

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

Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e  
etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em  
colesterol - LDE

Iara Fabricia Kretzer

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo  
2007

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

Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e  
etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em  
colesterol - LDE

Iara Fabricia Kretzer

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo  
2007

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

K92t Kretzer, Iara Fabricia  
Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e  
etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol  
- LDE. / Iara Fabricia Kretzer. -- São Paulo, 2007.  
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.  
Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Bioquímica clínica 2. Quimioterapia 3. Lipoproteína:  
Metabolismo I. T. II. Maranhão, Raul Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Iara Fabricia Kretzer

Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo  
associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol - LDE

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, setembro de 2007.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ,

À minha mãe **Leonida**, incondicional incentivadora.  
Seus ensinamentos e estímulos constantes foram fundamentais.

Ao meu pai **Norberto**, responsável pela minha formação.  
Por me ensinar que para vencer na vida é preciso ousar.

Às minhas irmãs **Lara e Sara**, exemplos de vida.  
Por terem me ensinado cada uma do seu jeito o significado  
de trabalho dedicado e perseverança.

Ao meu marido **Fernando**, paciente e companheiro.  
Por acreditar nas minhas escolhas e me apoiar durante o caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua diretora, Professora Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da Professora Titular Dulcinéia Paes Abdalla.

Ao meu orientador, Professor Titular Raul Cavalcante Maranhão, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Doutor Durvanei Augusto Maria, pela paciência e indispensável dedicação na co-orientação deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da FCF-USP, que sempre se mostraram disponíveis quando na necessidade de qualquer ajuda.

A todos os funcionários do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR, em especial à Débora F. Deus, Maria das Dores Pereira e Maria Conceição M. Latrilha, por acreditarem no meu potencial, pelo apoio, atenção e incentivo.

À secretária do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR: Sheila Loyolla, pela amizade, pela admiração e por toda ajuda.

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

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da FCF-USP: Elaine Midory Ychico e Jorge Alves Lima pelas dúvidas esclarecidas e auxílio na parte burocrática.

A todos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR pelo apoio e amizade. A convivência com vocês foi uma experiência além de agradável, inesquecível.

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

À Vilma Rodrigues Varzinsky pela valiosa colaboração, pelo carinho e amizade.

À Claudete J. Valduga, que sempre esteve pronta para me dar dicas, conselhos e incentivo. Toda sua ajuda foi muito importante para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

## EPÍGRAFE

"Existe uma coisa que uma longa  
existência me ensinou: toda a nossa ciência,  
comparada à realidade, é primitiva e inocente;  
e, portanto, é o que temos de mais valioso."

**Albert Einstein**



## RESUMO

KRETZER, Iara Fabricia. **Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol - LDE**. 2007. 121p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A LDE é uma nanoemulsão rica em colesterol com composição semelhante às lipoproteínas naturais. Devido a sua capacidade de ligação aos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) cuja expressão é aumentada em células neoplásicas, a LDE pode ser usada como veículo de agentes quimioterápicos concentrando os mesmos no tecido tumoral. A base racional da quimioterapia combinada é utilizar medicamentos que atuem em diferentes partes dos processos metabólicos da célula, aumentando dessa forma a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células tumorais. O principal fator limitante do uso combinado dos quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo é o efeito mielossupressor. O direcionamento específico do fármaco às células tumorais promovido pela LDE, tornaria possível a terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo, sem produzir os efeitos colaterais observados com o uso combinado das formulações comerciais. O presente estudo tinha como objetivo avaliar os efeitos da terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo em comparação com a terapia dos respectivos fármacos isoladamente, bem como com a terapia combinada do paclitaxel e etoposídeo comerciais. A atividade antitumoral foi determinada em camundongos portadores de melanoma após a administração de intraperitoneal de LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg e LDE-oleato de etoposídeo 10 mg/kg. Nos grupos dos fármacos comerciais injetou-se paclitaxel 3,75 mg/kg e etoposídeo 2,5 mg/Kg, ou paclitaxel 7,5 mg/Kg e etoposídeo 5 mg/kg. Os fármacos foram administrados em dois esquemas terapêuticos: 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>; e 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> dias após a inoculação do tumor. Todos os grupos apresentaram aumento na taxa de sobrevivência em comparação ao grupo controle. Por outro lado, nos grupos LDE-fármacos foi observada uma redução dos efeitos de mielossupressão, visto que as doses administradas nestes grupos foram 2 e 4 vezes maiores do que nos demais. Os tratamentos do melanoma nos dois protocolos terapêuticos mostraram-se eficazes na redução da massa tumoral, sendo seu efeito inibitório acima de 90% nos grupos LDE-fármacos e na combinação dos quimioterápicos comerciais de maior dose. O número de metástases foi menor nos grupos de combinação LDE-Fármacos. Os resultados mostraram que a terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo foi mais eficaz que as terapias isoladas destes fármacos e que a terapia combinada com o paclitaxel e etoposídeo comerciais.

Palavras-Chave: Nanoemulsão. Quimioterapia combinada. Paclitaxel. Etoposídeo. Terapia alvo.

## ABSTRACT

KRETZER, Iara Fabricia. **Antitumor Combined Therapy of paclitaxel and etoposide derivatives associated to a cholesterol-rich nanoemulsion – LDE.** 2007. 121p. Dissertation (Masters Degrees). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2007.

LDE is a cholesterol-rich emulsion with similar composition to the natural lipoproteins. Due to its ability of binding to the Low Density Lipoprotein (LDL) receptors and concentrate in neoplastic cells which present overexpression of these receptors, LDE may be used as vehicle to target antineoplastic drugs against cancer cells. Combined chemotherapy is a therapeutic strategy against cancer that usually uses drugs that act in different parts of cells metabolism, increasing the chances of destruction of the cancer cells. In addition, adverse effects can be reduced when combining agents with different toxicities at lower doses than the usual in single therapy. The major limiting factor in combining the chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide is their side effects such as leukopenia, thrombocytopenia and anemia. The ability of LDE to carry the drug into the cell may bring a strong possibility of combining LDE- paclitaxel oleate and LDE-etoposide oleate without producing the toxic effects observed in the combined use of the commercial formulations of these drugs. The current study was designed to evaluate the effects of combined antitumoral therapy of LDE- paclitaxel oleate and LDE-etoposide oleate in comparison to the combination of commercial paclitaxel and etoposide formulations and to the single therapy with the same LDE-agents. Antitumoral activity was determined in melanoma-bearing mice after injection of LDE-paclitaxel oleate 15 mg/kg and LDE-etoposide oleate 10 mg/kg, or commercial paclitaxel 3.75 mg/kg and etoposide 2.5 mg/kg, or commercial paclitaxel 7,5 mg/kg and etoposide 5 mg/kg. Drugs were administered in two protocols: 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>; and 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> days after tumor implantation. All groups had an increase in the survival rate in comparison to the control group, however LDE combination groups showed reduction in the bone marrow toxicity, since the doses used were 2 and 4 fold greater than in the commercial drugs groups. The tumor growth inhibition rate was greater in both LDE-drugs combination groups and in the higher dosage of paclitaxel and etoposide combination (over 90% in comparison to the control). There were also great reduction of metastatic nodes in LDE-drugs combination groups in comparison to the commercial drugs combination groups. Our results showed that the antitumor combined therapy of LDE-paclitaxel oleate and LDE-etoposide oleate was more effective than the therapies with LDE-paclitaxel oleate and LDE-etoposide oleate alone, and the combined therapy of commercial paclitaxel and etoposide formulations.

Keywords: Nanoemulsion. Combined chemotherapy. Paclitaxel. Etoposide. Drug targeting.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>apoB-100</b>	Apolipoproteína B-100
<b>apoE</b>	Apolipoproteína E
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EP</b>	Erro Padrão
<b>Et</b>	Etoposide comercial
<b>LDE</b>	Nanoemulsão rica em colesterol
<b>LDE-olet</b>	Oleato de etoposide associado à LDE
<b>LDE-olptx</b>	Oleato de paclitaxel associado à LDE
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10</b>	LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg + LDE-oleato de etoposide 10 mg/kg
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LNLA</b>	Leucemia não linfóide aguda
<b>M</b>	Média
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>Ptx</b>	Paclitaxel comercial
<b>Ptx 15/et 10</b>	Paclitaxel 15 mg/kg + etoposide 10 mg/kg
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b>	Paclitaxel 3,75 mg/kg + etoposide 2,5 mg/kg
<b>Ptx 7,5/et 5</b>	Paclitaxel 7,5 mg/kg + etoposide 5 mg/kg
<b>rLDL</b>	Receptores da lipoproteína de baixa densidade
<b>USA</b>	United States of America
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de densidade muito baixa
<b>VR</b>	Valor de referência
<b>1<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/5<sup>o</sup></b>	Administração de quimioterápicos nos 1 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> dias do experimento
<b>1<sup>o</sup>/4<sup>o</sup>/9<sup>o</sup></b>	Administração de quimioterápicos nos 1 <sup>o</sup> , 4 <sup>o</sup> e 9 <sup>o</sup> dias do experimento
<b>11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup></b>	Administração de quimioterápicos nos 11 <sup>o</sup> , 13 <sup>o</sup> e 15 <sup>o</sup> dias do experimento
<b>11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup></b>	Administração de quimioterápicos nos 11 <sup>o</sup> , 14 <sup>o</sup> e 19 <sup>o</sup> dias do experimento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 LIPOPROTEÍNAS E CÂNCER .....	13
1.1.1 Lipoproteínas de baixa densidade .....	13
1.1.2 Nanoemulsão lipídica rica em colesterol .....	16
1.2 QUIMIOTERAPIA E CÂNCER .....	18
1.2.1 Paclitaxel .....	18
1.2.2 Etoposídeo .....	20
1.2.3 Quimioterapia combinada .....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 MATERIAL .....	25
4.2 MÉTODOS .....	25
4.2.1 Preparo da LDE .....	25
4.2.2 Associação do oleato de etoposídeo à LDE .....	26
4.2.3 Associação de oleato de paclitaxel à LDE .....	27
4.2.4 Ensaios preliminares e determinação dos grupos de trabalho .....	27
4.2.5 Implante de células de melanoma B16F10 em Camundongos da Linhagem C57BL/6J .....	30
4.2.6 Avaliação do efeito antitumoral .....	30
4.2.7 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso .....	31
4.2.8 Avaliação do efeito da terapia antitumoral combinada sobre o desenvolvimento de metástases .....	31
4.2.9 Avaliação dos efeitos hematológicos .....	32
4.2.9.1 Avaliação dos efeitos hematológicos da quimioterapia combinada ....	32
4.2.9.2 Avaliação dos efeitos hematológicos em animais portadores de melanoma .....	32
4.2.10 Análise estatística .....	33

<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 EFEITO DA TERAPIA ANTITUMORAL COMBINADA NA TAXA SOBREVIDA .....	34
5.1.1 Efeito da terapia combinada paclitaxel e etoposídeo comerciais na sobrevida de camundongos .....	34
5.1.2 Efeito da terapia antitumoral combinada na sobrevida dos animais portadores de melanoma B16F10 .....	35
5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL .....	39
5.2.1 Efeito sobre o crescimento do tumor de melanoma B16F10 .....	39
5.2.2 Percentual de redução da massa tumoral .....	43
5.2.3 Efeito do crescimento do tumor de melanoma B16F10 sobre o peso .....	47
5.2.4 Efeito da terapia antitumoral combinada sobre o desenvolvimento de metástases .....	51
5.3 EFEITOS HEMATOLÓGICOS DA QUIMIOTERAPIA COMBINADA .....	60
5.3.1 Número de leucócitos.....	60
5.3.2 Contagem diferencial dos leucócitos .....	62
5.3.3 Número de leucócitos em animais portadores de melanoma B16F10 .....	63
5.3.4 Número de Hemácias em animais portadores de melanoma B16F10 .....	69
5.3.5 Número de plaquetas em animais portadores de melanoma B16F10 .....	76
5.3.6 Contagem diferencial dos leucócitos em animais portadores de melanoma B16F10.....	82
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da quimioterapia nos anos 50 e 60 resultou na disponibilidade de estratégias terapêuticas para pacientes com malignidades hematológicas e muitos tipos de tumores sólidos avançados. Esses avanços confirmaram que a quimioterapia pode realmente curar o câncer e promoveram a integração da quimioterapia em estratégias terapêuticas como cirurgias e a radioterapia nos estágios iniciais da doença (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005). Porém, o tratamento com monoquimioterapia tem como principal obstáculo o desenvolvimento de resistência celular aos fármacos (GOODMAN; GILMAN, 2001; ALMEIDA et al., 2005).

A quimioterapia combinada com agentes citotóxicos convencionais alcança resultados importantes, diferente da quimioterapia com um único agente. Além disso, proporciona o máximo de morte celular e previne ou diminui o desenvolvimento subsequente de resistência celular aos fármacos (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005). Muitos estudos estão sendo realizados para a obtenção de uma maior eficiência da quimioterapia com a combinação de diversos agentes antineoplásicos (ALMEIDA et al., 2005).

A dificuldade da quimioterapia combinada se dá na procura de um índice terapêutico favorável, visto que é desejável o uso de doses altas capazes de atingir o maior nível de morte celular possível, o que causa efeitos indesejáveis após o tratamento. Portanto, o uso clínico desses fármacos exige que seus benefícios sejam constantemente confrontados com a toxicidade dos mesmos (ECKHARDT; BORDEN, 1993; CHABNER; CALABRESI, 1995; SALMONM, 1998). Neste contexto, a terapêutica ideal seria baseada em agentes quimioterápicos que tivessem as células neoplásicas como alvos específicos, garantindo o uso de doses e combinações eficazes, e agredindo o mínimo possível os tecidos normais.

A tecnologia moderna forneceu dados sobre eventos moleculares e genéticos das células neoplásicas que permitem maiores possibilidades terapêuticas (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005). Todo o conhecimento a respeito do comportamento e características das células neoplásicas abre um extenso campo de pesquisa para o desenvolvimento de estratégias inovadoras na busca da cura do câncer. Neste contexto, muitos estudos foram realizados com a finalidade de aumentar a especificidade da quimioterapia às células tumorais, através do uso de

diversos tipos de veículos para agentes antineoplásicos: polímeros (KAN et al., 1990), emulsões lipídicas (MARANHÃO, et al., 1994; LUNDBERG, 1994; 2003; RENSEN et al., 2001), anticorpos (JUNGHANS et al., 1996; DUBOWCHIK; WALKER, 1999) e lipossomas carregados positivamente (SENGUPTA et al., 1998; 2000; MAMOT, 2003; FUJIMURA, 2006).

Dentre os estudos de terapia alvo, vários autores têm trabalhado na possibilidade de utilização das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para dirigir fármacos antitumorais às células neoplásicas (GAL et al., 1981; RUDLING et al., 1983; MASQUELIER et al., 1986; LUNDBERG et al., 1987; SMIDT et al., 1992; TOKUI et al., 1995; DUBOWCHIK; WALKER, 1999; RENSEN et al., 2001; CHUNG; WASAN, 2004). As pesquisas se basearam em evidências de que as células neoplásicas apresentam um aumento no número de receptores de LDL como consequência da maior demanda de colesterol para a síntese de novas membranas (HO et al., 1978).

Através do princípio que visa a entrada de quimioterápicos nas células tumorais via receptores de LDL, Maranhão et al. (1994), ampliaram os estudos nesta área, com o uso de outro veículo capaz de exercer esta função: uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol.

## 1.1 LIPOPROTEÍNAS E CÂNCER

### 1.1.1 Lipoproteínas de baixa densidade

A lipoproteína de baixa densidade (LDL), produto final da degradação da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), é uma nanoemulsão natural que transporta a maior parte do colesterol circulante no plasma humano. A fração LDL é constituída de partículas esféricas, cuja estrutura básica compõe-se de um núcleo apolar de ésteres de colesterol (45-50 % de massa lipídica) e um resíduo de triglicerídeos (3-9 %) circundado por uma monocamada de fosfolipídeos (16-25 %) que também contém colesterol livre (5-8 %).

A ligação da LDL aos receptores (rLDL) se faz por meio de domínios presentes na apolipoproteína B-100 (apo B-100). A apo B-100 se encontra ancorada na monocamada de fosfolipídeos e representa aproximadamente 20 % do peso da partícula (EISENBERG et al., 1980; CHUNG; WASAN, 2004).

O fígado é o principal órgão de remoção plasmática da LDL, sendo responsável por 70 % de sua degradação. Entretanto, quase todos os tecidos do organismo expressam receptores de LDL (rLDL). Esses receptores encontram-se em regiões específicas, depressões da membrana celular denominadas “coated pits”, revestidas por proteínas denominadas clatrin. Após a interação das lipoproteínas com os receptores essa região sofre invaginação, formando vesículas endocíticas. O envoltório de clatrina dissocia-se e ocorre fusão de várias vesículas formando os endossomos. A diminuição do pH nesses endossomos promove o desligamento do complexo receptor-LDL com o retorno do receptor à superfície celular. Segue-se a fusão de lisossomos com a vesícula, a degradação dos seus componentes e liberação de lipídeos no citoplasma. O colesterol da LDL liberado é utilizado em diversos processos, principalmente na síntese de membranas (GOLDSTEIN et al., 1979, CHUNG; WASAN, 2004).

Em 1978, Ho et al., observaram um aumento na atividade do rLDL nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia não linfóide aguda (LNLA), em relação às células mononucleares de indivíduos sadios. O aumento dos receptores nas células neoplásicas é um fenômeno muito intenso, podendo atingir de 3 a 100 vezes o número das células normais correspondentes. Alguns anos após, Gal et al. (1981) mostraram que algumas linhagens celulares neoplásicas (carcinoma epidermóide vaginal, carcinoma epidermóide cervical e adenocarcinoma endometrial), expressavam cerca de 15 a 30 vezes mais rLDL do que as células de linhagem normal (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais de glândula endometrial).

Posteriormente, vários estudos confirmaram o aumento de expressão de rLDL em células neoplásicas, entre eles: células de glioma (RUDLING et al, 1983); câncer de mama (RUDLING et al., 1986); câncer de bexiga (UEYAMA et al., 1990); linhagens de câncer gástrico (TOKUI et al., 1995); melanoma (VERSLUIS et al., 1996) ; e linhagens celulares de glioblastomas (MALETINSKA et al., 2000).

O aumento de expressão de rLDL pode ser explicado pelo fato de que células neoplásicas apresentam uma rápida proliferação, exigindo uma demanda maior de colesterol e fosfolipídeos para a síntese de novas membranas celulares (LENZ et al., 1997). Para suprir esta demanda, a célula multiplica os receptores para receber a LDL que proporciona o aporte desses lipídeos, fato este, que explicaria o aumento no número de rLDL e a hipocolesterolemia verificada em algumas neoplasias



(BUDD; GINSBERG, 1986; HENRIKSON et al., 1989; DUBOWCHIK; WALKER, 1999).

Vários estudos demonstraram as alterações no metabolismo lipídico de pacientes com câncer. Entre eles: hipocolesterolemia encontrada em pacientes com câncer (BARCLAY et al., 1955; BASES et al., 1965; NYDEGGER et al., 1972); relação entre a diminuição nos níveis de colesterol plasmático e a progressão da doença (KREGGER et al., 1992; PEKKANEN et al., 1994; IRIBARREN et al., 1995); normalização dos níveis plasmáticos de colesterol em pacientes com neoplasias após tratamento e remissão da doença (NIENDORF et al., 1995; HUNGRIA et al., 1995; NAKAGAWA et al., 1995; BARONI et al., 1996).

A possibilidade de se utilizar a LDL como agente direcionador de fármacos para as células neoplásicas tem sido explorada desde meados dos anos 80 por diversos grupos (RUDLING et al., 1983; LUNDBERG, 1987; SMIDT et al., 1992; SAMADI et al., 1993; TOKUI et al., 1995; XIAO et al., 1999). Essa utilização está baseada em três hipóteses que envolvem propriedades inerentes da partícula de LDL e do seu receptor (SAMADI et al., 1993):

- A LDL poderia transportar grandes quantidades de fármacos lipofílicos com efeitos citotóxicos;
- A internalização do fármaco na LDL protegeria o mesmo contra o ataque de biomoléculas plasmáticas e água;
- O fármaco incorporado na LDL teria maior concentração nas células neoplásicas que apresentam aumento de expressão de rLDL em relação às células normais.

Existem vários estudos bem sucedidos da associação de agentes antineoplásicos a LDL, entre eles: doxorubicina (KADER et al., 1998, CHU et al., 2001), derivados lipofílicos N-substituídos da daunorubicina (VERLUIIS et al., 1998) e derivados lipofílicos da doxorubicina (MASQUELIER et al., 2000).

Apesar de todas as vantagens advindas do emprego da LDL como agente direcionador de fármacos, sua utilização na clínica continua bastante limitada. O maior obstáculo para sua aplicação está relacionado com a sua natureza endógena, o que incorre na necessidade de isolamento do soro humano (RENSEN et al., 2001). Na prática, encontra-se dificuldade no isolamento por plasmaferese, além do

surgimento de alterações na sua estrutura durante a manipulação para incorporação de fármacos (VERSLUIS et al., 1998). Além disso, o uso de um hemoderivado como a LDL é acompanhado do risco de transmissão de doenças infecciosas.

Uma alternativa ao uso da LDL foi proposta inicialmente por alguns autores, nestes modelos fazia-se uso de emulsões artificiais com características semelhantes à LDL sem o domínio protéico (GINSBURG et al., 1982, HALBERT et al., 1984; OWENS et al., 1995; RENSEN et al., 2001). Contudo, o uso destes sistemas se restringiu em sua maioria apenas aos estudos das interações lipídicas, uma vez que eles não possuíam o domínio da apolipoproteína que se liga aos rLDL.

### **1.1.2 Nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE)**

Maranhão et al. (1993) realizaram estudos simulando o metabolismo da LDL através do uso de uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol, a LDE. A nanoemulsão constituída de aproximadamente 66 % de fosfolipídeos, 33 % de éster de colesterol e 1 % de triglicerídeos (HIRATA, 1991), seria utilizada na investigação da hipercolesterolemia relacionada à aterosclerose.

Em trabalho publicado em 1993, Maranhão et al., demonstraram que a LDE ligava-se aos rLDL, sendo captada pelas células. Os resultados de testes realizados em ratos mostraram que a LDE apresentava resposta metabólica semelhante à da LDL natural, sugerindo que estivesse sendo captada pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação.

Apesar da LDE não ter proteína, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais, e adquire dentre outras, a apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. Neste processo, a apo B-100 (responsável por ligar a LDL aos receptores celulares), não se liga a LDE. Portanto, é a apo E que serve de ponte para a LDE ligar-se ao receptor, sendo assim captada pelas células (MARANHÃO et al., 1993).

Hirata et al. (1999), demonstraram que a LDE tem uma taxa de remoção plasmática superior à da LDL em ratos, indicando uma maior afinidade da LDE pelos rLDL em relação à própria LDL natural. Este resultado confirma a teoria de que o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E.

Estudos *in vitro* mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular (MARANHÃO et al., 1997), e que a LDE é captada pelos rLDL (MARANHÃO et al., 2002).

Por ser obtida artificialmente, a LDE se difere da LDL ao não apresentar os riscos relacionados com a utilização de hemoderivados. Este fato, associado aos elementos disponíveis sobre o comportamento da LDE, fez com que Maranhão et al. (1993, 1994) levantassem a hipótese de que a LDE poderia substituir a LDL natural como veículo para direcionar quimioterápicos para os tecidos malignos, evitando órgãos e tecidos normais. Neste sentido, os quimioterápicos seriam incorporados à LDE, a qual seria injetada na circulação, adquirindo a apo E, e então, se ligaria preferencialmente aos receptores de LDL das células neoplásicas, os quais estariam em número muito maior comparativamente às células normais. Desta forma, a LDE aumentaria a eficiência do tratamento quimioterápico ao mesmo tempo em que reduziria seus efeitos colaterais.

Esta hipótese foi primariamente comprovada em estudos que demonstraram uma remoção da LDE com velocidade três vezes maior nos pacientes com leucemia não linfóide aguda do que em pacientes com leucemia linfóide aguda (com expressão normal de rLDL). Também foi demonstrado que, em contrapartida, após os pacientes serem tratados com quimioterápicos convencionais e atingirem completa remissão da doença, a remoção plasmática da LDE tornava-se mais lenta. Mostrou-se, portanto, que as células de LNLA, com receptores em número muito maior, provocaram remoção acelerada da nanoemulsão. Neste trabalho ficou comprovado que cerca de 70 % da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas dos pacientes portadores de LNLA (MARANHÃO et al., 1994).

A captação e concentração da LDE em tumores sólidos foram comprovadas em estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama, que mostraram o aumento da concentração de LDE nos tecidos neoplásicos. Em câncer de ovário, por exemplo, a captação da LDE foi dez vezes maior do que no tecido normal (ADES et al., 2001), enquanto que em carcinoma de mama, a captação tumoral foi 4,5 vezes maior do que a do tecido mamário normal (GRAZIANI et al., 2002).

A LDE foi utilizada como veículo para os quimioterápicos carmustina, paclitaxel, e etoposídeo. Quando incorporada à LDE, a carmustina apresentou diminuição dos seus efeitos tóxicos (MARANHÃO et al., 2002). Com o paclitaxel, a

associação apresentou-se estável, a atividade citotóxica do fármaco foi preservada e a toxicidade em camundongos foi menor (RODRIGUES et al., 2002).

Com exceção da carmustina, os quimioterápicos foram modificados quimicamente a fim de se tornarem mais lipofílicos para melhorar a associação com a LDE. O paclitaxel foi transformado no derivado oleato, e de fato, a associação LDE-oleato de paclitaxel se apresentou mais estável que a anterior, sem reduzir a ação citotóxica do fármaco. Além disso, a toxicidade animal foi em torno de doze vezes inferior à do fármaco comercial e em ensaios de regressão tumoral a preparação foi novamente superior à formulação comercial (RODRIGUES et al., 2005). Dias et al. (2007) demonstraram que em pacientes com tumores ginecológicos (ovário, endométrio e cérvix uterina), a captação da LDE-oleato de paclitaxel pelos tecidos tumorais foi 3,5 vezes maior do que nos respectivos tecidos normais.

Nos estudos envolvendo o etoposídeo, o aumento da taxa de associação a LDE também foi obtido pelo aumento da lipofilicidade da molécula, sem reduzir a sua ação citotóxica (VALDUGA et al., 2003). Ensaios em camundongos mostraram que além da redução dos efeitos tóxicos, a preparação LDE-oleato de etoposídeo teve maior efeito antitumoral quando comparado ao etoposídeo comercial (LO PRETE, 2006). Em ensaios clínicos com pacientes com câncer de ovário, a captação do fármaco pelo tecido tumoral foi quatro vezes superior ao tecido ovariano contralateral normal (AZEVEDO et al., 2005). Pacientes com linfoma submetidos ao tratamento com LDE-oleato de etoposídeo não mostraram toxicidade considerável e, além disso, a doença permaneceu estável durante o tratamento (PINHEIRO et al., 2006).

## 1.2 QUIMIOTERAPIA E CÂNCER

### 1.2.1 Paclitaxel

Paclitaxel é o fármaco precursor da classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. (ROWINSKY et al., 1990). O fármaco foi extraído no início dos anos 60 a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia*. Sua forma pura somente foi obtida em 1969 e a estrutura foi descrita pela primeira vez em 1971 (WANI et al., 1971).

O paclitaxel tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, colo uterino, cabeça, células não-pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi associados com AIDS. Também foi avaliada sua eficácia em várias neoplasias epiteliais e hematológicas (ROWINSKY et al., 1990; HOSSFELD et al., 1993; USP-DI, 2004b).

O mecanismo de ação do paclitaxel foi divulgado em 1984 por Manfredi et al. Diferentemente de outros agentes que agem nos microtúbulos, tais como os alcalóides da vinca, o paclitaxel promove a polimerização da tubulina. Os microtúbulos são essenciais para a manutenção da forma celular, sendo um dos componentes do fuso mitótico e do transporte de organelas dentro das células. A ligação do paclitaxel aos microtúbulos estimula a polimerização da tubulina, fato este que estabiliza os microtúbulos. Dessa forma, o ciclo celular acaba sendo bloqueado na sua última fase (G<sub>2</sub>) e na mitose, impedindo a divisão celular e proliferação das células neoplásicas (HORWITZ, 1992; HORWITZ et al., 1993; HOSSFELD et al., 1993; ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; KALECHMAN et al., 2000).

O mecanismo preciso pelo qual o paclitaxel é transportado para dentro das células é desconhecido. Supõe-se que devido à sua natureza hidrofóbica, o paclitaxel possa entrar na célula por difusão passiva (MANFREDI et al., 1984; RODRIGUES, 2004).

Um dos maiores problemas associados com a formulação do paclitaxel é a toxicidade do seu veículo Cremophor EL<sup>®</sup>, cujos efeitos colaterais incluem reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. O veículo também tem influência na função do endotélio e músculos, causando vasodilatação, dificuldade respiratória, letargia e hipotensão (WEISS et al., 1990; ROWINSKY et al., 1990; LIEBMANN et al., 1993). No intuito de amenizar os efeitos adversos e reduzir a incidência de reações de hipersensibilidade medidas profiláticas são adotadas durante o tratamento com o paclitaxel, como o uso de anti-histamínicos e corticosteróides durante a infusão (HOSSFELD et al., 1993; SHARMA et al., 1995). Outros efeitos característicos incluem leucopenia e trombocitopenia, sendo que a neutropenia raramente dura mais de sete dias (USP-DI, 2004b).

### 1.2.2 Etoposídeo

O etoposídeo é um fármaco da classe das podofilotoxinas, largamente utilizado no tratamento do câncer. É utilizado no tratamento de câncer de células pequenas e não pequenas de pulmão, tumores de células germinativas, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, leucemia não linfóide aguda, câncer de ovário, mama e gástrico (HOSSFELD et al., 1993; GOODMAN; GILMAN, 2001; GORDALIZA et al., 2004; USP-DI, 2004a).

O mecanismo de ação exato do etoposídeo é desconhecido. Este agente é inibidor da topoisomerase II, uma DNA-girase cuja atividade é bem maior nas células em proliferação. Durante a replicação da hélice do DNA nas células de mamíferos, ocorre um giro reversível em torno do filamento de replicação para impedir que a molécula de DNA se enovele irreversivelmente no decorrer da segregação mitótica (HANG; DALE; RITTER, 1997).

O fármaco parece agir no estágio pré-mitótico do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA. Pode ser considerado um agente de fase específica, com máximo efeito nas fases S tardia (síntese de DNA) e G<sub>2</sub> (intervalo pré-mitótico) da divisão celular. O etoposídeo causa quebras nas fitas duplas e simples do DNA, produz “cross-links” (ligações cruzadas de proteínas) e aberrações cromossômicas. A quebra da fita de DNA devido à formação de um complexo ternário com a enzima topoisomerase-II, é provavelmente o efeito inicial das seqüências biossintéticas e cinéticas que levam à citotoxicidade. A enzima permanece ligada à extremidade livre do filamento quebrado de DNA, levando à propagação das quebras deste, e conseqüente morte celular (GOODMAN; GILMAN, 2001; USP-DI, 2004a).

Pacientes fazendo uso do etoposídeo têm efeitos colaterais como náusea e vômito. Os efeitos tardios são alopecia e mielossupressão. A leucometria tende a retornar à normalidade aproximadamente vinte dias após a administração do fármaco (HOSSFELD et al., 1993; USP-DI, 2004a).

### 1.2.3 Quimioterapia combinada

Clinicamente a quimioterapia combinada começou a ser empregada nos anos 60 no tratamento da leucemia linfóide aguda. Desde então, estudos como o de Corbett et al. (1979) descrevem que sistemas de tumores de animais foram muito

utilizados em ensaios de combinações para fornecer bases mais fortes de quais agentes, regime de doses e seqüência de tratamento deveriam ser utilizados. As vantagens marcantes do uso de modelo de tumores animais para esses propósitos são: tempo relativamente curto para estudo de tumor animal, e habilidade de se controlar todos os aspectos de cada ensaio.

Dois fármacos citotóxicos, administrados em combinação, podem exercer seus efeitos independentemente ou interagir de forma farmacológica e bioquímica. Os dois fármacos podem causar dano celular nos mesmos alvos. Se isto é feito de modo que se aumente a citotoxicidade comparando-se ao uso dos agentes isoladamente, pode ocorrer sinergismo terapêutico. Por outro lado, também pode ocorrer o aumento da toxicidade nas células normais do hospedeiro, sem que ocorra aumento no efeito terapêutico (WITTES; GOLDIN, 1986). Quando a ação de um fármaco interfere no metabolismo do outro, ou ambos os fármacos atuam na mesma via metabólica ou função celular, efeitos de sinergismo são esperados. Nestes casos, é recomendada a realização de ensaios pré-clínicos desta combinação (DEGEORGE et al., 1998).

A escolha de um esquema terapêutico pode aumentar ou diminuir a atividade antitumoral de agentes antineoplásicos. Até mesmo a seqüência de administração dos fármacos pode alterar a resposta à terapêutica (WITTES; GOLDIN, 1986; DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005). Portanto, a completa avaliação de uma combinação particular de dois fármacos é um procedimento trabalhoso que requer a determinação sistemática dos efeitos da alteração dos esquemas terapêuticos e variação na intensidade de doses, na eficácia da terapia.

