.; HEDLEY, D.W.; MINDEN, M.D.; PENN, L.Z. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma*, v.40, p.167-178, 2000.

DIMITROULAKOS, J.; YE, L.Y.; BENZAQUEN, M.; MOORE, M.J.; KAMEL-REID, S.; FREEDMAN, M.H.; YEGER, H.; PENN, L.Z. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.*, v.7, p.158-167, 2001.

DONG, C.; SLATTERY, M.J.; LIANG, S.; PENG, H.H. Melanoma cell extravasation under flow conditions is modulated by leukocytes and endogenously produced interleukin 8. *Mol Cell Biomech.*, v.2(3), p.145-159, 2005.

DONNELLAN, R.; CHETTY, R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Clin Pathol:Mol Pathol.*, v.51, p.1-7, 1998.

DUAN, Z.; FELLER, A.J.; CHABNER, B.A.; SEIDEN, M.V. Discovery of differentially expressed genes associated with paclitaxel resistance using cDNA array technology: analysis of interleukin (IL) 6, IL-8, and monocyte chemoattractant protein 1 in the paclitaxel-resistant phenotype. *Clin Cancer Res.*, v.5(11), p.3445-3453, 1999.

DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, v.5(8), p.579-594, 2005.

EISENHOWER, E.; TEN BOKKEL, W.W.; SWENERTON, K.D.; GIANNI, L.; MYLES, J.; VAN DER BURG, I.; KERR, I.; VERMORKEN, J.B.; BUSER, K.; COLOMBO, K.N.; BACON, M.; SANTABARBARA, P.; ONETTO, N.; WINOGRAD, B.; CANETTA, R. European-Canadian randomized trial of taxol in relapsed ovarian cancer: high vs. low dose and long vs. short infusion. *J Clin Oncol.*, v.12, p.2654, 1994.

ENDO, A.; TSUJITA, Y.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem.*, v.77(1), p.31-36, 1977.

ENTIN, I.; PLOTNIKOV, A.; KORENSTEIN, R.; KEISARI, Y. Tumor growth retardation, cure, and induction of antitumor immunity in B16 melanoma-bearing mice by low electric field-enhanced chemotherapy. *Clin Cancer Res.*, v.9, p.3190-3197, 2003.

FARMER, J.A.; TORRE-AMIONE, G. Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase Inhibitors. *Drug Saf.*, v.23, p.197-213, 2000.

FAVERO, G.M. **Nanoemulsão contendo 7-cetocolesterol (LDE/7C) promove inibição do crescimento de melanoma em camundongos e aumento de sobrevida.** São Paulo, 2007. 100p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

FELESZKO, W.; ZAGOZDZON, R.; GOLAB, J.; JAKÓBISIAK, M. Potentiated antitumour effects of cisplatin and lovastatin against MmB16 melanoma in mice. *Eur J Cancer.*, v.34, p.406-411, 1998.

FELESZKO, W.; MLYNARCZUK, I.; BALKOWIEC-ISKRA, E.Z.; CZAJKA, A.; SWITAJ, T.; STOKLOSA, T.; GIEMASZ, A.; JAKÓBISIAK, M. Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res.*, v.6, p.2044-2052, 2000.

FELESZKO, W.; MLYNARCZUK, I.; OLSZEWSKA, D.; JALILI, A.; GRZELA, T.; LASEK, W.; HOSER, G.; KORCZAK-KOWALSKA, G.; JAKÓBISIAK, M. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. *Int J Cancer.*, v.100, p.111-118, 2002.

FICHTENBAUM, C.J.; GERBER, J.G.; ROSENKRATZ, S.L.; SEGAL, Y.; ABERG, J.A.; BLASCHKE, T.; ALSTON, B.; FANG, F.; KOSEL, B.; AWEEKA, F. Pharmacokinetic interactions between protease inhibitors and statins in HIV seronegative volunteers: ACTG Study A5007. *AIDS*, v.16, p.569-577, 2002.

FOLMAN, C.C.; LINTHORST, G.E.; VAN MOURIK, J.; VAN WILLIGEN, G.; DE JONGE, E.; LEVI, M.; DE HAAS, M.; DEM BORNE, A.E. Platelets release thrombopoietin (Tpo) upon activation: another regulatory loop in thrombocytopoiesis? *Thromb. Haemost.*, v.83, p.923-930, 2000.

FOSTER, H.L.; SMALL, J.D.; FOX, J.G. **The mouse in biomedical research.** New York, NY: Academic Press, 1982.

FROMIGUÉ, O.; HAMIDOUCHE, Z.; MARIE, P.J. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion. *J Biol Chem.*, v. 83(45), p.30549-30556, 2008.

FUJIMURA, T.; NAKAGAWA, S.; OHTANI, T.; ITO, Y.; AIBA, S. Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *Eur J Immunol.*, v. 36(12), p.3371-3380, 2006.

GANANSIA-LEYMARIE, V.; BISCHOFF, P.; BERGERAT, JP. Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents.*, v.3, p.291, 2003.

GAZZANIGA, S.; BRAVO, A.I.; GUGLIELMOTTI, A.; VAN ROOIJEN, N.; MASCHI, F.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; MORDOH, J.; WAINSTOK, R. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol.*, v.127(8), p.2031-2041, 2007.

GELDERBLOM, H.; MROSS, K.; TEN TIJE, A.J.; BEHRINGER, D.; MIELKE, S.; VAN ZOMEREN, D.M.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Comparative pharmacokinetics of unbound paclitaxel during 1- and 3-hour infusions. *J Clin Oncol.*, v.20(2), p.574-581, 2002.

GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MACDONALD, M.M.; SCHUMACHER, A.M.; ABBOTT, B.J. **Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems.** 3a Ed. Bethesda, MA: National Institute of Health, 1972. p.47-51.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A.D.; KARAMANOS, N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.*, v.278(1), p.16-27, 2011.

GIANNI, L.; KEARNS, C.M.; GIANI, A.; CAPRI, G.; VIGANÓ, L.; LACATELLI, A.; BONADONNA, G.; EGORIN, M.J. Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in humans. *J Clin Oncol.*, v.13, p.180, 1995.

GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D., Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, v.257, p.8216-8227, 1982.

GIRGERT, R.; VOGT, Y.; BECKE, D.; BRUCHELT, G.; SCHWEIZER, P. Growth inhibition of neuroblastoma cells by lovastatin and L-ascorbic acid is based on different mechanisms. *Cancer Lett.*, v.137, p.167-172, 1999.

GLYNN, S.A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A.J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer*, v.8, p.9, 2008.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v.343, p.425-430, 1990.

GRAZIANI, S.R.; IGREJA, F.A.F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L.I.; BARBOSA, R.; AMANCIO, F.R.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol.*, v.85, p.493-497, 2002.

HAN, K.H.; RYU, J.; HONG, K.H.; KO, J.; PAK, Y.K.; KIM, J.B.; PARK, S.W.; KIM, J.J. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo. *Circulation*, v.111(11), p.1439-1447, 2005.

HEATHCOTE, D.A.; PATEL, H.; KROLL, S.H.; HAZEL, P.; PERIYASAMY, M.; ALIKIAN, M.; KANNEGANTI, S.K.; JOGALEKAR, A.S.; SCHEIPER, B.; BARBAZANGES, M.; BLUM, A.; BRACKOW, J.; SIWICKA, A.; PACE, R.D.; FUCHTER, M.J.; SNYDER, J.P.; LIOTTA, D.C.; FREEMONT, P.S.; ABOAGYE, E.O.; COOMBES, R.C.; BARRETT, A.G.; ALI, S. A novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein kinases 1, 2, and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration. *J Med Chem.*, v.53(24), p.8508-8522, 2010.

HENEY, M.; ALIPOUR, M.; VERGIDIS, D.; OMRI, A.; MUGABE, C.; TH'NG, J.; SUNTRES, Z. Effectiveness of liposomal paclitaxel against MCF-7 breast cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol.*, v.88(12), p.1172-1180, 2010.

HINDLER, K.; CLEELAND, C.S.; RIVERA, E.; COLLARD, C.D. The Role of Statins in Cancer Therapy. *The Oncologist*, v. 11, p.306-315, 2006.

HO, Y.K.; SMITH, G.L.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, v.52, p.1099-1114, 1978.

HOLSTEIN, S.A.; HOHL, R.J. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.*, v.1, p.141-149, 2001.

HOLT, S.V.; BROOKES, K.E.; DIVE, C.; MAKIN, G.W. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. *Oncol Rep.*, v.4, p.1177-1181, 2011.

HORIGUCHI, A.; SUMITOMO, M.; ASAKUMA, J.; ASANO, T.; ASANO, T.; HAYAKAWA, M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor, fluvastatin, as a novel agent for prophylaxis of renal cancer metastasis. *Clin Cancer Res.*, v.10(24), p.8648-8655, 2004.

HORWITZ, S.B.; LOTHSTEIN, L.; MANFREDI, J.J.; MELLADO, W.; PARNES, J.; ROY, S.N.; SCHIFF, P.B.; SORBARA, L.; ZEHEB, R. Taxol: mechanisms of action and resistance. *Ann N Y Acad Sci.*, v.466, p.733-744, 1986.

HORWITZ, S.B. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 13(4), p.134-136, 1992.

HWANG, S.J.; LUO, J.C.; LI, C.P.; CHU, C.W.; WU, J.C.; LAI, C.R.; CHIANG, J.H.; CHAU, G.Y.; LUI, W.Y.; LEE, C.C.; CHANG, F.Y.; LEE, S.D. Thrombocytosis: a paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, v.10(17), p.2472-2477, 2004.