De um modo geral a combinação de fármacos provou ser mais efetiva do que a monoterapia no tratamento do câncer, tanto nos casos de tumores metastizados, como nos casos de pacientes em risco de recidiva pós-cirurgia (CHABNER; THOMAS, 2005). Isto porque a quimioterapia combinada permite o alcance de resultados importantes que não são possíveis com o tratamento com um único agente (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005):

- Promoção de uma máxima morte celular, com uma margem de toxicidade tolerada pelo indivíduo para cada fármaco, desde que a dose não seja comprometida;
- Promoção de uma margem maior de cobertura às linhagens de células resistentes em uma população de tumor heterogêneo, e

- prevenção ou retardamento do desenvolvimento de novas linhagens resistentes.

Diversos estudos avaliaram as respostas terapêuticas de combinações que incluem os agentes paclitaxel e etoposídeo. No caso do câncer de células pequenas de pulmão, um estudo de fase II mostrou que o paclitaxel pode ser administrado em doses completas ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) junto de um regime terapêutico carboplatina/etoposídeo, mantendo uma toxicidade tolerável (RECK et al., 2003). Apesar deste tipo de câncer ser responsivo à quimioterapia, a média de sobrevida dos pacientes permaneceu em 8 a 10 meses. Nestes casos, a terapia combinada de diversos agentes antineoplásicos com o etoposídeo possui um efeito de sinergismo e ao mesmo tempo podem ser bem toleradas. Porém, estratégias terapêuticas que envolvem a combinação de agentes quimioterápicos ditos eficazes para este tumor, não apresentaram repostas promissoras em longo prazo (KURUP; HANNA, 2004).

A combinação do quimioterápico paclitaxel com agentes citotóxicos complementares também tem sido investigada para o tratamento do câncer de células não pequenas de pulmão (LOKICH et al., 1998). Neste caso, o Cancer Center de Boston (USA) realizou um ensaio clínico combinando três fármacos: paclitaxel, cisplatina e etoposídeo. O estudo mostrou que a toxicidade foi o fator limitante para a escolha das doses e intervalos de administração, sendo que regimes diferentes apresentaram diferentes respostas terapêuticas.

Outros exemplos do uso de quimioterapia combinada com estes agentes é o estudo em tumores de células germinativas combinando os agentes paclitaxel, isofosfamida, carboplatina e etoposídeo (MOTZER et al., 2000; KONDAGUNTA et al., 2007), e a indicação do paclitaxel, etoposídeo e carboplatina para o tratamento de primeira linha de carcinomas de sítio primário desconhecido (USP-DI, 2004b).

Apesar do crescente uso dos quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo combinados, o efeito mielossupressor que ambos os fármacos apresentam é um fator limitante para esta modalidade terapêutica. Neste contexto, o direcionamento específico dos fármacos às células tumorais promovido pela nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE), tornaria possível a terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo.



## 2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores realizados com a associação da LDE com agentes quimioterápicos demonstraram que a LDE é um veículo promissor para o direcionamento de fármacos de ação antineoplásica, porque, além de aumentar a concentração do fármaco nos tecidos neoplásicos, reduz grandemente a toxicidade dos mesmos.

A quimioterapia combinada é uma estratégia terapêutica que visa utilizar medicamentos que atuam em diferentes partes dos processos metabólicos da célula, aumentando dessa forma, a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células cancerosas.

O principal fator limitante do uso combinado dos agentes quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo é o efeito mielossupressor que ambos os fármacos apresentam. Porém, o direcionamento específico dos fármacos às células tumorais promovido pela LDE, tornaria possível a terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo, sem produzir os graves efeitos colaterais observados com o uso combinado das formulações comerciais.

### 3 OBJETIVOS

- Determinar a eficácia da terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo em comparação à terapia combinada do paclitaxel e etoposídeo comercial;
- Comparar a eficácia da terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo com a monoterapia dos mesmos agentes associados à LDE;
- Verificar os efeitos hematológicos da administração combinada de LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo em comparação à terapia combinada do paclitaxel e etoposídeo comercial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Os lipídeos 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).

O paclitaxel foi adquirido da Calbiochem® (Calbiochem-Novabiochem corporation, La Jolla, EUA), dimetilsulfóxido, e óleo de castor polietoxilado (Cremophor® EL) e demais solventes orgânicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

O Oncosídeo® (etoposídeo em sua formulação comercial) e seu veículo foram doados pela Indústria Farmacêutica Quiral Química do Brasil (Juiz de Fora, MG, Brasil).

Para a realização deste trabalho foram utilizados 140 camundongos isogênicos C57BL/6J fêmeas, com peso mínimo 20 g e de aproximadamente dois meses de idade.

Para os estudos de eficácia antitumoral foi utilizado um modelo de tumor murino, melanoma B16F10. Os camundongos foram cedidos pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Divisão de Desenvolvimento Científico, do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos no biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico, com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, temperatura constante de 20 °C, água filtrada e esterilizada, e ração "ad libidum".

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Maranhão et al. (1993). A mesma foi preparada a partir da mistura de 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína, e 0,5 mg de colesterol livre, dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 h, a 4°C, para a remoção total dos solventes residuais.

Ao final desse período foram adicionados 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0 à mistura. A suspensão foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55 °C (na qual os componentes estão em estado de transição cristal-liquído), controlada por termômetro digital inserido diretamente no frasco. 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 (Arruda Ultrassom, São Paulo, SP, Brasil), equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro.

A emulsão foi ultracentrifugada (Ultracentrífuga Sorvall, Wilmington, EUA) por 30 min, a 35.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante (1,0 mL), contendo partículas que flutam em densidade 1,006 g/mL, foi retirado e descartado. O volume restante teve sua densidade ajustada para 1,210 g/mL pela adição de brometo de potássio e foi novamente submetido à ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 2 h, a 4 °C. Do sobrenadante foram removidos 2,0 mL contendo a fração de partículas de tamanho e composição desejados. A nanoemulsão foi dialisada utilizando-se 4,0 L de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, estéril e saco de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA), por 16 h, a 4°C, para a total remoção do brometo de potássio. Após esse período, a nanoemulsão foi esterilizada por filtração em filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, São Paulo, SP).

Todo o procedimento de preparo das nanoemulsões foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical, para evitar contaminação por microorganismos.

#### **4.2.2 Associação do oleato de etoposídeo à LDE**

O oleato de etoposídeo, sintetizado conforme método descrito por Valduga et al. (2003), foi associado à LDE numa razão 5:1, em massa de lipídeos:fármaco. O etoposídeo foi dissolvido em etanol (10 % do volume final) e misturado com a LDE. A associação do fármaco foi realizada por irradiação ultrassônica, com potência de 125 Watts, por 40 min a 55 °C em banho de água/gelo. A fração do fármaco que não se associou à LDE foi separada por centrifugação a 3.700 rpm por 30 min. Apenas o etoposídeo associado à LDE foi utilizado no experimento. As preparações foram esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µm e realizadas no mesmo dia do experimento.

### **4.2.3 Associação de oleato de paclitaxel à LDE**

O oleato de paclitaxel sintetizado conforme método descrito por Rodrigues et al. (2005), foi associado à LDE numa razão 5:1 em massa de lipídeos:fármaco. O paclitaxel foi dissolvido em etanol (10 % do volume final) e a LDE adicionada à solução. A associação foi realizada por sonicação por 40 min com temperatura variando entre 50 e 55 °C em banho de água/gelo. As preparações foram realizadas no mesmo dia dos respectivos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µm.

### **4.2.4 Ensaios preliminares e determinação dos grupos de trabalho**

Trabalhos prévios publicados pelo laboratório mostram uma maior eficácia na terapia antitumoral com LDE-oleato de etoposídeo (LDE-olet) em relação ao etoposídeo comercial (Et). Também foi demonstrado que a dose de 10 mg/kg do oleato de etoposídeo associado à LDE foi suficiente para a melhora no índice terapêutico do fármaco, em protocolo de administração nos dias 1, 3 e 5 (LO PRETE et al., 2007). Da mesma forma, em modelo de melanoma murino a LDE-oleato de paclitaxel (LDE-olptx) mostrou ser mais eficaz que o paclitaxel comercial (Ptx) na dose de 15 mg/kg administrada nos dias 1, 4 e 9 (RODRIGUES et al., 2005).

Baseado nestes resultados preconizou-se para os testes de eficácia antitumoral com quimioterapia combinada, o uso das doses de 15 mg/kg para os derivados de taxanos e 10 mg/kg para os derivados da podofilotoxina em dois esquemas terapêuticos: administração dos quimioterápicos nos dias 1, 3 e 5; e administração dos quimioterápicos nos dias 1, 4 e 9.

Devido à intensificação dos efeitos colaterais causados pelo uso combinado de agentes quimioterápicos com reações adversas similares, realizou-se um teste preliminar em camundongos para observação dos efeitos da administração de paclitaxel e etoposídeo comercial nas doses de 15 e 10mg/kg, respectivamente. Os fármacos foram injetados intraperitonealmente com intervalo de duas horas entre a aplicação do paclitaxel e do etoposídeo.

As doses utilizadas levaram a um drástico efeito de toxicidade, com a morte de 100 % dos animais em até seis dias, inviabilizando o experimento. Portanto,

optou-se por trabalhar com doses inferiores para as formulações comerciais de paclitaxel e etoposídeo (1/4 da dose utilizada com os fármacos associados à LDE).

O efeito da quimioterapia combinada na neutropenia de animais foi avaliado em quatro grupos distintos:

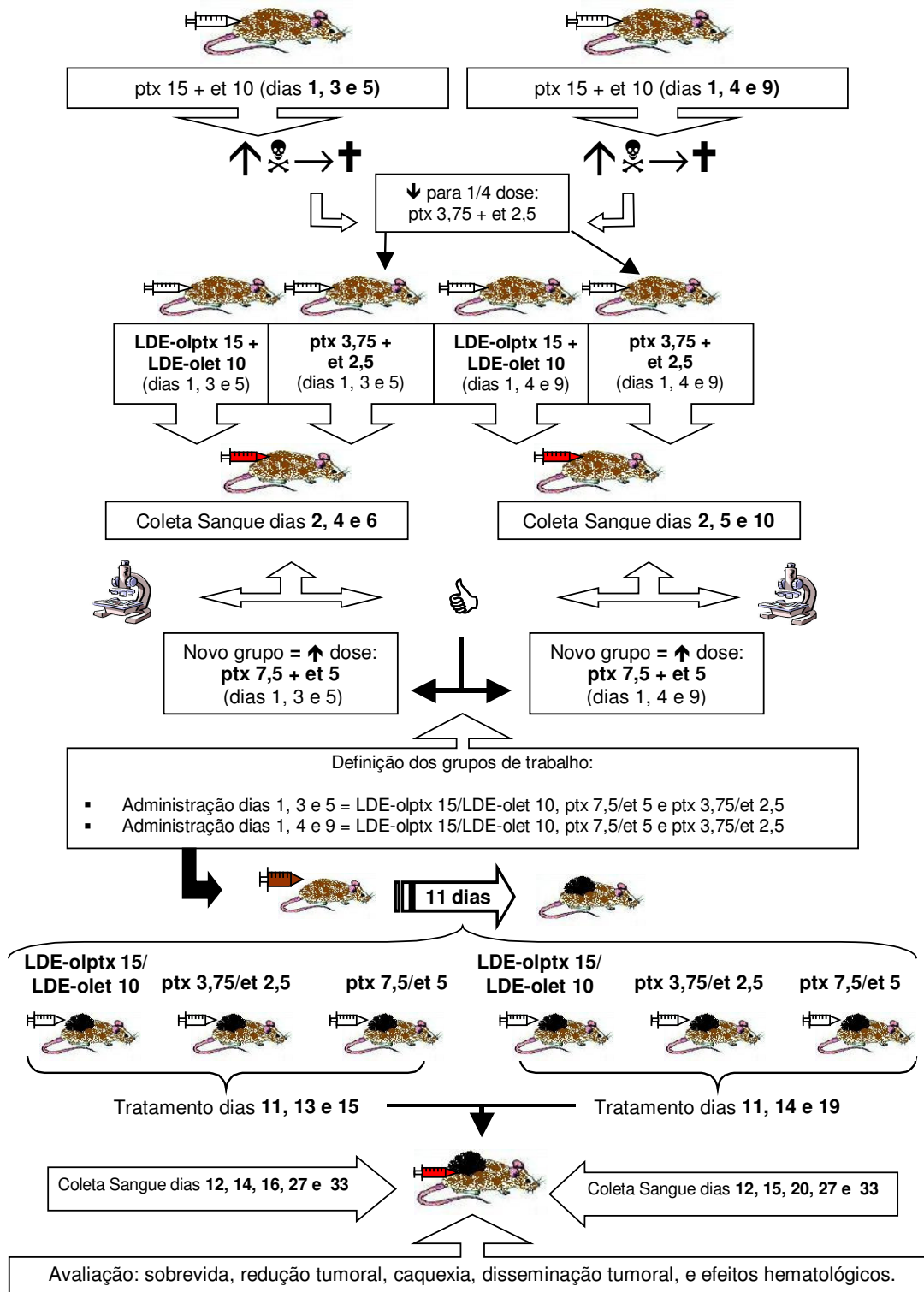
- LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (1<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/5<sup>o</sup>);
- LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (1<sup>o</sup>/4<sup>o</sup>/9<sup>o</sup>);
- Ptx 3,75/et 2,5 (1<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/5<sup>o</sup>);
- Ptx 3,75/et 2,5 (1<sup>o</sup>/4<sup>o</sup>/9<sup>o</sup>).

Com a observação da sobrevivência de todos os animais neste ensaio e visto que a redução das doses de quimioterápicos é considerada fator importante no fracasso da quimioterapia combinada, optou-se também por utilizar esquemas terapêuticos com dose maior de paclitaxel e etoposídeo comerciais nos ensaios com animais portadores de tumor (Ptx 7,5/et 5).

Todos os grupos foram comparados com grupos de animais portadores de tumor tratados isoladamente com:

- LDE-oleato etoposídeo 10 mg/Kg (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), conforme Lo Prete (2005);
- LDE-oleato paclitaxel 15mg/Kg (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), conforme Rodrigues (2004);
- Nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE);
- Solução de cloreto de sódio 0,9% (controle).

A figura 1 mostra uma representação esquemática dos ensaios realizados para determinação dos grupos e esquemas terapêuticos que foram empregados para avaliação da eficácia da quimioterapia combinada no modelo de melanoma murino abordado neste trabalho.



**Figura 1.** Representação dos ensaios preliminares e determinação dos grupos de trabalho: = Camundongos C57BL/6J, = Administração de quimioterapia (doses em mg/kg), = Elevada toxicidade, = morte, **ptx** = paclitaxel, **et** = etoposídeo, **LDE-olptx** = LDE-oleato paclitaxel, **LDE-olet** = LDE -oleato etoposídeo, = Coleta de sangue, = leucometria, = Animais vivos, = implante de células de melanoma B16F10, = camundongos portadores de tumor.

#### **4.2.5 Implante de células de melanoma B16F10 em Camundongos da Linhagem C57BL/6**

Aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  contendo  $5 \times 10^4$  células de melanoma B16F10 viáveis, em solução de fosfato tamponada, foram injetados subcutaneamente na região dorsal, previamente depilada, de camundongos fêmeas C57BL/6J, em condições estéreis.

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 o implante do tumor, os animais foram observados a cada 72 h e o crescimento tumoral acompanhado até atingir diâmetro médio de  $0,5 \text{ cm}^3$ , sem a presença de ulcerações ou necroses. Entre o 10º e 14º dias após a inoculação, os tumores foram visualizados macroscopicamente.

#### **4.2.6 Avaliação do efeito antitumoral**

O efeito antitumoral da combinação LDE-oleato de etoposídeo e LDE-oleato de paclitaxel foi avaliado de acordo com o protocolo estabelecido pelo National Cancer Institute (PLOWMAN et al., 1997).

Após desenvolvimento do tumor com visualização macroscópica, foram injetadas intraperitonealmente soluções de LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg e LDE-oleato de etoposídeo 10 mg/kg sempre duas horas após a injeção do primeiro fármaco. Da mesma forma, nos grupos dos fármacos comerciais foram injetadas soluções de paclitaxel 3,75 mg/kg e etoposídeo 2,5mg/kg, e soluções de paclitaxel 7,5mg/kg e etoposídeo 5mg/kg. Os grupos controles receberam pela mesma via de administração e no mesmo esquema, soluções de cloreto de sódio 0,9 %. As administrações dos fármacos se deram em dois esquemas terapêuticos: 11º, 13º e 15º dias; e 11º, 14º e 19º dias, após o implante das células tumorais.

Os parâmetros tumorais analisados foram: peso corpóreo e a massa tumoral, avaliados três vezes por semana até o 35º dia após o início do experimento. As medições foram feitas de forma longitudinal e transversal do tumor, com auxílio de um paquímetro. Observações diárias da taxa de sobrevivência dos animais foram realizadas até o 60º dia de experimentação.



A massa do tumor foi estimada a partir do seu diâmetro, sendo calculada de acordo com a expressão (GERAN et al., 1972):

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

A taxa de redução da massa tumoral foi calculada a partir da média da massa tumoral dos grupos tratados em relação à média do grupo controle, de acordo com padrões do National Cancer Institute (NCI) descritos por Plowman et al. (1997).

#### **4.2.7 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso**

O peso corpóreo e a massa tumoral dos camundongos foram acompanhados a partir do início do tratamento (11<sup>o</sup> dia após o implante do tumor). Estes parâmetros foram avaliados três vezes por semana até o 35<sup>o</sup> dia após o início do experimento.

Do peso corpóreo total foi subtraído o valor da massa tumoral, distinguindo-se portanto o peso real do animal. Esta variação no peso dos animais foi analisada em duas datas distintas pós-tratamento dos animais (20<sup>o</sup> e 31<sup>o</sup> dias após início do experimento).

O percentual de redução do peso real dos animais dos diferentes grupos foi estimado através da relação entre o peso real (nos 20<sup>o</sup> e 31<sup>o</sup> dias após início do experimento) e peso corpóreo total na data do início do tratamento dos animais (11<sup>o</sup> dia).

#### **4.2.8 Avaliação do efeito da terapia antitumoral combinada sobre o desenvolvimento de metástases**

Após o 60<sup>o</sup> dia de experimentação, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida realizou-se necropsia, análise de tumores dorsais, identificação de lesões internas macroscópicas, documentação de medidas e fotos. Os animais que morreram ao longo do experimento foram imediatamente separados conforme seu grupo de tratamento e congelados. Posteriormente foram selecionados de forma aleatória para necropsia.

O percentual de animais de cada grupo com metástases e a multiplicidade dos nódulos metastáticos, foram determinados na necropsia.

#### **4.2.9 Avaliação dos efeitos hematológicos**

##### **4.2.9.1 Avaliação dos efeitos hematológicos da quimioterapia combinada**

Camundongos receberam injeções de LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg e LDE-oleato de etoposídeo 10 mg/kg 2 h após a injeção do primeiro, ou soluções de paclitaxel 3,75 mg/kg e etoposídeo 2,5 mg/kg também 2 h após a injeção do primeiro. O grupo controle recebeu pela mesma via de administração e no mesmo esquema, soluções de cloreto de sódio 0,9 %. As administrações dos fármacos se deram em dois esquemas terapêuticos: 1º, 3º e 5º dias; e 1º, 4º e 9º dias de experimento.

Um dia após administração da quimioterapia, amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo venoso retrorbital de animais, com o auxílio de um microcapilar Helmington heparinizado.

Foi realizada a contagem do número de leucócitos ( $n^{\circ}$  céls/mL) em câmara de Malassez. O sangue total foi diluído em solução de Turk (1/20) para a contagem das células.

A partir do sangue total foram confeccionados esfregaços sanguíneos corados com corante panótico para análise do diferencial de células.

##### **4.2.9.2 Avaliação dos efeitos hematológicos em animais portadores de melanoma**

Um dia após administração da quimioterapia em animais portadores de tumor (item 4.2.6), amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo venoso retrorbital com o auxílio de um microcapilar Helmington heparinizado.

Foram realizadas contagens do número de leucócitos ( $n^{\circ}$  céls/mL) e do número hemácias ( $n^{\circ}$  céls/mL) em câmara de Malassez. O sangue total foi diluído em solução de Turk (1/20) para a contagem de leucócitos e em solução de NaCl 0,9 % (1/1000) para a contagem de hemácias. As plaquetas ( $n^{\circ}$  céls/mm<sup>3</sup>) foram contadas em câmara de Neubauer, a partir do sangue total diluído (1/100) em

solução de oxalato de amônio 1 %. Foi analisada também a contagem diferencial de células em esfregaço sanguíneo corado com corante panótico.

Após o fim do tratamento os parâmetros hematológicos também foram avaliados no 27<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dias após o início do experimento, para o acompanhamento do perfil hematológico dos camundongos pós-quimioterapia.

#### **4.2.10 Análise estatística**

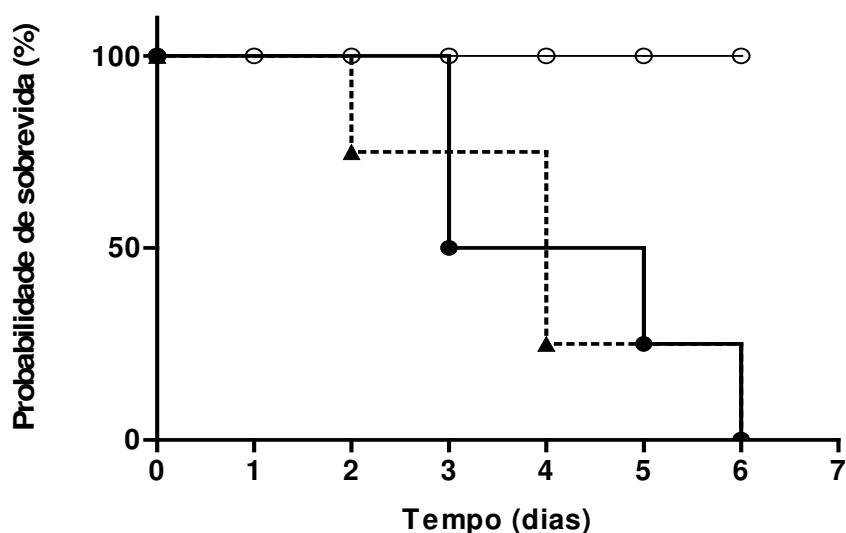
Para a análise dos dados dos experimentos utilizamos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. A probabilidade de sobrevida foi analisada com curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. Para as análises foram utilizados os programas Graphpad Prism 4.0 e Graphpad InStat 3.01. Os níveis críticos para significância foram de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DA TERAPIA ANTITUMORAL COMBINADA NA TAXA SOBREVIDA

#### 5.1.1 Efeito da terapia combinada paclitaxel e etoposídeo comerciais na sobrevida de camundongos

A figura 2 mostra o efeito drástico de toxicidade causado pelo uso combinado dos quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo comerciais. Houve morte de 100 % dos animais em até seis dias do início do experimento.



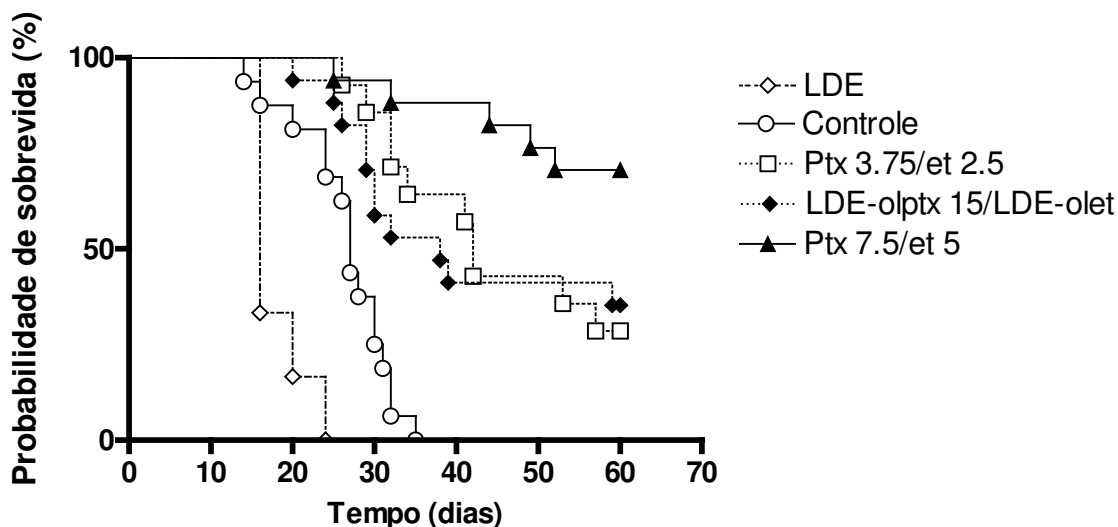
**Figura 2.** Probabilidade de sobrevivência de animais em resposta ao tratamento com paclitaxel e etoposídeo: (●) Ptx 15/et 10 (1º/3º/5º); (▲) Ptx 15/et 10 (1º/4º/9º); e (○) Controle.

Os animais foram pesados no dia seguinte à injeção dos fármacos. Os animais do grupo Ptx 15/et 10 (1º/3º/5º), perderam 4 % do seu peso corpóreo inicial, após a administração da primeira dose de quimioterapia, e 20 % após a segunda dose ( $p < 0,001$ ). Apenas 25 % dos animais sobreviveram para receber a terceira dose de quimioterápicos, mas morreram no mesmo dia da administração. No caso do grupo Ptx 15/et 10 (1º/4º/9º), os animais perderam 10 % do seu peso inicial já na

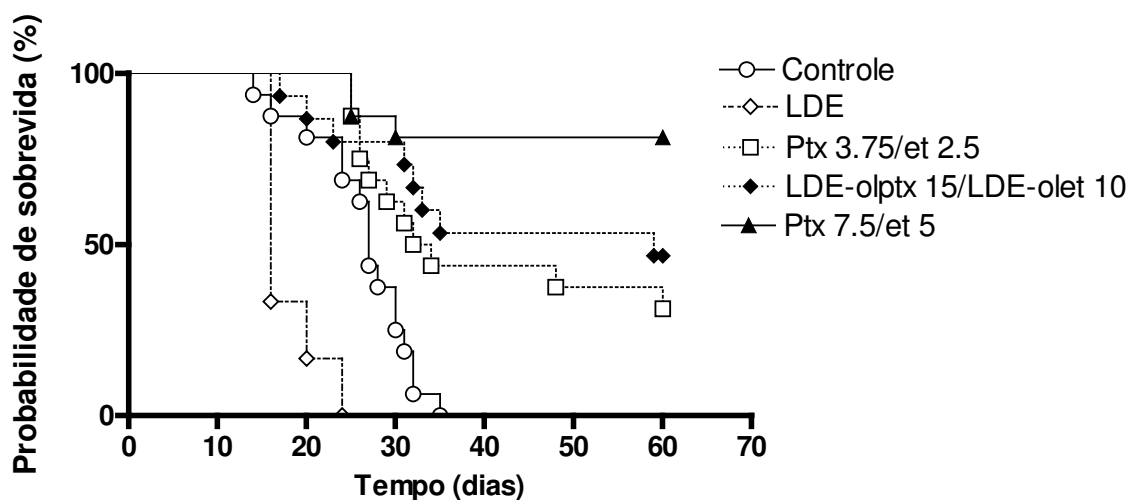
primeira dose de quimioterapia ( $p < 0,05$ ), e todos morreram antes mesmo da administração da terceira dose dos quimioterápicos.

### 5.1.2 Efeito da terapia antitumoral combinada na sobrevivência dos animais portadores de melanoma B16F10

A probabilidade de sobrevivência foi avaliada no período de 60 dias. As figuras 3 e 4 representam probabilidade de sobrevivência dos camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias 11, 13 e 15 e 11, 14 e 19, respectivamente. Os animais dos grupos tratados com quimioterapia apresentaram aumento na probabilidade de sobrevivência quando comparados ao grupo controle e ao grupo que recebeu apenas a LDE. Neste caso, 100% dos animais morreram em 23 dias de experimento.



**Figura 3.** Probabilidade de sobrevivência de animais portadores de melanoma B16F10 tratados com quimioterapia combinada nos dias 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> após a inoculação do tumor.



**Figura 4.** Probabilidade de sobrevivência de animais portadores de melanoma B16F10 tratados com quimioterapia combinada nos dias 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> após a inoculação do tumor.

As figuras 3 e 4 também mostram que no 60<sup>o</sup> dia, o grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), teve um aumento de 6 % probabilidade de sobrevivência em relação ao LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>). Da mesma forma, os grupos tratados com formulações comerciais Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), e Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), apresentaram um aumento na taxa de sobrevivência de 4 % e 22 % em relação aos grupos Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), e Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), respectivamente.

Nas tabelas 1 e 2 são mostradas as taxas de mortalidade dos animais tratados (com quimioterapia combinada ou não), no 35<sup>o</sup> dia de experimento (dia em que a porcentagem de mortalidade dos camundongos do grupo controle atingiu 100 %).

**Tabela 1.** Taxa de mortalidade de camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com regimes terapêuticos de agentes únicos e quimioterapia combinada nos dias 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup>.

Regime terapêutico	% Mortalidade 35 <sup>o</sup> dia
Controle	100 <sup>♦</sup>
LDE	100
Etoposídeo 10 mg/kg	80 <sup>1</sup>
LDE-olet 10 mg/kg	67 <sup>1</sup>
LDE-olptx 15/LDE-olet 10	47
Ptx 3,75/et 2,5	36
Ptx 7,5/et 5	12 <sup>○▪•</sup>

Notas: <sup>1</sup> = Lo Prete, 2005.

- ♦ = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 (p < 0,05)
- = Ptx 7,5/et 5 vs Etoposídeo e Controle (p < 0,001)
- = Ptx 7,5/et 5 vs LDE (p < 0,01)
- = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-Olet (p < 0,05)

**Tabela 2.** Taxa de mortalidade de camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com regimes terapêuticos de agentes únicos e quimioterapia combinada nos dias 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup>.

Regime terapêutico	% Mortalidade 35 <sup>o</sup> dia
Controle	100 <sup>♦</sup>
LDE	100
Paclitaxel 15 mg/kg	38 <sup>1</sup>
LDE-olptx 15 mg/kg	75 <sup>1</sup>
LDE-olptx 15/LDE-olet 10	47
Ptx 3,75/et 2,5	56
Ptx 7,5/et 5	19 <sup>‡</sup> ■

Notas: <sup>1</sup> = Rodrigues, 2004.

♦ = Controle vs Paclitaxel (p < 0,05)

\* = Ptx 7,5/et 5 vs Controle (p < 0,001)

■ = Ptx 7,5/et 5 vs LDE (p < 0,01)

De acordo com Lo Prete et al. (2007), animais tratados apenas com etoposídeo comercial 10 mg/kg apresentaram uma taxa de 80 % de morte, e a associação LDE-oleato de etoposídeo 10 mg/kg apresentou 67 % de morte no mesmo período (Tabela 1).

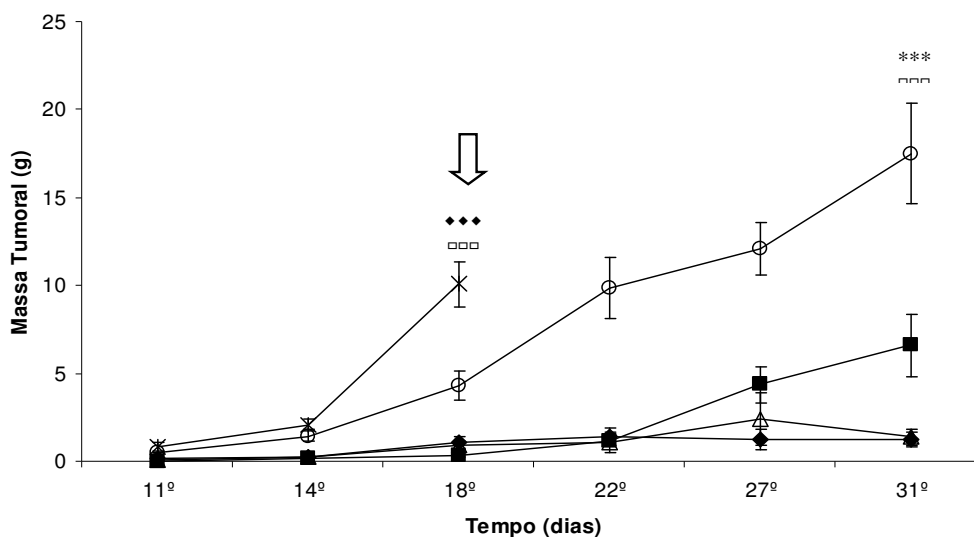
A tabela 2 mostra uma taxa de 38 % e 75 % de morte para os grupos LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg e paclitaxel comercial 15 mg/kg, respectivamente.



## 5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL

### 5.2.1 Efeito da terapia antitumoral combinada sobre o crescimento do tumor de melanoma B16F10

A figura 5 representa o efeito dos tratamentos (administrados nos dias 11, 13 e 15), na evolução do crescimento do tumor de melanoma. As curvas de crescimento do tumor indicam não haver uma diferença entre os grupos de tratamento quimioterápico ( $p > 0,05$ ), porém quando comparados ao controle, e ao grupo tratado apenas com LDE a diferença é enorme ( $p < 0,001$ ).