ICHIHARA, K.; SATOH, K. Disparity between angiographic regression and clinical event rates with hydrophobic statins. *Lancet*, v. 359(9324), p.2195-2198, 2002.

ILISKOVIC, N.; SINGAL, P.K. Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *Am J. Pathol.*, v.150, p.727-734, 1997.

INOHARA, S.; KITAGAWA, K.; KITANO, Y. Expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. *Dermatology*, v.192, p.94-98, 1996.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, v.292, p.1160-1164, 2001.

IVANOV, V.N.; PARTRIDGE, M.A.; HUANG, S.X.; HEI, T.K. Suppression of the proinflammatory response of metastatic melanoma cells increases TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem.*, v.112(2), p.463-475, 2011.

JACOBSON, TA. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol.*, v.94, p.1140-1146, 2004.

JACOBY, R.O.; FOX, J.G. BIOLOGY AND DISEASE OF MICE. IN: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; FRANKLIN, L.M. **Laboratory animal medicine**. San Diego: academic press, 1984. p.39-41.

JOHNSEN, M.; LUND, L.R.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. cell biol.*, v.10, p.667-671, 1998.

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer metastasis rev.*, v.18, p.345-357, 1999.

JOHNSON, L.; MERCER, K.; GREENBAUM, D.; BRONSON, RT.; CROWLEY, D.; TUVESON, D.A.; JACKS T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*, v.410, p.1111-1116, 2001.

KAN, P.; CHEN, Z.; LEE, C.; CHU, I. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J. Controlled Release*, v.58(3), p.271-278, 1999.

KANDEMIR, E.G.; MAYADAGLI, A.; KARAGOZ, B.; BILGI, O.; TURKEN, O.; YAYLACI, M. Prognostic significance of thrombocytosis in node-negative colon cancer. *J Int Med Res.*, v.33(2), p.228-235, 2005.

KAUSHAL, V.; KOHLI, M.; MEHTA, P.; MEHTA, J.L. Potential anticancer effects of statins: fact or fiction? *Endothelium*, v.10, p.49-58, 2003.

KELVIN, K.W.; CHAN, K.K.; OZA, A.M.; SIU, L.L. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res.*, v.9, p.10-19, 2003.

KIN, Y.J.; BORSIG, L.; VARKI, N.M.; VARKI, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.95, p.9325-9330, 1998.

KOGA, M.; KAI, H.; EGAMI, K.; MUROHARA, T.; IKEDA, A.; YASUOKA, S.; EGASHIRA, K.; MATSUIISHI, T.; KAI, M.; KATAOKA, Y.; KUWANO, M.; IMAIZUMI T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.365(2), p.279-284, 2008.

KONDO, T.; SENTANI, K.; OUE, N.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YASUI, W. Expression of RHOC is associated with metastasis of gastric carcinomas. *Pathobiology*, v.71, p.19–25, 2004.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK-KNÖTIGOVÁ, P.; MASEK, J.; KORVASOVÁ, Z.; SKRABALOVÁ, M.; PLOCKOVÁ, J.; BARTHELDYOVÁ, E.; TURÁNEK, J. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: Preparation, characterisation and in vivo anticancer effect. *J Pharm Sci.*, v.99(5), p.2309-2319, 2010.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett.*, v. 370, p. 212-217, 2004.

KRETZER, I.F. **Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol – LDE.** São Paulo, 2007.121p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KURODA, T.; KITADAI, Y.; TANAKA, S.; YANG, X.; MUKAIDA, N.; YOSHIHARA, M.; CHAYAMA, K. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin Cancer Res.*, v.11(21), p.7629-7636, 2005.

KUSAMA, T.; MUKAI, M.; TATSUTA, M.; MATSUMOTO, Y.; NAKAMURA, H.; INOUE, M. Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor. *Clin Exp Metastasis.*, v.20, p.561-567, 2003.

LABROUSSE, A.L.; NTAYI, C.; HORNEBECK, W.; BERNARD, P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.*, v.49(3), p.269-275, 2004.

LAUFS, U.; LIAO J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.*, v.273, p.24266–24271, 1998.

LAVIE, O.; COMERCI, G. DARAS, V.; BOLGER, B.S.; LOPES, A.; MONAGHAN, J.M. Thrombocytosis in women with vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol.*, v.72, p.82-86, 1999.

LEE, L.F.; SCHUERER-MAL, C.C.; LOFQUIST, A.K.; HAAFTEN, D.C.; TING, J.P.; WHITE, C.M, MARTIN, B.K.; HASKILL, J.S. Taxol dependent transcriptional activation of IL-8 expression in a subset of human ovarian cancer. *Cancer Res.*, v.56(6), p.1303-1308, 1996.

LEE, M.; KIM, S.W.; NAM, E.J.; YIM, G.W.; KIM, S.; KIM, Y.T. The impact of pretreatment thrombocytosis and persistent thrombocytosis after adjuvant chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*, v.122(2), p.238-241, 2011.

LEE, S.J.; HA, M.J.; LEE, J.; NGUYEN, P.; CHOI, Y.H.; PIRNIA, F.; KANG, W.K.; WANG, X.F.; KIM, S.J.; TREPEL, J.B. Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of p21(WAF1/CIP1) in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem.*, v.273, p.10618-10623, 1998.

LEWIN, J.J.; NAPPI, J.M.; TAYLOR, M.H. Rhabdomyolysis with concurrent atorvastatin and diltiazem. *Ann Pharmacother.*, v.36, p.1546-1549, 2002.

LIABAKK, N.B.; TALBOT, I.; SMITH, R.A.; WILKINSON, K.; BALKWILL, F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.*, v.56, p.190-196, 1996.

LIAO, J.K.; LAUFS, U. Pleiotropic Effects of Statins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*, v.45, p.89-118, 2004.

LIEBMANN, J.; COOK, J.A.; MITCHELL, J.B.; CREMOPHOR, E.L. Solvent for paclitaxel, and toxicity. *Lancet*, v.342(8884), p.1428, 1993.

LOCATELLI, C.; CARVALHO, D.R.; MASCARELLO, A.; DE CORDOVA, C.A.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; PILATI, C.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. *Invest New Drugs*, [Epub ahead of print], 2011.

LOPES, A.; DARAS, V.; CROSS, P.A.; ROBERTSON, G.; BENYON, G.; MONAGHAN, JM. Thrombocytosis as a prognostic factor in women with cervical cancer. *Cancer*, v.74, p.90-92, 1994.

LO PRETE, A.C.; MARIA, A.D.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBAÑEZ, O.C.M.; MARANHÃO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. *J.Pharm.Pharmacol.*, v.58(6), p.801-808, 2006.

LUNDBERG, B. Preparation of drug-carrier emulsions stabilized with phosphatidylcholine-surfactant mixture. *J.Pharm.Sci.*, v.83(1), p.72-75, 1994.

LUNDBERG, B.B; RISOVIC, V.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J Control Release*, v. 9;86(1), p.93-100, 2003.

MALTZ, H.C.; BALOG, D.L.; CHEIGH, J.S. Rhabdomyolysis associated with concomitant use of atorvastatin and cyclosporine. *Ann Pharmacother.*, v.13, p.1176-1179, 1999.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D.C.; HONG, K; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J.W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resist Updat.*, v. 6(5), p.271-279, 2003.

MANFREDI, J.J.; PARNES, J.; HORWITZ, S.B. Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol.*, v.94, p.688, 1982.

MANFREDI, J.J.; HORWITZ, S.B. Taxol: an antimetabolic agent with a unique mechanism of action. *Pharmacol. Ther.*, v.25, p.83-125, 1984.

MANNELLO, F.; TONTI, G.; PAPA, S. Matrix metalloproteinase inhibitors as targets of anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*, v.5, p.285-298, 2005.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; LLACER, P.D.; PILEGGI, F.J.; CHAMONE, D.A. 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 Biol Res.*, v.25(10), p.1003-1007, 1992.

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*, v.28(8), p.691-696, 1993.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; DORLHIAC-LLACER, P.; CADENA, S.M.; COELHO, I.J.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.; CHAMONE, D.A. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, v.54(17), p.4660-4666, 1994.

MARANHÃO, R.C.; ROLAND, I.A.; TOFFOLETTO, O.; RAMIRES, J.A.; GONÇALVES, R.P.; MESQUITA, C.H.; PILEGGI, F. Plasma kinetic behaviour in hiperlipidemic subjects of a lipid microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*, v.32(6), p.627-633, 1997.

MARANHÃO, R.C.; GRAZIANI, S.R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R.F.; LATRILHA, M.C.; RODRIGUES, D.G.; COUTO, R.D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A.C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.49(6), p.487-498, 2002.

MARON, D.J.; FAZIO, S.; LINTON, M.F. Current perspectives on statins. *Circulation*, v.101, p.207–213, 2000.

MCFARLANE, S.I.; MUNIYAPPA, R.; FRANCISCO, R. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Clin Endocrinol Metab.*, v.87, p.1451-1458, 2002.

MENDES, S.; GRAZIANI, S.R.; VITÓRIO, T.S.; PADOVEZE, A.F.; HEGG, R.; BYDLOWSKI, S.P.; MARANHÃO, R.C. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: a new strategy for neoadjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol.*, v.112(2), p.400-404, 2009.

MICHAUD, L.B.; VALERO, V.; HORTOBAGYI, G. Risks and benefits of taxanes in breast and ovarian cancer. *Drug Safety*, v. 23 (5), p.401-428, 2000.

MILANE, L.; DUAN, Z.; AMIJI, M. Development of EGFR-targeted polymer blend nanocarriers for combination paclitaxel/lonidamine delivery to treat multi-drug resistance in human breast and ovarian tumor cells. *Mol Pharm.*, v.8(1), p.185-203, 2011.