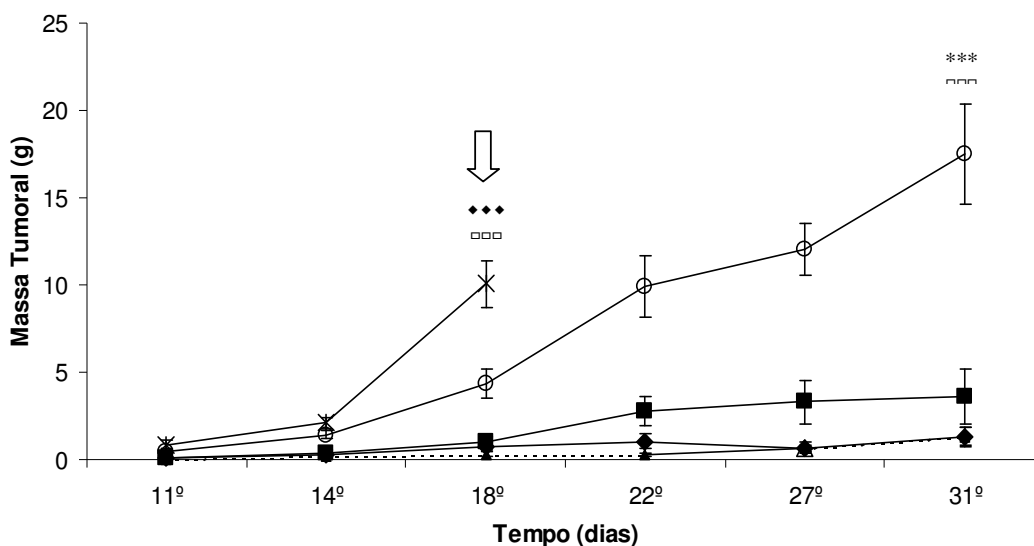


**Figura 5.** Crescimento da massa de tumoral em camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias 11º, 13º e 15º após o implante do tumor: (◆) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (▲) Ptx 7,5/et 5; (■) Ptx 3,75/et 2,5; (O) Controle; e (\*) LDE. ↓ = após esta data, morte dos animais tratados com LDE; □□□ = Controle vs LDE ( $p < 0,001$ ); ◆◆◆ = Grupos tratados com quimioterapia vs LDE ( $p < 0,001$ ); \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Os tumores do grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 apresentaram comportamento muito semelhante aos do grupo Ptx 7,5/et 5, e ambos cresceram menos do que no grupo Ptx 3,75/et 2,5.

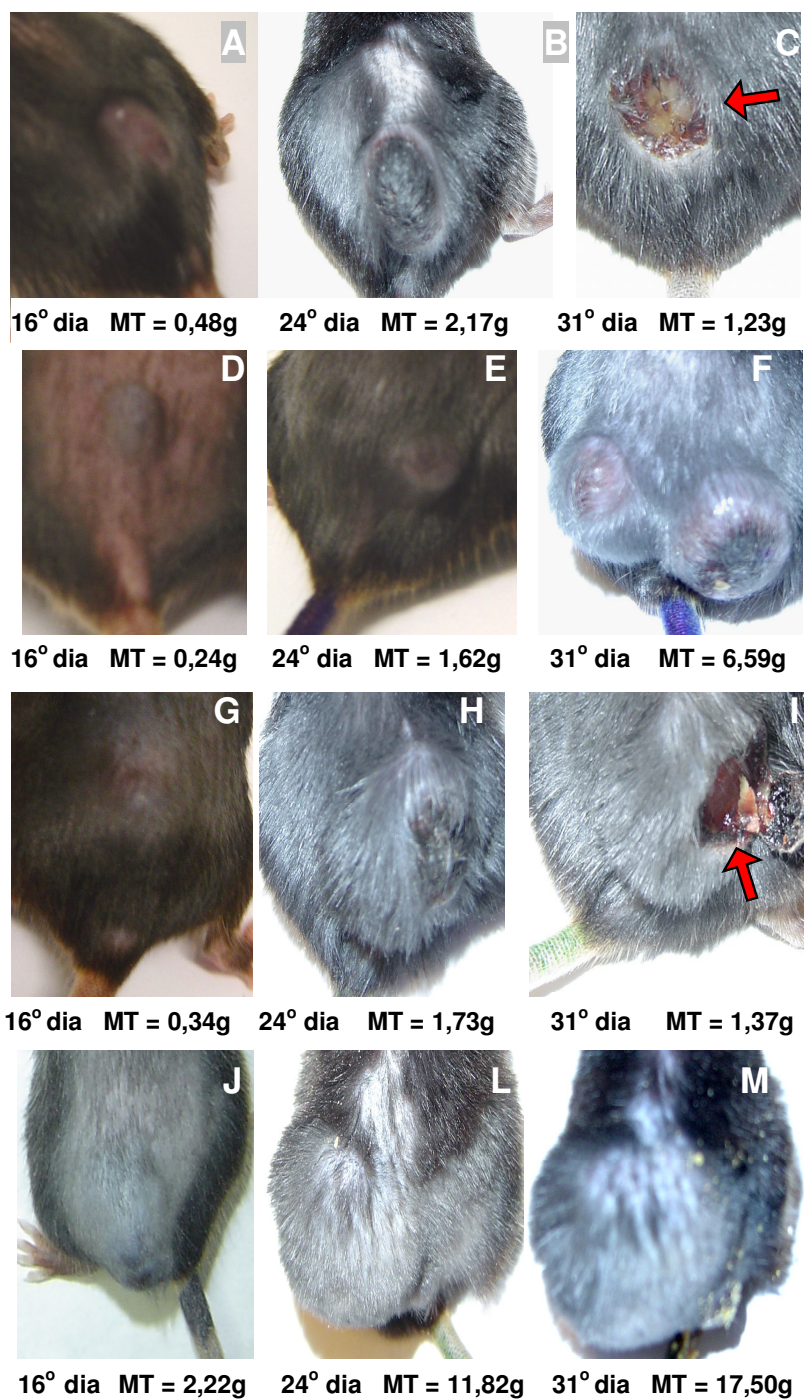
Também não houve diferença no efeito do crescimento dos tumores entre os tratamentos combinados administrados nos dias 11, 14 e 19, representados na

figura 6. Nota-se que o comportamento dos grupos deste protocolo se assemelhou muito com os grupos apresentados na figura 5.

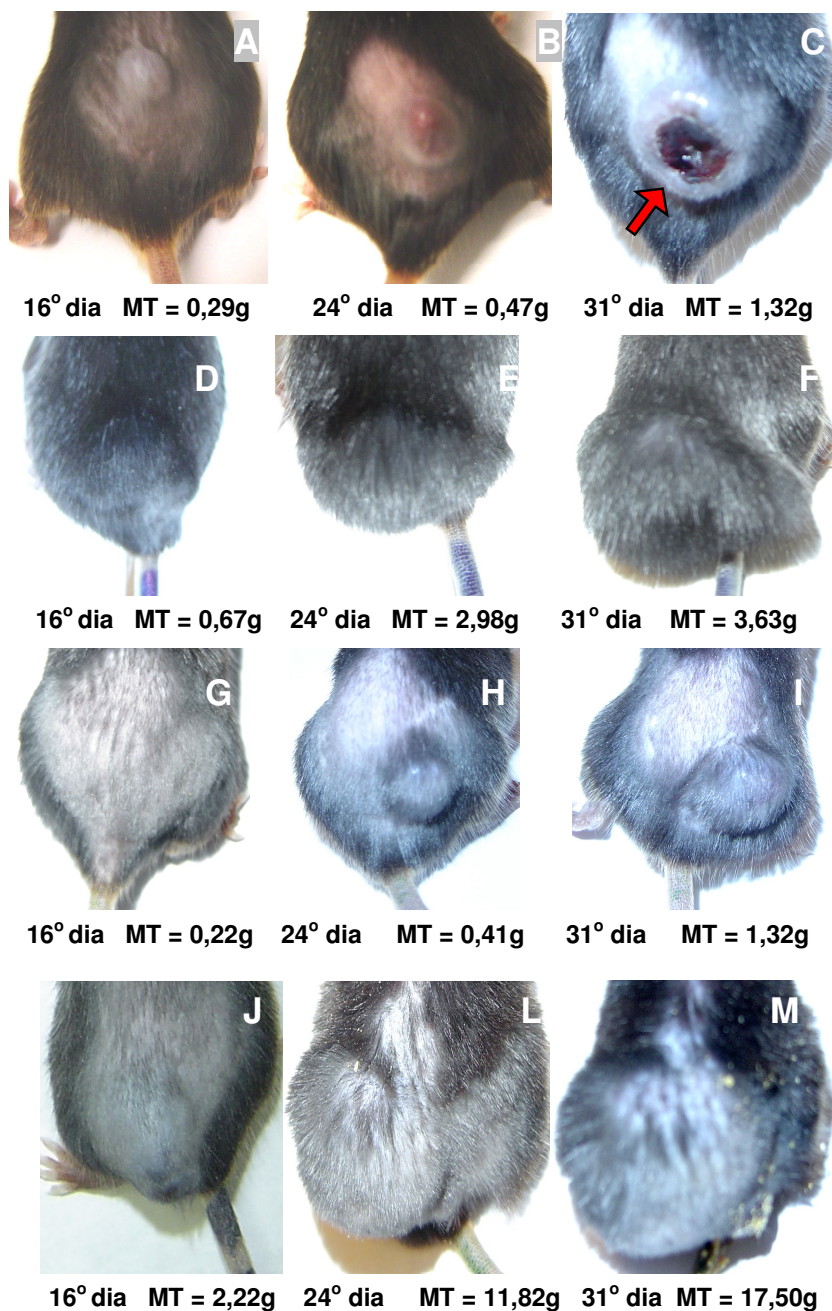


**Figura 6.** Crescimento da massa de tumoral em camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias 11º, 14º e 19º após o implante do tumor: (◆) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (△) Ptx 7,5/et 5; (■) Ptx 3,75/et 2,5; (○) Controle; e (\*) LDE. ↓ = após esta data, morte dos animais tratados com LDE; □□ = Controle vs LDE ( $p < 0,001$ ); ◆◆ = Grupos tratados com quimioterapia vs LDE ( $p < 0,001$ ); \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Fotos que representam a evolução da massa tumoral dos dias 16, 24, e 31 após a inoculação do tumor, são mostradas nas figuras 7 e 8. Nestas figuras destacam-se os tumores em processo de remissão nos grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e também no grupo Ptx 7,5/et 5 (11º/13º/15º).



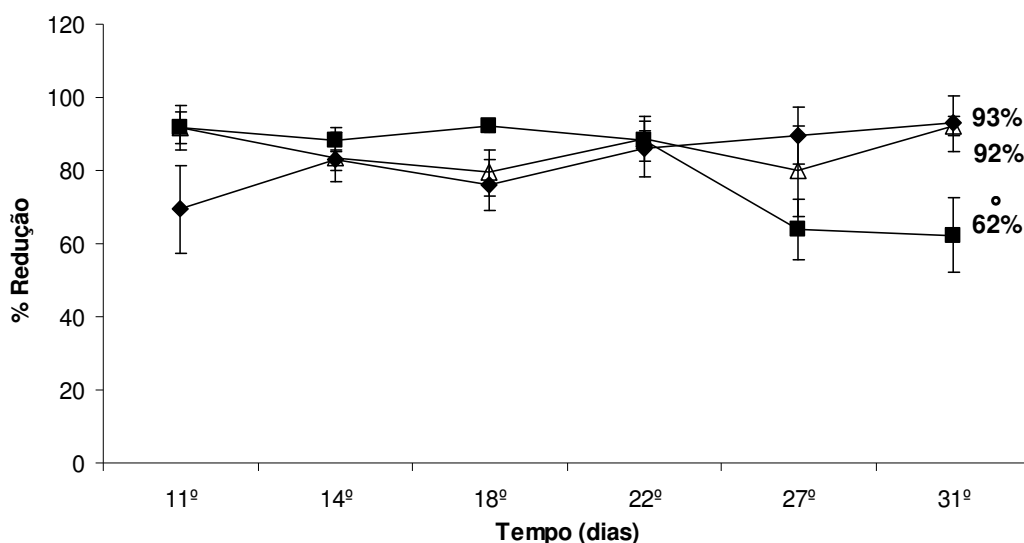
**Figura 7.** Representação da evolução da massa tumoral nos dias subseqüentes à inoculação das células B16F10: **A, B e C** = LDE-olptx 15/LDE-olet 10; **D, E e F** = Ptx 3,75/et 2,5; **G, H e I** = Ptx 7,5/et 5; **J, L e M** = Controle. Administração nos dias 11°, 13° e 15° após a inoculação do tumor. **MT** = Média da massa tumoral. ➔ Área de necrose - tumor em processo de remissão.



**Figura 8.** Representação da evolução da massa tumoral nos dias subseqüentes à inoculação das células B16F10: **A, B e C** = LDE-olptx 15/LDE-olet 10; **D, E e F** = Ptx 3,75/et 2,5; **G, H e I** = Ptx 7,5/et 5; **J, L e M** = Controle. Administração nos dias 11°, 14° e 19° após a inoculação do tumor. **MT** = Média da massa tumoral. ➔ Área de necrose - tumor em processo de remissão.

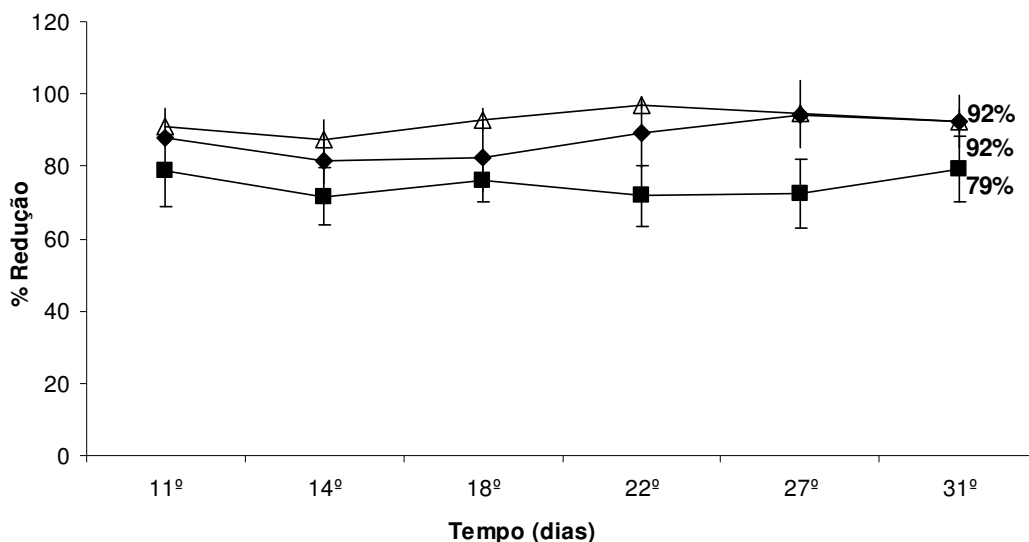
### 5.2.2 Percentual de redução da massa tumoral

As figuras 9 e 10 mostram com clareza a eficácia antitumoral da quimioterapia combinada em todos os grupos, com altos índices de redução da massa tumoral. Os resultados revelam que tanto o grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $11^{\circ}/13^{\circ}/15^{\circ}$ ), quanto o grupo Ptx 7,5/et 5 ( $11^{\circ}/13^{\circ}/15^{\circ}$ ) foram mais eficazes em reduzir o tumor do que o grupo Ptx 3,75/et 2,5 ( $11^{\circ}/13^{\circ}/15^{\circ}$ ), com 93 %, 92 % e 62 % de redução respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Redução da massa tumoral em camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias  $11^{\circ}$ ,  $13^{\circ}$  e  $15^{\circ}$  após a inoculação do tumor: (◆) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (△) Ptx 7,5/et 5; (■) Ptx 3,75/et 2,5. ° = Ptx 3,75/et 2,5 vs Demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

No caso dos grupos de tratamento representados na figura 10, não houve diferença entre eles ( $p > 0,05$ ) e as percentagens de redução da massa tumoral foram de 92 % para os grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $11^{\circ}/14^{\circ}/19^{\circ}$ ) e Ptx 7,5/et 5 ( $11^{\circ}/14^{\circ}/19^{\circ}$ ), e 79 % para o grupo Ptx 3,75/et 2,5 ( $11^{\circ}/14^{\circ}/19^{\circ}$ ).



**Figura 10.** Redução da massa tumoral em camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias 11º, 14º e 19º após a inoculação do tumor: (◆) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (△) Ptx 7,5/et 5; (■) Ptx 3,75/et 2,5. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Não houve diferença na redução da massa tumoral entre os grupos dos protocolos de tratamento nos dias 11, 13 e 15 e 11, 14 e 19 ( $p > 0,05$ ).

O grupo de animais tratados apenas com LDE não apresentou regressão tumoral. Ao contrário, em todas as datas analisadas o grupo apresentou elevada taxa de crescimento da massa tumoral chegando a 81% no 20º dia.

Nas tabelas 3 e 4 estão representados parâmetros associados à atividade antitumoral dos diferentes regimes terapêuticos (combinados ou não) no 25º dia de experimento. A partir da média da massa tumoral dos camundongos foi possível determinar o índice de retardamento do crescimento do tumor. A tabela 3 mostra que este índice foi semelhante para os grupos de terapia combinada, diferenciando-se somente nos grupos tratados com etoposídeo comercial 10 mg/kg isoladamente e com LDE ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Na tabela 4, observa-se que só existe diferença entre os tratamentos com paclitaxel comercial 15 mg/kg isoladamente e novamente com a LDE ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente).

**Tabela 3.** Redução da massa do tumor B16F10 em grupos de camundongos tratados com quimioterapia combinada ou isolada, nos dias 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup>, após o implante do tumor.

Regime terapêutico	% TGI	T-C
	25 <sup>o</sup> dia	(dias)
Controle	-	-
LDE	*** <sup>1</sup> -28	0 <sup>1</sup>
Etoposídeo 10 mg/kg	• <sup>2</sup> 48	4 <sup>2</sup>
LDE-olet 10 mg/kg	<sup>2</sup> 87	10 <sup>2</sup>
LDE-olptx 15/LDE-olet 10	82	8
Ptx 3,75/et 2,5	86	10
Ptx 7,5/et 5	85	6

Notas: <sup>1</sup> = Rodrigues, 2004.

<sup>2</sup> = Lo Prete, 2005.

\*\*\* = LDE vs Demais grupos (p < 0,001)

• = Etoposídeo vs Ptx 7,5/et 5, LDE-olet e Ptx 3,75/et 2,5 (p < 0,05)

% TGI = 100 - [(Média da massa tumoral dos animais tratados / Média da massa tumoral do controle) x 100]

T - C = Índice de retardamento da progressão do tumor (tempo médio estimado para um grupo tratado (T) e o controle (C) alcançarem uma determinada massa tumoral (> 750 mg).

**Tabela 4.** Redução da massa do tumor B16F10 em grupos de camundongos tratados com quimioterapia combinada nos dias 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup>, após o implante do tumor.

Regime terapêutico	% TGI	T-C
	25 <sup>o</sup> dia	(dias)
<b>Controle</b>	-	-
<b>LDE</b>	*** <sup>1</sup> -28	0 <sup>1</sup>
<b>Paclitaxel 15 mg/kg</b>	♦ <sup>1</sup> 58	4 <sup>1</sup>
<b>LDE-olptx 15 mg/kg</b>	<sup>1</sup> 67	7 <sup>1</sup>
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b>	96	6
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b>	75	6
<b>Ptx 7,5/et 5</b>	96	8

Notas: <sup>1</sup> = Rodrigues, 2004.

\*\*\* = LDE vs Demais grupos (p < 0,001)

♦ = Paclitaxel vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 7,5/et 5 (p < 0,05)

% TGI = 100 - [(Média da massa tumoral dos animais tratados / Média da massa tumoral do controle) x 100]

T - C = Índice de retardamento da progressão do tumor (tempo médio estimado para um grupo tratado (T) e o controle (C) alcançarem uma determinada massa tumoral (> 750 mg).

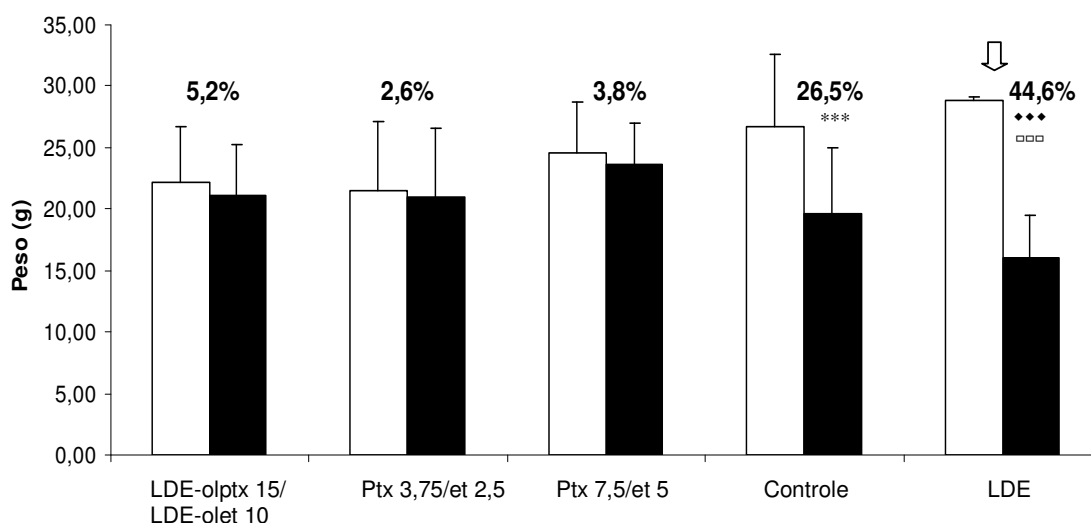


### 5.2.3 Efeito do crescimento do tumor de melanoma B16F10 sobre o peso

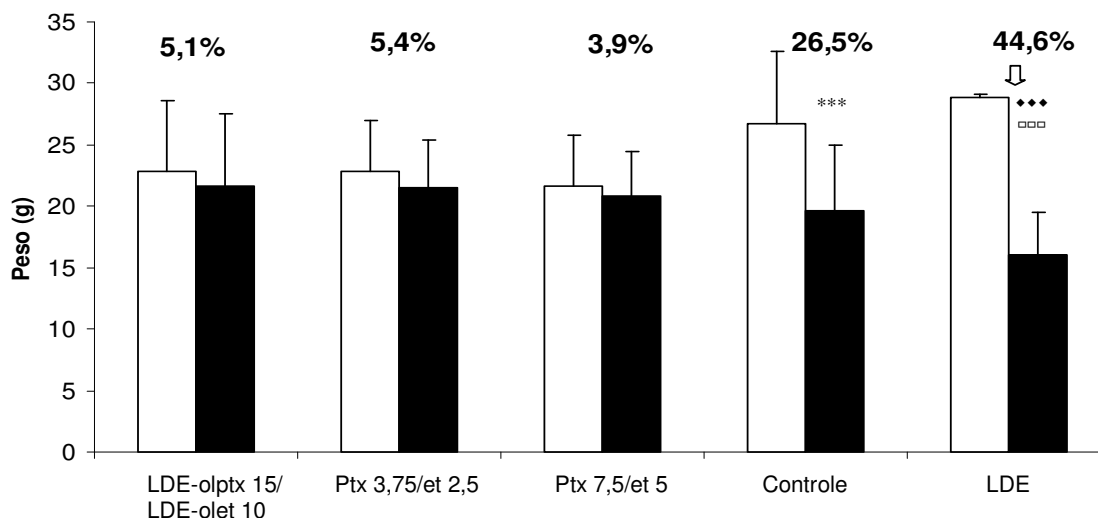
O peso corpóreo e a massa tumoral dos camundongos foram acompanhados a partir da data de início do tratamento do tumor implantando (11º dia).

Do peso corpóreo total foi subtraído o valor da massa tumoral distinguindo-se portanto, o peso real do animal. Esta variação no peso dos animais foi demonstrada em duas datas distintas pós-tratamento dos animais, no 20º e 31º dias após início do experimento.

As figuras 11 e 12 mostram em porcentagem, as variações de peso dos animais tratados com quimioterapia combinada no 20º dia de experimento.



**Figura 11.** Variação de peso no 20º dia após a inoculação do tumor em animais tratados nos dias 11º, 13º e 15º: (□) Peso total e (■) Peso real (Peso total - massa tumoral). ↓ = após esta data, morte dos animais tratados com LDE; □□□ = Controle vs LDE ( $p < 0,001$ ); ♦♦♦ = Grupos tratados com quimioterapia vs LDE ( $p < 0,001$ ); \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

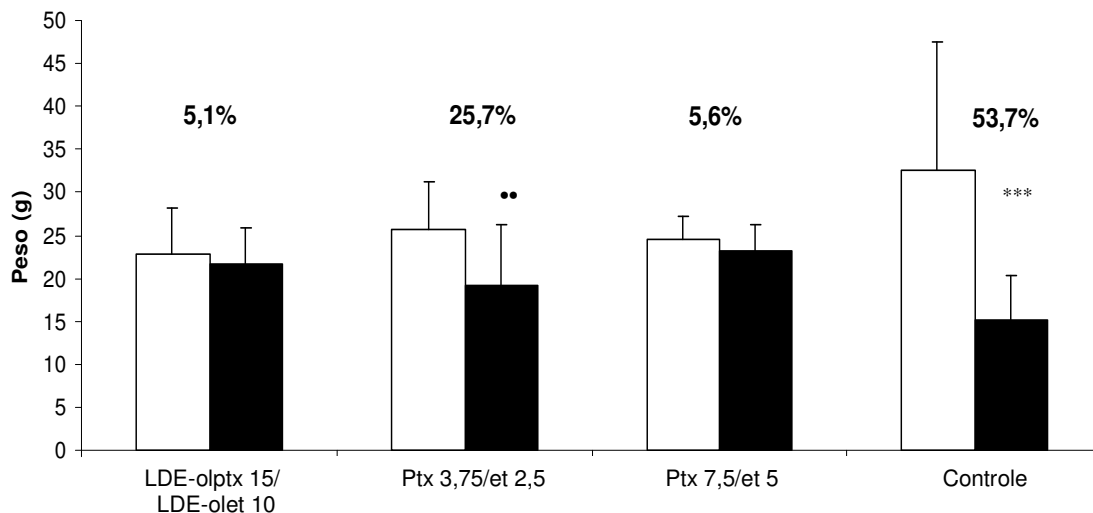


**Figura 12.** Variação de peso no 20<sup>o</sup> dia após a inoculação do tumor em animais tratados nos dias 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup>: (□) Peso total e (■) Peso real (Peso total - massa tumoral). ↓ = após esta data, morte dos animais tratados com LDE; □□□ = Controle vs LDE ( $p < 0,001$ ); ♦♦♦ = Grupos tratados com quimioterapia vs LDE  $p < (0,001)$ ; \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

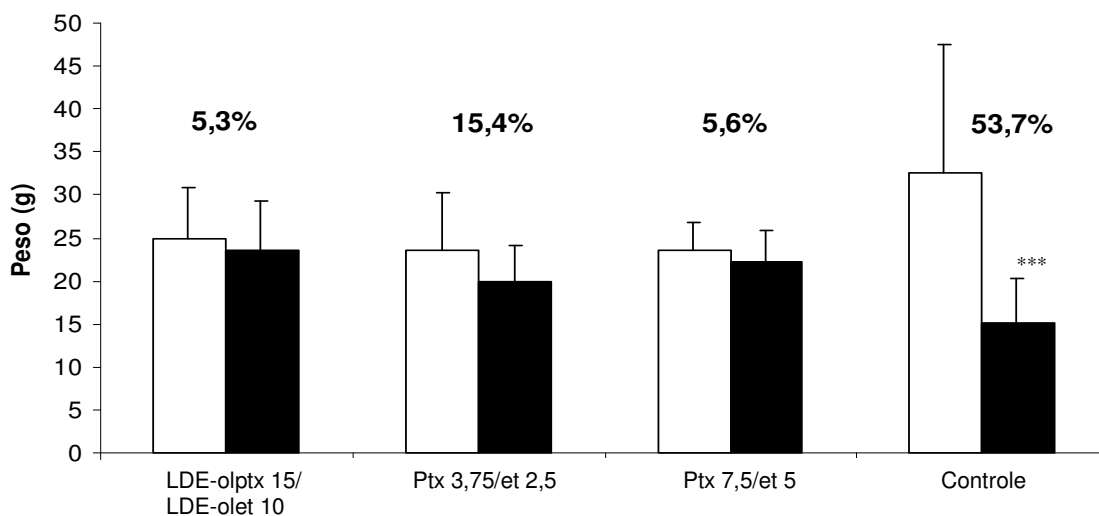
Nesta data destacou-se o grupo tratado exclusivamente com a LDE, onde aproximadamente 45 % do peso corpóreo dos animais referia-se à massa tumoral, refletindo o estado avançado da doença. O grupo controle apresentou menor variação de peso, sendo que aproximadamente 26 % do seu peso total foi relacionado à massa de tumor.

Dentre os grupos de quimioterapia combinada, a variação de peso ficou entre 2,5 e 5,5 % ( $p < 0,05$ ). Quando comparados aos grupos controle e LDE, todos os tratamentos tiveram uma variação de peso muito inferior ( $p < 0,001$ ) e refletem redução na massa tumoral.

Os gráficos das figuras 13 e 14 mostram a variação de peso dos animais tratados com quimioterapia combinada no 31<sup>o</sup> dia de experimento. Nesta data a massa tumoral do grupo controle foi responsável por 54 % do peso total dos animais, o que ilustra a progressão do tumor em relação ao 20<sup>o</sup> dia com uma diferença de 28 % entre as duas medidas.



**Figura 13.** Variação de peso no 31<sup>o</sup> dia após a inoculação do tumor em animais tratados nos dias 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup>: (□) Peso total e (■) Peso real (Peso total - massa tumoral). \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ); \*\* = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx 15/ LDE-olet e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 14.** Variação de peso no 31<sup>o</sup> dia após a inoculação do tumor em animais tratados nos dias 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup>: (□) Peso total e (■) Peso real (Peso total - massa tumoral); (□) Peso total e (■) Peso final (Peso total - massa tumoral). \*\*\* = Grupos tratados com quimioterapia vs Controle ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Os grupos tratados com a combinação LDE-fármacos e a combinação de paclitaxel e etoposídeo nas maiores doses apresentaram aproximadamente 5 % de variação no peso. Já em ambos os grupos tratados com a combinação paclitaxel e etoposídeo em doses menores Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), houve redução no peso real dos animais. Cerca de 26 % e 15 % do peso total dos animais era relativo à massa tumoral, respectivamente.

Os dados da tabela 5 mostram o percentual de redução do peso real dos animais dos diferentes grupos, estimado através da relação entre o peso real (nos 20<sup>o</sup> e 31<sup>o</sup> dias após início do experimento) e peso corpóreo total na data do início do tratamento dos animais (11<sup>o</sup> dia). Não há diferença entre os grupos tratados ( $p>0,05$ ), mas fica evidente a redução no peso dos animais não tratados com quimioterapia ( $p<0,001$ ).

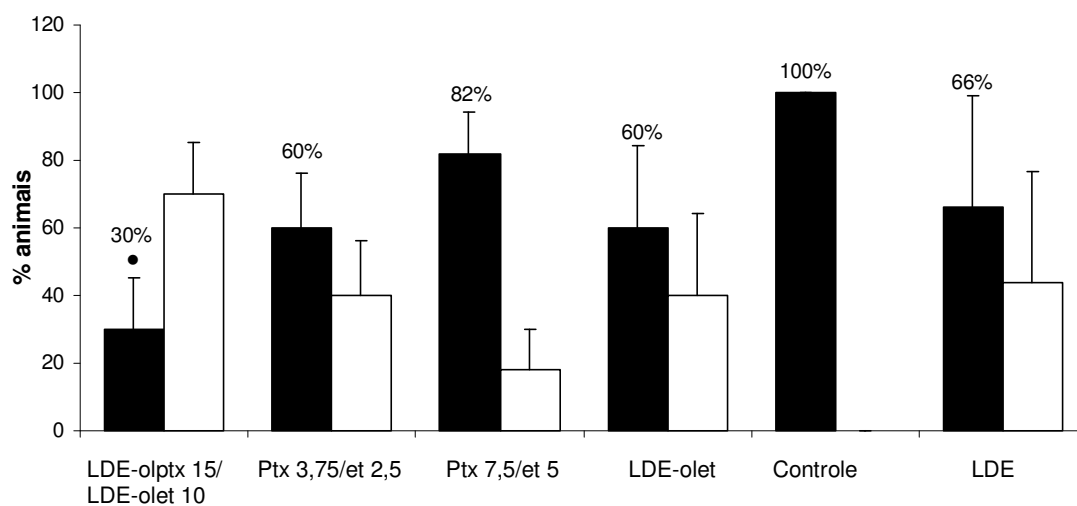
**Tabela 5.** Percentual de redução do peso em animais portadores de tumor B16F10.