MONTECUCCO, F.; BURGER, F.; PELLI, G.; POKU, N.K.; BERLIER, C.; STEFFENS, S.; MACH F. Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes. *Rheumatology*, v.48(3), p.233-242, 2009.

NARISAWA, T.; FUKAURA, Y.; TERADA, K.; UMEZAWA, A.; TANIDA, N.; YAZAWA, K.; ISHIKAWA, C. Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis by HMG-CoA reductase inhibitors, pravastatin and simvastatin, in ICR mice. *Carcinogenesis*, v.15(9), p.2045-2048, 1994.

NASH, G.F.; TURNER, L.F.; SCULLY, M.F.; KAKKAR, A.K. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.*, v.3, p.425-430, 2002.

NEUVONEN, P.J.; NIEMI, M.; BACKMAN, J.T. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.*, v.80, p.565-581, 2006.

NIESWANDT, B.; HAFNER, M.; ECHTENACHER, B.; MANNEL, D.N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.*, v.59, p.1295-1300, 1999.

NORTON, L.A. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res.*, v.48, p.7067, 1988.

O'DRISCOLL, G.; GREEN, D.; TAYLOR, R.R. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation*, v.95, p.1126-1131, 1997.

O'DWYER, P.J.; KING, S.A.; FORTNER, C.L.; LEYLAND-JONES, B., Hypersensitivity reactions to teniposide (VM26): an analysis. *J.Surg Oncol.*, v.4, p.1262, 1986.

O'MALLEY, D.M.; RICHARDSON, D.L.; RHEAUME, P.S.; SALANI, R.; EISENHAUER, E.L.; MCCANN, G.A.; FOWLER, J.M.; COPELAND, L.J.; COHN, D.E.; BACKES, F.J. Addition of bevacizumab to weekly paclitaxel significantly improves progression-free survival in heavily pretreated recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*, 2011.

OMAR, M.A.; WILSON, J.P. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother.*, v.36, p.288-295, 2002.

PAZDUR, R.; KUDELKA, A.P.; KAVANAGH, J.J.; COHEN, P.R.; RABER, M.N. The taxoids: paclitaxel (Taxol®) and docetaxel (Taxotere®). *Cancer Treat Rev.*, v.19, p.351-386, 1993.

PAPAETIS, G.S.; SYRIGOS, K.N. Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. *BioDrugs.*, v.23(6), p.377-389, 2009.

PEDERSEN, L.M.; MILMAN, N. Prognostic significance of thrombocytosis in patients with primary lung cancer. *Eur Respir J.*, v.9(9), p.1826-1830, 1996.

PEMMARAJU, N.; KANTARJIAN, H.; RAVANDI, F.; CORTES, J. FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: The start of an era? *Cancer*, 2011.

PENSON, R.T.; KRONISH, K.; DUAN, Z.; FELLER, A.J.; STARK, P.; COOK, S.E.; DUSKA, L.R.; FULLER, A.F.; GOODMAN, A.K.; NIKRUI, N.; MACNEILL, K.M.; MATULONIS, U.A.; PREFFER, F.I.; SEIDEN M.V. Cytokines IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFa in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer*, v.10(1), p.33-41, 2000.

PINHEIRO, K.V.; HUNGRIA, V.T.M.; FICKER, E.S.; VALDUGA, C.J.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.57(5), p.624-630, 2006.

PIRES, L.A.; HEGG, R.; VALDUGA, C.J.; GRAZIANI, S.R.; RODRIGUES, D.G.; MARANHÃO, R.C. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.63(2), p.281-287, 2009.

PLOWMAN, J.; DYKER, D.J.; HOLLINGSHEAD, M.; SIMPSON-HERREN; ALLEY, M.C. **Human tumor xenograft models in NCI development, in Anticancer Drug Development: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval.** Totowa, New Jersey: (B.A. Teicher ed.) Humana Press, 1997. p.101-125.

PUSZTAI, L.; MENDOZA, T.R.; REUBEN, J.M.; MARTINEZ, M.M.; WILLEY, J.S.; LARA, J.; SYED, A.; FRITSCH, H.A.; BRUERA, E.; BOOSER, D.; VALERO, V.; ARUN, B.; IBRAHIM, N.; RIVERA, E.; ROYCE, M.; CLEELAND, C.S.; HORTOBAGYI, G.N. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine*, v.25(3), p.94-102, 2004.

QIAN, X.; TUSZYNSKI, G.P. Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v.212, p.199-207, 1996.

RAO, S.; LOWE, M.; HERLICZEK, T.W.; KEYOMARSI, K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene*, v.17, p.2393-2402, 1998.

RENSEN, P.C.; DE VRUEH, R.L.; KUIPER, J.; BIJSTERBOSCH, M.K.; BIESSEN, E.A.; VAN BERKEL, T.J. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Adv Drug Deliv Rev.*, v.47(2-3), p.251-276, 2001.

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. *J. Pharm and Pharmacol.*, v.54, p.765, 2002.

RODRIGUES, D.G., MARIA, D.A., FERNANDES, D.C., VALDUGA, C.J., COUTO, R.D., IBÁÑEZ, O.C. M., MARANHÃO, R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.55, p.565, 2005.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p.329-335, 1947.

ROWINSKY, E.K.; CAZENAVE, L.A.; DONEHOWER, R.C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.*, v.82(15), p.1247-1259, 1990.

ROWINSKY, E.K.; DONEHOWER, R.C. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmac. Ther.*, v. 52, p.35-84, 1991.

ROWINSKY, E.K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.*, v.48, p.353-374, 1997.

SAITO, A.; SAITO N.; MOL, W.; FURUKAWA, H.; TSUTSUMIDA, A.; OYAMA, A.; SEKIDO, M.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, Y. Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. *Melanoma Res.*, v.18, p.85-94, 2008.

SALVEN, P.; ORPANA, A.; JOENSUU, H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clinical Cancer Research*, v.5,p. 487–491,1999.

SAMPEDRO, F.; PATRIKA, J.; SANTALO, P.; MOLINS-PUJOL, A.M.; BONAL, J.; PEREZ-SOLER, R. Liposomes as carriers of different new lipophilic antitumor drugs:a preliminary report. *J. Microencap.*, v.11, p.309–318, 1993.

SANTOS, E.S.; GOMEZ, J.E.; RAEZ, L.E. Targeting angiogenesis from multiple pathways simultaneously: BIBF 1120, an investigational novel triple angiokinase inhibitor. *Invest New Drugs*, 2011.

SAUTER, R.E.; YEO, U.; VON STEMM, A.; ZHU, A.; LITWIN, S.; TICHANSKY, D.S.; PISTRITTO, G.; NESBIT, M.; PINKEL, D.; HERLYN, M.; BASTIAN, B.C. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Research*, v.26, p.3200-3206, 2002.

SENGUPTA, S.; TYAGI, P.; CHANDRA, S; KOCHUPILLAI, V.; GUPTA, S.K. Encapsulation in cationic liposomes enhances antimour efficacy and reduces the toxicity of etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Pharmacology*, v.62(3), p.163-171, 2001.

SHARMA, A.; STRAUBINGER, R.M. Novel Taxol formulations: preparation and characterization of Taxol-containing liposomes. *Pharm. Res.*, v.11, p.889–895, 1994.

SHARMA,U.S.; BALASUBRAMANIAN, S.V.; STRAUBINGER, R.M. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complex with cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.*, v.84, p.1223-1230, 1995.

SHELLMAN, Y.G.; RIBBLE, D.; MILLER, L.; GENDALL, J.; VANBUSKIRK, K.; KELLY, D.; NORRIS, D.A.; DELLAVALLE, R.P. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.*, v.15, p.83–89, 2005.

SIMAMORA, P.; DANNENFELSER, R.M.; TABIBI, S.E.; YALKOWSKY, S.H. Emulsion formulation for intravenous administration of paclitaxel. *J. Pharm. Sci.*, v.52, p.170–172, 1998.

SINGLA, A.K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. *D. Int J Pharm.*, v.235(1-2), p.179-192, 2002.

SKAUKAT, A.; BENEKLI, M.; VLADUTIN, G.D.; SLACK, J.L.; WETZLER, M.; BAER, M.R. Simvastatin-fluconazole causing rhabdomyolysis. *Ann Pharmacoter.*, v.37, p.1032-1035, 2003.

SLATTERY, M.J.; DONG, C. Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer*, v.106(5), p.713–722, 2003.

SOMA, M.R.; BAETTA, R.; DE RENZIS, M.R.; MAZZINI, G.; DAVEGNA, C, MAGRASSI, L.; BUTTI, G.; PEZZOTTA, S.; PAOLETTI, R.; FUMAGALLI, R. In vivo enhanced antitumor activity of carmustine [7V,W-Bis(2-chloroethyl)- Af-nitrosourea] by simvastatin. *Cancer Research*, v.55, p.597-602, 1995.

SPARREBOOM, A.; BAKER, S.D.; VERWEIJ, J. Paclitaxel repackaged in an albumin-stabilized nanoparticle: handy or just a dandy? *J. Clin. Oncol.*, v.23(31), p.7765–7767, 2005.

SPIVAK, J.L. Cancer-related anemia: its causes and characteristics. *Semin Oncol.*, v.2(3), p.3-8, 1994.

SUWA, H.; OHSHIO, G.; IMAMURA, T.; WATANABE, G.; ARII, S.; IMAMURA, M.; NARUMIYA, S.; HIAI, H.; FUKUMOTO, M. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*, v.77, p.147-152, 1998.