Regime terapêutico	<sup>1</sup> Redução de peso (%)	
	20 <sup>o</sup> dia	31 <sup>o</sup> dia
Controle	17	36
LDE	30	-
LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	8	5,5
Ptx 3,75/et 2,5 (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	3,7	12,2
Ptx 7,5/et 5 (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	- 1	1,4
LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	10	2,2
Ptx 3,75/et 2,5 (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	1,3	8,4
Ptx 7,5/et 5 (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	6,1	0,1

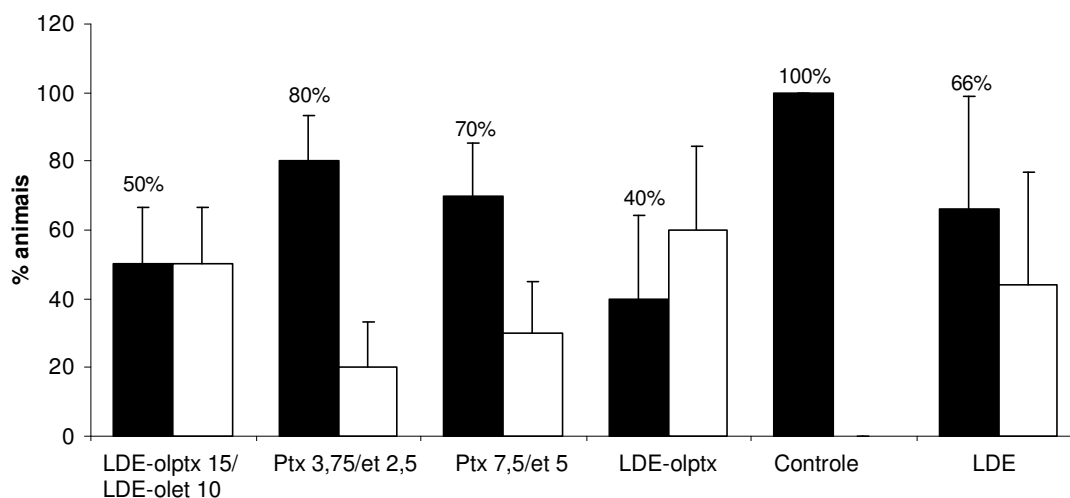
<sup>1</sup> = Percentual de redução do peso real (peso corpóreo total - massa tumoral) em relação ao peso corpóreo total na data do início do tratamento dos animais (11<sup>o</sup> dia).

### 5.2.4 Efeito da terapia antitumoral combinada sobre o desenvolvimento de metástases

Nas figuras 15 e 16 destaca-se o percentual de camundongos com nódulos metastáticos de todos os grupos. Os grupos Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) e Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) apresentaram respectivamente 82, 80 e 70 % de animais com presença de metástase. Todos os animais do grupo controle apresentaram nódulos metastáticos.



**Figura 15.** Percentual de animais com nódulos metastáticos, tratados no 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após o implante do tumor: (■) Animais com metástase. (□) Animais sem metástase. • = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Controle ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

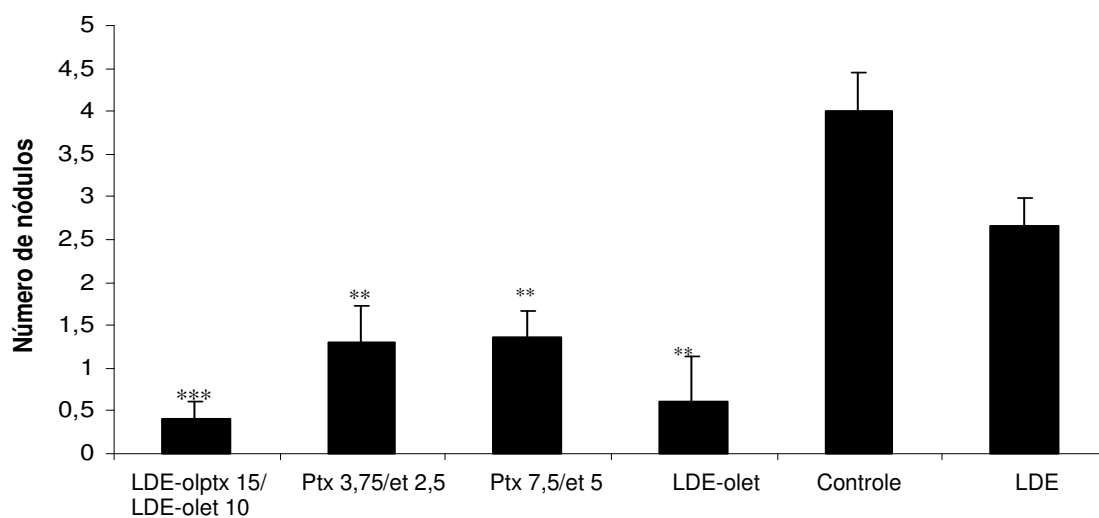


**Figura 16.** Percentual de animais com nódulos metastáticos, tratados no 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia após o implante do tumor: (■) Animais com metástase. (□) Animais sem metástase. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

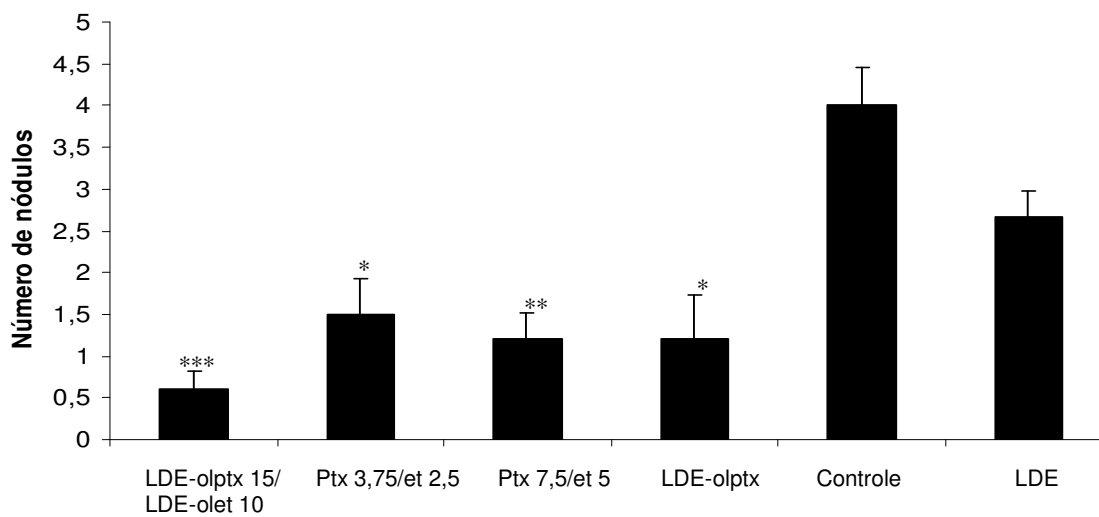
Na figura 15 destacou-se o grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) com número de animais com metástases menor do que nos demais grupos.

As figuras 17 e 18 ilustram o número de nódulos encontrados nos animais. Ficou evidente que a multiplicidade de sítios metastáticos foi menor nos grupos de tratamento com agentes antineoplásicos associados à LDE, especialmente nos grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>). Os resultados dos dois grupos foram semelhantes ao encontrado para o tratamento exclusivo com LDE-oleato de etoposídeo.

Todos os tratamentos combinando quimioterápicos nas formulações comerciais também apresentaram redução do número de nódulos metastáticos em relação ao controle. Porém, a diferença de doses entre estes grupos, bem como a diferença de intervalo nas administrações dos quimioterápicos não resultou em redução no número de nódulos encontrados.



**Figura 17.** Número de nódulos metastáticos em animais tratados no 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia após o implante do tumor. \*\*\* = LDE-olptx 15/LDE-olet vs Controle ( $p < 0,001$ ). \*\* = Ptx 3,75/et 2,5; Ptx 7,5/et 5 e LDE-ol et vs Controle ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 18.** Número de nódulos metastáticos em animais tratados no dia 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia após o implante do tumor. \*\*\* = LDE-olptx 15/LDE-olet vs Controle ( $p < 0,001$ ); \*\* = Ptx 7,5/et 5 vs Controle ( $p < 0,01$ ); \* = Ptx 3,75/et 2,5 e LDE-olptx vs Controle ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

A sequência de figuras 19 a 22 ilustram as necropsias de todos os grupos estudados. Alguns animais do grupo controle, apresentaram tumor muito avançado como representado na figura 19 (F), onde fica visível a grande disseminação e a agressividade do câncer. Todos os animais deste grupo apresentaram nódulos metastáticos e metástases ganglionares (Figura 19A) e, em 66 % deles, também foram encontrados nódulos em gânglios paraórticos (Figura 19C). Em 67 % foram encontrados nódulos pulmonares (Figura 19D), e em apenas 17 % dos animais encontrou-se nódulos de metástases retroabdominais (Figura 19B), no peritônio (Figura 19B) ou no mesentério. A figura 19 (E) mostra em detalhe a vascularização próxima a um nódulo ganglionar.

A figura 20 ilustra a necropsia de animais dos grupos tratados com combinação de fármacos associados à LDE. A vascularização foi discreta na maioria dos animais do grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), que teve 30 % dos seus animais metastizados com nódulos ganglionares (Figura 20 A e B). Apenas em 10 % dos animais foram encontrados nódulos no pulmão. No caso do grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), 50 % dos animais apresentaram metástases ganglionares e somente 10 % do grupo apresentou também nódulos no pulmão. Na figura 20 (C e D) fica evidente que a vascularização deste grupo é reduzida.

Na figura 21 observa-se o intenso processo de vascularização em ambos os grupos tratados com paclitaxel 7,5 mg/kg e etoposídeo 5 mg/kg. No caso do grupo Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), 44 % dos animais apresentaram nódulos hepáticos (Figura 21C); 37 % nódulos ganglionares; 15 % nódulos no mesentério e 7,4 % no baço e pulmão. No grupo Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), 40 % dos animais apresentaram nódulos ganglionares, 30 % hepáticos (Figura 21F), e 10 % dos animais possuíam nódulos subcutâneos, próximos à derme, mesentério ou pulmão.

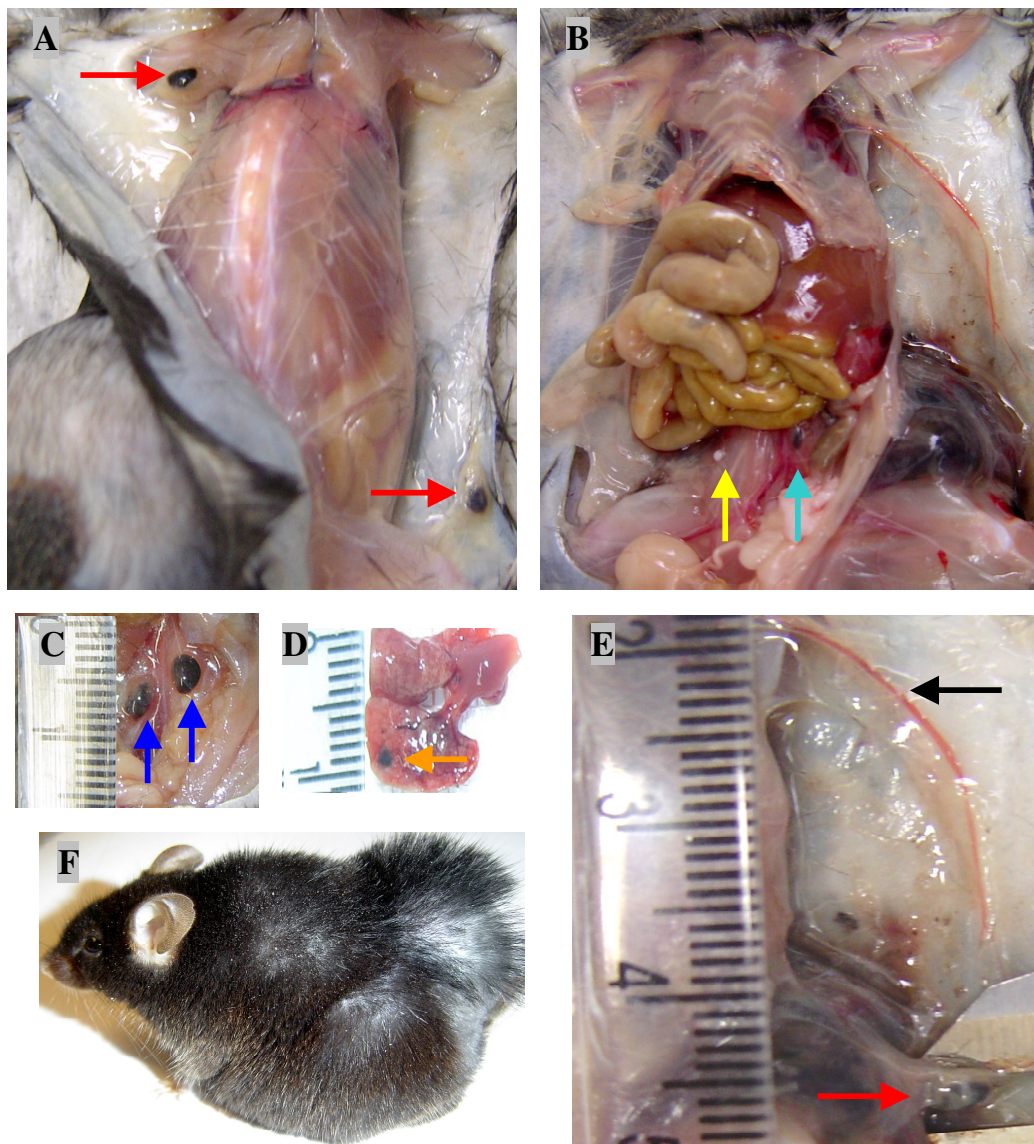
A figura 22 mostra fotos das necropsias dos grupos Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), LDE e LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo isoladamente (LDE-olptx e LDE-olet). Do grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), 50 % dos animais apresentaram nódulos ganglionares, 30 % pulmonares, 20 % hepáticos (Figura 22D) e 10 % intestinais ou retroperitoneais. No grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) foram observadas metástases em 80 % dos camundongos (Figura 16). Dos animais deste grupo, 60 % apresentaram nódulos ganglionares, 30 % pulmonares (Figura 22C) e 20 % hepáticos.



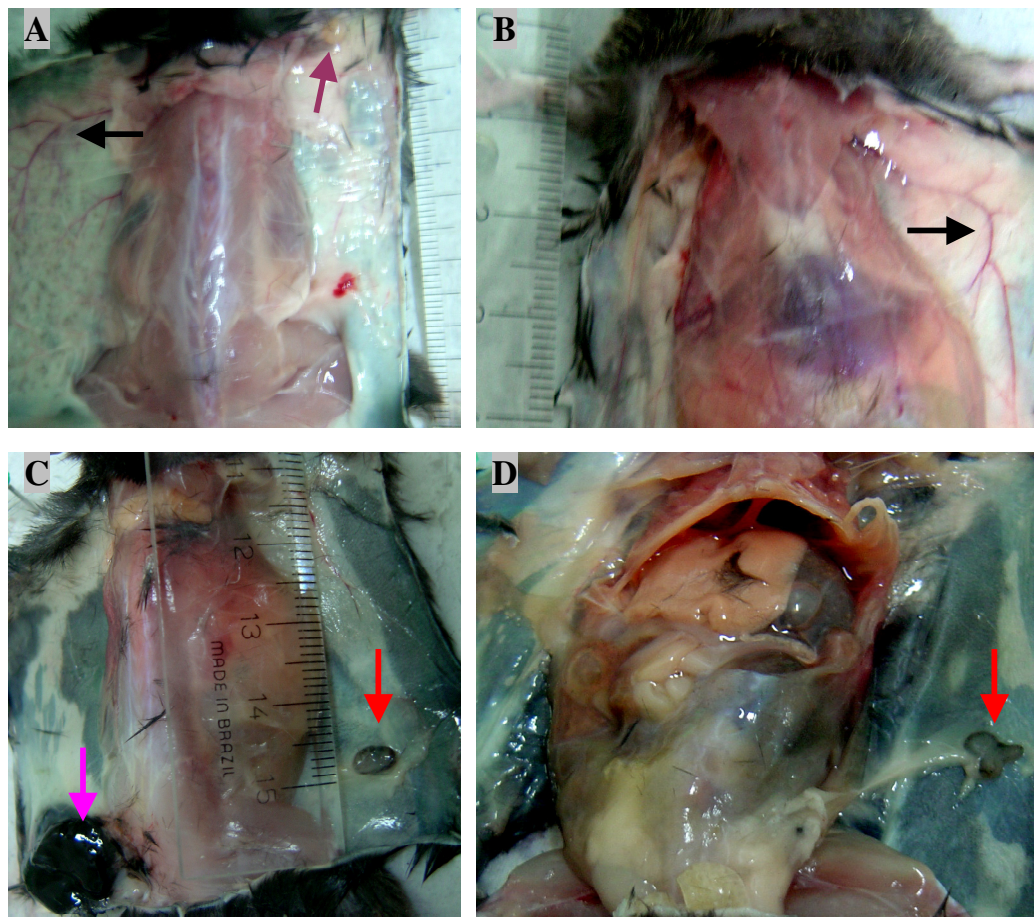
O gráfico da figura 15 mostrou que 60 % dos animais tratados unicamente com LDE-oleato de etoposídeo apresentaram sítios de metástases, sendo que 20 % dos animais apresentaram nódulos ganglionares e 40 % metástases no estômago (Figura 22B).

No tratamento exclusivo com LDE-oleato de paclitaxel, 40 % dos camundongos metastizaram (Figura 16), todos com metástase ganglionar e 20 % também com nódulos no pulmão ou estômago. A vascularização observada neste grupo esta representada na figura 22 (E e F).

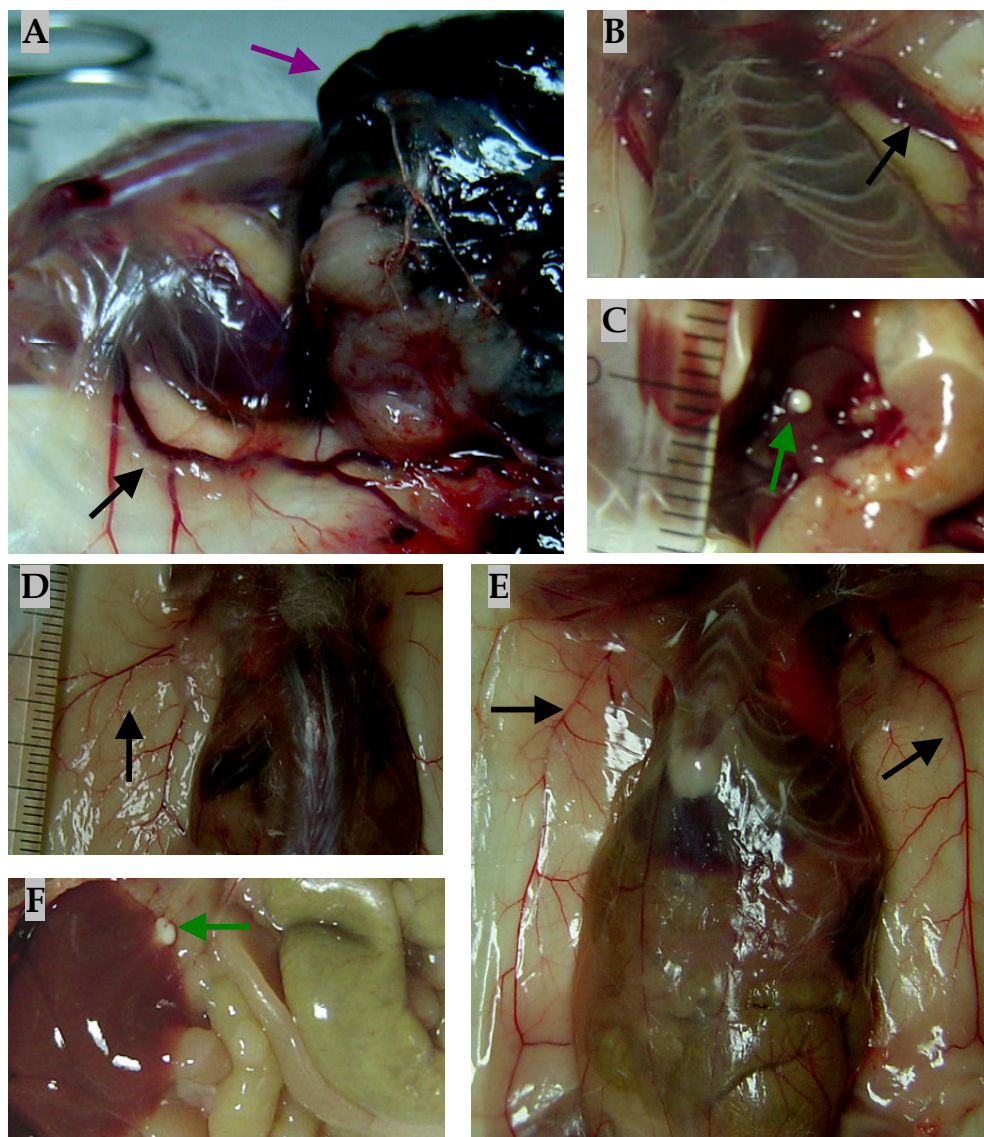
Finalmente, o grupo onde se administrou apenas a LDE apresentou 67 % dos animais metastizados, sendo que 33 % deles apresentaram nódulos ganglionares e hepáticos (Figura 22A), e outros 33 % nódulos ganglionares e pulmonares.



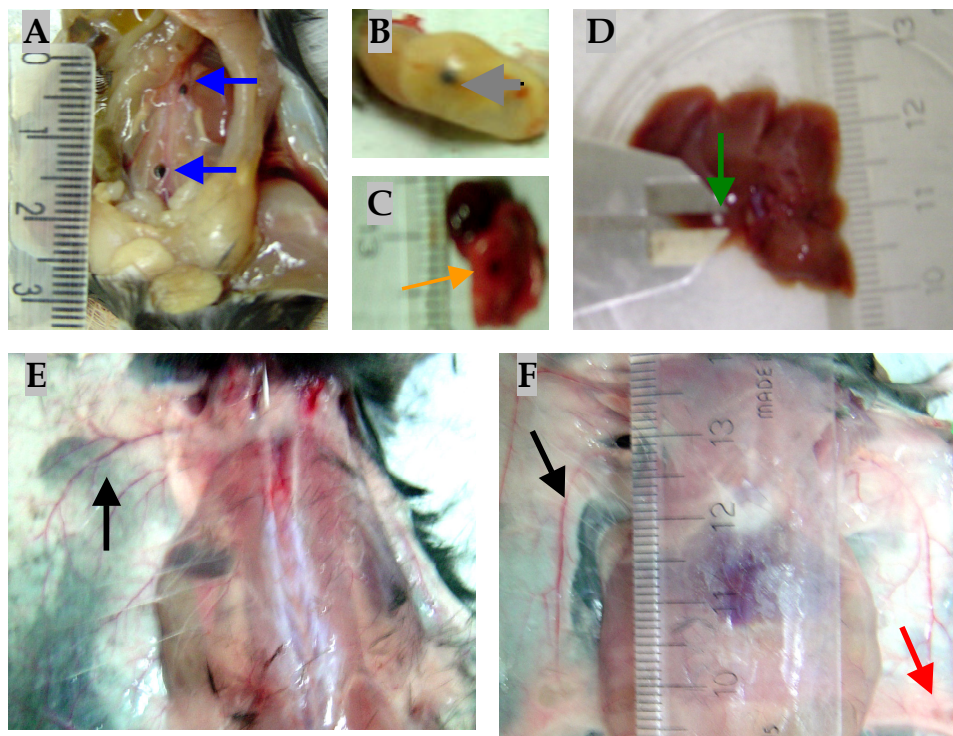
**Figura 19.** Animais portadores de melanoma do grupo controle: **A)** Região dorsal sem vascularização e gânglios metastáticos (→). **B)** Abertura do abdômen com metástases retroabdominal (→) e peritoneal (→). **C)** Nódulos metastáticos em gânglios paraórticos próximos ao hilo renal (→). **D)** Pulmão com nódulo metastático (→). **E)** Nota-se vascularização (→) e gânglio metastático (→). **F)** Animal com tumor altamente disseminado em estágio avançado.



**Figura 20.** Animais portadores de melanoma tratados com LDE-olptx 15/LDE-olet 10: **A e B.** LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $11^{\circ}/13^{\circ}/15^{\circ}$ ) = Região dorsal (**A**) e ventral (**B**) com vascularização ( $\rightarrow$ ) e gânglio normal ( $\rightarrow$ ). **C e D.** LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $11^{\circ}/14^{\circ}/19^{\circ}$ ) = Região dorsal pouco vascularizada (**C**) com o tumor ( $\rightarrow$ ) e metástase ganglionar ( $\rightarrow$ ); região ventral (**D**) sem vascularização e com gânglio metastático ( $\rightarrow$ ).



**Figura 21.** Animais portadores de melanoma tratados com PtX 7,5/et 5: **A, B e C.** PtX 7,5/et 5 (11°/13°/15°) = Região dorsal (**A**) e ventral (**B**) com intensa vascularização (→), tumor dorsal em estágio avançado (→), e região abdominal (**F**) com metástase hepática (→). **D, E e F.** PtX 7,5/et 5 (11°/14°/19°) = Região dorsal (**D**) e ventral (**E**) com intensa vascularização (→); e região abdominal (**F**) com metástase hepática (→).



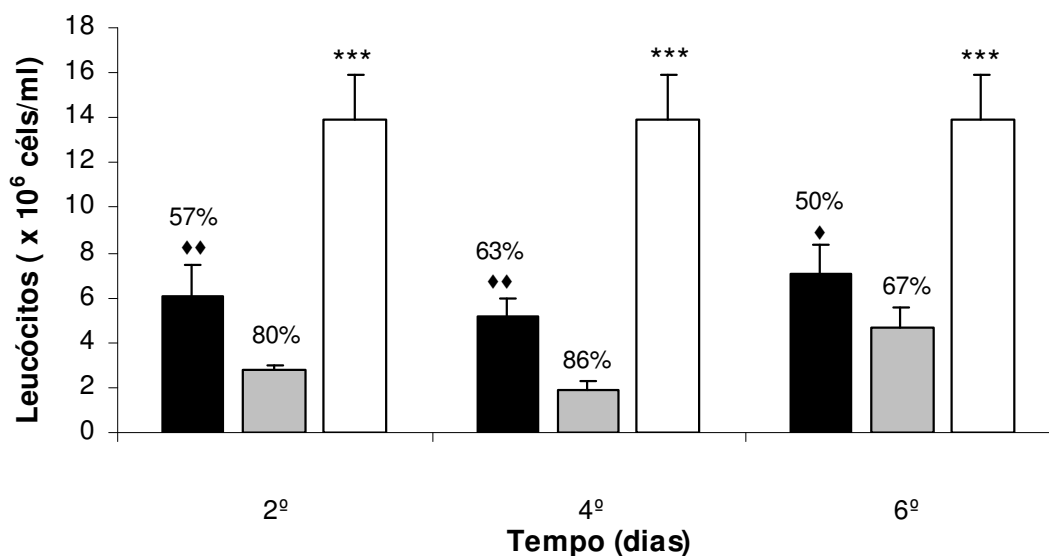
**Figura 22.** Animais portadores de melanoma: **A)** grupo tratado apenas com LDE, com metástases em gânglios paraórticos superior e inferior próximos ao hilo renal (→). **B)** Metástase no estômago do grupo **LDE-olet** (→). **C)** Metástase pulmonar do grupo **Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>)**. **D)** Metástase hepática do grupo **Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>)**. **E)** Região dorsal do grupo **LDE-olptx** com vascularização (→). **F)** Região ventral do grupo **LDE-olptx** com vascularização (→) e gânglio metastático (→).

## 5.3 EFEITOS HEMATOLÓGICOS DA QUIMIOTERAPIA COMBINADA

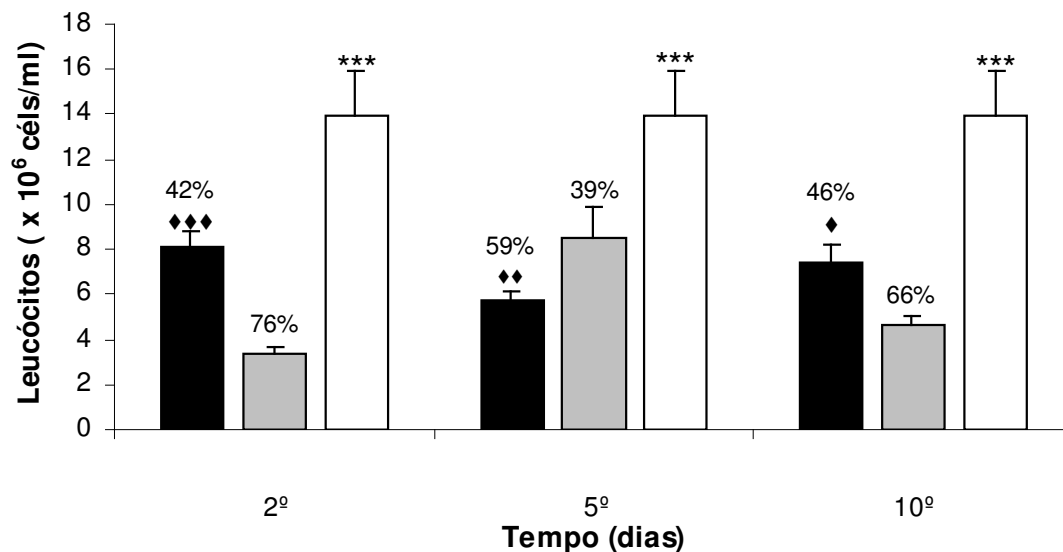
### 5.3.1 Número de leucócitos

Um dia após administração da quimioterapia, amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo venoso retrorbital dos camundongos.

As figuras 23 e 24 mostram o efeito de redução do número de leucócitos destes tratamentos, destacando a porcentagem de queda dos mesmos em relação aos animais que não receberam os agentes antineoplásicos.



**Figura 23.** Contagem de leucócitos em animais tratados nos dias 1, 3 e 5: (■) Ptx 3,75/et 2,5; (■) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (□) VR. \*\*\* = VR vs Grupos tratados ( $p < 0,001$ ); ♦♦ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); e ♦ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 24.** Contagem de leucócitos em animais tratados nos dias 1, 4 e 9: (■) Ptx 3,75/et 2,5; (■) LDE-olptx 15/LDE-olet 10; (□) VR. \*\*\* = VR vs Grupos tratados ( $p < 0,001$ ); ◆◆◆ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ◆◆ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); e ◆ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados demonstram aumento da leucopenia dos grupos tratados nos dias 1, 3 e 5, do início do tratamento, em relação aos grupos tratados nos dias 1, 4 e 9, cujo intervalo entre as administrações de quimioterapia foi maior. O momento crítico ocorreu após a segunda dose de quimioterapia nos grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (1º/3º/5º) e Ptx 3,75/et 2,5 (1º/3º/5º), que apresentaram respectivamente 63% e 86% de queda do número de células brancas, em relação ao valor de referência (Figura 23).

Em comparação ao valor de referência, observou-se redução na leucometria de todos os grupos. Porém, os grupos que receberam a combinação LDE-fármacos demonstraram menor redução do número de leucócitos do que nos tratamentos com os quimioterápicos comerciais.

### **5.3.2 Contagem diferencial dos leucócitos**

A contagem do diferencial de leucócitos foi realizada sempre um dia após a administração da quimioterapia e representa, em valor percentual, a quantidade das diferentes linhagens de células leucocitárias presentes no sangue periférico. Também podem ser observados aspectos relacionados às células da linhagem eritrocitária e megacariocítica.

Da mesma forma que no item 5.3.1, foi estudada a resposta hematológica à quimioterapia combinada de maior dose LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/kg e LDE-oleato de etoposídeo 10 mg/kg, e de menor dose paclitaxel 3,75 mg/kg e etoposídeo 2,5 mg/kg .

Os resultados não demonstram alterações nos parâmetros analisados e estão representados nos Apêndices A, B e C.

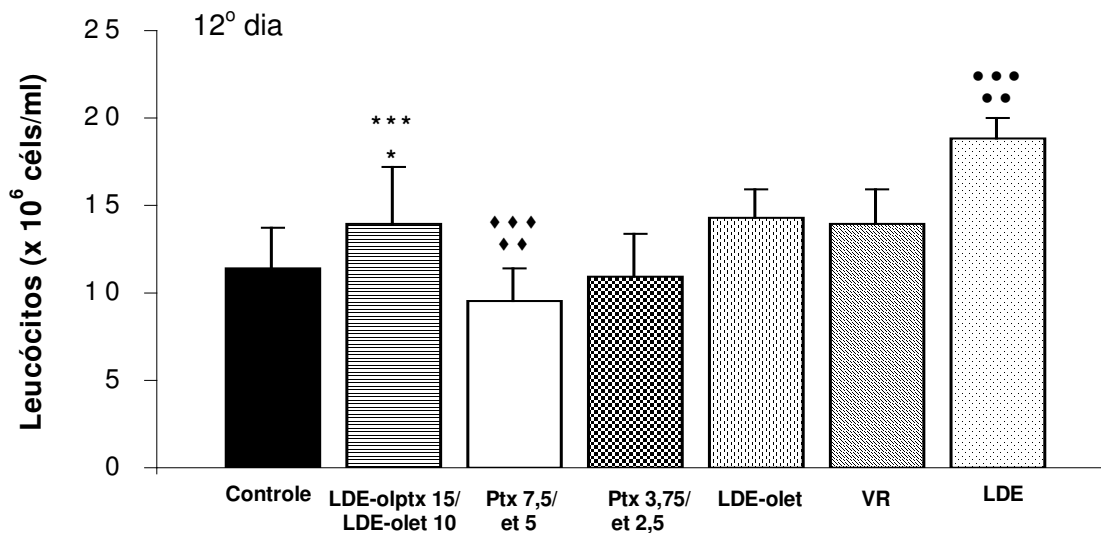


### 5.3.3 Número de leucócitos em animais portadores de melanoma B16F10

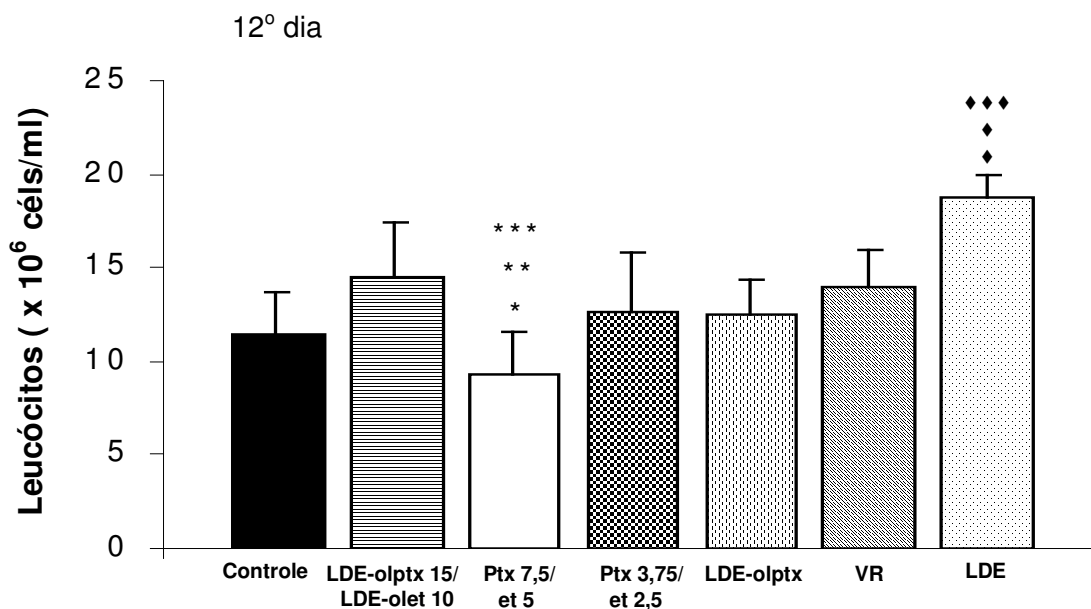
Um dia após administração da quimioterapia em animais portadores de tumor amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo venoso retroorbital dos camundongos.

Após o fim do tratamento os parâmetros hematológicos também foram avaliados no 27º e 33º dia após o início do experimento para o acompanhamento do perfil hematológico dos camundongos pós-quimioterapia.

Após a primeira dose de quimioterapia, os grupos que receberam a combinação de formulações comerciais tiveram suas contagens reduzidas em relação ao controle e valor de referência, diferentemente dos grupos LDE-fármacos. Os grupos que receberam monoquimioterapia (LDE-olptx e LDE-oletop) mantiveram-se dentro da normalidade (Figuras 25 e 26). O grupo tratado apenas com a LDE não apresentou diferença em relação ao valor de referência ( $p > 0,05$ ).

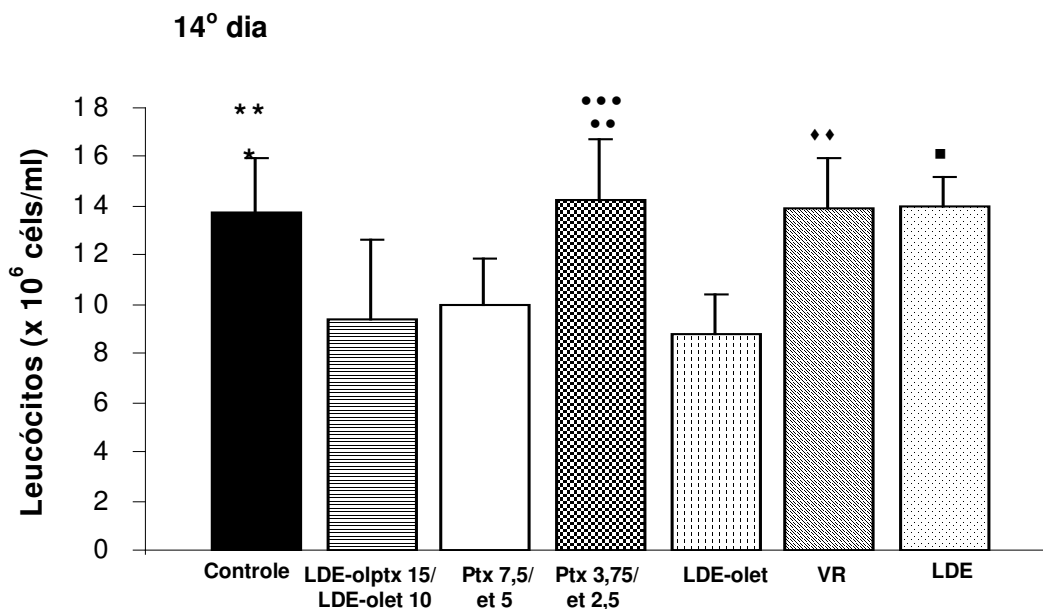


**Figura 25.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); \* = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ); ◆◆◆ = Ptx 7,5/et 5 vs VR ( $p < 0,001$ ); ◆◆ = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olet ( $p < 0,01$ ); ●●● = LDE vs Controle, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5 e Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ●● = LDE vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ).

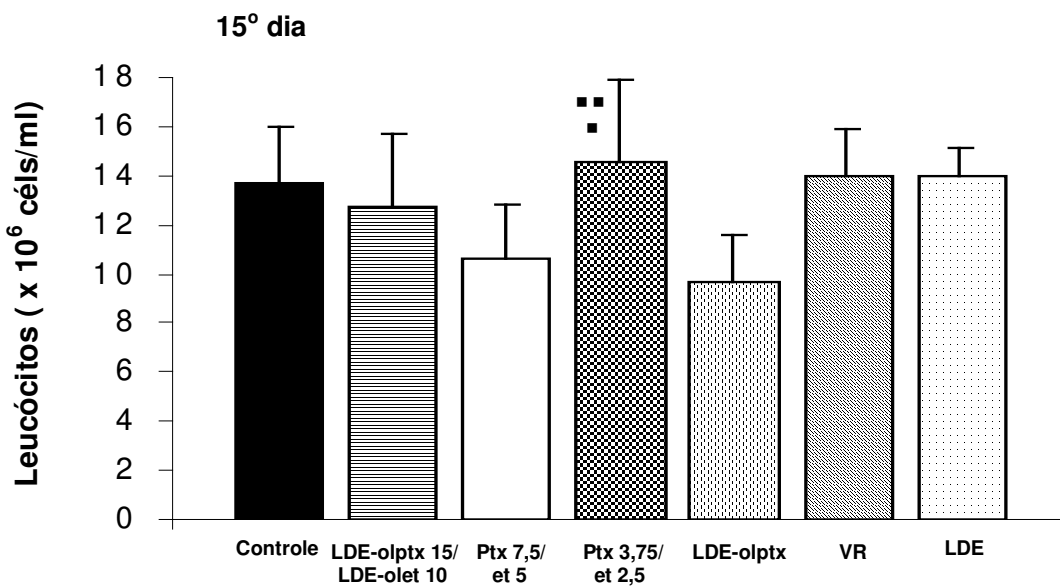


**Figura 26.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias **11, 14 e 19**. \*\*\* = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); \*\* = Ptx 7,5/et 5 vs VR ( $p < 0,01$ ); \* = Ptx 7,5/et 5 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ); ♦♦♦ = LDE vs Controle, Ptx 7,5/et 5 e Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ♦♦ = LDE vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ ); ♦ = LDE vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e VR ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Após a segunda dose de quimioterapia (Figuras 27 e 28), todos os grupos apresentaram queda na leucometria em relação aos valores de referência e ao grupo controle, exceto o grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>). Na figura 28 nota-se que o grupo LDE-oleato de paclitaxel não se diferenciou dos valores de referência e do grupo controle. Da mesma forma, o grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), manteve-se dentro da normalidade.

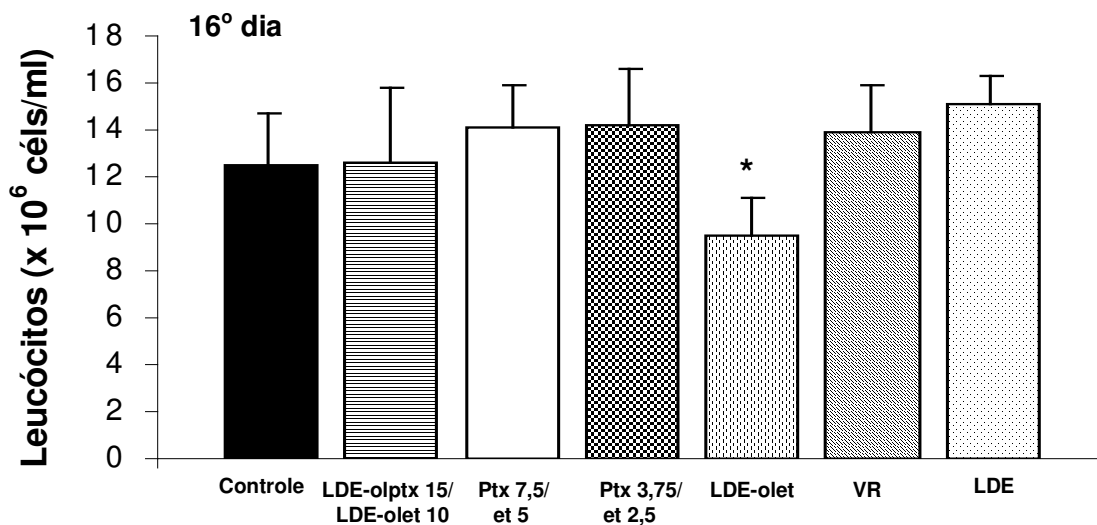


**Figura 27.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\* = Controle vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ); \* = Controle vs LDE-olet ( $p < 0,05$ ); ••• = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); •• = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olet ( $p < 0,01$ ); ♦♦ = VR vs LDE-olptx 15/LDE-olet 1, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,01$ ); ■ = LDE vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,05$ ).

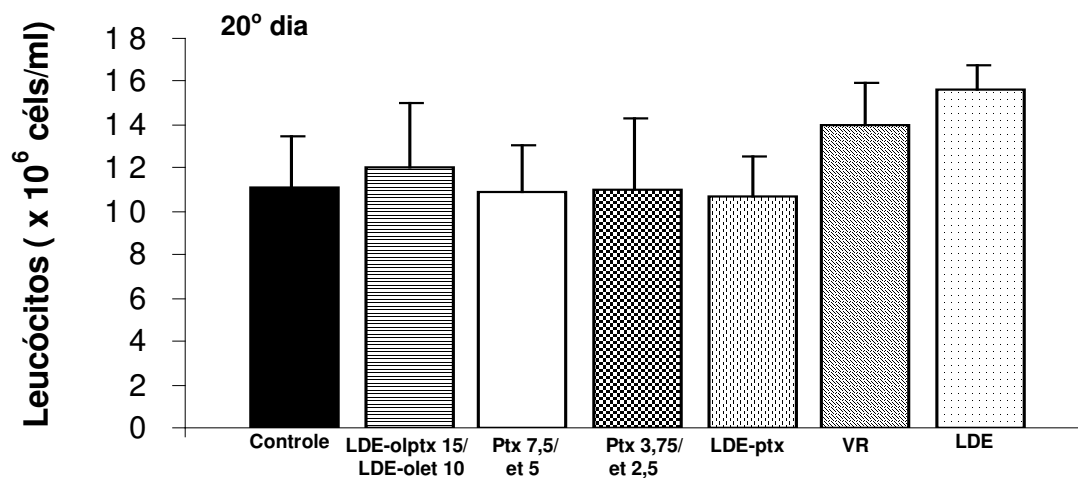


**Figura 28.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. ■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); ■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Na terceira dose de quimioterapia (Figuras 29 e 30), todos os grupos mantiveram valores próximos aos valores de referência.

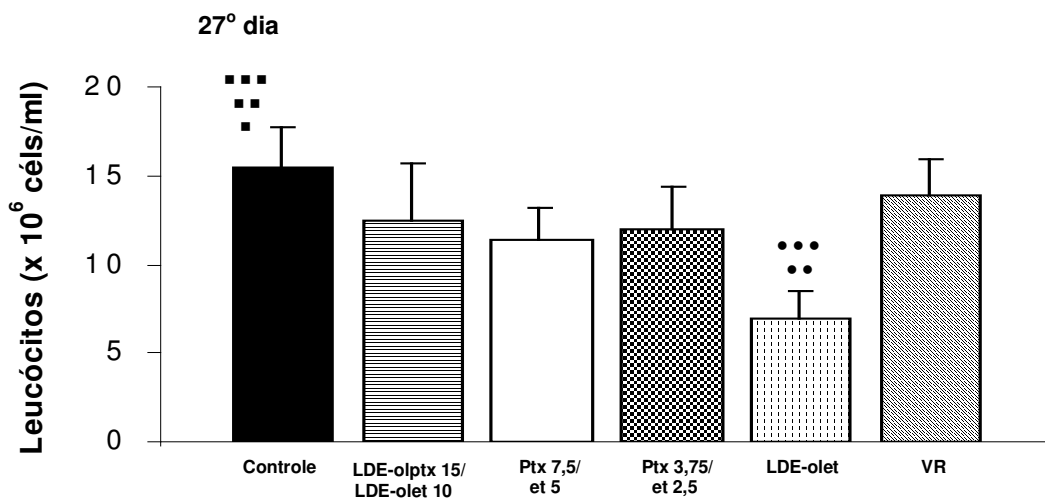


**Figura 29.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \* = LDE-olet vs Ptx 7,5/et 5, Ptx 3,75/et 2,5 e VR ( $p < 0,05$ ).

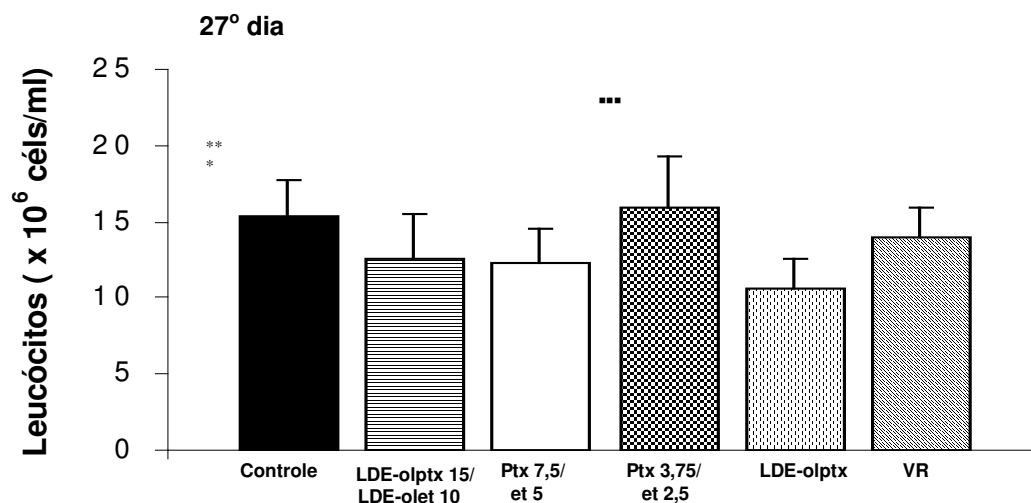


**Figura 30.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

O 27º dia de experimento está representado nas figuras 31 e 32, é nítido que ocorre um aumento da leucometria do grupo controle. Nesta data também se destaca uma redução leucocitária no grupo LDE-oleato de etoposídeo.

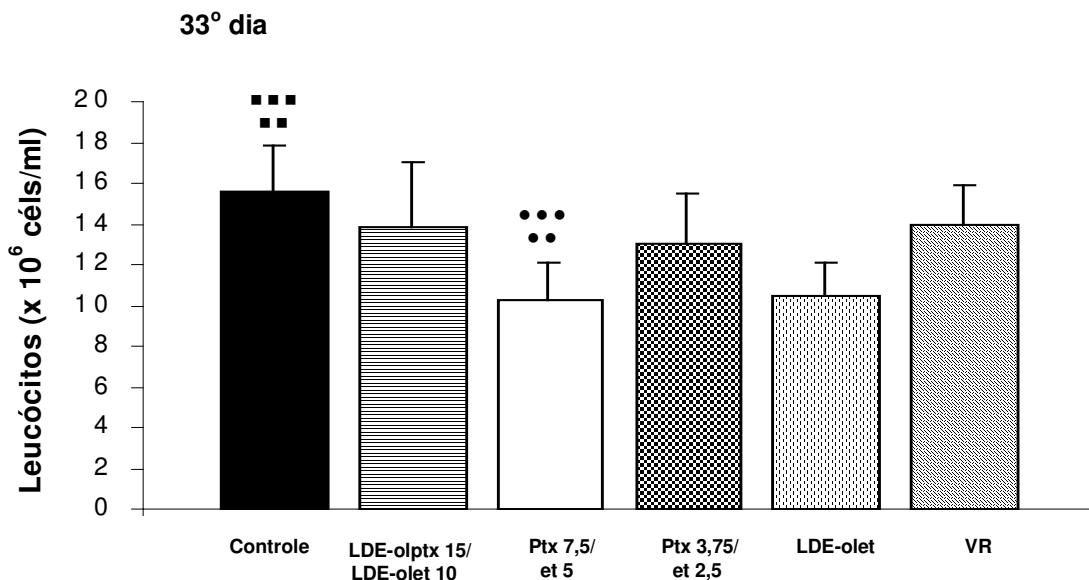


**Figura 31.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. ■■■ = Controle vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,001$ ); ■■ = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); ■ = Controle vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ); ●●● = LDE-olet vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e VR ( $p < 0,001$ ); ●● = LDE-olet vs Ptx 7,5/et 5 e Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ).

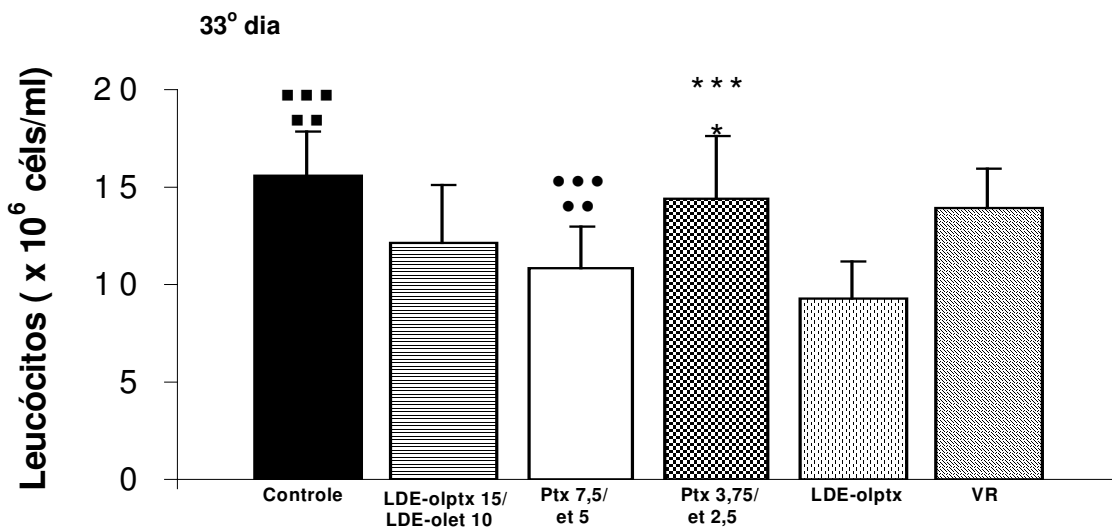


**Figura 32.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. ♦♦ = Controle vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,01$ ); ♦ = Controle vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,05$ ); ■■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

No 33º dia (Figuras 33 e 34) os grupos Ptx 7,5/et 5 (11º/13º/15º) e Ptx 7,5/et 5 (11º/14º/19º) apresentaram redução dos seus valores quando comparados aos demais grupos. No grupo LDE-oleato de etoposídeo ocorre o retorno à normalidade.



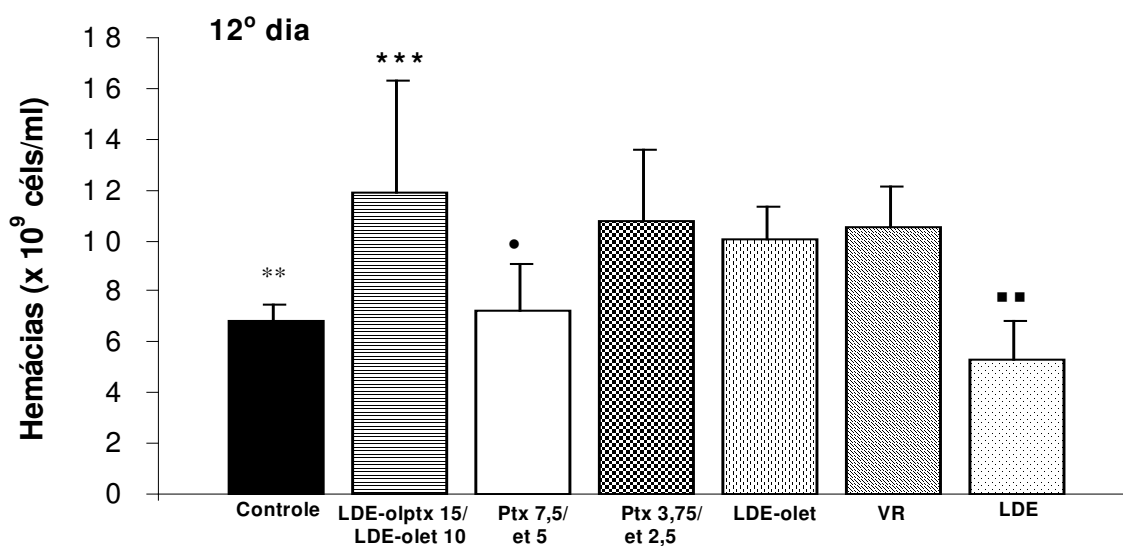
**Figura 33.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. ■■■ = Controle vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); ■■ = Controle vs LDE-olet ( $p < 0,01$ ); ■●● = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); ●● = Ptx 7,5/et 5 vs VR ( $p < 0,01$ ); ● = Ptx 7,5/et 5 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ).



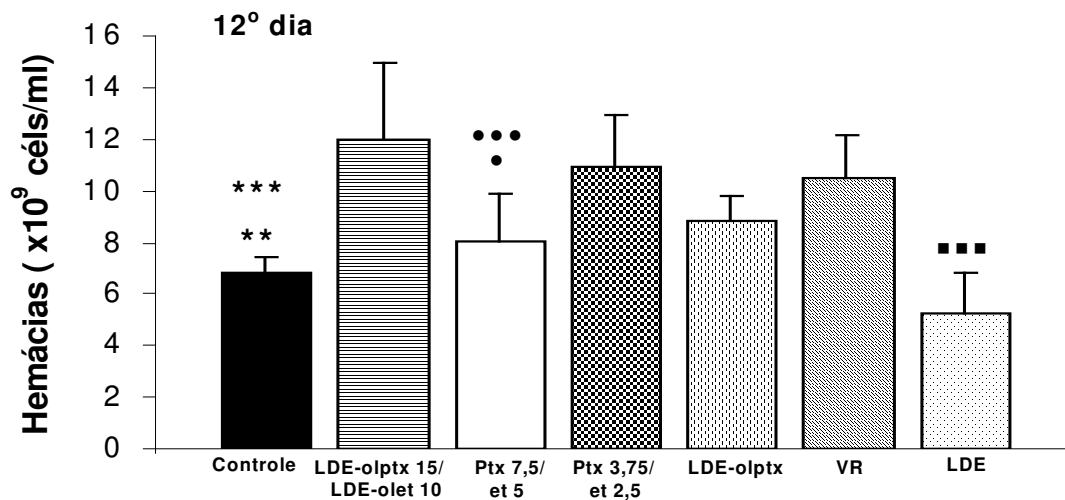
**Figura 34.** Leucometria de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. ■■■ = Controle vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); ■■ = Controle vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ); ■●● = Ptx 7,5/et 5 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ●● = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olptx, VR e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ); \*\*\* = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); \* = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.3.4 Número de hemácias em animais portadores de melanoma B16F10

Após a primeira dose de quimioterapia os grupos LDE-fármacos não apresentaram alterações em relação ao controle e valor de referência (Figuras 35 e 36), diferente dos grupos Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), e Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>). Nestes dois grupos houve redução na contagem de hemácias, o que não aconteceu com as combinações Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) e Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>).



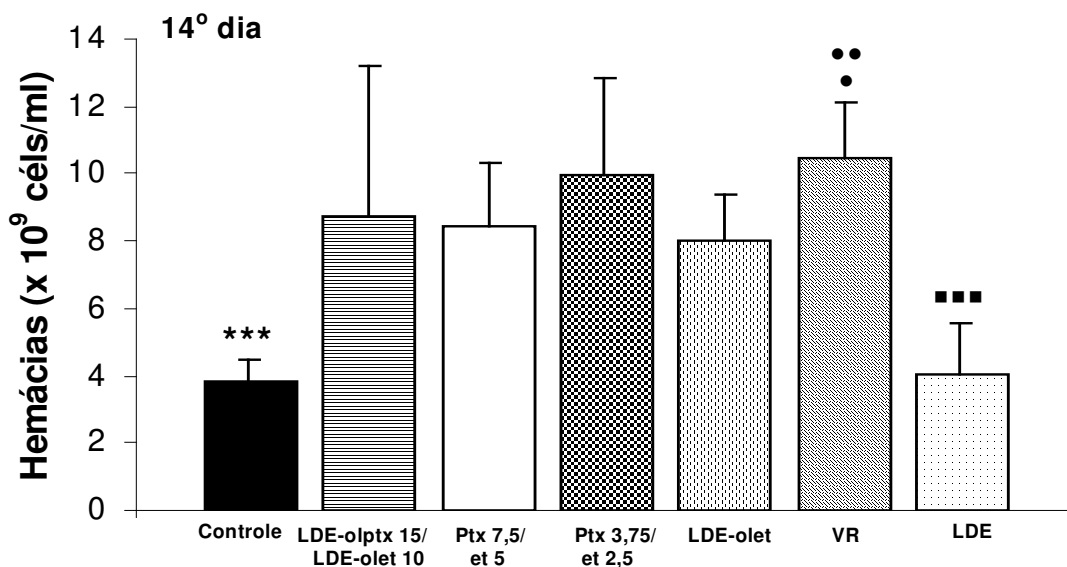
**Figura 35.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Controle, Ptx 7,5/et 5 e LDE ( $p < 0,001$ ); \*\* = Controle vs VR ( $p < 0,01$ ); • = Ptx 7,5/et 5 vs Ptx 3,75/et 2,5 e VR ( $p < 0,05$ ); ■■ = LDE vs Ptx 3,75/et 2,5 e VR ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



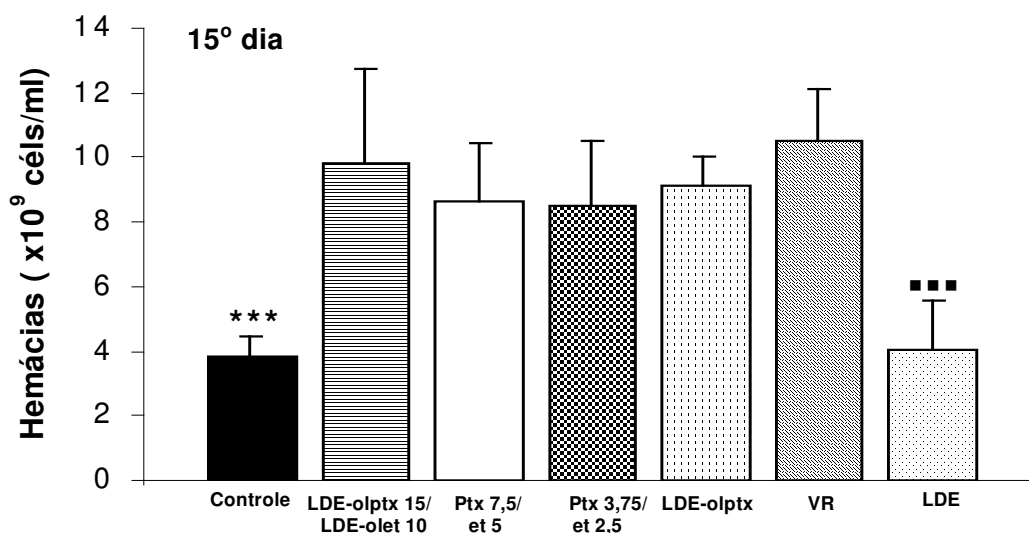
**Figura 36.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); \*\* = Controle vs VR ( $p < 0,01$ ); ••• = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); • = Ptx 7,5/et 5 vs Ptx 3,75/et 2,5 e VR ( $p < 0,05$ ); \*\*\*\* = LDE vs Ptx 3,75/et 2,5, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e VR ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

As figuras 35 e 36 mostram que tanto o grupo controle, quanto o grupo LDE tiveram suas contagens de hemácias reduzidas em relação ao valor de referência. Este efeito foi intensificado na segunda avaliação dos hemogramas (Figuras 37 e 38).



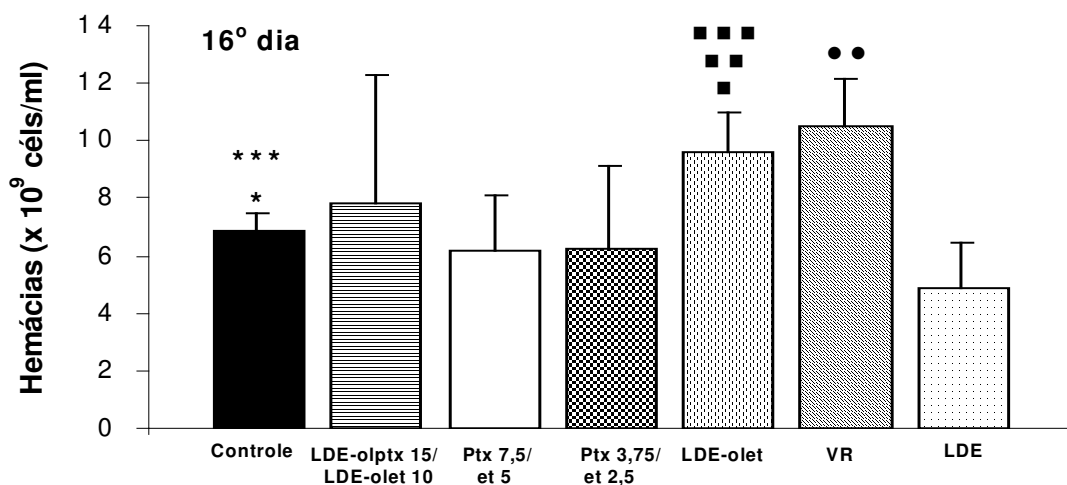


**Figura 37.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ); •• = VR vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); • = VR vs LDE-olet e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,05$ ); ■■■ = LDE vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ).

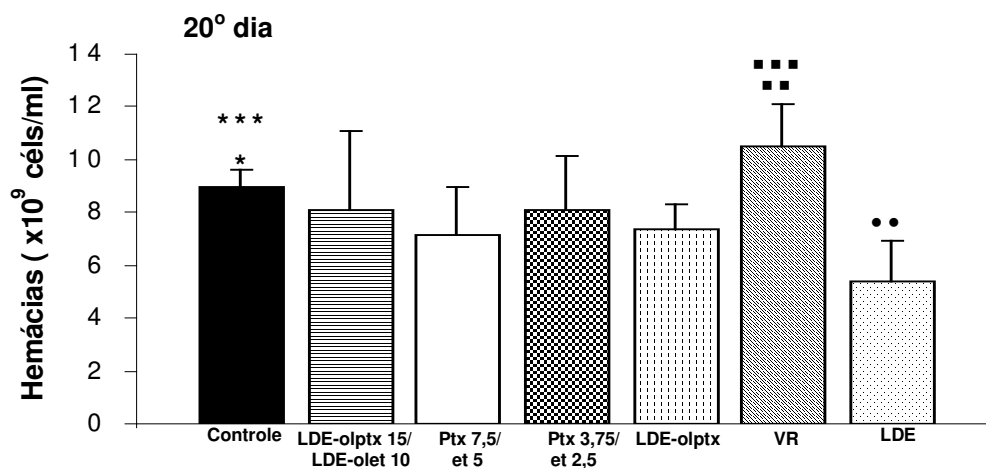


**Figura 38.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ); ■■■ = LDE vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

A partir do 16º dia de experimento o número de hemácias do grupo controle e LDE voltam a subir continuamente (Figuras 39 e 40). Os grupos tratados nos dias 11, 13 e 15 (Figura 39) mostraram redução do número de hemácias, e o grupo Ptx 7,5/et 5 (11º/13º/15º) teve a maior queda deste parâmetro. Os tratamentos representados na figura 40 mantiveram-se abaixo do valor de referência.