TAKEBAYASHI, Y.; AKIYAMA, S.; AKIBA, S.; YAMADA, K.; MIYADERA, K.; SUMIZAWA, T.; YAMADA, Y.; MURATA, F.; AIKOU, T. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*, v.88, p.1110-1117, 1996.

TAKEDA, I.; MARUYA, S.; SHIRASAKI, T.; MIZUKAMI, H.; TAKAHATA, T.; MYERS, J.N.; KAKEHATA, S.; YAGIHASHI, S.; SHINKAWA, H. Simvastatin inactivates beta1-integrin 99 and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci.*, v.98, p.890-899, 2007.

TEIXEIRA, R.S.; CURI, R.; MARANHÃO, R.C. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *J Pharm Pharmacol.*, v.56(7), p.909-914, 2004.

TEIXEIRA, R.S. **Associação de derivados do quimioterápico daunorrubicina a nanoemulsão lipídica que se liga aos receptores de LDL: estudos pré-clínicos.** São Paulo, 2005. Tese e Doutorado – Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

TEIXEIRA, R.S.; VALDUGA, C.J.; BENVENUTTI, L.A.; SCHREIER, S.; MARANHÃO, R.C. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. *J. Pharm Pharmacol.*, v.60(10), p.1287-95, 2008.

THIBAUT, A.; SAMID, D.; TOMPKINS, A.C.; FIGG, W.D.; COOPER, HOHL, R.J.; TREPPEL, J.; LIANG, B.; PATRONAS, N.; VENZON, D.J.; REED, E.; MYERS, C.E. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res.*, v. 2(3), p.483-491, 1996.

TISHER, R.B.; LAMPPU, D.M.; PARK, S.; PRICE, B.D. Microtubule-active drugs Taxol, vinblastine, and nocodazole increase the level of transcriptionally active p53. *Cancer Res.*, v.55, p.6021, 1995.

TOBERT, J.A. Efficacy and long term adverse effect pattern of lovastatin. *Am J. Cardiol.*, v.62, p.28–34, 1988.

TRESCOW, B.V.; STRANDMANN, E.P.; SASSE, S.; TAWADROS, S.; ENGERT, A.; HANSEN, H.P. Simvastatin-dependent apoptosis in Hodgkin's lymphoma cells and growth impairment of human Hodgkin's tumors in vivo. *Haematologica.*, v.92, p.05, 2007.

TULENKO, T.N.; SUMNER, A.E. The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol.*, v.9(6), p.638-649, 2002.

UKOMADU, C.; DUTTA, A. p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by mevastatin is independent of inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.*, v.278, p.43586–43594, 2003.

VALDUGA, C.J.; FERNANDES, D.C.; LO PRETE A.C.; AZEVEDO C.H.; 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.*, v.55, p.1615-1622, 2003.

VAN GOLEN, K.L.; WU, Z.F.; QIAO, X.T.; BAO, L.W.; MERAJVER, S.D. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res.*, v.60, p.5832–5838, 2000.

VAN KEMPEN, L.C.; RIJNTJES, J.; MAMOR-CORNELISSEN, I.; VINCENT-NAULLEAU, S.; GERRITSEN, M.J.; RUITER, D.J.; VAN DIJK, M.C.; GEFFROTIN, C.; VAN MUIJEN, G.N. Type I collagen expression contributes to angiogenesis and the development of deeply invasive cutaneous melanoma *Int. J. Cancer.*, v.122, p.1019-1029, 2008.

VAN ZUYLEN, L.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs.*, v.19(2), p.125-141, 2001.

VASSILEVA, V.; GRANT, J.; SOUZA, R.; ALLEN, C.; PIQUETTE, M.M. Novel biocompatible intraperitoneal drug delivery system increases tolerability and therapeutic efficacy of paclitaxel in a human ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.60(6), p.907-914, 2007.

VEILLARD, N.R.; BRAUNERSREUTHER, V.; ARNAUD, C.; BURGER, F.; PELLI, G.; STEFFENS, S.; MACH, F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*, v.188(1), p.51-58, 2006.

VERSLUIS, A.; RUMP, E.T.; RENSEN, P.C.N.; VAN BERKEL, T.J.C.; BIJSTERBOSH, M.K. Synthesis of a Lipophilic daunorubicin derivate and its incorporation into lipidic carriers developed for LDL receptor-mediated tumor therapy. *Pharmaceutical Research*, v.15(4), p.531-537, 1998.

WACHTERSHAUSER, A.; AKOGLU, B.; STEIN, J. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*, v.22, p. 1061-1067, 2001.

WALTER, K.A.; CAHAN, M.A.; GUR, A.; TYLER, B.; HILTON, J.; COLVIN, O.M.; BURGER, .C.; DOMB, A.; BREM, H. Interstitial taxol delivered from biodegradable polymer implant against experimental malignant glioma. *Cancer Res.*, v.54, p.2207–2212, 1994.