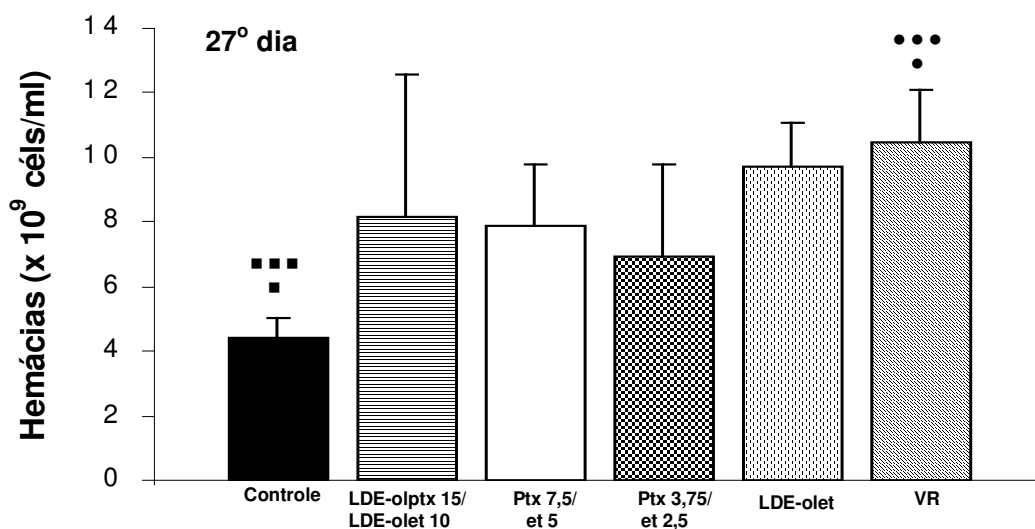


**Figura 39.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs VR, Ptx 3,75/et 2,5 e LDE ( $p < 0,001$ ); \* = Controle vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,05$ ); ■■■ = LDE vs LDE-olet ( $p < 0,001$ ); ■■ = LDE vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); ■ = LDE vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,05$ ); ● = VR vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

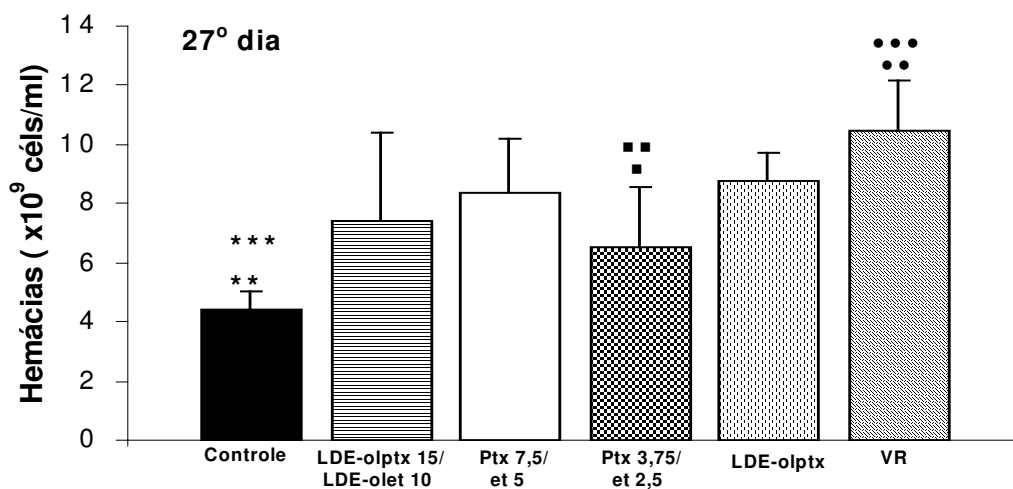


**Figura 40.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs LDE ( $p < 0,001$ ); \* = Controle vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,05$ ); ■■■ = VR vs Ptx 7,5/et 5 e LDE ( $p < 0,001$ ); ■■ = VR vs Ptx 3,75/et 2,5, LDE-olptx e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ); ■ = VR vs Ptx 3,75/et 2,5, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

O número de hemácias no 27º dia de experimento está representado nas figuras 41 e 42, e mostra que o grupo controle apresentou maior grau de anemia comparado com todos os outros grupos, com uma taxa de redução de 58 % em relação ao valor de referência. Nos demais grupos a redução foi menor, destacando-se principalmente o grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11º/14º/19º) (Figura 42), que teve redução de 38 % em relação ao valor de referência.

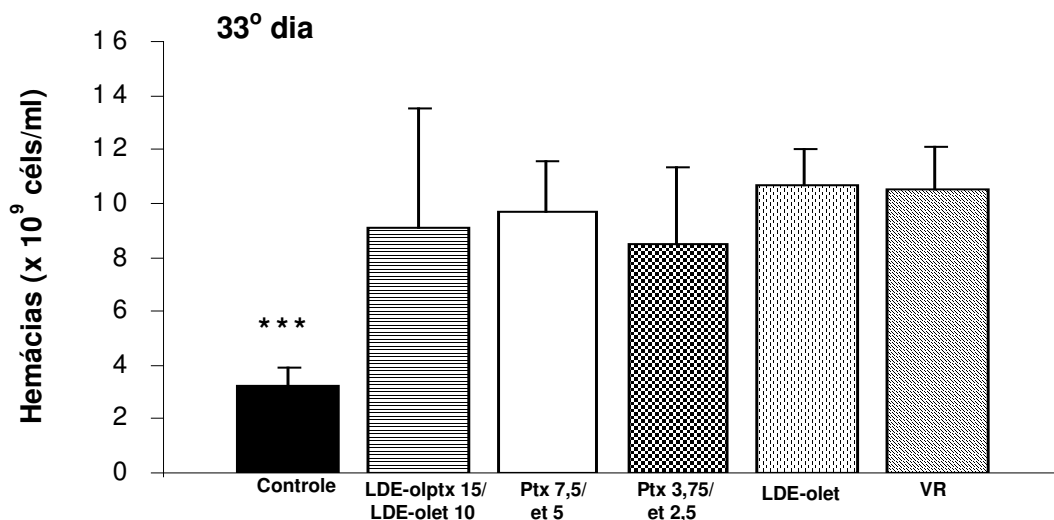


**Figura 41.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. ■■■ = Controle vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,001$ ); ■ = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); ●●● = VR vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ● = VR vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

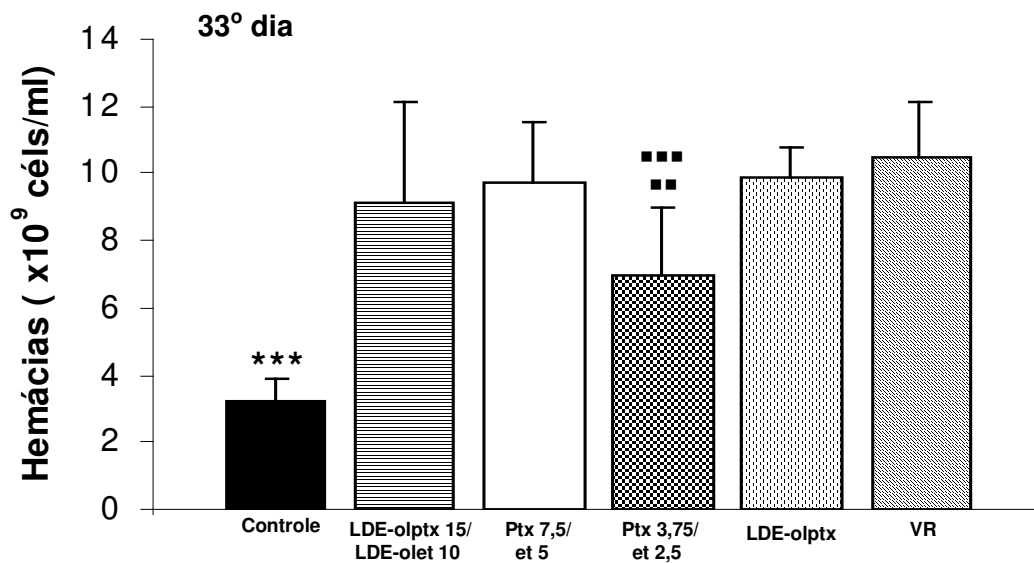


**Figura 42.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); \*\* = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); ■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); ■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ ); ●●● = VR vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ●● = VR vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

No último dia de análise, representado nas figuras 43 e 44, o grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) (Figura 44) manteve redução em relação ao valor de referência em torno de 33 %. O grupo controle apresentou acentuada anemia comparada com todos os outros grupos, com uma taxa de redução de 69 % em relação ao valor de referência.



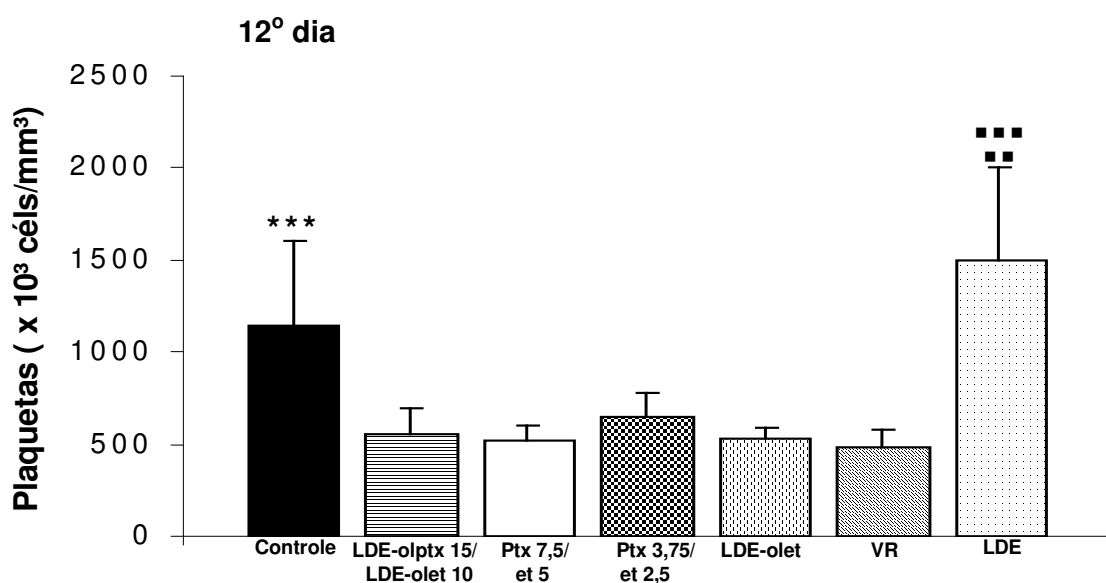
**Figura 43.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



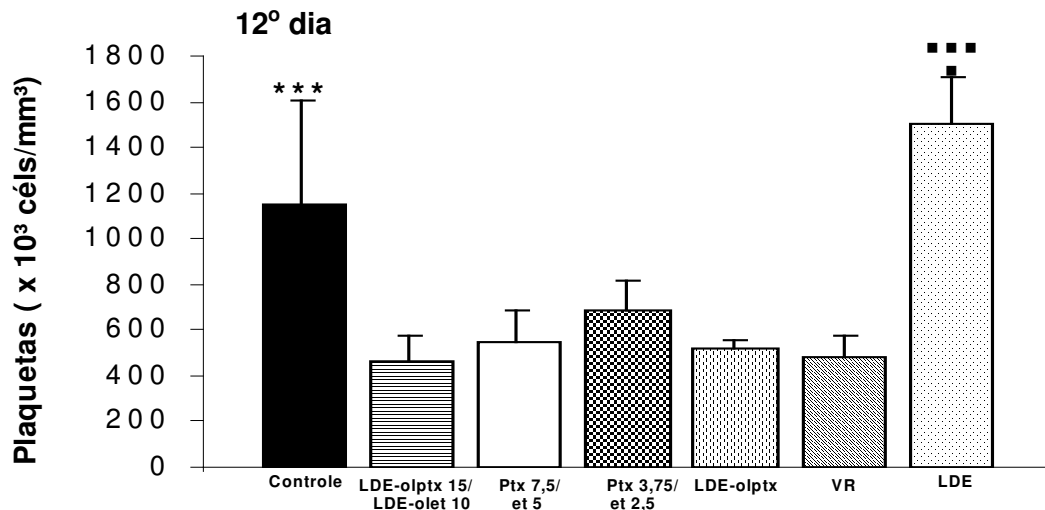
**Figura 44.** Hemácias de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ); ■■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); ■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.3.5 Número de plaquetas em animais portadores de melanoma B16F10

Já na primeira coleta, após o primeiro dia de tratamento, são nítidas as alterações no número de plaquetas dos grupos que não receberam quimioterapia (controle e LDE) (Figuras 45 e 46). Estes grupos apresentaram surpreendentes elevações de 137 % para o grupo controle e 210 % para o grupo LDE comparando-se com o valor de referência.

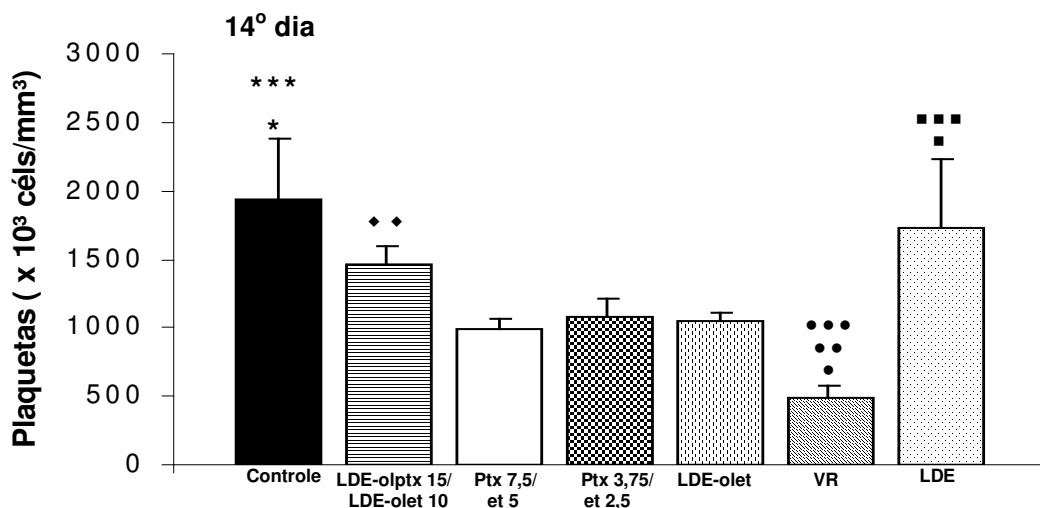


**Figura 45.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 3,75/et 2,5, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,001$ ); ■ = LDE vs Controle ( $p < 0,01$ ); ■■■ = LDE vs Demais grupos  $p < 0,001$ . Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

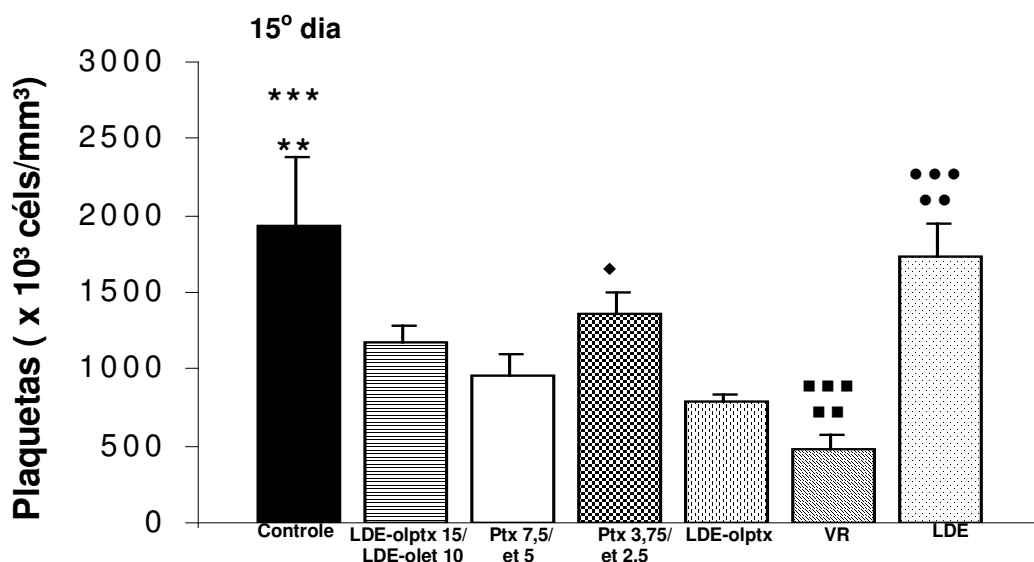


**Figura 46.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 3,75/et 2,5, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); ■ = LDE vs Controle ( $p < 0,05$ ); ■■■ = LDE vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Na segunda observação (Figuras 47 e 48) os valores do controle e LDE continuaram a aumentar, com uma taxa de crescimento de 68 % e 15 % em relação à medida anterior.



**Figura 47.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs VR, Ptx 3,75/et 2,5, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet ( $p < 0,001$ ); \* = Controle vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,05$ ); ◆◆◆ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs VR ( $p < 0,001$ ); ◆◆ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); ●●● = VR vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ●● = VR vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); ● = VR vs LDE-olet ( $p < 0,05$ ); ■■■ = LDE vs VR, e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); ■ = LDE vs Ptx 3,75/et 2,5 e LDE-olet ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

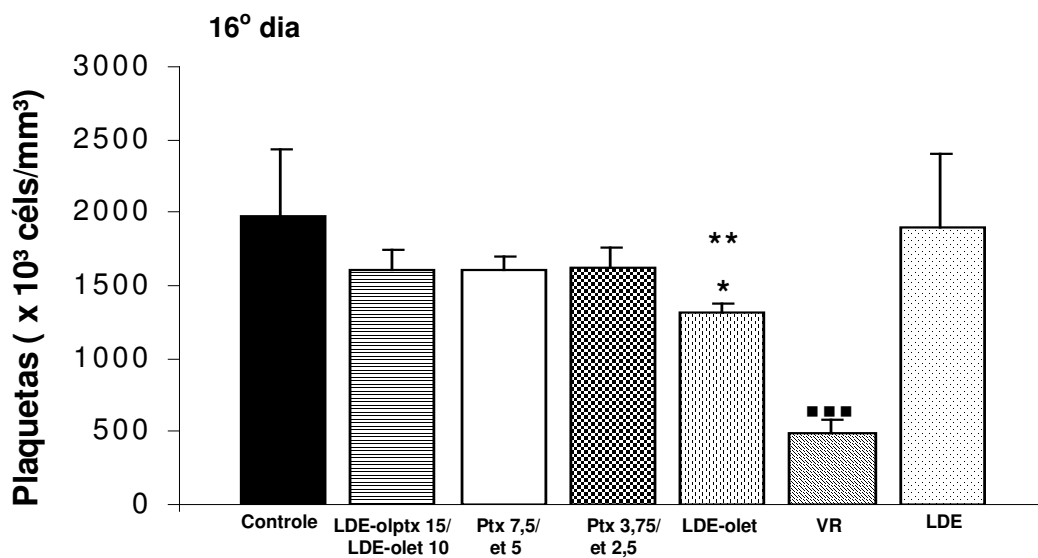


**Figura 48.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs VR, Ptx 7,5/et 5, LDE-olptx e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); \*\* = Controle vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,01$ ); ♦ = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,05$ ); ■■■ = VR vs Ptx 3,75/et 2,5 e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,001$ ); ■■ = VR vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); ●● = LDE vs VR, Ptx 7,5/et 5 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); ● = LDE vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,01$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

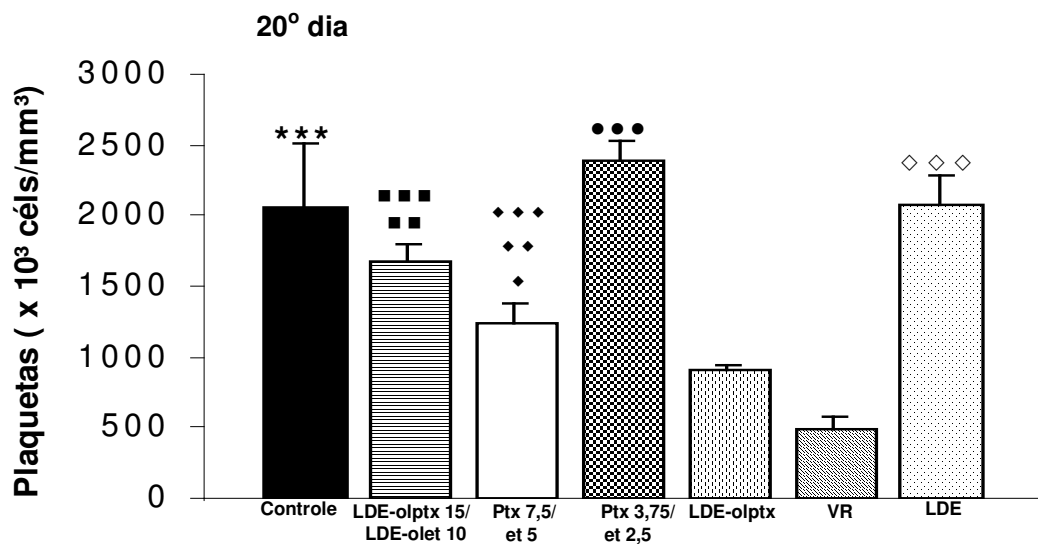
Após a segunda dose de quimioterapia, todos os grupos apresentaram aumento do número de plaquetas em relação ao valor de referência, destacando-se o grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) representado na figura 47, e o grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>), na figura 48. O único grupo que se manteve dentro dos valores de referência foi o LDE-oleato de paclitaxel.

O aumento dos valores plaquetários manteve-se na terceira data de observação, conforme ilustrado pelos gráficos das figuras 49 e 50. Com exceção do grupo LDE-olet, os demais grupos tratados nos dias 11, 13 e 15 (Figura 49) tiveram suas contagens aproximadas aos elevados valores do grupo controle e LDE. Na figura 50 pode-se observar fenômeno semelhante, sendo que o grupo Ptx 7,5/et 5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) teve o menor aumento. O grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/14<sup>o</sup>/19<sup>o</sup>) teve o maior aumento na contagem de plaquetas, chegando a um valor cerca de cinco vezes superior ao valor de referência.



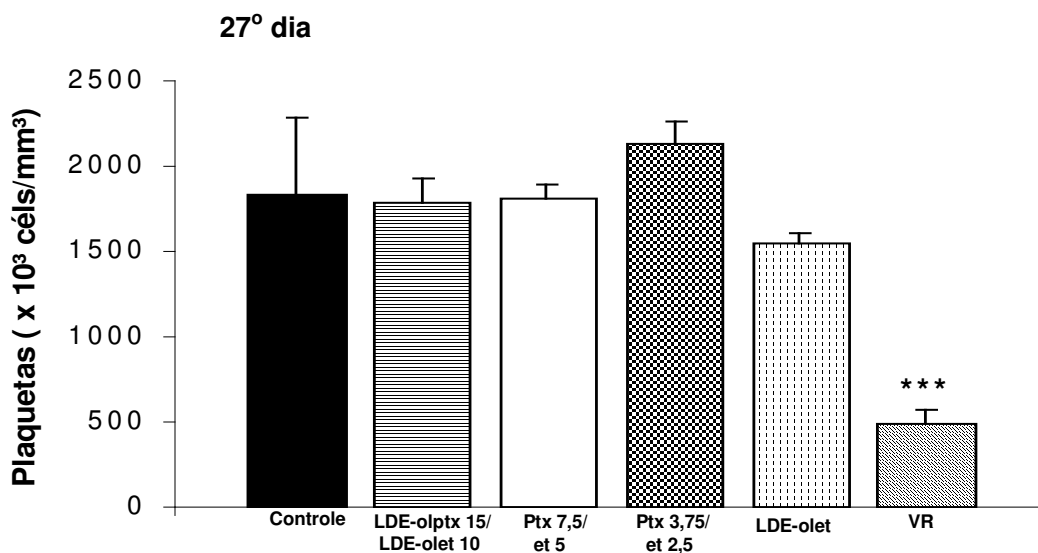


**Figura 49.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias **11, 13 e 15**. \*\* = LDE-olet vs Controle ( $p < 0,01$ ); \* = LDE-olet vs LDE ( $p < 0,05$ ); ■■■ = VR vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

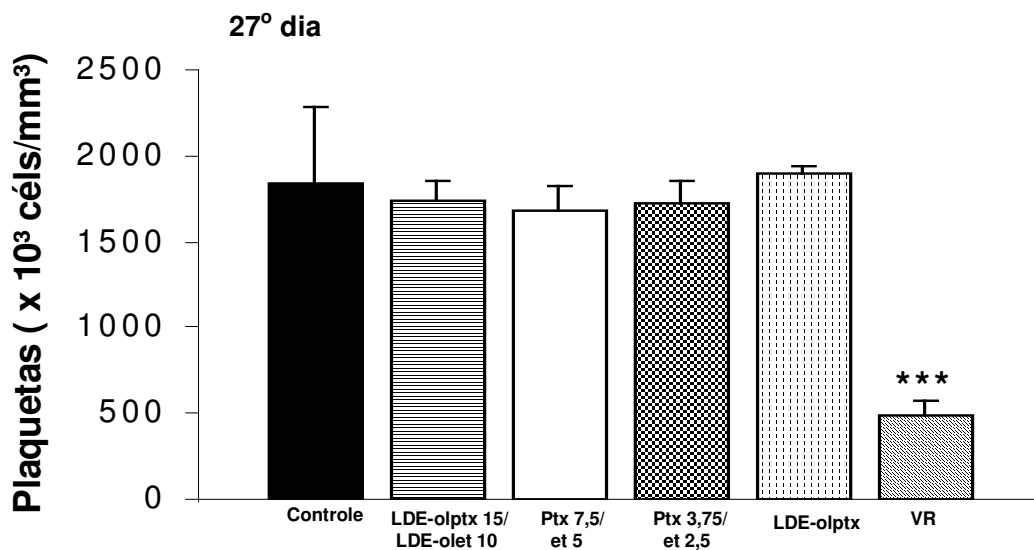


**Figura 50.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias **11, 14 e 19**. \*\*\* = Controle vs VR, LDE-olptx e Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,001$ ); ■■■ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs VR ( $p < 0,001$ ); ■■ = LDE-olptx 15/LDE-olet 10 vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ ); ◆◆◆ = Ptx 7,5/et 5 vs VR ( $p < 0,001$ ); ◆◆ = Ptx 7,5/et 5 vs LDE ( $p < 0,01$ ); ◆ = Ptx 7,5/et 5 vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,05$ ); ●●● = Ptx 3,75/et 2,5 vs VR, Ptx 7,5/et 5, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); ◇◇◇ = LDE vs VR e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

No 27º dia de experimento todos os animais do grupo LDE já haviam morrido (Figuras 51 e 52). Os gráficos destas figuras mostram que todos os grupos apresentavam trombocitose intensa, com valores que variaram aproximadamente de três a cinco vezes o valor de referência.

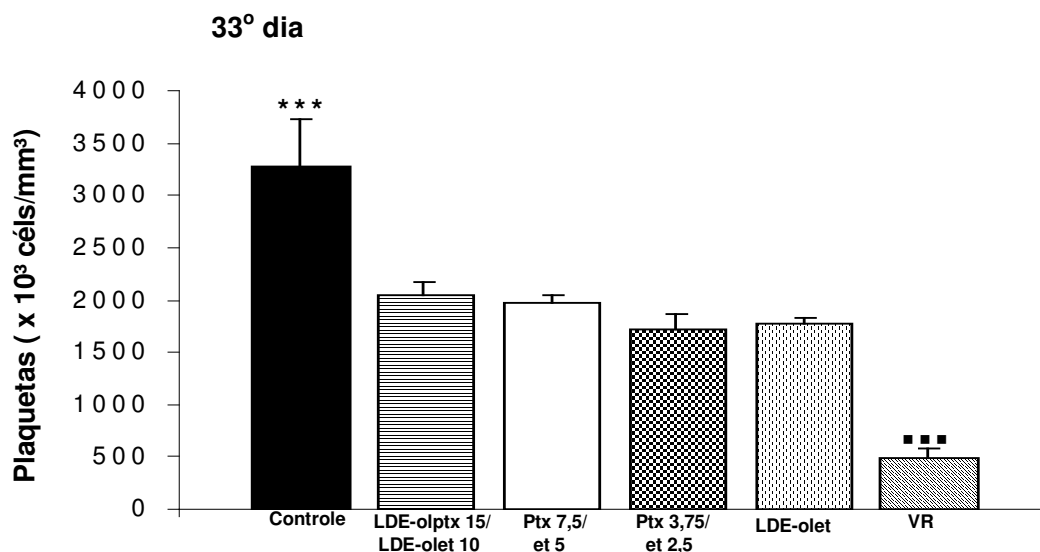


**Figura 51.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = VR vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

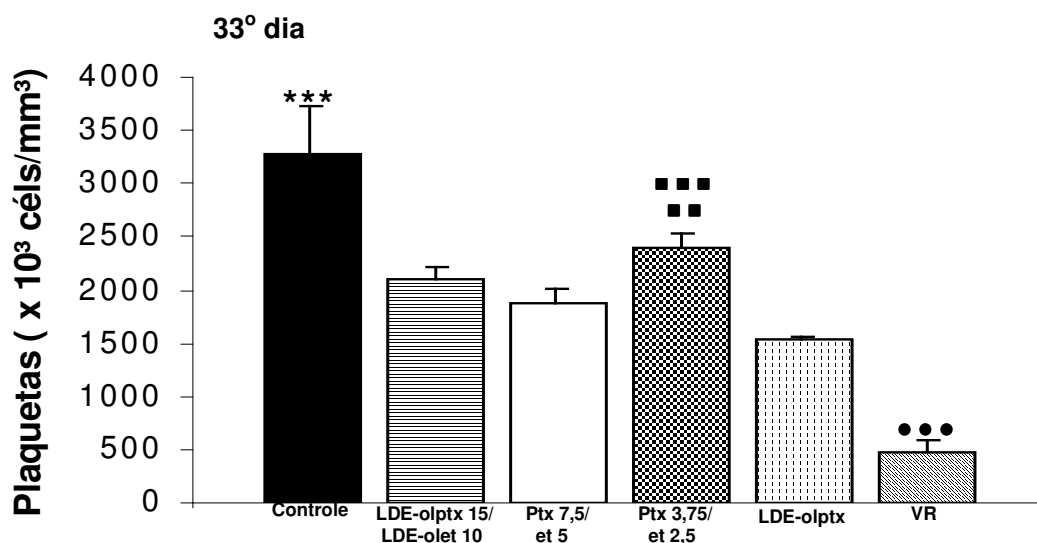


**Figura 52.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = VR vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

No último dia de análise, todos os grupos mantiveram trombocitose (Figuras 53 e 54), principalmente o grupo controle e o grupo Ptx 3,75/et 2,5 ( $11^{\circ}/14^{\circ}/19^{\circ}$ ), com valores sete e cinco vezes superiores ao valor de referência, respectivamente (Figura 54).



**Figura 53.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ); ■■■ = VR vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 54.** Plaquetas de animais portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19. \*\*\* = Controle vs Demais grupos ( $p < 0,001$ ); ■■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs LDE-olptx ( $p < 0,001$ ); ■■ = Ptx 3,75/et 2,5 vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ). ●●● = VR vs Ptx 3,75/et 2,5, Ptx 7,5/et 5, LDE-olptx 15/LDE-olet 10 e LDE-olptx ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

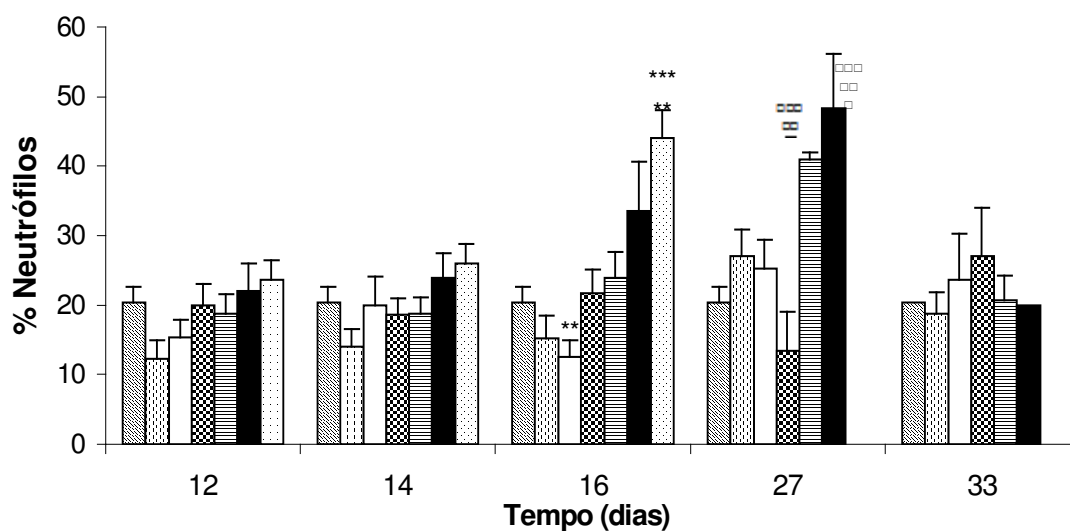
### **5.3.6 Contagem diferencial dos leucócitos em animais portadores de melanoma B16F10**

A contagem do diferencial de leucócitos presentes no sangue periférico foi realizada sempre um dia após a administração da quimioterapia e representa em valor percentual, a quantidade das diferentes linhagens de células leucocitárias presentes no sangue periférico. O ensaio também permitiu a observação de alterações em outros elementos do sangue, como aspectos relacionados às células da linhagem eritrocitária e megacariótica.

Da mesma forma que nos itens 5.3.3, 5.3.4 e 5.3.5, após o fim do tratamento os parâmetros hematológicos também foram avaliados no 27<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dias após o início do experimento para o acompanhamento do perfil hematológico dos camundongos pós-quimioterapia.

Os resultados na íntegra estão representados seqüencialmente nos Apêndices D a H. Da mesma forma, os Apêndices I a N mostram os resultados referentes a três tipos de alterações e estruturas encontradas no decorrer do experimento (monócitos vacuolizados, manchas de Gumprecht e policromasia).

Foram encontradas alterações nos neutrófilos após a segunda dose de quimioterapia como demonstrado nas figuras 55 e 56. Em ambos os casos, os neutrófilos dos grupos controle e LDE encontravam-se elevados em relação ao valor de referência. No grupo LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) também ocorreu aumento no número de neutrófilos no 27<sup>o</sup> dia de experimento (Figura 55).



**Figura 55. Neutrófilos em camundongos portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15:**

▨ Valor de referência

▩ LDE-olet;

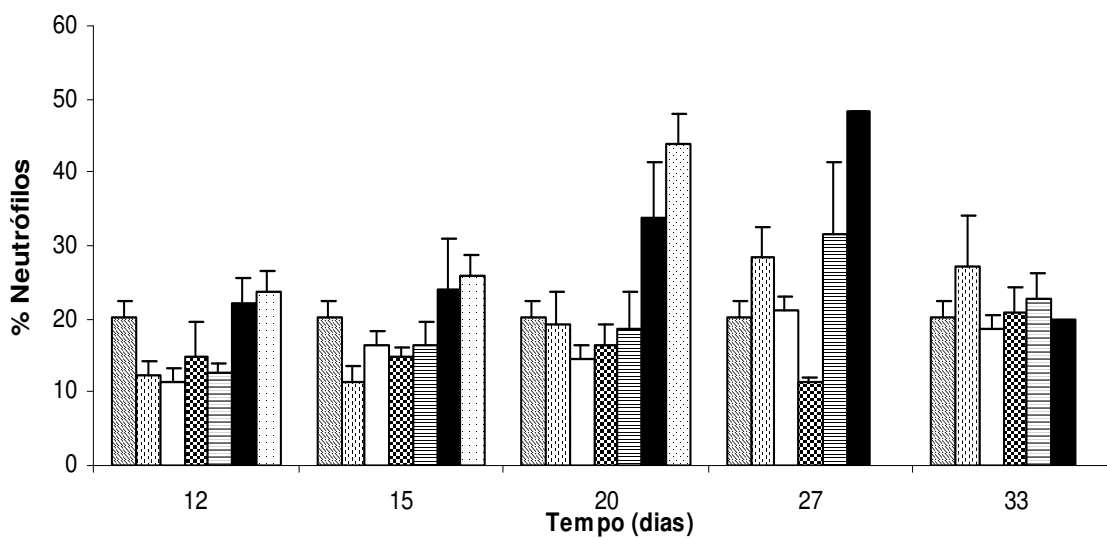
□ Ptx 7,5/et 5 \*\* vs LDE (p<0,01)

▤ Ptx 3,75/et 2,5

▧ LDE-olptx 15/LDE-olet 10 □□ vs Ptx 3,75/et 2,5 (p<0,001); □□ vs VR(p<0,01)

■ Controle □□ vs VR, Ptx 3,75/et 2,5 (p<0,001); □□ vs Ptx 7,5/et 5 (p<0,01); □ vs VR, LDE-olet (p<0,05)

▩ LDE = \*\*\* vs VR, LDE-olet, Ptx 3,75/et 2,5 (p<0,001); \*\* vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (p<0,01)



**Figura 56.** Neutrófilos em camundongos portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19:

▨ Valor de referência

▩ LDE-olptx

□ Ptx 7,5/et 5 \* vs controle ( $p < 0,05$ )

▤ Ptx 3,75/et 2,5

▨ LDE-olptx 15/LDE-olet 10

■ Controle \*\* vs Ptx 7,5/et 5 ( $p < 0,01$ ); \* vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,05$ )

▩ LDE ■■■ vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5, Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ■■ vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ )

No caso dos linfócitos, ocorreu aumento dos valores do grupo Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) e redução nos grupos controle e LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>), no 27<sup>o</sup> dia de experimento (Figura 57). No entanto, os valores encontrados não se encontram fora da normalidade para estes animais. Na figura 58 o grupo LDE mostrou queda no 20<sup>o</sup> dia de experimento. O grupo controle também mostrou queda nos dias 20 e 27.

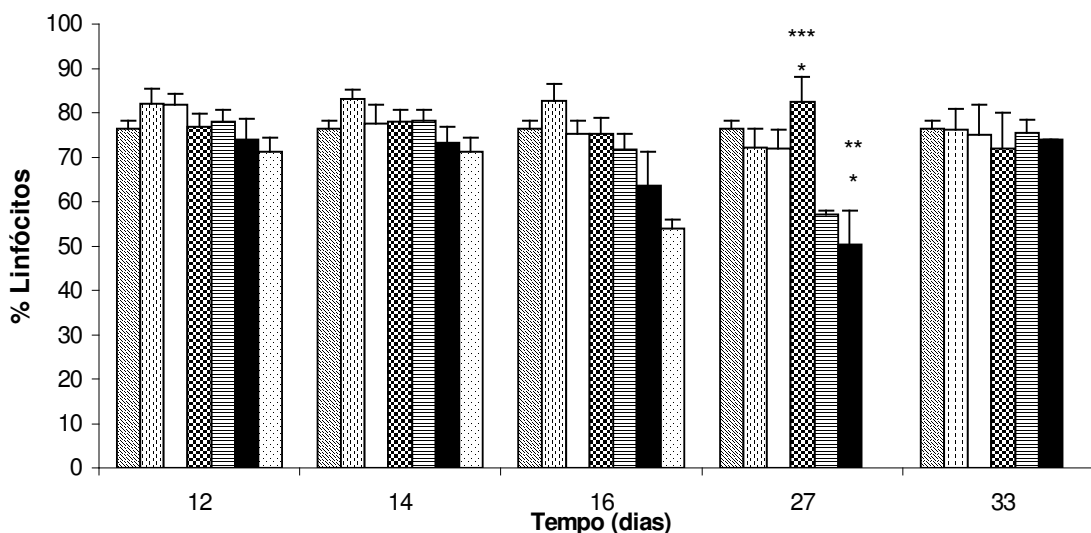


Figura 57. Linfócitos em camundongos portadores de tumor tratados nos dias 11, 13 e 15:

■ Valor de referência

▨ LDE-olet

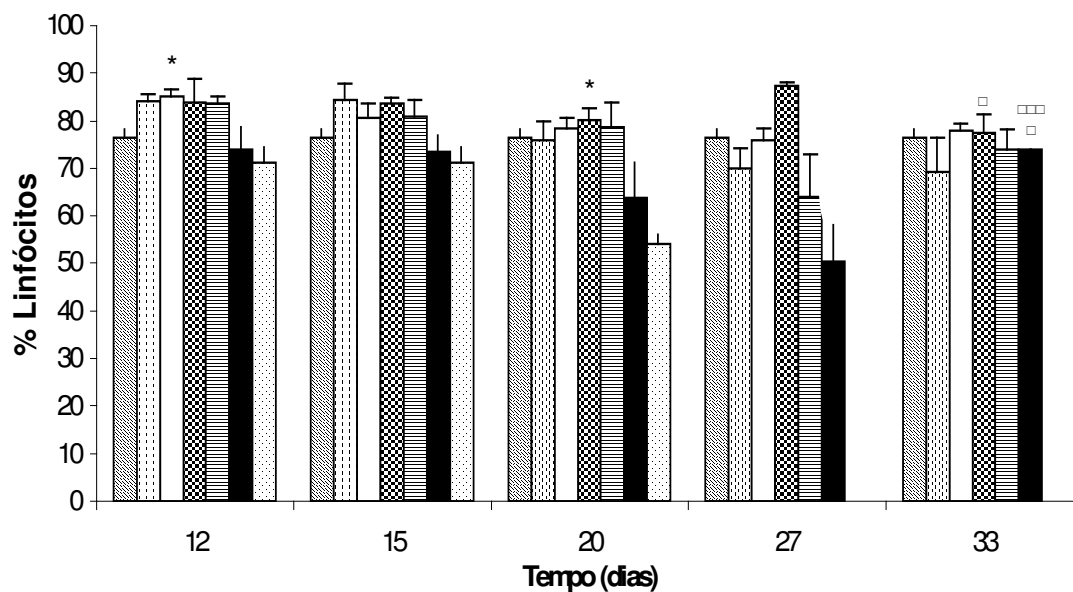
□ Ptx 7,5/et 5

▩ Ptx 3,75/et 2,5 \*\*\* vs Controle (p<0,001); \* vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 (p<0,05)

▨ LDE-olptx 15/LDE-olet 10

■ Controle \*\* vs VR (p<0,01); \* vs Ptx 7,5/et 5 e LDE-olet (p<0,05);

▨ LDE



**Figura 58.** Linfócitos em camundongos portadores de tumor tratados nos dias 11, 14 e 19:

▨ Valor de referência

▩ LDE-olptx

□ Ptx 7,5/et 5 \* vs LDE ( $p < 0,05$ )

▩ Ptx 3,75/et 2,5 \* vs LDE ( $p < 0,05$ ); vs LDE-olptx 15/LDE-olet 10 ( $p < 0,05$ )

▨ LDE-olptx 15/LDE-olet 10

■ Controle □ vs Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); □ vs Ptx 7,5/et 5 e VR ( $p < 0,05$ )

▩ LDE ■ vs VR, LDE-olptx 15/LDE-olet 10, Ptx 7,5/et 5, Ptx 3,75/et 2,5 ( $p < 0,001$ ); ■ vs LDE-olptx ( $p < 0,01$ )



## 6 DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório, na tentativa de se aumentar o índice terapêutico, carmustina, paclitaxel e etoposídeo foram incorporados à LDE, o que foi de fato conseguido em animais de experimentação (MARANHÃO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; VALDUGA et al., 2003, TEIXEIRA et al., 2004). Nesses trabalhos, tanto a toxicidade quanto a inibição do crescimento tumoral e a sobrevivência dos animais foram melhorados quando se associou os quimioterápicos à LDE.

No presente estudo, abrimos caminho para o uso da LDE na quimioterapia combinada. A quimioterapia combinada é usada sistematicamente no tratamento do câncer, com frequência bem maior do que a monoquimioterapia. Nesta modalidade são associados os mecanismos de ação de cada um dos fármacos usados, propiciando um ataque mais efetivo à doença. Tendo em vista o alto grau de incapacitação e mortalidade das neoplasias malignas, é necessário procurar a maior efetividade terapêutica possível. A LDE, como foi documentado, reduz drasticamente os efeitos colaterais desses fármacos. Esses fatos nos levaram a testar o potencial de aplicação do sistema de nanopartículas na terapêutica combinada.

O quadro de toxicidade levou à diferença de doses do etoposídeo e do paclitaxel comercial comparados às preparações de associação com a LDE. No estudo piloto, mostramos claramente que a combinação das formas comerciais de paclitaxel, na dose de 15 mg/kg e de etoposídeo na dose de 10 mg/kg não era tolerável pelos animais, levando à morte de todos os animais antes do terceiro ciclo de tratamento. Pelo contrário, estes níveis de dose, nas combinações com a LDE eram perfeitamente toleráveis. Desta forma, julgamos pertinente usar níveis de dose diferentes para as preparações comerciais e as associadas à LDE. O fato de doses maiores serem usadas nas associações com a LDE está plenamente justificado tendo em vista a procura da melhor efetividade terapêutica.

Com os resultados da leucometria realizada nos animais durante os tratamentos ficou evidente que as combinações de paclitaxel e etoposídeo comerciais resultam em maior efeito mielotóxico do que fármacos associados à LDE, o que é uma das explicações do porquê a nanoemulsão propiciou uma tolerabilidade tão nitidamente maior. Devemos destacar que o veículo do paclitaxel, o Cremophor EL, tem toxicidade própria.

Os resultados encontrados neste estudo estão portanto de acordo com a redução de toxicidade encontrada por Lo Prete et al. (2006) e Rodrigues et al. (2005) ao testar o LDE-oleato de etoposídeo e o LDE-oleato de paclitaxel. Provavelmente, a nova biodistribuição dos fármacos criada pela associação à LDE, e a melhora dos parâmetros farmacocinéticos do quimioterápico, cuja meia-vida é prolongada, com aumento do volume de distribuição, são os fatores que determinam a marcante redução de toxicidade. Corroborando estes dados, outros sistemas transportadores de paclitaxel ou etoposídeo, tais como lipossomas, emulsões de natureza lipídica e polímeros, demonstraram uma atenuação significativa dos efeitos tóxicos dos fármacos (SOUZA et al. 1993; ALLEN, 1998; GREENWALD et al., 1999; FENG; HUANG, 2001; ZHANG; FENG, 2006).

Um outro ponto que merece atenção é a escolha do modelo oncológico experimental. O modelo murino de tumor melanoma B16 é um dos modelos utilizados pelo NCI – USA na avaliação da atividade antitumoral de agentes antineoplásicos novos. Apesar de haver diferença entre o metabolismo lipídico dos camundongos e humano, está bem documentado que a LDL é captada de maneira seletiva por células de tumores de melanoma B16 *in vitro* e *in vivo* (PONTY et al., 1993, VERLUIIS et al., 1996, SETIAWAN et al., 1996). Além disso, este modelo tem sido utilizado para avaliação dos efeitos antitumorais de fármacos associados à LDE nos trabalhos anteriores do nosso grupo. Com base nessas características, este foi o modelo animal escolhido para os testes de ação antineoplásica das diversas preparações.

ENTIN et al., (2003) reportaram que camundongos com melanoma B16 não tratados morrem em média 35 – 40 dias após a implantação do tumor. De fato, em nosso estudo 100 % dos animais do grupo controle morreram até o 35<sup>o</sup> dia após a implantação do tumor.

No período de 60 dias, os grupos Ptx 7,5/et 5 apresentaram taxas de mortalidade inferiores aos demais grupos, indicando que as doses maiores estão otimizadas no protocolo experimental.

Um aspecto importante de nossos resultados provém dos resultados de necropsia dos animais. Nesses estudos, observamos que o número de metástases dos grupos tratados com as formulações comerciais foi muito maior do que nos tratados com as associações à LDE. Isto sugere que o tratamento com a LDE seja

mais efetivo na destruição dos sítios metastáticos ou, alternativamente, iniba o desenvolvimento das metástases. De qualquer forma, este resultado nos parece fundamental, indicando um caminho de pesquisa bastante promissor.

Estudos realizados por Norton (1988), sugerem que a menos que ocorra uma erradicação total das micromestátases, volumes residuais variantes produziriam uma resposta similar na probabilidade de sobrevida de pacientes em cinco anos, tornando obscura as principais diferenças na redução tumoral em programas terapêuticos diferentes. Esta informação reforça a idéia de que o baixo número de animais metastizados nos grupos LDE-fármacos é um bom sinal de eficácia terapêutica em longo prazo.

O modelo tumoral de melanoma B16 é conhecido por suas características de alta atividade proliferativa e metastática. No momento em que o tumor alcança cinco mm, micromestátases já são observadas nos pulmões dos animais (OPHIR et al., 1999). São considerados curados os animais tratados nos quais ocorreu o desaparecimento do tumor primário e que não morreram por metástase em até 150 dias após a inoculação (ENTIN et al., 2003). No período avaliado (60 dias), os grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10 apresentaram 30 a 50 % de animais com metástases, indicando uma possível remissão do tumor em 70 a 50% dos animais, diferentemente dos grupos que receberam combinação dos fármacos comerciais.

A associação de fármacos à LDE aumentou o tempo de meia-vida dos mesmos. Tal fenômeno pode oferecer uma vantagem adicional ao sistema, pois o aumento do tempo de meia-vida encontrado para a LDE-oleato de etoposídeo é importante para que se alcance uma máxima atividade antitumoral com o etoposídeo (DREWINKO; BARLOGIE, 1976; WOLFF et al., 1987; SLEVIN et al. 1989). Da mesma forma, a citotoxicidade do paclitaxel é muito dependente da duração da exposição das células ao fármaco e pouco dependente da sua concentração (GOBLE; BEAR, 2003). A toxicidade do paclitaxel é dependente do esquema terapêutico quando administrado com outros fármacos metabolizados pelo sistema citocromo p450 (WOOD, 1995). Por este motivo as formulações com paclitaxel foram administradas duas horas antes das formulações do etoposídeo.

A eficácia antitumoral de todos os grupos que receberam quimioterapia combinada foi refletida nos altos índices de redução da massa tumoral observados. Os resultados dos tratamentos revelaram que tanto os grupos LDE-fármacos, quanto os grupos tratados com fármacos comerciais combinados em maior dosagem, foram

mais eficazes em reduzir o tumor do que os grupos comerciais de menor dosagem, ultrapassando 90 % de redução na massa tumoral em relação ao controle. Este resultado confere com dados da literatura que afirmam que reduções de doses na quimioterapia adjuvante estão associadas com significativa redução no efeito terapêutico, mostrando que modificações empíricas nas doses utilizadas podem causar a falha dos tratamentos (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005).

De acordo com padrões estabelecidos pela divisão de tratamento do câncer do NCI, 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. Quando estes valores são menores que 10 %, indicam atividade antitumoral altamente significativa (PLOWMAN et al., 1997). Nossos dados satisfazem esses critérios, pois no 31º dia de experimento, os grupos de combinação LDE-fármacos e os de combinação das formulações comerciais de maior dose mostraram valores de T/C de aproximadamente 7 %.

O fato de não ter havido diferença ( $p < 0,05$ ) entre os percentuais de redução das massas tumorais dos grupos LDE-olptx 15/LDE-olet 10, ptx 7,5/Et 5, LDE-olptx 15 e LDE-olet 10 pode ser explicado de duas maneiras. Uma delas, por possível saturação dos receptores de LDL das células tumorais (BROWN; GOLDSTEIN, 1986), o que limita a entrada das nanopartículas na célula e, por extensão, a captação celular do quimioterápico a elas associado. Uma outra explicação é que a entrada nas células de quantidades crescentes do colesterol constituinte da LDE possa ter reduzido a expressão dos receptores. Experimentos anteriores realizados com etoposídeo e paclitaxel corroboram esta hipótese mostrando que não houve diferença nas curvas de crescimento tumoral, entre diferentes níveis de dose testados com estes fármacos associados à LDE (RODRIGUES et al., 2005; LO PRETE et al., 2006).

O fato de que o grupo de animais que receberam exclusivamente a LDE, tenha apresentado elevada taxa de crescimento da massa tumoral pode estar relacionado com a maior disponibilidade de colesterol provido pela LDE, e prontamente consumido pelas células tumorais para a síntese de novas membranas.

A redução do número de animais com metástases sugere que mesmo com a semelhança nos resultados de regressão tumoral, a terapia combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo é mais eficiente do que as monoterapias com os mesmos fármacos associados à nanoemulsão. O mesmo é válido quando se

comparam os resultados das terapias combinadas LDE-fármacos com a combinação do paclitaxel e etoposídeo comerciais.

Além do efeito de direcionamento dos fármacos associados à LDE, essas formulações podem modular a resposta específica contra o tumor induzindo a ação de células Natural Killer (NK) e CD8 (citotóxicas). O mecanismo de inibição de crescimento tumoral é provavelmente apoptótico. Resultados anteriores corroboram esta hipótese e mostram um aumento do número de células apoptóticas em estudos *in vitro* com LDE- oleato de etoposídeo (LO PRETE et al., 2006).

Estudos com outros sistemas mostram dados semelhantes, a exemplo da doxurrubicina lipossomal anti-CD19, que apresentou morte celular por apoptose após a rápida internalização dos imunolipossomas e lenta liberação do fármaco dos lisossomas e endossomas (LOPES et al.,1999). O número de moléculas de fármacos levados para dentro da célula é maior quando os complexos fármacos-transportadores são endocitados e gradualmente liberados dentro da célula (ALLEN et al., 2002).

Nas respostas induzidas com o paclitaxel e etoposídeo comerciais, o mecanismo de inibição de crescimento tumoral é provavelmente de toxicidade e conseqüente necrose das células. Este processo leva a uma resposta inflamatória que, ao contrário daquela induzida por processos apoptóticos, gera um efeito inibitório sobre as células imunológicas, favorecendo o crescimento tumoral. A presença de vascularização observada nos grupos de combinação do paclitaxel e etoposídeo comerciais pode ser resultado da liberação de citocinas inflamatórias e da presença de leucócitos infiltrados.

O aparecimento de monócitos vacuolizados nos animais dos grupos Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) e LDE-olptx pode ser decorrente do microambiente tumoral rico em radicais livres, citocinas, hipóxia, baixo pH, além da interação dos fármacos com as células infiltradas. A presença de vacúolos em monócitos reflete o seu estado ativação, em resposta a este microambiente tumoral e a indução de morte celular pelo fármaco sobre as células tumorais. Por outro lado, esse fenômeno, o de vacuolização, também ocorre na recuperação de quimioterapias mielosupressoras, em resposta a um estímulo intenso de mielopoiese.

Levando em conta a nítida redução no crescimento tumoral, e a redução do número de nódulos metastáticos encontrados, pode-se afirmar que os regimes terapêuticos combinando fármacos associados à LDE são eficazes. Além disso, o

sistema LDE permite o uso de doses maiores dos agentes quimioterápicos sem que ocorram os efeitos colaterais comuns a eles. Tal fato pode ser observado nos resultados que mostram similaridade nas contagens dos parâmetros hematológicos (hemácias, plaquetas e leucócitos) de camundongos portadores de tumor, sendo que as doses utilizadas nos grupos de combinação LDE-fármacos foram duas ou quatro vezes maiores do que nos grupos de combinação de quimioterápicos comerciais.

Apesar do crescente uso clínico dos quimioterápicos paclitaxel e etoposídeo combinados, o efeito mielossupressor que ambos os fármacos apresentam é um fator altamente limitante ao uso desta modalidade terapêutica. Neste contexto, o direcionamento específico dos fármacos às células tumorais promovido pela LDE pode viabilizar a terapia antitumoral combinada LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo, sem produzir os efeitos colaterais observados com o uso combinado das formulações comerciais. Neste caso, evita-se a necessidade de redução das doses de cada fármaco, fator responsável pela falha de diversas terapias antitumorais. Além disso, os estudos que associam fármacos e seus derivados à LDE sugerem que o sistema LDE é flexível o suficiente para a inclusão de muitos agentes antitumorais, tornando possível a terapia combinada com diferentes preparações LDE-fármacos.

## 7 CONCLUSÕES

- A eficácia terapêutica da combinação LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo é maior que a combinação dos mesmos quimioterápicos na sua apresentação comercial;
- A eficácia terapêutica do uso combinado de LDE-oleato de paclitaxel e LDE-oleato de etoposídeo é maior do que a dos mesmos agentes associados à LDE administrados isoladamente;
- A toxicidade hematológica foi menor no tratamento com a combinação dos fármacos associados à LDE do que com a combinação dos mesmos fármacos na sua apresentação comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S.R.; AMANCIO, R.F.; SOUEN, J.S.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecologic Oncology**, v.82, n.1, 2001. p.84-87.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C.; MARTIN, F.; REDEMANN, T.G.; YAU-YOUNG, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1066, 1991. p. 29-36.

ALLEN, T. M.; SAPRA, P.; MOASE, E.; MOREIRA, J. N.; IDEN, D. L. Adventures in targeting. **J. Liposome Res.**, 121, 2002. p. 5–12.

ALLEN, T. M. Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy. **Nature**, v. 2, 2002. p. 750-763.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v.28, n.1, 2005.

AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHÃO, 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, n.1, 2005. p.178-182.

BARCLAY, M.; ESCHER, G.C.; KAUFMAN, R.J.; KIDDER, E.D.; PETRMANN, M.L. Human plasma lipoproteins in normal women and in women advanced carcinoma of breast. **Cancer**, v.8, 1995. p.253-60.

BARONI, S.; SCRIBANO, D.; ZUPPI, C.; PAGANO, L.; LEONE, G.; GIARDINA, B. Prognostic relevance of lipoprotein cholesterol levels in acute lymphocytic and nonlymphocytic leukemia. **Acta Hematol.**, v. 96, 1996. p.24-28.

BASES, R.E.; KRAKOFF, I.H. Studies of serum cholesterol levels in leukemia. **J. Reticul. Soc.**, v.2, 1965. p.8-14.

BUDD, D.; GINSBERG, H. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. **Cancer**, v. 58, 1986. p. 1361-1365.

CHABNER, B.A.; CALABRESI, P. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: M<sup>c</sup> Graw Hill, 1995, p. 903-949



CHU, A.C.; TSANG, S.Y.; LO, E.H.; FUNG, K.P. Low density lipoprotein as a targeted carrier for doxorubicin in nude mice bearing human hepatoma HepG2 cells. **Life Sci**, v.70, n.5, 2001. p.591-601.

CHUNG, N.S.; WASAN, K.M. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n.9, 2004. p.1315-1334.

CORBETT, T.H.; GRISWOLD JR, D.P.; WOLPERT, M.K.; VENDITTI, J.M.; SCHABEL JR, F.M. Design and evaluation of combination chemotherapy trials in experimental animal tumor systems. **Cancer Treat. Rep.**, v.63, n.5, 1979. p.799-801.

DEGEORGE, J.J.; AHN, C.H.; ANDREWS, P.A.; BROWER, M.E.; GIORGIO, D.W.; GOHEER, M.A.; HAM, D.Y.L.; MCGUINN, W.D.; SUN, C.J.; TRIPATHI, S.C. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. **Journal Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.41, n.3, 1997. p.173-185.

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, n.1, 2007. p.105-111.

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

DORLHIAC-LLACER, P.E.; MARANHÃO, R.C.; MARQUEZINI, M.V.; TOFFOLETTO, O.; CARNEIRO, R.C.G.; CHAMONE, D.A.F. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. **Brazil J. Med. Biol. Res.**, v.34, n.10, 2001. p.1257-1263.

DUBOWCHIK, G.M.; WALKER, M.A. Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. **Pharmacol Ther.**, v.83, n.2, 1999. p.67-123.

ECKHARDT, S. Diagnóstico, estadiamento, e princípios de tratamento. In: HOSSFELD, D.K.; SHERMAN, C.D.; LOVE, R.D.; BOSCH, F.X. (Org.) **Manual de Oncologia clínica**. 6<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1993.

ECKHARDT, S.; BORDEN, E.C. Terapias Sistêmicas. In: HOSSFELD, D.K.; SHERMAN, C.D.; LOVE, R.D.; BOSCH, F.X. (Org.) **Manual de Oncologia clínica**. 6<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1993.

EISENBERG, S. Plasma lipoprotein conversions: the origins of low-density and high-density lipoproteins. **Ann N.Y. Acad. Sci.**, v.348, 1980. p.30-47.

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. **Clinical Cancer Research**, v.9, 2003. p.3190-3197.

FENG, S.S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. **J. Control Release**. v.71, n.1, 2001. p.53-69.

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. Immunology**, v.36, n.12, 2006. p.3371-3380.

GAL, D.; MACDONALD, P.C.; PORTER, J.C.; SMITH, J.W.; SIMPSON, E.R. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. **Cancer Res.**, v. 41, 1981. p.473-477.

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**. 3<sup>a</sup> Ed. Maryland: Bethesda, 1972. p.47-51.

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.57, 1982. p.8216-8227.

GOBLE, S.; BEAR, H.D. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. **Surg Clin North Am.**, v. 83, 2003. p. 943–971.

GOLDSTEIN, J.L.; ANDERSON, R.G.; BROWN, M.S. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. **Nature**, v. 279, 1979. p. 679-685.

GOODMAN & GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 2001.

GORDALIZA, M.; GARCIA, P.A.; MIGUEL, J.M; CASTRO, M.A.; GOMEZ-ZURITA, M.A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicol.**, v.44, 2004. p.441–459.

GREENWALD, R.B.; CONOVER, C.D.; PENDRI, A.; CHOE, Y.H.; MARTINEZ, A.; WU, D.C.; GUAN, S.Y.; YAO, Z.L.; SHUM, K.L. Drug delivery of anticancer agents: water soluble 4-poly (ethyleneglycol) derivatives of the lignan podophyllotoxin. **J. Controlled Release**, v.61, 1999. p.281–294.

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

HALBERT, G. W.; STUART, J. F. B.; FLORENCE, A T. The incorporation of lipid-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. **Int. J. Pharm.**, v. 21, 1984. p. 219-232.

HANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

HENRIKSSON, P.; ERIKSSON, M.; ERICSSON, S.; RUDLING, M.; STEGE, R.; BERGLUND, L.; ANGELIN, B. Hypocholesterolemia and increased elimination of low-density lipoproteins in metastatic cancer of prostate. **Lancet**, 1989. p.1178-1180.

HIRATA, R.D.C. **Efeitos da apolipoproteína B sobre o metabolismo lipídico através da utilização de emulsões semelhantes a fração lipídica da LDL**. 1991. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

HIRATA, R.D.C; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H.; CESAR, T.B.; MARANHÃO, R.C. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, 1999. p. 53-62.

HO, Y.K., SMITH, R.G.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v.52, 1978. p.1099-1104.

HORWITZ, S.B. Mechanism of action of taxol. **Trend Pharmacol Sci**, v.13, 1992. p.134-136.

HORWITZ, S.B.; COHEN D.; RAO, S., RINGEL, I., SHEN, H.J., YANG, C.P. Taxol: mechanisms of action and resistant. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.15, 1993. p.55-61.

HOSSFELD, D.K.; SHERMAN, C.D.; LOVE, R.D.; BOSCH, F.X. (Org.) **Manual de Oncologia clínica**. 6<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1993.

HUNGRIA, T.M.V.; CHIATTONE, C.S.; BARROS, J.C.; LATRILHA, M.C.; PILEGGI, F.; CHAMONE, D.A. F.; MARANHÃO, R.C. Plasma lipids and apolipoproteins in multiple myeloma patients. **Blood**, v.86, 1995. p.836.

IRIBARREN, C., REED, D.M., CHEN R., YANO K., DWYER J.H., Low serum cholesterol and mortality, which is the cause and which is the effect. **Circulation** v.92, 1995. p.2396-2405.

JUNGHANS, R.P.; SGOUROS, G.; SCHEINBERG, D. A antibody-based immunotherapies for cancer. In: CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.655-657.

KADER, A.; DAVIS, P.J.; KARA, M.; LIU, H. Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles. **J. Control. Release**, v.55, n.2-3, 1998. p.231-243.

KALECHMAN, Y.; LONGO, D.L.; CATANE, R.; SHANI, A.; ALBECK, M. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (taxol)+AS101 in a murine model of B16 melanoma: Association with ras-dependent signal-transduction pathways. **International Journal of Cancer**, v.86, n.2, 2000. p.281-288.

KAN, P.; CHEN, Z.; LEE, C.; CHU, I. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. **J. Contolled Release**, v.58, 1990. p.271-278.

KONDAGUNTA, G.V.; BACIK, J.; SHEINFELD, J.; BAJORIN, D.; BAINS, M.; REICH, L.; DELUCA, J.; BUDNICK, A.; ISHILL, N.; MAZUMDAR, M.; BOSL, G.J.; MOTZER, R.J. Paclitaxel plus Ifosfamide followed by high-dose carboplatin plus etoposide in previously treated germ cell tumors. **J. Clin. Oncol.**, v.25, n.1, 2007. p.85-90.

KREGER, B.E.; ANDERSON, K.M.; SCHATZKIN, A.; SPLANSKY, G.L. Serum cholesterol level, body mass index, and the risk of colon cancer- the Framingham Study. **Cancer**, v.70, 1992. p.1038-1043.

KURUP, A.; HANNA, N. H. Treatment of small cell lung cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.52, 2004. p.117-126.

LENZ, M.; MIEHE, W. P.; VAHRENWALD, F.; BRUCHELT, G.; SCHWEIZER, P.; GIRGERT, R. Cholesterol based antineoplastic strategies. **Anticancer Res.**, v.17, 1997. p.1143-1146.

LOKICH, J.; ANDERSON, N.; BERN, M.; COCO, F.; GOTTHARDT, S.; OLIYNYK, P.; DOW, E. Paclitaxel, cisplatin, etoposide combination chemotherapy: a multifractionated bolus dose schedule for non-small cell lung cancer. **Eur. J. Cancer.**, v.34, n.5, 1998. p.659-663.

LOPES, D. E.; KIRCHMEIER, M. J.; GAGNE, J.F.; PILARSKI, L. M; ALLEN, T. M. Cellular trafficking and cytotoxicity of anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin in B lymphoma cells. **J. Liposome Res.**, v.9, 1999. p.199-228.

LO PRETE, A.C. **Toxicidade e ação antitumoral de um derivado do quimioterápico etoposídeo (oleato de etoposídeo) associado a uma emulsão rica em colesterol.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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**, 2007.

LUNDBERG, B. Preparation of drug-low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. **Cancer Res**. v.47, 1987. p.4105-4108.

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

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.86, n.1, 2003. p.93-100.

MALETINSKA, L.; BLAKELY, E. A.; BJORNSTAD, K. A.; DEEN, D. F.; KNOFF, J.; FORTE, T. M. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density-lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. **Cancer Res.**, v.60, 2000. p.2300-2303.

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

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

MARANHÃO, R. C.; TERYAC, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on metabolism of protein-free emulsion models of lipoprotein. **Biochem. Biophys. Acta**, v.875, 1986. p.247-255.

MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO, M.S.R.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, 1993. p.691-696.

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

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, n.6, 1997. p.627-633.

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, n.6, 2002. p.487-498.

MASQUELIER, M.; VITOLS, S.; PETERSON, C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo fate of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. **Cancer Research**, v. 46, n.8, 1986. p.3842-3847.

MASQUELIER, M.; VITOLS, S.; PALSSON, M.; MARS, U.; LARSON, B.S.; PETERSON, C.O. Low Density lipoprotein as a carrier of cytostatics in cancer chemotherapy: study fo stability of drug-carrier complexes in blood. **J. Drug Target**, v.8, n.3, 2000. p.155-164.

MOTZER, M.M.; SHEINFELD, J.; BAJORIN, D. F.; MACAPINLAC, H. A.; FLOMBAUM, M. C.; MARIANI, T.; TONG, W.; BOSL, G.J. Sequential Dose-Intensive Paclitaxel, Ifosfamide, Carboplatin, and Etoposide Salvage Therapy for Germ Cell Tumor Patients. **J. Clin. Oncol.**, v.18, 2000. p.1173-1180.

NAKAGAWA, T.; UHEYAMA, Y.; NOZAKI, S.; YAMASHITA, S.; MENJU, M.; FUNAHASHI, T.; TAKEMURA, K.; KUBO, M.; TOKUNAGA, K.; TANAKA, T.; YAGI, M.; MATSUZAWA, Y. Marked hypocholesterolemia in a case with adrenal adenoma-enhanced catabolism of low density lipoprotein (LDL) via the LDL receptors of tumor cells. **J. Clin. Endocrinol Metab.** v.80, 1995. p.92–96.

NIENDORF, A.; NAGETE, H.; GERDING, D.; MEYER, P.O.; GEBBARDI, A. Increased LDL receptor mRNA expression in colon cancer is correlated with a rise in plasma cholesterol levels after curative surgery. **Int. J. Cancer**, vol.61, 1995. p.461-464.

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

NYDEGGER, U.E.B. Serum lipoprotein levels in patients with cancer. **Cancer Res.** v.32, n.8, 1972. p.1756-1760.

OPHIR, R.; MOALEM, G.; PECHT, M.; SHASHOUA, M.; RASHID, G.; BEM-EFRAIM, S.; TRAININ, N.; BURSTEIN, Y.; KEISARI, Y. THF-2 mediated reduction of pulmonary metastases and augmentation of immunocompetence in C57BL6/6 mice bearing B16-melanoma. **J. Immunother.**, v.22, 1999. p.103-113.

OWENS, M.D.; BAILLIE, G.; HALBERT, G.W. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apolipoprotein B receptor sequences. **Int. J. Pharm.**, v.228, 2001. p.109-117.

PEKKANEN, J.; NISSINEN, A.; VARTANEN, B.; SALONEN, J.L.; PUNSAR, S.; KARNOVEN, M.J. Changes in serum cholesterol levels and mortality, a 30-follow-up, the finish cohorts of the seven countries study. **Am. J. Epidemiol.**, v.139, 1994. p.155-165.

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, n.5, 2006. p.624-630.

PONTY, E.; FAVRE, G.; BENANIBA, R.; BONEU, A.; LUCOT, H.; CARTON, M.; SOULA, G. Biodistribution study of 99mTc-labeled LDL in B16-melanoma-bearing mice. Visualization of a preferential uptake by the tumor. **Int. J. Cancer.** v.54, 1993. p.411-417.

PLOWMAN, J.; DYKES, D.J.; HOLLINGSHEAD, M.; SIMPSON, H.; ALLEY, M.C. **Anticancer Drug Development: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval.** New Jersey: B.A. Teicher, 1997. p.101-125.

RECK, M.; JAGOS, U.; GRUNWALD, F.; KAUKEL, E.; KOSCHEL, G.; VON-PAWEL, J.; HESSLER, S.; GATZEMEIER, U. Long-term survival in SCLC after treatment with paclitaxel, carboplatin and etoposide - A phase II study. **Lung Cancer.** v.39, n.1, 2003. p.63-69.

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

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. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, n.6, 2002. p.765-772.

RODRIGUES, D.G. **Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo animal**. 2004. 110f. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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, 2005. p.565.

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

RUDLING, M.J.; COLLINS, V.P.; PETERSON, C.O. . Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells *in vitro* by the low density lipoprotein pathway. **Cancer Res.**, v.43, 1983. p.4600-4605.

RUDLING, M.J.; STAHL, L.; PETERSON, C.O.; SKOGG, L. Content of low density lipoprotein receptors in breast cancer tissue related to survival of patients. **Br. Med. J.**, v.292, 1986. p. 580-582.

SALMONM, S.E. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro :Guanabara Koogan, 1998, p. 629-655.

SAMADI-BABOLI, M.; FAVRE, G.; CANAL, P.; SOULA, G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. **Br. J. Cancer** v. 68, 1993. p. 319-326.

SENGUPTA, S.; VELPANDIAN, T.; SAPRA, P.; SANYAL, M.; GUPTA, S. K. Etoposide encapsulated long circulating liposomes: improved antitumour efficacy with reduced adverse effects. **Naunyn Schmeide-berg's Arch Pharmacol.**,1998. p.358.

SENGUPTA, S.; TYAGI, P.; CHANDRA, S; KOCHUPILLAI, V.; GUPTA, S.K. Encapsulation in cationic liposomes enhances antitumour efficacy and reduces the toxicity of etoposide, a topoisomerase II inhibitor. **Pharmacology.**, 2000. p.760.

SETIAWAN, Y.; MOORE, D.; ALLEN, B.J. Selective uptake of boronated low-density lipoprotein in melanoma xenografts achieved by diet supplementation. **Br. J. Cancer.** v.74, 1996. p.1705-1708.

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

SMIDT, P.C.; BERKEL, T.J., Characteristics of association of oleoyl derivatives of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate with low-density lipoproteins (LDL). **Pharm Res.** v.9, n.4, 1992. p.565-569.

SOUZA, L.; MARANHÃO, R.C.; SHREIRER, S.; CAMPA, A. In vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with triglyceride-rich emulsion. **J. Antimicrob. Chemother.** v.32, 1993. p.123-132.

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

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, 2006. p.1532–1555.

TOKUI, T.; TAKATORI, T.; SHINOZAKI, N.; ISHIGAMI, M.; SHIRAISHI, A.; IKEDA, T.; TSURUO, T. Delivery and cytotoxicity of RS-1541 in St-4 human gastric cancer cells in vitro by the low-density-lipoprotein pathway. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.36, n.1, 1995. p.1-6.

UEYAMA, Y.; MATSUZAWA, U.; YAMASHITA, S.; FUNASHASHI, T.; SAKAI, N.; NAKAMURA, T.; KUBO, M.; TARUI, S. Hypocholesterolemic factor from gallbladder cancer cells. **Lancet**, v.336, 1990. p.707-709.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP-DI). **Etoposide (Systemic) - Drug Information for the Health Care Professional.** [s.l.]:Thomson Healthcare, 2004a. Disponível em: <[http://200.179.60.198/mdxcgi/htmldisp.exe?CTL=/mdx/mdxcgi/MEGAT.SYS&SET=83060F904353D3D3491810&SYS=28&T=477&D=1&Q=0#M\\_Cat](http://200.179.60.198/mdxcgi/htmldisp.exe?CTL=/mdx/mdxcgi/MEGAT.SYS&SET=83060F904353D3D3491810&SYS=28&T=477&D=1&Q=0#M_Cat)>. Acesso em: julho, 2006.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP-DI). **Paclitaxel (Systemic) - Drug Information for the Health Care Professional.** [s.l.]:Thomson Healthcare, 2004b. Disponível em: <<http://200.179.60.198/mdxcgi/mdxhtml.exe?&tmpl=calcmenu.tm1&SCRNAME=calcmenu&CTL=/mdx/mdxcgi/megat.sys>>. Acesso em: julho, 2006.

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. and Pharmacol.**, v.55, n.12, 2003. p.1615-1622.



- VERSLUIS, A.J.; GEEL, VAN P.J.; OPPELAAR, H.; BERKEL, T.J.C.; BIJTERBOSCH, M.K.; Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells *in vitro* and *in vivo* in mice. **Br. J. Cancer**, v. 74, 1996. p.525-532.
- VERSLUIS, A.J.; RUMP, E.T.; RENSEN, P.C.N.; VAN BERKEL, T.J.C.; BIJSTERBOSCH, M.K. Synthesis of a Lipophilic Daunorubicin Derivative and Its Incorporation into Lipidic Carriers Developed for LDL Receptor-Mediated Tumor Therapy. **Journal Pharmaceutical Research**, v.15, n.4, 1998. p.531-537.
- 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, 1971. p.2325-2327.
- 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-JONES, B. Hypersensitivity reactions from taxol. **J. Clin.Oncol.**, v.8, 1990. p.1263-1268.
- WITTES, R.E.; GOLDIN, A. Unresolved issues in combination chemotherapy. **Cancer Treat. Rep.** v.70, n.1, 1986. p.105-125.
- WOOD, A.J. Paclitaxel (Taxol). **New England J. of Medicine**, v.332, 1995. p.1004-1014.
- XIAO, W.; WANG, L.; RYAN, J.M.; PATER, A.; LIU, H. Incorporation of an (125)I-labeled hexa-iodinated diglyceride analog into low-density lipoprotein and high specific uptake by cells of cervical carcinoma cell lines. **J. Drug Target.** v.152, n.3, 1999. p. 250-256.
- 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, 2006. p.262-270.

**ANEXOS**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

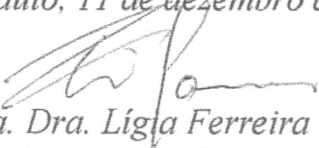
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 91/2006

**CERTIFICADO**

*Certificamos que o Projeto “Efeito da Terapia Antitumoral Combinada LDE-Oleato de Paclitaxel e LDE-Oleato de Etoposídeo em Melanoma Murino” (Protocolo CEEA nº133), sob a responsabilidade da pesquisadora Iara Fabricia Kretzer e do orientador Prof. Raul Cavalcante Maranhão, 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 em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 11/12/2006.*

*São Paulo, 11 de dezembro de 2006.*

  
*Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes  
Presidente da CEEA*



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

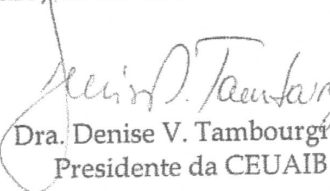
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

---

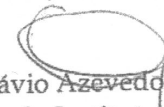
## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 352/06, sobre o projeto intitulado "Efeito da terapia antitumoral combinada LDE-Oleato de Paclitaxel e LDE-Oleato de Etoposídeo em melanoma murino", sob a responsabilidade de 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 10/04/2007.

São Paulo, 12 de abril de 2007.

  
Dra. Denise V. Tambourgy  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos saudáveis após a primeira administração de quimioterapia combinada

<b>Grupos de Tratamento</b>	<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>Eosinófilos (%)</b>	<b>Monócitos (%)</b>	<b>Basófilos (%)</b>
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	14,0 ± 3,9	83,6 ± 3,6	1,0 ± 1,0	1,4 ± 1,7	0
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> ),	13,2 ± 4,9	82,5 ± 3,7	0,25 ± 0,5	1,0 ± 0,8	0
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> ),	14,8 ± 2,5	83 ± 3,5	0,5 ± 1,0	1,8 ± 0,5	0
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	13,5 ± 3,0	81,2 ± 3,2	1,2 ± 0,9	2,0 ± 1,2	0,5 ± 0,6
<b>VR</b>	20,5 ± 6,8	76,0 ± 5,6	1 ± 1,2	1,0 ± 1,2	0,5 ± 0,6

Nota: Resultados expressos em média ± desvio padrão.

**APÊNDICE B.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos saudáveis após a segunda administração de quimioterapia combinada.

<b>Grupos de Tratamento</b>	<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>Eosinófilos (%)</b>	<b>Monócitos (%)</b>	<b>Basófilos (%)</b>
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	13,8 ± 6,6	81,8 ± 7,0	1,6 ± 2,5	2,2 ± 1,3	0,2 ± 0,4
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> ),	16,6 ± 9,6	79,0 ± 9,6	0,8 ± 0,8	2,4 ± 0,9	0,6 ± 0,9
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> ),	16,5 ± 8,5	80,5 ± 10,4	0,2 ± 0,5	2,5 ± 2,4	0,2 ± 0,5
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	13,0 ± 5,8	83,0 ± 7,7	0,2 ± 0,5	3,25 ± 2,2	0
<b>VR</b>	20,5 ± 6,8	76,0 ± 5,6	1,0 ± 1,2	1,0 ± 1,2	0,5 ± 0,6

Nota: Resultados expressos em média ± desvio padrão

**APÊNDICE C.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos saudáveis após a terceira administração de quimioterapia combinada.

<b>Grupos de Tratamento</b>	<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>Eosinófilos (%)</b>	<b>Monócitos (%)</b>	<b>Basófilos (%)</b>
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> )	15,2 ± 6,9	80,8 ± 8,2	1,0 ± 0,7	2,0 ± 1,2	0,4 ± 0,9
<b>LDE-olptx 15/LDE-olet 10</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> ),	20,0 ± 5,6	78,0 ± 8,5	1,0 ± 1,4	1,0 ± 1,4	0
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /13 <sup>o</sup> /15 <sup>o</sup> ),	25,0 ± 10,4	69,5 ± 10,9	0,5 ± 1,0	4,0 ± 1,6 **	0,5 ± 1,0
<b>Ptx 3,75/et 2,5</b> (11 <sup>o</sup> /14 <sup>o</sup> /19 <sup>o</sup> )	16,5 ± 5,7	79,3 ± 6,9	0,5 ± 1,0	3,0 ± 1,2	0,2 ± 0,5
<b>VR</b>	20,5 ± 6,8	76,0 ± 5,6	1,0 ± 1,2	1,0 ± 1,2	0,5 ± 0,6

Notas: \*\* = Ptx 3,75/et 2,5 (11<sup>o</sup>/13<sup>o</sup>/15<sup>o</sup>) vs VR (p<0,01)  
Resultados expressos em média ± desvio padrão



**APÊNDICE D:** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10, após a primeira administração quimioterápica.

Grupos de Tratamento	Neutrófilos (%)		Linfócitos (%)		Eosinófilos (%)		Monócitos (%)		Basófilos (%)		Bastonetes (%)		Metamielócitos (%)		Linfoblasto (%)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
12° dia																
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>1</sup>	18,8 ± 2,7		78,0 ± 2,7		1,3 ± 0,4		0,7 ± 0,4		0 ± 0		0,7 ± 0,4		0,1 ± 0,1		0,6 ± 0,6	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>1</sup>	20,0 ± 3,1		76,7 ± 3,0		1,1 ± 0,3		0,6 ± 0,3		0 ± 0		0,2 ± 0,2		0,2 ± 0,2		0,5 ± 0,5	
Ptx 7,5/et 5 <sup>1</sup>	15,4 ± 2,4		81,8 ± 2,3		0,9 ± 0,3		0,5 ± 0,2		0 ± 0		1,4 ± 0,2		0 ± 0		0 ± 0	
LDE-OIEtop <sup>1</sup>	12,2 ± 2,7		82,0 ± 3,4		2,0 ± 0,7		3,0 ± 0,7		0 ± 0		0,5 ± 0,2		0,2 ± 0,2		0 ± 0	
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>2</sup>	12,6 ± 1,4		83,6 ± 1,5		1,2 ± 0,3		1,2 ± 0,2		0,06 ± 0,06		0,5 ± 0,2		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>2</sup>	14,8 ± 4,7		83,8 ± 5,1		0,4 ± 0,4		0,2 ± 0,2		0 ± 0		0,8 ± 0,8		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>2</sup>	11,4 ± 1,2		85,1 ± 1,3		1,1 ± 0,4		1,2 ± 0,2		0 ± 0		1,1 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0	
LDE-OIPTx <sup>2</sup>	12,4 ± 1,7		84,0 ± 1,5		2,0 ± 0,6		1,2 ± 0,4		0,2 ± 0,2		1,2 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0	
Controle	23,9 ± 3,5		74,0 ± 4,6		2,8 ± 0,7		0,5 ± 0,2		0,1 ± 0,1		0,4 ± 0,4		0,2 ± 0,2		0,3 ± 0,3	
LDE	23,6 ± 2,9		71,2 ± 3,13		2,4 ± 0,4		1,6 ± 0,4		0 ± 0		0,8 ± 0,4		0,4 ± 0,4		0 ± 0	
VR	20,3 ± 2,2		76,3 ± 1,8		0,8 ± 0,4		0,8 ± 0,4		0 ± 0		1,3 ± 0,6		0 ± 0		0 ± 0	

Notas: <sup>1</sup> Administração de quimioterápicos nos 11°, 13° e 15° dias.

<sup>2</sup> Administração de quimioterápicos nos 11°, 14° e 19° dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE E.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após a segunda administração de quimioterapia.

Grupos de Tratamento	Neutrófilos (%)		Linfócitos (%)		Eosinófilos (%)		Monócitos (%)		Basófilos (%)		Bastonetes (%)		Metamielócitos (%)		Linfoblasto (%)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
14 <sup>o</sup> / 15 <sup>o</sup> dia																
LDE-olptx 15/ LDE-oliet 10 <sup>1</sup>	18,7±0,2		78,2±2,5		0,9±0,2		0,9±0,4		0,07±0,07		0,9±0,4		0,1±0,1		0±0	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>1</sup>	18,6±3,1		77,9±2,8		1,0±0,6		1,1±0,3		0±0		0,3±0,2		0±0		0±0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>1</sup>	20,0±4,0		77,5±4,2		0,7±0,4		1,5±0,4		0,2±0,1		0,1±0,1		0,1±0,1		0±0	
LDE-OIEtop <sup>1</sup>	14,0±2,6		77,5±2,0		0,4±0,4		0,8±0,4		0±0		1,6±0,7		0,4±0,4		0±0	
LDE-olptx 15/ LDE-oliet 10 <sup>2</sup>	16,4±3,1		81,0±3,4		0,1±0,1		1,5±0,3		0±0		0,6±0,2		0,8±0,3		0,7±0,4	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>2</sup>	14,7±1,2		83,6±1,2		0,3±0,2		1,1±0,4		0±0		0,1±0,1		0±0		0±0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>2</sup>	16,4±2,9		80,6±3,0		0,4±0,2		1,2±0,3		0±0		0,5±0,2		0±0		0±0	
LDE-OIPtx <sup>2</sup>	11,4±2,3		84,4±3,4		1,4±1,1		0,8±0,3		0±0		0±0		0±0		1,0±0,5	
Controle	23,8±7,0		73,3±3,61		1,0±0,4		1,4±0,4		0,1±0,1		0,6±0,4		0±0		0,3±0,3	
LDE	26,0±2,8		71,3±3,1		1,3±0,4		0,5±0,3		0±0		0,5±0,3		0,3±0,3		0±0	
VR	20,3±2,2		76,3±1,8		0,8±0,4		0,8±0,4		0±0		1,3±0,6		0±0		0±0	

Notas: <sup>1</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.

<sup>2</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE F. Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após a terceira administração quimioterapia**

Grupos de Tratamento	Neutrófilos (%)			Linfócitos (%)			Eosinófilos (%)			Monócitos (%)			Basófilos (%)			Bastonetes (%)			Metamielócitos (%)			Linfoblasto (%)		
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP		
16° / 20° dia																								
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>1</sup>	24,0±3,6		71,6±3,6		1,0±0,2		1,6±0,5		0±0		1,3±0,3		0±0		0,2±0,1		0,3±0,3							
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>1</sup>	21,7±3,4		75,2±3,6		0,5±0,3		1,5±0,4		0±0		0,5±0,3		0±0		0,5±0,3		0,3±0,3							
Ptx 7,5/et 5 <sup>1</sup>	12,5±2,4		75,3±2,7		0,6±0,4		0,5±0,2		0,2±0,2		0,7±0,4		0,1±0,1		0,1±0,1		0,1±0,1							
LDE-OIEtop <sup>1</sup>	15,2±3,3		82,8±3,7		1,6±0,9		0±0		0±0		0,4±0,4		0±0		0±0		0±0							
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>2</sup>	18,5±4,9		78,5±5,1		1,0±0,4		1,2±0,5		0±0		1,1±0,5		0,2±0,2		0,2±0,2		0±0							
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>2</sup>	16,4±2,6		80,1±2,5		1,1±0,4		1,3±0,2		0±0		0,6±0,2		0±0		0±0		0±0							
Ptx 7,5/et 5 <sup>2</sup>	14,6±3,1		78,5±2,2		0±0		1,5±0,7		0±0		1,3±0,8		0±0		0±0		0,6±0,6							
LDE-OIPtx <sup>2</sup>	19,2±4,3		76,0±3,8		3,2±0,8		0,2±0,2		0±0		0±0		0±0		0±0		0±0							
Controle	33,6±7,0		63,6±7,4		1,6±0,6		0,5±0,3		0±0		0,5±0,3		0±0		0,5±0,3		0±0							
LDE	44,0±4		54,0±2		1,0±1		0,5±0,5		0±0		0,5±0,5		0±0		0,5±0,5		0±0							
VR	20,3±2,2		76,3±1,8		0,8±0,4		0,8±0,4		0±0		1,3±0,6		0±0		0±0		0±0							

Notas: <sup>1</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.

<sup>2</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE G.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após o fim do tratamento (27° dia de experimento).

Grupos de Tratamento	Neutrófilos (%)		Linfócitos (%)		Eosinófilos (%)		Monócitos (%)		Basófilos (%)		Bastonetes (%)		Metamielócitos (%)		Linfoblastos (%)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
27° dia																
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>1</sup>	41,0 ± 1,0		57,0 ± 1,0		1,0 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0		1,0 ± 1		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>1</sup>	13,5 ± 5,5		82,0 ± 5,5		1,5 ± 0,5		1,5 ± 0,5		0 ± 0		1,0 ± 1		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>1</sup>	25,9 ± 4,0		71,8 ± 4,2		1,2 ± 0,5		0,2 ± 0,2		0 ± 0		1,0 ± 0,4		0 ± 0		0,8 ± 0,8	
LDE-OIEtop <sup>1</sup>	27,0 ± 3,8		72,2 ± 4,1		0,4 ± 1		0,0 ± 0		0 ± 0		0,4 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0	
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>2</sup>	31,6 ± 9,6		64,0 ± 8,9		2,6 ± 1,1		0,5 ± 0,3		0 ± 0		1,0 ± 0,5		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>2</sup>	11,2 ± 0,7		87,2 ± 0,9		1,0 ± 1		0,5 ± 0,5		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>2</sup>	21,2 ± 2,2		76,0 ± 2,3		1,5 ± 0,8		0,5 ± 0,3		0 ± 0		0,2 ± 0,2		0 ± 0		0,2 ± 0,2	
LDE-OIPTx <sup>2</sup>	28,4 ± 4,0		70,0 ± 4,1		0,4 ± 0,4		0,4 ± 0,4		0 ± 0		0,8 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0	
Controle	48,3 ± 7,8		50,3 ± 7,7		1,3 ± 0,3		0,3 ± 0,3		0 ± 0		1,0 ± 0,5		0 ± 0		1,6 ± 1,6	
LDE	20,3 ± 2,2		76,3 ± 1,8		0,8 ± 0,4		0,8 ± 0,4		0 ± 0		1,3 ± 0,6		0 ± 0		0 ± 0	
VR	41,0 ± 1,0		57,0 ± 1,0		1,0 ± 0,4		0 ± 0		0 ± 0		1,0 ± 1		0 ± 0		0 ± 0	

Notas: <sup>1</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.

<sup>2</sup> Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE H.** Diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após o fim do tratamento (33° dia de experimento).

Grupos de Tratamento	Neutrófilos (%)		Linfócitos (%)		Eosinófilos (%)		Monócitos (%)		Basófilos (%)		Bastonetes (%)		Metamielócitos (%)		Linfoblasto (%)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
33° dia																
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>1</sup>	20,7 ± 3,4		75,5 ± 2,8		2,2 ± 1,0		0 ± 0		0 ± 0		0,2 ± 0,2		0 ± 0		1,2 ± 0,7	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>1</sup>	27,0 ± 7,0		72,0 ± 8,0		0 ± 0		1,0 ± 1,0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>1</sup>	23,6 ± 6,7		75,0 ± 6,7		0,2 ± 0,2		1,2 ± 0,3		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0	
LDE-OIetop <sup>1</sup>	18,8 ± 3,0		76,2 ± 4,7		2,2 ± 0,4		0,8 ± 0,8		0 ± 0		1,2 ± 0,8		0 ± 0		0 ± 0	
LDE-olptx 15/ LDE-olet 10 <sup>2</sup>	22,6 ± 3,6		74,0 ± 4,0		1,3 ± 0,6		0,3 ± 0,3		0 ± 0		1,6 ± 0,6		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 3,75/et 2,5 <sup>2</sup>	20,7 ± 3,4		77,5 ± 3,9		0,5 ± 0,5		0,2 ± 0,2		0 ± 0		1,0 ± 0,5		0 ± 0		0 ± 0	
Ptx 7,5/et 5 <sup>2</sup>	18,5 ± 1,9		78,0 ± 1,4		1,8 ± 0,4		0,3 ± 0,2		0 ± 0		0,6 ± 0,6		0,6 ± 0,4		0,8 ± 0,6	
LDE-OIptx <sup>2</sup>	27,2 ± 6,9		69,2 ± 7,2		2,0 ± 1,0		0 ± 0		0 ± 0		1,0 ± 0,4		0,2 ± 0,2		0,6 ± 0,6	
Controle	20,0 ± 0		74,0 ± 0		2,0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		2,0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0	
LDE	20,3 ± 2,2		76,3 ± 1,8		0,8 ± 0,4		0,8 ± 0,4		0 ± 0		1,3 ± 0,6		0 ± 0		0 ± 0	
VR	20,7 ± 3,4		75,5 ± 2,8		2,2 ± 1,0		0 ± 0		0 ± 0		0,2 ± 0,2		0 ± 0		1,2 ± 0,7	

Notas: <sup>1</sup> Administração de quimioterápicos nos 11°, 13° e 15° dias.

<sup>2</sup> Administração de quimioterápicos nos 11°, 14° e 19° dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE I.** Principais alterações encontradas nos esfregaços de sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após a primeira administração de quimioterapia.

<b>Grupos de Tratamento 12º dia</b>	<b>Monócitos Vacuolizados (%)</b>	<b>Manchas de Gumprecht (%)</b>	<b>Policromasia (+)</b>
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>1</sup></b>	2,5 ± 1,9	14,0 ± 4,6	2 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>1</sup></b>	1,2 ± 1,25	12,8 ± 5,9	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>1</sup></b>	0,08 ± 0,08	9,5 ± 2,3	2 ± 0
<b>LDE-OIEtop<sup>2</sup></b>	0 ± 0	6,0 ± 3,8	2 ± 1
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>2</sup></b>	1,0 ± 0,7	7,1 ± 1,4	2 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>2</sup></b>	3,4 ± 3,1	10,4 ± 5,7	1 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>2</sup></b>	2,4 ± 2	8,1 ± 5,3	2 ± 0
<b>LDE-OIPtx<sup>2</sup></b>	0 ± 0	9,0 ± 3,8	3 ± 0
<b>Controle</b>	0 ± 0	11,2 ± 5,5	2 ± 0
<b>VR</b>	0 ± 0	8,6 ± 3,3	3 ± 0

Notas: <sup>1</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11º, 13º e 15º dias.  
<sup>2</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11º, 14º e 19º dias.  
 Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE J.** Principais alterações encontradas nos esfregaços de sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após a segunda administração de quimioterapia.

<b>Grupos de Tratamento 14<sup>o</sup>/15<sup>o</sup> dia</b>	<b>Monócitos Vacuolizados (%)</b>	<b>Manchas de Gumprecht (%)</b>	<b>Policromasia (+)</b>
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>1</sup></b>	0,6 ± 0,4	5,2 ± 1,5	3 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>1</sup></b>	0,4 ± 0,4	7,5 ± 1,2	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>1</sup></b>	1,5 ± 1,1	14,6 ± 8,5	2 ± 1
<b>LDE-OIETop<sup>2</sup></b>	0,6 ± 0,6	0 ± 0	3 ± 1
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>2</sup></b>	1,6 ± 1,6	6,3 ± 1,6	3 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	11,2 ± 3,1	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>2</sup></b>	2,2 ± 1,4	3,1 ± 1,7	1 ± 0
<b>LDE-OIPtx<sup>2</sup></b>	0,6 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 1
<b>Controle</b>	0 ± 0	17,4 ± 7,6	2 ± 1
<b>VR</b>	0 ± 0	2,6 ± 1,6	3 ± 0

Notas: <sup>1</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.

<sup>2</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE L.** Principais alterações encontradas nos esfregaços de sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após a terceira administração de quimioterapia.

<b>Grupos de Tratamento 16<sup>o</sup>/20<sup>o</sup> dia</b>	<b>Monócitos Vacuolizados (%)</b>	<b>Manchas de Gumprecht (%)</b>	<b>Policromasia (+)</b>
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>1</sup></b>	2,3 ± 2,3	5,8 ± 1,9	2 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>1</sup></b>	0,4 ± 0,4	3,8 ± 1,3	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>1</sup></b>	0,2 ± 0,2	4,3 ± 1,8	2 ± 0
<b>LDE-OIETop<sup>2</sup></b>	0 ± 0	4,0 ± 4,0	2 ± 0
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>2</sup></b>	2,0 ± 2	1,1 ± 1,1	3 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	9,1 ± 5,8	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>2</sup></b>	0,3 ± 0,3	5,0 ± 2,2	2 ± 0
<b>LDE-OIPtx<sup>2</sup></b>	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1
<b>Controle</b>	0,6 ± 0,6	2,3 ± 2,3	2 ± 1
<b>VR</b>	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 0

Notas: <sup>1</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.  
<sup>2</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.  
 Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).



**APÊNDICE M.** Principais alterações encontradas nos esfregaços de sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após o fim do tratamento (27<sup>o</sup> dia de experimento).

<b>Grupos de Tratamento 27<sup>o</sup> dia</b>	<b>Monócitos Vacuolizados (%)</b>	<b>Manchas de Gumprecht (%)</b>	<b>Policromasia (+)</b>
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>1</sup></b>	0 ± 0	2,5 ± 2,5	2 ± 2
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>1</sup></b>	0 ± 0	16,0 ± 4,0	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>1</sup></b>	5,0 ± 5,0	0 ± 0	2 ± 1
<b>LDE-OIETop<sup>2</sup></b>	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>2</sup></b>	0 ± 0	1,1 ± 1,1	2 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	2,0 ± 1,3	2 ± 1
<b>LDE-OIPtx<sup>2</sup></b>	4,0 ± 4,0	0 ± 0	2 ± 1
<b>Controle</b>	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1
<b>VR</b>	0 ± 0	1,5 ± 0,6	1 ± 1

Notas: <sup>1</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.

<sup>2</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.

Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

**APÊNDICE N.** Principais alterações encontradas nos esfregaços de sangue periférico de camundongos portadores de melanoma B16F10 após o fim do tratamento (33<sup>o</sup> dia de experimento).

<b>Grupos de Tratamento 33<sup>o</sup> dia</b>	<b>Monócitos Vacuolizados (%)</b>	<b>Manchas de Gumprecht (%)</b>	<b>Policromasia (+)</b>
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>1</sup></b>	0 ± 0	6,7 ± 3,9	2 ± 1
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>1</sup></b>	12,0 ± 12,0	5,0 ± 5,0	3 ± 0
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>1</sup></b>	0 ± 0	1,6 ± 1,6	3 ± 1
<b>LDE-OIETop<sup>2</sup></b>	2,6 ± 1,1	6,4 ± 2,7	3 ± 0
<b>LDE-olptx 15/ LDE-olet 10<sup>2</sup></b>	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 0
<b>Ptx 3,75/et 2,5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	2,5 ± 2,5	1 ± 1
<b>Ptx 7,5/et 5<sup>2</sup></b>	0 ± 0	6,6 ± 4,4	3 ± 1
<b>LDE-OIPtx<sup>2</sup></b>	12,6 ± 5,4	7,0 ± 3,2	3 ± 0
<b>Controle</b>	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 0
<b>VR</b>	0 ± 0	1,5 ± 0,6	1 ± 1

Notas: <sup>1</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias.  
<sup>2</sup>. Administração de quimioterápicos nos 11<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dias.  
 Resultados expressos em média (M) ± erro padrão (EP).