WANDEL, E.; GRASSHOFF, A.; MITTAG, M.; HAUSTEIN, H.F.; SAALBACH, A. Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Exp Dermatol.*, v.9, p.34-41, 2000.

WANDEL, E.; RASCHKE, A.; HILDEBRANDT, G.; EBERLE, J.; DUMMER R.; ANDEREGG, U.; SAALBACH, A. Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res.*, v.293, p.601-608, 2002.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; McPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, v.93, p.2325-2327, 1971.

WEISS, R.B.; DONEHOWER, R.C.; WIERNIK, P.H.; OHNUMA, T.; GRALLA, R.J.; TRUMP, D.L.; BAKER, J.R.; VANECHO, D.A.; VONHOFF, D.D.; LEYLAND, J.B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J.Clin.Oncol.*, v.8, p.1263-1268, 1990.

WINTERNITZ, C.I.; JACKSON, J.K.; OKTABA, A.M.C.; BURT, H.M. Development of polymeric surgical paste formulation for taxol. *Pharm. Res.*, v.13, p.368-375, 1996.

WONG, W.W.; DIMITROULAKOS, J.; MINDEN, M.D.; PENN, L.Z. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*, v.16, p.508-519, 2002.

WOODS, C.M.; ZHU, J.; MCQUENEY, P.A.; BOLLAG, D.; LAZARIDES, E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med.*, v.1, p.506, 1995.

XIA, Z.; TAN, M.M.; WONG, W.W.; DIMITROULAKOS, J.; MINDEN, M.D.; PENN, L.Z. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, v.15, p.1398-1407, 2001.

YANG, Y.C.; HUANG, W.F.; CHUAN, L.M.; XIAO, D.W.; ZENG, Y.L.; ZHOU, D.A.; XU, G.Q.; LIU, W.; HUANG, B.; HU, Q. In vitro and in vivo Study of Cell Growth Inhibition of Simvastatin on Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Chemotherapy*, v.54, p.438-446, 2008.

ZHANG, Z.; FENG, S.S. Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. *Biomaterials*, v.27, n.2, p.262-270, 2006.


ZHANG, Y.; TANG, L.; SUN, L.; BAO, J.; SONG, C.; HUANG, L.; LIU, K.; TIAN Y.; TIAN, G.; LI, Z.; SUN, H.; MEI, L. A novel paclitaxel-loaded poly(epsilon-caprolactone)/Poloxamer 188 blend nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment. *Acta Biomater.*, v.6(6), p.2045-2052, 2010.

ZHAO, H.; WANG, J.C.; SUN, Q.S.; LUO, C.L.; ZHANG, Q. RGD-based strategies for improving antitumor activity of paclitaxel-loaded liposomes in nude mice xenografted with human ovarian cancer. *J Drug Target.*, v.17(1), p.10-18, 2009.

ZULEHNER, N.; MAURER, M.; WESIERSKA-GADEK, J. Effect of anti-estrogen combined with roscovitine, a selective CDK inhibitor, on human breast cancer cells differing in expression of ER. *J Exp Ther Oncol.*, v.9(1), p.17-25, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/75/2009

São Paulo, 11 de agosto de 2009

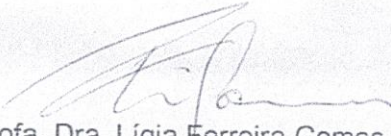
Ilmo(a) Sr(a).
Iara Fabricia Kretzer
Orientador(a): Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP em reunião realizada em 10 de agosto de 2009, **APROVOU** o projeto “Terapia antitumoral combinada com sinvastatina e oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica rica em colesterol” (Protocolo CEEA nº 246), apresentado por Vossa Senhoria.

A CEEA recomenda, no entanto, a substituição do método de eutanásia por procedimento com a utilização de anestésico geral.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: maio@usp.br

ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

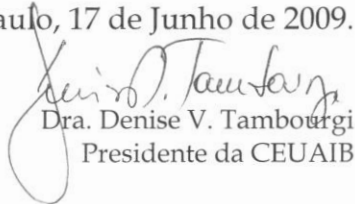
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Terapia antitumoral combinada com sinvastatina e oleato de paclitaxel associado a nanoemulsão lipídica rica em colesterol” protocolo nº 638/09, sob a responsabilidade de Dr. Durvanei Augusto Maria e Iara Fabricia Kretzer, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/06/2009.


We certify that the research entitled “Antitumor combined therapy with sinvastatin and a paclitaxel derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion”, protocol nº 638/09, under the responsibility of Dr. Durvanei Augusto Maria and Iara Fabricia Kretzer, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 06/17/2009.

Vigência do Projeto: 09/2009 – 07/2011	Nº de animais/espécie
Laboratório de Bioquímica	30/ camundongo BalB/c 60/camundongo C57BL/6J 36/camundongo Balb/C Nu(-/-)

São Paulo, 17 de Junho de 2009.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan