

Giovani Marino Favero

**Nanoemulsão contendo 7-cetocolesterol (LDE/7KC)
promove inibição do crescimento de melanoma em
camundongos e aumento de sobrevida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

SÃO PAULO
2007

À DEUS.

*Aos meus pais, Luiz e Nelma, por sempre
incentivarem o estudo desde os primeiros
momentos de minha vida.*

*À minha esposa Luciane, por me apoiar e me
fortalecer durante esta caminhada.*

Ao fruto do nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por todo auxílio na experimentação animal e pela ajuda intelectual neste projeto.

À dona Vilma Rodrigues Barcellini, pelo cuidado e auxílio com os camundongos.

Ao Renato e Débora Deus do laboratório de Lípidos do INCOR, pelo auxílio na produção das emulsões.

À Dra Estela Novak, pelos momentos de discussão científica, colaboração e ajuda constante.

Ao médico patologista Raphael Salles, pelas horas trabalhadas junto ao microscópio na análise histológicas deste trabalho.

À Profa. Dra. Primavera Borelli, pela colaboração nas análises hematológicas.

Ao farmacêutico Francisco Erivaldo Barros, pela ajuda nas contagens hematológicas, momentos de alegria e amizade.

Às amigas Andréia H. Otake e Luciana Nogueira de Souza Andrade, pelas discussões científicas, momentos de descontração e constante apoio.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pelo apoio e disponibilidade.

Ao amigo Antonio Carlos Magnanelli, por me fazer evoluir tecnicamente como pesquisador, pela amizade e cafés filosóficos.

Aos demais amigos do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular, LIM 31.

À Tânia Joicy Mota, por estar sempre apta a atender na secretaria da pós-graduação da Alergia e Imunopatologia.

Ao amigo Ricardo Monesi, por me auxiliar profissionalmente, didaticamente e esportivamente.

Ao grande Dr. David Kasahara, por ter me auxiliado muito quando estava no Brasil e pela amizade.

Ao meu irmão e melhor amigo, Luiz Antonio Favero Filho, pelo exemplo e pioneirismo na pesquisa em minha família.

À minha irmã, Maria Leonor, pelo exemplo de dinamismo social e profissional por ela sempre demonstrado.

Ao meu avô, Marino Avelino Favero, pelo eterno exemplo de honestidade, trabalho e longevidade.

À minha avó, Maria Girardi Favero, pelo exemplo demonstrado aproveitando a vida sempre intensamente.

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
INTRODUÇÃO	1
Emulsões lipídicas.....	15
A nanoemulsão LDE/7KC.....	18
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
Preparo da nanoemulsão LDE.....	23
Preparo da nanoemulsão contendo 7-KC (LDE/7KC).....	24
Biodistribuição de LDE/7KC.....	25
Implante das células tumorais.....	27
Toxicidade de LDE/7KC estudos “ <i>in vivo</i> ”.....	29
Preparo dos tecidos para análise histopatológica.....	36
Análise estatística.....	38
RESULTADOS	39
Cinética de depuração plasmática de LDE/7KC.....	41
Biodistribuição da nanoemulsão LDE/7KC.....	42
Cinética de depuração plasmática de LDE/7KC em camundongos portadores de melanoma B16F10.....	45
Biodistribuição de LDE/7KC em camundongos portadores de melanoma 47	
Ação anti-tumoral da nanoemulsão LDE/7KC em camundongos portadores de melanoma B16F10.....	50
Sinergismo farmacológico entre sinvastatina e LDE/7KC.....	54
Análise do perfil das enzimas hepáticas dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos.....	56
Estudos dos parâmetros hematológicos.....	63
Análise histopatológica dos tumores.....	74
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMO

Favero,G.M.. *Nanoemulsão contendo 7-cetocolesterol (LDE/7KC) promove inibição do crescimento de melanoma em camundongos e aumento de sobrevida*[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007,100 p.

7-cetocolesterol (7KC) é um oxisterol conhecido por inibir a proliferação celular e por ser citotóxico. Desenvolvemos uma nanoemulsão contendo 7KC (LDE/7KC) que demonstrou efeito anti-proliferativo sobre as linhagens RPMI 8226 (mieloma) e melanoma (B16F10), *in vitro*, sendo preferencialmente captada via receptores de LDL. No presente trabalho avaliamos, *in vivo*, a cinética plasmática, biodistribuição, ação anti-tumoral e parâmetros tóxico-hematológicos em camundongos portadores de melanoma. A cinética plasmática apresentou um decaimento estatisticamente igual entre os animais portadores de melanoma e não portadores. Em relação à biodistribuição da nanoemulsão, houve um acúmulo de seus componentes radioativamente marcados, principalmente no fígado e no tumor, sugerindo sua captação via receptores de LDL. LDE/7KC promoveu uma redução superior a cinquenta por cento do tamanho do tumor, que apresentou maior área de necrose e menor quantidade de vasos. Nos camundongos tratados com LDE/7KC houve um aumento da sobrevida. As análises toxico-hematológicas demonstraram que a nanoemulsão apresentou pouca ou nenhuma toxicidade. Os resultados demonstram a possibilidade da utilização da nanoemulsão LDE/7KC como um agente no tratamento do câncer, com poucos efeitos colaterais, devido a sua seletividade aos receptores da LDL.

Descritores: Cetocolesterolis, emulsões, lipoproteínas do colesterol LDL, receptores LDL, melanoma experimental, farmacocinética.

SUMMARY

Favero,G.M.. *A 7-ketocholesterol containing-nanoemulsion (LDE/7KC) inhibits growth of melanoma tumor in mice and increases survival rate* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007, 100 p.

7-ketocholesterol (7KC) is an oxysterol known to inhibit cell proliferation and to be cytotoxic. A nanoemulsion containing-7KC (LDE/7KC) was shown to have antiproliferative effects on RPMI 8226 myeloma cell line and melanoma (B16F10), *in vitro*. This particle is taken up mainly by LDL receptors. Here we have evaluated the plasma kinetic, biodistribution, anti-tumoral action and hematologic toxicity of LDE/7KC in melanoma bearing mice. The nanoemulsion accumulated in the liver and tumor, tissues with a high expression of LDL receptors. LDE/7KC promoted a tumor size reduction over fifty percent. An increased necrosis area and a decreased amount of blood vessels were found. An increased survival rate was observed. The hematologic analyses demonstrated a lack of toxicity. The results shows the possibility to use the LDE/7KC nanoemulsion as an agent for cancer treatment, with few collateral effects probably due to its internalization by LDL receptors.

Keywords: Ketocholesterol, emulsions, LDL lipoprotein, LDL receptor, melanoma, pharmacokinetics.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

7-cetocolesterol (7-KC) é um produto da oxidação do colesterol conhecido por inibir a proliferação celular e por ser citotóxico (Favero, 2003; Lizard *et al*, 1999). Fisiologicamente atua como regulador endógeno da enzima 3- hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase dentre outras atividades (Bjorkhem, 2002).

O colesterol é um lipídio esteróide. Está presente em todos os tecidos do organismo, sendo componente essencial das membranas celulares, precursor dos ácidos biliares e reagente de partida da síntese de vários hormônios. O colesterol é obtido da dieta (30%) ou sintetizado endogenamente (70%) a partir do acetil-CoA via HMG-CoA redutase.

A oxidação é uma das principais reações químicas às quais os lipídios podem estar sujeitos. O colesterol mostra um comportamento oxidativo particular, pela dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 e pelo grupo hidroxila presente na posição 3 da sua estrutura cíclica. De acordo com uma revisão extensa (Kandutsch *et al.*, 1978), a instabilidade do colesterol na presença de luz e ar foi documentada inicialmente em 1901, enquanto que sua oxidação foi descrita primeiramente em 1907. Esta observação se tornou importante quando, em 1935, foi reconhecido que o colesterol fornecido aos animais, em experimentos de aterosclerose, não era puro. Assim, o agente ativo na aterosclerose induzida por dieta poderia não ser o colesterol *per se*, mas seus produtos de oxidação, denominados **oxisteróis**, o que foi

postulado por Altschul em 1950. Os oxisteróis podem ser definidos como produtos de oxidação do colesterol, que são formados de maneira enzimática e não-enzimática. São formados de maneira enzimática, basicamente, no fígado e tecidos geradores de hormônios; não-enzimática, por auto-oxidação induzida principalmente por radicais livres, ocorrendo com maior facilidade na posição 7; peroxidação lipídica, na qual o colesterol é oxidado por hidroperóxidos ou peróxidos cíclicos, produzindo oxidação nas posições 7, 20 e 25 (Maerker *et al.*, 1991). A biossíntese de oxisteróis foi primeiramente documentada em 1956 por Fredrickson e Ono, que incubaram colesterol radioativo com uma fração subcelular enriquecida com mitocôndrias e mostraram que eram formados 25- e 27-hidroxicolesterol. Outros oxisteróis foram descobertos posteriormente.

No plasma humano, os oxisteróis estão aparentemente distribuídos entre lipoproteínas de alta e baixa densidade. Smith *et al* (1981) detectaram em plasma humano diferentes ésteres de oxisteróis, incluindo 7-cetocolesterol (7-KC; 3 β -hidroxicolest-5-en-7-ona; 7-oxocolesterol), 25-hidroxicolesterol, 26-hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicoolesterol. Eles sugeriram que a presença de alguns desses ésteres de oxisteróis leva à peroxidação do colesterol *in vivo*. Vários dos oxisteróis (dentre os mais de 60 diferentes compostos descritos) ocorrem também nos alimentos, incluindo colesterol - α e - β -epóxidos, 7 α - e 7 β -hidroxicoolesterol e o 7-cetocolesterol, que é o predominante (Parish *et al*, 1989).

Apesar disto, os oxisteróis permaneceram como uma curiosidade bioquímica até que se demonstrou, em 1973, que certos derivados da

síntese de esteróis eram potentes inibidores da síntese de esteróis em células de mamíferos em cultura e diminuía os níveis de atividade da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase nestas células (Peng *et al.*, 1978; Fornas *et al.*, 1987). Colesterol altamente purificado, nas mesmas condições, praticamente não possuía efeito (Taylor *et al.* 1979). Isto sugeriu que os oxisteróis tinham um papel no metabolismo lipídico e estimulou a pesquisa de suas ações fisiológicas. Nos anos seguintes, mostrou-se que os oxisteróis participam em vários e diferentes aspectos do metabolismo lipídico (Peng *et al.* 1978).

De fato, os oxisteróis representam uma classe de moléculas regulatórias potentes, com ações biológicas importantes, como na interferência no metabolismo de esteróis, na inibição da proliferação e diferenciação celulares, na citotoxicidade, na aterogenicidade, na mutagenicidade e na carcinogenicidade (Baranowski *et al.* 1982). São reguladores da expressão gênica, substratos para a síntese de ácidos biliares e mediadores do transporte de esteróis. Como moléculas regulatórias, inibem a produção de fatores de transcrição requeridos para a expressão de vários genes das vias de suprimento de colesterol (Higley *et al.*, 1984) e são ligantes que ativam receptores nucleares (Boissoneault *et al.*, 1985). Também podem ser substratos para a síntese de hormônios estereoidais (Lyons e Brown, 1999). Os oxisteróis são inativados pela conversão em ácidos biliares e, em algumas instâncias, a necessidade de ácidos biliares pode somente ser suprida através do metabolismo de oxisteróis (Yoshida *et al.*, 2003).

Os oxisteróis receberam atenção particular na pesquisa da aterosclerose, principalmente devido à sua presença no tecido aterosclerótico humano e porque exercem muitas propriedades pró-aterogênicas *in vitro* e, em menor escala, *in vivo*. Aparentemente, o estudo mais antigo sobre a presença de oxisteróis na aorta foi o de Hardegger et al, em 1943 (Kandutsch *et al.* 1978), que descreveram a colest-3,5-dien-7-ona como o principal oxisterol dentre 4 identificados. Este oxisterol é o produto de desidratação do 7-KC, formado artificialmente durante saponificação alcalina a quente. De fato, na placa aterosclerótica, 7-KC é o colesterol oxidado encontrado em maior abundância (Brown *et al.*, 2000). Posteriormente, estudos mostraram que o acúmulo de lipídios em macrófagos na aterosclerose se dá quando a LDL está modificada como, por exemplo, quando está oxidada. Neste caso, a interiorização se dá via receptores outros, que não o da LDL, ou por fagocitose. LDL oxidada é uma mistura complexa de vários componentes que incluem hidroperóxidos lipídicos, aldeídos e oxisteróis. Quando a LDL é oxidada *in vitro*, várias mudanças ocorrem nos seus componentes lipídicos e protéicos, incluindo uma perda substancial de colesterol livre e esterificado, que são convertidos a oxisteróis. Os oxisteróis, principalmente 7 β -hidroperoxi-colesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, podem mimetizar os efeitos citotóxicos da LDL oxidada em vários tipos celulares (Hsu *et al.*, 1980; Holmes *et al.*, 1984). Interessantemente, na LDL oxidada pelo Cu⁺⁺ predominam os esteróis oxigenados na posição 7, em particular o 7 – cetocolesterol , que

difere do colesterol por apresentar um grupo funcional cetona na posição 7 (Rao *et al.*, 1999).

Além da origem endógena, foi sugerido que 7-KC pode ser derivado exogenamente da dieta, pois é o principal oxisterol presente em alimentos processados, ricos em colesterol (Chang *et al.*, 1998; Osada *et al.*, 2000). O fato de 7-KC incorporado à LDL acetilada ser rapidamente metabolizado e excretado pelo fígado, após injeção em ratos, sugeriu que a dieta pode não ser uma fonte importante de oxisteróis presentes na placa aterosclerótica (Chang *et al.*, 1998); porém, este trabalho recebeu críticas potenciais, pois o veículo não era fisiológico; oxisteróis de origem dietética podem ser absorvidos e incorporados em quilomícrons.

Os efeitos do 7-KC *in vitro* incluem inibição da liberação do colesterol das células, diminuição da permeabilidade à glicose, interrupção do fluxo de Ca^{++} , alteração da barreira endotelial, inibição da expressão do receptor de LDL e da liberação de óxido nítrico, citotoxicidade, indução de apoptose, necrose e autofagia (Lizard *et al.*, 1997; 1998; 1999). O esquema apresentado na figura I demonstra uma das possíveis vias de oxidações a qual a molécula de colesterol esta sujeita, formando o 7-cetocolesterol, este que é a substância mais importante neste projeto.

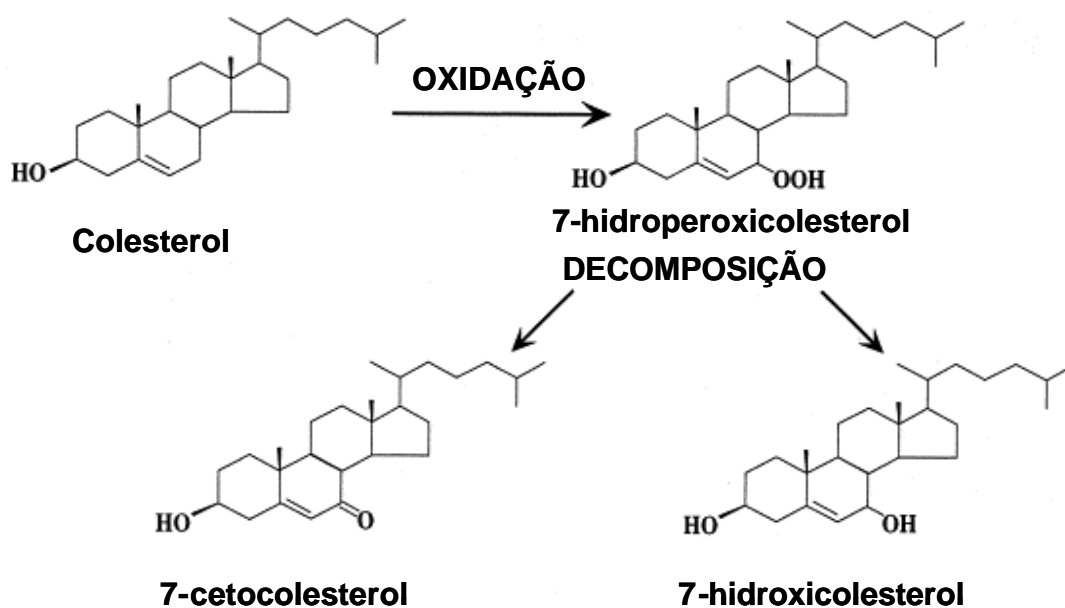


Figura I: Maior produto da ação de radicais livres é o 7-hidroperoxicolesterol, este é rapidamente convertido em 7-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol epiméricos. O 7-cetocolesterol é o oxisterol de origem não enzimática mais abundante na lipoproteína de baixa densidade. (Lyons *et al*, 1998, adaptado)

Oxisteróis são citotóxicos e inibem o crescimento e viabilidade de células de hepatoma e linfoma em cultura (Parish *et al.*, 2001); também possuem efeitos tóxicos em células musculares lisas (Nassem *et al.*, 1987). Quando colocados em forma de cristais em uma camada de colágeno inibem a adesão e o crescimento de células musculares lisas em cultura (Guyton *et al.*, 1990). Oxisteróis, incluindo o 7-KC, são potentes indutores da apoptose em células endoteliais (Peng *et al.*, 1978; Fornas *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1979), assim como para uma variedade de outras células, como fibroblastos (Boissonneault *et al.*, 1985; Kolsch *et al.*, 1999), células de mastocitoma (Fornas *et al.*, 1987) e neuroblastoma humano (Kolsch *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual oxisteróis causam morte celular está em estudo. Haveria três mecanismos principais não excludentes entre si. Um deles, seria a inibição da síntese de colesterol por inibição da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase pelos oxisteróis (Hsu *et al.*, 1980). De fato, há correlação entre crescimento celular e síntese de esterol e a atividade da enzima. O bloqueio total da atividade enzimática por oxisteróis inibe a síntese de DNA e a proliferação celular (Chen, 1984). O segundo mecanismo se daria pela inserção de moléculas de oxisteróis na bicamada lipídica da membrana celular (Holmes & Yoss, 1984), alterando substancialmente a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , o que não é causado pelo colesterol (Zhou *et al.*, 1993). O Ca^{2+} intracelular aumentaria acima de determinados níveis, ocorrendo morte celular. O terceiro seria associado ao potencial oxidante dos oxisteróis como mencionado adiante. Podem existir outras causas. Por exemplo, os oxisteróis favorecem a secreção de interleucina 1β durante o processo apoptótico em células de leucemia promonocítica humana U937 (Lizard *et al.*, 1997), aparentemente de modo dependente dos níveis celulares de glutatona (Lizard *et al.*, 1998).

Em estudos *in vitro* demonstramos que 7-KC foi capaz de induzir morte celular nas linhagens RPMI 8226 (mieloma múltiplo) e B16F10 (melanoma murino), acompanhada pela diminuição de células viáveis, da perda do potencial transmitocondrial (JC-1), alterações de citoesqueleto e presença de figuras de mielina, que são vacúolos autofágicos e com característica multilamelar, observados na microscopia eletrônica. A avaliação ultraestrutural demonstrou a intensidade dos efeitos causados pelo

7-KC, aspecto citopático e alteração na forma nuclear acompanhando de rompimento do citoesqueleto (Favero, 2003).

Adicionado ao meio de cultura 7-KC, provavelmente, associa-se a constituintes deste meio (Lin *et al*, 1996). Lin *et al* (1996) demonstraram que tanto o colesterol quanto os oxisteróis livres estão mais associados à albumina e, portanto, mais facilmente disponível em relação à célula. Com esta fácil captação, o 7-KC poderia desencadear o processo de morte. O colesterol, por sua vez, em nossos estudos, mostrou baixa ou nenhuma toxicidade na concentração utilizada.

A variedade de efeitos relacionados ao 7-KC impossibilita a descrição do mecanismo preciso de morte celular. Monier *et al* (2003) sugerem o termo Oxiaoptofagia (OXIdação, APOPTose, autoFAGIA) para a morte induzida por 7-KC, já que há a presença dos três processos. O mais provável é que o processo de morte esteja ligado a alterações de membrana e, como consequência, aumento do influxo de cálcio; paralelamente, há a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sevanian *et al* (1986) demonstraram que os oxisteróis podem substituir o colesterol na membrana celular, afetando a fluidez, permeabilidade e estabilidade da membrana celular. Oxisteróis também afetam a estrutura estereoquímica das proteínas e fosfolípidios, alterando as características da membrana.

Outros estudos corroboram nossos achados, demonstrando que 7-KC promove indução de autofagia em células endoteliais de cordão umbilical humano, caracterizados pela formação de figuras de mielina (Lizard *et al*, 1997). Num recente trabalho, o mesmo grupo observou a formação das

figuras de mielina em células U937, associado a ensaios com monodansilcadaverina, que é um marcador para vacúolos autofágicos (Monier *et al.*, 2003, Favero, 2003).

De uma maneira geral estes trabalhos mostram que 7-cetocolesterol desencadeia o processo de morte celular programada, em concentrações micromolares, em linhagens normais e cancerígenas, caracterizada pela condensação do núcleo, externalização de fosfatidilserina, perda do potencial transmembrana da mitocôndria, liberação do citocromo c, ativação de caspase 9 e 3 com subsequente degradação da polimerase poly ADP-ribose, e formação e acúmulo de ceramidas C16:0 e C24:1. (Lizard *et al.*, 2002).

O uso terapêutico de 7-KC foi proposto primeiramente por Erickson, S. K. *et al* (1977), que submeteu ratos ao 7-KC via oral, com a intenção de inibição da enzima HMG-CoA redutase, diminuindo, assim, a síntese endógena do colesterol. Os animais tiveram uma inibição entre 60% a 70% nas primeiras 18 horas; porém, após 66 horas, mesmo com outras dosagens de 7-KC, a inibição da enzima não era mais significativa. Portanto, para este propósito, 7-KC não demonstrou futuras perspectivas terapêuticas, já que induziu à tolerância, além da perda da massa corporal dos animais.

Estudos como o de Breuer *et al* (1993) dedicados também à utilização de 7-KC como inibidor da HMG-CoA redutase, porém com administração via endovenosa do oxisterol em meio etanólico, mostraram, inicialmente, diminuição da síntese de ácidos biliares, com aumento compensatório da atividade da enzima 7 α -hidroxilase.

Alguns grupos tentaram utilizar oxisteróis e derivados para aplicação antitumoral (Smith e Johnson, 1989). Christ *et al* (1991) administraram intraperitonealmente duas soluções aquosas de 7 β -hidroxicolesterol fosfodiéster em camundongos portadores de mastocitoma P815. Foi observado com dosagens de 20 e 40 mg/Kg/dia atividade antitumoral. Moog *et al* (1993) demonstrou que fosfodiésteres podem atuar como pró-drogas, liberando gradativamente oxisteróis no organismo.

Nenhum estudo logrou administrar 7-KC diretamente na circulação, devido à sua pouca solubilidade em meios aquosos. O seu uso depende necessariamente de diluição em meios etanólicos, o que dificulta a sua utilização diretamente na circulação sangüínea.

Como os nossos estudos *in vitro* demonstraram o potencial de 7-KC como uma substância naturalmente “assassina”, utilizamos uma estratégia para conduzir o oxisterol até células tumorais. Para isto fizemos o uso de uma variante da nanoemulsão LDE, emulsão esta com características funcionais semelhantes à LDL.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um constituinte normal do sangue e a principal transportadora de colesterol para todos os tecidos. O colesterol, um dos principais constituintes da membrana celular, é obtido pela célula por síntese celular ou via captação de LDL. Há evidências de que vários tipos de células neoplásicas possuem maior captação de LDL: medida da captação de LDL pelos tumores, diminuição da LDL plasmática em pacientes com câncer e aumento do número de receptores para LDL (LDLr) em células tumorais. Devido a estes aspectos, há mais de duas décadas

estuda-se a possibilidade de veicular drogas através da LDL ou de substâncias que atuem similarmente a ela (Firestone, 1993).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal transportadora de colesterol na circulação, carregando cerca de 2/3 do colesterol total (Brown et al., 1981). As partículas de LDL possuem um diâmetro médio de 22nm e são constituídas de moléculas de triglicerídeos, colesterol esterificado e fosfolípídios na monocamada que a reveste, contendo apenas uma apolipoproteína, a apoB-100 e aproximadamente 600 moléculas de colesterol livre, sendo um terço no interior da vesícula e o restante no envoltório (Hevonoja *et al.*, 2000).

A LDL é originada da VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), que é produzida no fígado e convertida em LDL através de processo metabólico ocorrido na circulação, possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente dois dias. Sua densidade varia entre 1,019 e 1,063 g/ml, possuindo três subclasses bem definidas dentro desta variação de densidade (Rhainds *et al.*, 1999).

A remoção da LDL do plasma é feita principalmente pelo fígado, mas também periféricamente, ocorrendo à captação da LDL através da interação com os receptores apo B/E. Estes receptores que têm afinidade tanto por Apo B-100 como por Apo E, encontram-se em regiões específicas da membrana de todos os tipos celulares do nosso organismo (Goldstein *et al.*, 1983).

Após a interação da lipoproteína com o receptor, ocorre sua interiorização com a participação da clatrina, uma proteína de sustentação

celular, formando vesículas endocíticas, cuja fusão forma os endossomos. A diminuição do pH local promove a liberação do receptor de LDL, que acaba por voltar à superfície da membrana (Goldstein *et al.*, 1979).

A concentração de colesterol intracelular é o regulador da afinidade dos receptores B/E por LDL, assim como da sua expressão, além de regular a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A-redutase (HMG CoA), responsável pela principal etapa de biossíntese do colesterol. A HMG CoA redutase faz parte do mecanismo que converte endogenamente acetil coenzima A em colesterol.

A importância dos receptores de Apo B/E nas células é demonstrada nos altos níveis de LDL plasmático, encontrado em pacientes com hipercolesterolemia familiar, nos quais a perda da capacidade de ligação dos receptores celulares de Apo B/E, torna-os incapazes de internalizar lipoproteínas (Rall *et al.* 1983).

Os níveis de LDL plasmáticos estão grandemente implicados no desenvolvimento de vários processos patológicos, dos quais talvez o mais conhecido seja a aterosclerose. Alterações na concentração de colesterol e LDL são relatadas em alguns tipos de tumor.

A primeira documentação da diminuição do colesterol circulante em pacientes com neoplasias foi realizada em 1939 por Muller, quando se observou que pacientes com leucemia apresentavam baixo colesterol plasmático (Lackner, 1989). Por muito tempo, poucos estudos foram realizados após esse relato.

No início da década de 80, observou-se cerca 20.000 homens por mais de sete anos; constatou-se claramente a diminuição dos níveis circulantes de colesterol em casos de câncer (Tornberg,1989;Muldoon,1990). Hoje, o que é de especial importância, é o fato da diminuição do colesterol circulante ser proporcional à agressividade e/ou metastatização do câncer, de acordo com maiores necessidades de LDL (Ho *et al.* 1978).

A alta necessidade de LDL pelas células malignas está relacionada ao rápido crescimento e divisão celular. A primeira documentação disto foi em 1978, quando se observou que células de leucemia aguda captavam de 3 a 100 vezes mais LDL do que células normais (Kritchevsky *et al.*,1991).

Alguns tumores sólidos, como câncer epidermóide de cervix uterino, captam 15 vezes mais LDL do que tecidos adrenais e 50 vezes mais do que o tecido ginecológico normal. Muitos tumores cerebrais captam 2 a 3 vezes mais LDL do que o tecido cerebral sadio, especialmente meduloblastoma, oligodendroglioma e meningioma maligno (Firestone, 1993).

Ponty *et al* (1993) demonstraram acúmulo de LDL humana marcada com Tc em tumores implantados (melanoma, B16F10) de camundongos (C57bl/6). Após oito dias do implante do tumor, o acúmulo de LDL marcada, era maior no tumor do que no fígado ou rim.

Emulsões lipídicas

Emulsões são misturas altamente interdispersas de dois líquidos, aquosos ou oleosos, que não formam soluções. Essa extensa fronteira entre os domínios de aquoso e oleoso é estabilizada por um terceiro componente, o surfactante. Assim, há uma fase dispersa, chamada de fase interna, e uma fase contínua, chamada de fase externa.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode ser considerada a fase interna de uma microemulsão; como já dito, possui um núcleo constituído por éster de colesterol (45-50% da massa) e triglicérides (3-4%) envolvidos por uma monocamada de colesterol não esterificado (5-8%) e fosfolípidios (16-25%) que atuam como agente surfactante, sendo a fase externa o sangue. ApoB-100 é praticamente a única proteína na LDL e serve como seu ligante em receptores específicos de membrana plasmática (Goldstein *et al.*, 1983).

O termo microemulsão foi introduzido por Schulmann, em 1943, e é definido como sendo uma dispersão transparente, fluida, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, contendo quantidades apropriadas de surfactante. São opticamente transparentes em decorrência do diminuto tamanho dos microdomínios de água e óleo (10-200 nm) que não espalham luz visível.

Do ponto de vista microestrutural, as microemulsões podem ser encaradas como agregados de surfactantes (micelas), de água dispersa em óleo (a/o) ou de óleo disperso em água (o/a). Mais precisamente, poderiam

ser definidas como micelas inchadas pela incorporação dos demais lipídios. Em uma micela, as moléculas de surfactante estão organizadas em monocamadas com seus grupos polares (cabeça) orientadas na direção da água e suas caudas na direção do óleo.

Uma representação simples da estrutura de microemulsões é o modelo da gotícula. A figura 2 ilustra as gotículas da microemulsão circundadas por uma película interfacial constituída por moléculas de tensoativo.

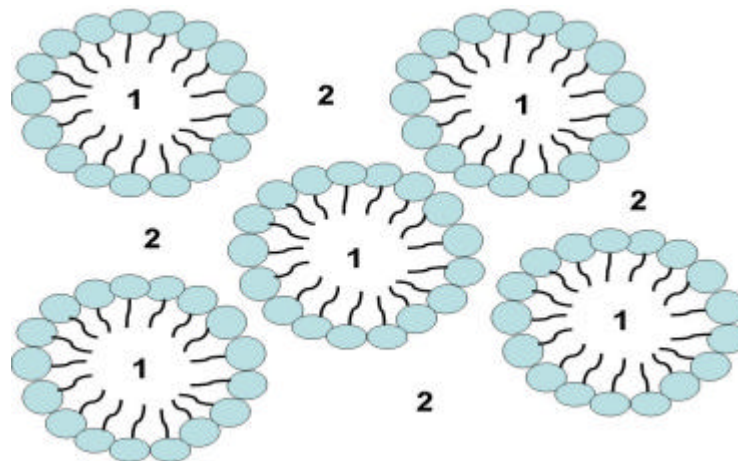


Figura 2: Representação esquemática da estrutura de uma microemulsão óleo em água. (1=óleo, 2=água).

Maranhão *et al.* (1993) descreveram uma nanoemulsão lipídica sintética (LDE) com determinadas características que a tornaram funcionalmente semelhante à LDL, sendo capaz de incorporar apoE, proteína através da qual se liga ao receptor de LDL. Essa emulsão está sendo experimentalmente utilizada para transportar quimioterápicos até determinadas células cancerígenas, uma vez que essas células apresentam

uma maior captação de LDL por possuírem um número maior de receptores em relação a células normais. Estas células proliferam rapidamente, necessitando de uma maior demanda para a síntese de membranas, tanto plasmática, como a nuclear e mitocondrial. O aumento de receptores para LDL em células neoplásicas pode atingir de 3 a 100 vezes o número das células normais (Ho *et al.*, 1978; Mosley *et al.*, 1981)

LDE, então, poderia ser utilizada como um veículo para direcionamento de drogas.

De uma maneira geral, as drogas direcionadas tem a habilidade de se acumular em tecidos específicos, seletivamente e quantitativamente, independente do local ou método de administração. As principais vantagens das drogas direcionadas são: (a) simplificação dos protocolos de administração de drogas; (b) redução da quantidade das drogas administradas e conseqüentemente do custo da terapia; (c) concentração da droga no órgão alvo e redução dos efeitos colaterais indesejáveis em outros órgãos (Gelmon *et al.*, 1999; Torchilin, 2000).

Existem estratégias para direcionamento como: (a) aplicação direta da droga na zona afetada (tecido, órgão); (b) acumulação passiva da droga através de vasculatura dilatada e fenestrada (tumores, infartes, inflamação); (c) direcionamento físico baseado em pH anormal e/ou temperatura alterada na região alvo; (d) droga direcionada com propriedade magnética direcionada via ação externa de um campo magnético; (d) uso de moléculas vetores que possuam uma alta afinidade específica com a zona afetada (Torchilin, 2000; Gelmon *et al.*, 1999; Huang e Oliff, 2001).

O uso de vários compostos anti-tumorais são restritos principalmente devido a sua ação sobre a medula óssea. Terapias com antraciclina, doxorubicina, daunorrubicina são limitadas devido a comum mielossupressão e riscos de cardiotoxicidade. Estas drogas atuam no DNA e podem induzir morte celular via p53 ou em vias independentes, também atuam no DNA mitocondrial além de produzirem radicais livres. Devido aos inúmeros problemas sistêmicos oriundos destas drogas estratégias como a conjugação de ácido glicurônico à doxorubicina minimizaram seus efeitos, outra estratégia foi a utilização de doxorubicina e daunorrubicina incorporadas a lipossomas (Gelmon *et al*,1999; Torchilin, 2000; Huang e Oliff, 2001; Sellers e Fisher,1999).

A nanoemulsão LDE/7KC

A nanoemulsão LDE/7KC é uma variante da emulsão lipídica LDE, com aproximadamente 35nm, desenvolvida por nós (Favero, 2003). Esta emulsão foi idealizada no intuito de aproveitar a agressividade citotóxica do 7-cetocolesterol e a capacidade de direcionamento da LDE até locais com alta concentração de receptores de LDL. *In vitro*, esta nanoemulsão demonstrou efeito anti-proliferativo sobre a linhagem de melanoma (B16F10) caracterizado por: (I) indução de morte celular em uma pequena fração das células tratadas, por processo marcado pela hiperpolarização do potencial transmembranar mitocondrial e aparecimento de figuras de mielina

(apoptose e autofagia); (II) alterações de citoesqueleto associadas à poliploidia, sugerindo inibição da citocinese (Favero, 2003).

LDE/7KC também promoveu efeitos tóxicos sobre linhagem de mieloma múltiplo (RPMI 8226) com indução de células com acúmulo nas fases proliferativas do ciclo celular, mas com aumento de morte. Frente a linhagens com poucos receptores de LDL, como fibroblastos 3T3, LDE/7KC demonstrou uma atividade tóxica menos significativa do que as linhagens tumorais que apresentam uma quantidade maior de receptores para a lipoproteína (Favero, 2003).

Estes dados mostram a capacidade que esta nanoemulsão possui como agente para transporte e direcionamento de 7-KC e sua potencial utilização como agente quimioterápico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Avaliação da atividade antiproliferativa da nanoemulsão LDE/7KC *in vivo*, através de:

- Estudo da cinética de depuração plasmática da nanoemulsão em camundongos portadores e não portadores de melanoma B16F10.
- Análise da biodistribuição tecidual da nanoemulsão em camundongos portadores e não portadores de melanoma B16F10.
- Verificação da captação de LDE/7KC(³H) pelo tumor.
- Análise da ação anti-tumoral da nanoemulsão LDE/7KC sobre melanoma B16F10 em camundongos.
- Avaliação histopatológica do melanoma após tratamento dos camundongos com a nanoemulsão LDE/7KC.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP, dia 26/08/04 com protocolo de Pesquisa número 541/04, Departamento de Clínica Médica.

Preparo da nanoemulsão (LDE)

A LDE foi preparada segundo o método de Ginsburg *et al* (1982) modificado por MARANHÃO *et al* (1993). Em um frasco de vidro foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina (Lipid Products-Surrey, UK), 20 mg de oleato de colesterol (Lipid Products-Surrey, UK), 1,0 mg de trioleína (Nu-Check-Elysian, MN), 0,5 mg de colesterol (Nu-Check-Elysian, MN) e [¹⁴C]-oleato de colesterol (Amershan Internacional - Surrey, UK). A seguir, a mistura foi seca sob fluxo de Nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas a 4 ° C para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 mL de solução tris HCl 0,01 M; pH 8,05, a mistura de lipídios foi sonicada, utilizando-se um disruptor celular Branson Ultrasonics Corp., modelo B 450 (Danbury, EUA) equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro e potência de 125 Watts, por 3 h, sob atmosfera de Nitrogênio, com temperatura variando entre 50 ° C e 55 ° C.

A emulsão foi centrifugada a 36.000 r.p.m. por 30 minutos a 4 ° C (Ultracentrífuga Beckman, rotor Beckman SW-41 T I). A parte superior do

tubo, perfazendo um total de 10% do volume da emulsão, foi desprezada por conter partículas maiores do que o desejado. A densidade da emulsão foi ajustada para 1,21 g/mL, adicionando-se brometo de potássio. Foi realizada nova centrifugação por 2 h, a 4° C a 36.000 r.p.m. com o mesmo rotor. A fração do topo do tubo que corresponde a 20% do total é a LDE. O excesso de brometo de potássio foi removido através de diálise contra duas trocas de 2 L de tampão-tris HCl 0,01 M, pH 8,05. A emulsão foi esterilizada utilizando filtros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Bedford, MA) e armazenada em frascos estéreis a 4 C por até 30 dias.

Preparo da nanoemulsão contendo 7-KC (LDE/7KC)

O 7-KC (Sigma - St. Louis, USA) foi adicionado aos mesmos lípidos usados no preparo da LDE na concentração de 5,0mg, seguindo o protocolo da emulsão anterior. A quantidade de 7-KC incorporada a LDE foi determinada pela incorporação de 7-KC [H^3]. As taxas colesterol / 7-KC marcados foram determinadas nas emulsões pelas suas respectivas atividades específicas, desta maneira foi possível avaliar a capacidade de incorporação do 7-KC (Favero, 2003).

BIODISTRIBUIÇÃO DE LDE/7KC

Foram utilizados camundongos C57Bl/6J do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, com a colaboração do Dr. Durvanei Augusto Maria. Os animais, adultos de aproximadamente 2 a 3 meses de idade e pesando em torno de 20g, foram mantidos em biotério, com ciclo claro/escuro, com alimentação e água *ad libitum*. Os procedimentos seguiram as normas de conduta com pesquisa animal e com autorização do comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Estudo de Biodistribuição – Captação Tecidual de [¹⁴C]-LDE/[³H]-7KC

A depuração plasmática e a biodistribuição foram realizadas em camundongos C57/bl6/6J com 40 dias de vida; 3mg de LDE/7KC marcada com 7-KC H³ e ¹⁴C colesterol livre foram injetados na veia do plexo retro-orbital com coleta de sangue e sacrifício após 5, 15, 30, 60 e 240 minutos, seguido da retirada da pele e demais órgãos internos conservados em solução de NaCl 0,9% a 4°C, até se dar início aos procedimentos de extração lipídica. Os órgãos foram pesados e realizadas as extrações lipídicas com posterior ressuspensão e análise dos isótopos em contador beta, conforme descrito a seguir.

Extração lipídica das diferentes amostras de tecido

Após a retirada, os órgãos foram colocados em solução salina gelada, conservando-os a 4° C até o momento do processamento. A limpeza foi realizada sobre placa de vidro, sobre gelo, o mais rápido possível para remoção de sangue e debris.

Os órgãos foram então pesados e retiradas quantidades de 200mg de cada um. Cada fragmento dos órgãos foi macerado até adquirirem um aspecto pastoso.

Cada amostra foi transferida para tubos de vidro, adicionando-se 10mL de metanol e 20 mL de clorofórmio, ficando em repouso por 12 horas a 4° C.

Após 24 hs, cada amostra foi filtrada com gaze e o líquido transferido para outro tubo fazendo uma lavagem com 2,5mL de clorofórmio. A seguir, adicionou-se 7 mL de água, cobrindo com parafilme e deixando novamente em repouso por 12 horas.

No terceiro dia, a base sobrenadante foi removida e descartada adicionando-se 4 mL de solução de “clear Folch” (Clorofórmio/Metanol/H₂O; 3/48/47) e deixado em repouso por 12 horas.

Na manhã seguinte, a fase sobrenadante foi aspirada e descartada sendo o restante seco sobre fluxo de Nitrogênio. Após seco, os cristais formados foram ressuspensos em 100µL clorofórmio/metanol (2:1), com lavagem do tubo e transferência para tubos menores. 10 µL de cada

amostra foi retirado e colocado em tubos contendo líquido de cintilação com posterior leitura em contador de cintilação beta LKB.

IMPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS

Células B16 F10 (melanoma murino) foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa (37°C) com atmosfera de 5% de dióxido de carbono, até a confluência.

Para o implante das células, os camundongos C57Bl/6J tiveram a região posterior do dorso tricotomizada. Alíquotas de 5×10^4 células B16 F10 foram então injetadas pela via subcutânea no dorso dos camundongos. Para este procedimento não se fez necessário o uso de anestésicos, pois estes roedores não apresentam inervação subcutânea, não sendo um processo doloroso ao animal. Este tipo de tumor possui um crescimento acelerado, sendo visível em menos de 10 dias após o implante (Plowman *et al*, 1997).

Parâmetros Macroscópicos do Crescimento Tumoral

Após o desenvolvimento visível e palpável do tumor implantado, cerca de 10 dias após a injeção das células, a massa corporal e o volume do tumor foram medidos. A massa corporal é um critério importante para avaliação do tratamento executado; pela massa pode-se chegar à máxima dose tolerada e à dose letal, além de acompanhar se está ocorrendo processo de caquexia.

A eficácia do tratamento necessariamente foi realizada pelo acompanhamento do desenvolvimento do volume do tumor. O tamanho e volume tumoral foi avaliado com o auxílio de um paquímetro, duas medidas do comprimento (Longitudinal) e duas medidas da largura (Vertical) da massa tumoral dorsal. O paquímetro é um aparelho de grande utilidade para se medir pequenos comprimentos em geral, e em particular para medidas de diâmetros internos e externos e profundidades.

Seguindo as normas estabelecidas pelo NCI (National Câncer Institute)(Plowman *et al*, 1997), para a aprovação de drogas com potencial anti-tumoral, os valores das medidas foram convertidos em volume levando em consideração a fórmula do cálculo do volume esférico, cálculo este usual para a medição de tumores sólidos em experimentação animal. A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$\text{Volume do tumor} = \text{Longitudinal (cabeça-cauda)} \times \text{Transverso}^2 \text{ (pata-pata)} \times \frac{3}{4} \text{ p.}$$

Além do acompanhamento da massa corporal e do volume do tumor, foi avaliada a taxa de sobrevivência, ou seja, o tempo de vida dos animais durante e após os tratamentos.

TOXICIDADE DE LDE/7KC estudos “*in vivo*”.

LDE/7KC nas concentrações de 3, 6, 12, e 24 mg de lipídios totais foram injetados intraperitonealmente. Os animais foram mantidos no biotério com comida e água *ad libitum*. Após diferentes períodos e estratégias de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

A Máxima Dose Tolerada (MDT), que não provoca no animal uma perda de massa corpórea superior a 10%, foram avaliadas nos camundongos portadores de tumor e nos controles.

ANÁLISE DO EFEITO DE LDE/7KC SOBRE OS TUMORES

Após a inoculação das células B16F10, o crescimento dos tumores foi acompanhado diariamente. Com o desenvolvimento do tumor, visível e palpável, cerca de 10 dias após o implante, iniciou-se os tratamentos com injeção de 3 mg de lipídios totais das diferentes emulsões (LDE e LDE/7KC), administrados pela via intraperitonealmente. Diferentes estratégias de tratamento foram abordadas; a primeira com dosagens únicas; em um segundo experimento, doses diárias e, em outro, doses intercaladas a cada 48hs. Os animais foram pesados e os tumores medidos periodicamente seguindo o protocolo para medição descrito anteriormente. Para observação de efeitos sistêmicos das drogas utilizadas, em alguns experimentos, foram coletados amostras de sangue para avaliação de parâmetros analíticos clínicos como hemograma e enzimas hepáticas. Para estes experimentos

optou-se pela utilização de animais com 60 dias ou mais de vida, para que houvesse uma total maturação hematológica.

Avaliação da ação anti-tumoral do sinergismo da nanoemulsão LDE/7KC com a Sinvastatina

Outra perspectiva farmacoterapêutica foi abordada: o sinergismo com a sinvastatina na tentativa de aumentar a captação da LDE/7KC *in vivo*.

A sinvastatina pertence à classe das estatinas, uma classe de medicamentos que foram introduzidos na clínica para o tratamento de hipercolesterolemia, por serem competitivos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, inibindo assim a conversão do ácido mevalônico em colesterol, dolicol ou ubiquinona. O significado biológico é importante, pois estes derivados do mevalonato são necessários para a construção de membranas plasmáticas, funções ubiquinona no transporte de cadeia de elétrons da mitocôndria, no transporte e na síntese de glicoproteínas via dolicol.

Quimicamente a sinvastatina é o ácido butanóico 2,2-dimetil-1,2,3,7,8,8^a-hexahidro-3,7-dimetil-8[2-(tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il)-etil]-1-naftalenil éster, com fórmula molecular C₂₅H₃₈O₅.

Devido às suas características químicas, uma lactona inativa, a sinvastatina depois de ingerida é hidrolisada ao seu correspondente beta-hidroxiácido. Este é o principal metabólito e o responsável pela inibição da

(HMG-CoA) redutase. O pico de concentração plasmática da sinvastatina e de seus metabólitos é atingido cerca de 1 a 2,4 horas após ingestão.

O implante tumoral seguiu o protocolo descrito anteriormente. Após 10 dias do implante iniciou-se os diferentes tratamentos: salina (controle), sinvastatina (5mg/Kg/dia por via oral), 2mg/Kg LDE/7KC com 3 doses/semana, e sinvastatina (5mg/Kg/dia por via oral) associada à LDE/7KC (2mg/Kg, 3 doses/semana). A sinvastatina utilizada foi obtida da Indústria Farmacêutica Novartis. Cada comprimido apresenta 10mg de sinvastatina; após maceração do comprimido, foi preparada uma suspensão em 3mL de água, sendo ministrado, com ajuda de micropipeta, 50 μ L da suspensão para cada camundongo, por dia, via oral, através de gavagem.

Determinação de Enzimas Hepáticas, Hemograma, Esplenograma e Mielograma.

As amostras sanguíneas foram obtidas do plexo axilar em camundongos C57BL/6J previamente anestesiados. Amostras sem anticoagulantes foram utilizadas para obtenção do soro, e amostras com EDTA 10 %, como anticoagulante, utilizado para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

Determinação de Enzimas hepáticas

Levando em consideração a importância do fígado no metabolismo de componentes lipídicos e da sinvastatina, avaliamos um possível efeito hepatotóxico, por avaliação de três enzimas associadas à agressão hepática, a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), a transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e a gama glutamil transferase (gama-GT).

O princípio do método enzimático para avaliação da atividade das enzimas hepáticas TGO e TGP esta baseada no consumo de NADH pelo produto formado a adição de cetoglutarato a estas enzimas. A TGO catalisa a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A atividade enzimática da TGO na amostra é calculada com base na redução da absorbância em 340nm, quando o NADH se transforma em NAD^+ . A TGP catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A atividade enzimática da TGP na amostra é calculada com base na redução da absorbância em 340 ou 365 nm, quando o NADH se transforma em NAD^+ .

O procedimento experimental consiste na simples adição de 50 μL da amostra a 1000 μL do reagente de trabalho, para a TGP é uma mistura de 4 volumes de Tampão contendo Tris 110 mmol/L pH 7,3 , L-alanina 550

mmol/L e LDH > 1350 U/L, 1 volume de Coenzima contendo 2-cetoglutarato 198 mmol/L e NADH 2,6 mmol/L, após mistura, homogeneizou-se os tubos, colocando em banho (37°C), acionando o cronômetro, após 1 minuto fez-se a primeira leitura da absorbância inicial (A_1), e outras leituras de absorbância após exatamente 1, 2 e 3 minutos, o cálculo é feito pelo decréscimo de absorbância médio por minuto. As leituras foram realizadas a 340 nm em espectrofotômetro. Para TGO seguiu-se o mesmo protocolo porém, o tampão é composto pela mistura de Tris 88 mmol/L pH 7,8, L-aspartato 264 mmol/L, MDH > 460 U/L e LDH > 660 U/L e a coenzima continha 2-cetoglutarato 198 mmol/L e NADH 2,6 mmol/L.

Para quantificação da gama-GT foi pipetado 100 µL de soro em uma cubeta adicionada a 1000µL do reagente de trabalho, constituído de 4 volumes de Tampão glicilglicina 165 mmol/L em pH 7,9 com 1 volume de Substrato-Glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 32,5 mmol/L, após mistura, homogeneizou-se os tubos, colocando em banho (37°C), acionando o cronômetro, após 1 minuto foi realizada a primeira leitura da absorbância inicial (A_1), e outras leituras de absorbância após exatamente 1, 2 e 3 minutos, o cálculo é feito pelo decréscimo de absorbância médio por minuto. O princípio do teste é a catalisação promovida pela gama-Gt promovendo a transferência do grupamento lutamil da γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina liberando γ -glutamylglicilglicina e 3-carboxi-4-nitroanilina. A 3-carboxi-4-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 ou 410 nm e a quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade da GGT na

amostra. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de formação da 3-carboxi-4-nitroanilina.

Avaliação Hematológica

Determinação do Hemograma e da Contagem de Reticulócitos

As amostras de sangue foram colhidas do plexo axilar dos animais de todos os grupos experimentais, as quais foram utilizadas para realização de hemograma e contagem de reticulócitos, de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da FCF/USP.

Obtenção de Células da Medula Óssea (MO)

Os animais foram previamente anestesiados, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. As medulas ósseas foram obtidas por lavagem da cavidade femural com meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA) gelado.

Mielograma

A partir das amostras da suspensão total de células da medula óssea, foram preparadas lâminas em citocentrífuga (Incibrás) e coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947). Utilizando

líquido de Turk, foi efetuada a contagem de no mínimo 200 células em câmara hemocitométrica de Neubauer. As células foram classificadas em células de mitose e blásticas; granulócitos neutrófilos jovens (promielócitos e mielócitos), em fase anel (metamielócitos e bastonetes), segmentado e eosinófilos; monócitos e macrófagos; linfócitos e plasmócitos; pró-eritroblastos e eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos (Garcia, 1992; Boreli *et al.*, 1995).

Obtenção de Células do Baço

Esplenograma

Para a obtenção das células do baço os animais foram anestesiados, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. O baço foi transferido para placa de Petri de plástico, contendo meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA) gelado, contendo EDTA 10 %, utilizado para a coleta das células. Na placa de Petri, a cápsula do órgão foi rompida em uma de suas extremidades, com o auxílio de duas agulhas dobradas em "L", e fixas em seringas. As células foram delicadamente retiradas da cápsula pelo método de dissociação. A suspensão foi homogeneizada na placa de Petri, com pipeta tipo Pasteur, para completa dissociação celular e transferidas para tubo cônico de plástico e mantido em banho de gelo.

As células obtidas do baço foram quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, após diluição de 1:500 líquido de Turk, diluente composto de solução de 1 % de ácido acético glacial.

Para avaliação morfológica, foram realizadas lâminas da suspensão celular em citocentrífuga (Incibras) e posteriormente submetidos à coloração de May Grunwald-Giensa, modificado (ROSENFELD, 1947) e peroxidase (método de GRAHAM-KNOLL modificado), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares.

PREPARO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após os diferentes grupos e esquemas de tratamentos, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos que apresentaram depósitos de melanina, nódulos metastáticos e o tumor dorsal foram retirados e fixados imediatamente em solução tamponada de formaldeído a 4% gelado. A fixação tem como principal função a insolubilização das proteínas dos tecidos mantendo assim a sua estrutura próxima a do normal.

A etapa seguinte foi à desidratação do material com solução alcoólica de concentrações crescentes de 70% a absoluto. Para a observação ao microscópio se faz necessário uma terceira etapa, o clareamento do material, com xilol; após o clareamento, o tecido foi mergulhado em parafina fundida e colocada em uma estufa a 60°C. Nesta temperatura o xilol evapora e o espaço por ele antes ocupado passa a ser preenchido por

parafina. A montagem do bloco final foi feita em um pequeno molde com um pouco de parafina. Os cortes foram realizados em um micrótomo, com a espessura de 5 μ m.

A coloração utilizada foi à dupla marcação com hematoxilina e eosina (HE).

Todas estas etapas foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

Coloração de Verloeff para fibras elásticas

Partindo de cortes histológicos sem coloração prévia, apenas fixados à lâmina, iniciamos os procedimentos desta coloração específica.

O tecido das lâminas foi novamente submetido ao processo de clarificação com duas lavagens de vinte minutos com xilol, seguida de 5 passagens em soluções alcoólicas, em seguida lavagem com água corrente por 5 minutos.

Após estas preparações, os cortes foram corados com à solução de Verloeff por quinze minutos. A solução de Verloeff é constituída por uma mistura de 2 mL de hematoxilina a 5%, 0,8 mL de cloreto de ferro a 10% e 0,8mL de lugol. Após quinze minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente até retirada de todo o excesso. A visualização das fibras foram evidenciadas pela a adição de solução aquosa de cloreto férrico a 2%, adicionado até a visualização das fibras elásticas ao microscópio óptico.

O próximo passo é a lavagem com água corrente, em seguida por álcool absoluto e duas passagens de 2 minutos em xilol, seguida da montagem da lamínula.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças entre os grupos controle, LDE, LDE/7KC foram analisados utilizando o teste de “one-way” ANOVA, com posterior análise pelos métodos de *Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test* ou *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. A bio-distribuição e os ensaios comparativos entre LDE e LDE/7KC utilizaram o teste T de Student’s para amostras pareadas. As análises estatísticas foram realizadas no software Graph Pad – Prism Stat 4.0 e Graph Pad Instat.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os primeiros ensaios foram realizados em camundongos C57BL/6J para determinar a dose letal (DL 50%). Iniciou-se com doses únicas intraperitoneais que variaram de 2,5mg/Kg (78,125 μ M de 7-KC) a 20mg/Kg (625 μ M de 7-KC). Esta última dose foi administrada em um volume de 2 mL de nanoemulsão, um volume extremamente elevado e que não levou à morte dos animais. Assim, se fosse ultrapassado este volume, a morte do animal provavelmente seria devido ao volume e não à ação do 7-KC (Figura 3). Como nenhum animal morreu após 24 horas da administração da nanoemulsão, foi analisada a variação da massa do animal durante 30 dias, para observarmos o efeito tardio que, eventualmente levasse o animal a óbito, além da análise da máxima dose tolerável (MDT).

A nanoemulsão LDE/7KC não apresentou toxicidade; porém, na concentração de 20mg/Kg, observou-se uma redução significativa na massa corpórea desses animais. Este valor representa a MDT no primeiro dia após a injeção de LDE/7KC. Os dados referentes à toxicidade aguda nos cinco primeiros dias estão apresentados na figura 3.

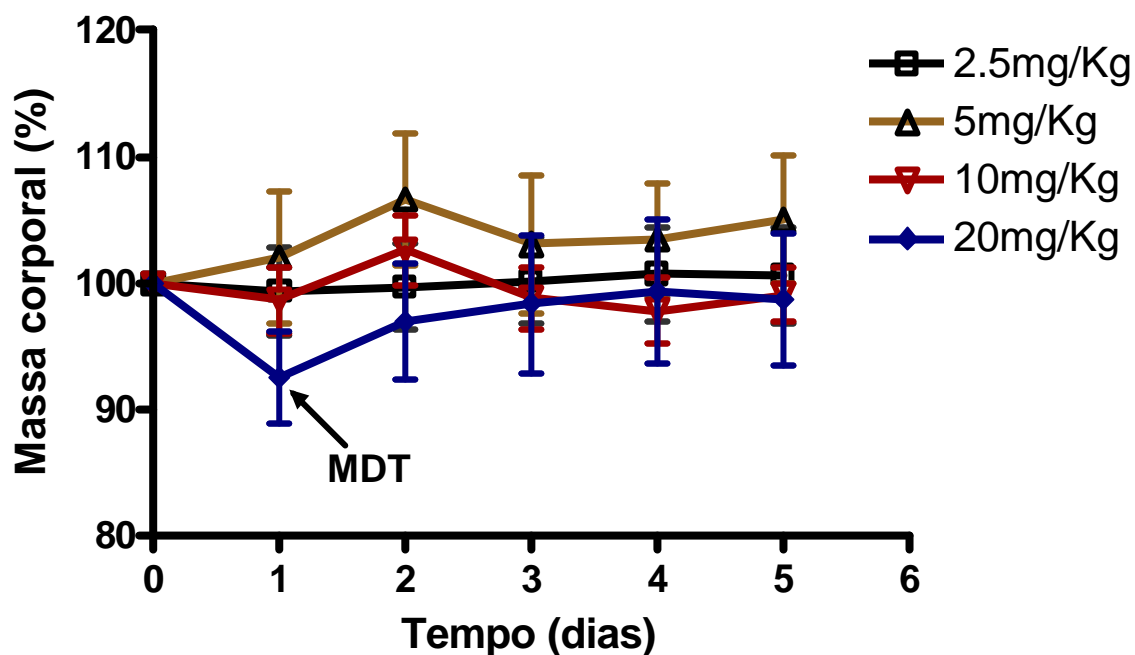


Figura 3. Variação de massa corporal (%) após a injeção intraperitoneal da nanoemulsão LDE/7KC em camundongos C57Bl/6J.

CINÉTICA DE DEPURAÇÃO PLASMÁTICA DE LDE/7KC

Utilizando uma solução da nanoemulsão LDE/7KC duplamente marcada com ^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol foram realizados os experimentos da cinética de depuração plasmática em camundongos C57Bl/6J em diferentes períodos. Após a injeção no plexo retro-orbital da nanoemulsão LDE/7KC contendo aproximadamente 10.000 cpm, de cada lipídeo marcado, o sangue foi coletado no outro plexo retro-orbital do animal. Os resultados apresentados na figura 4 mostram que não houve diferença estatística entre as curvas de depuração dos dois compostos radioativos.

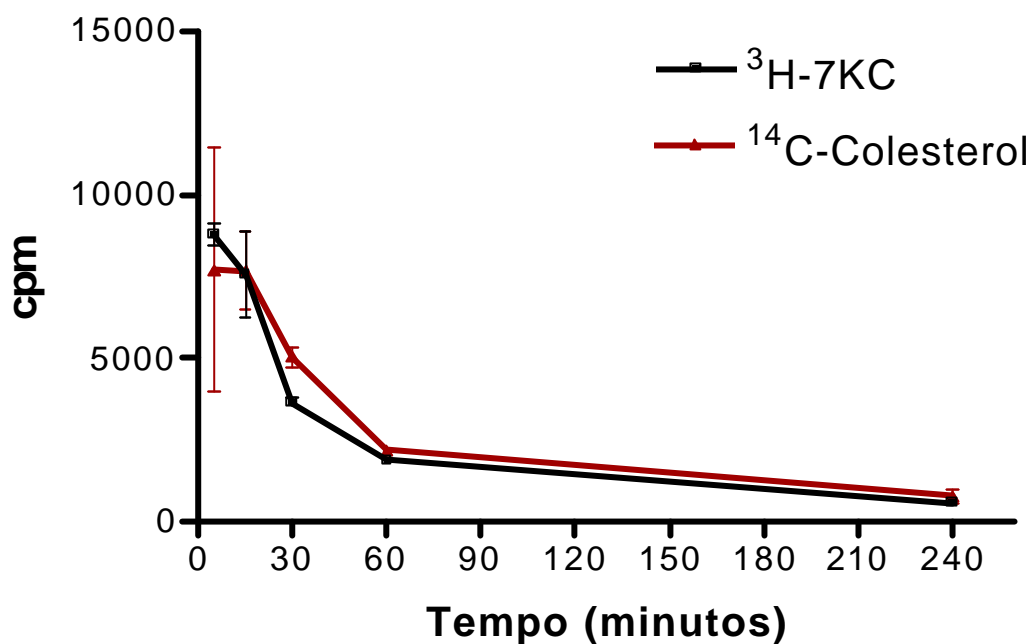
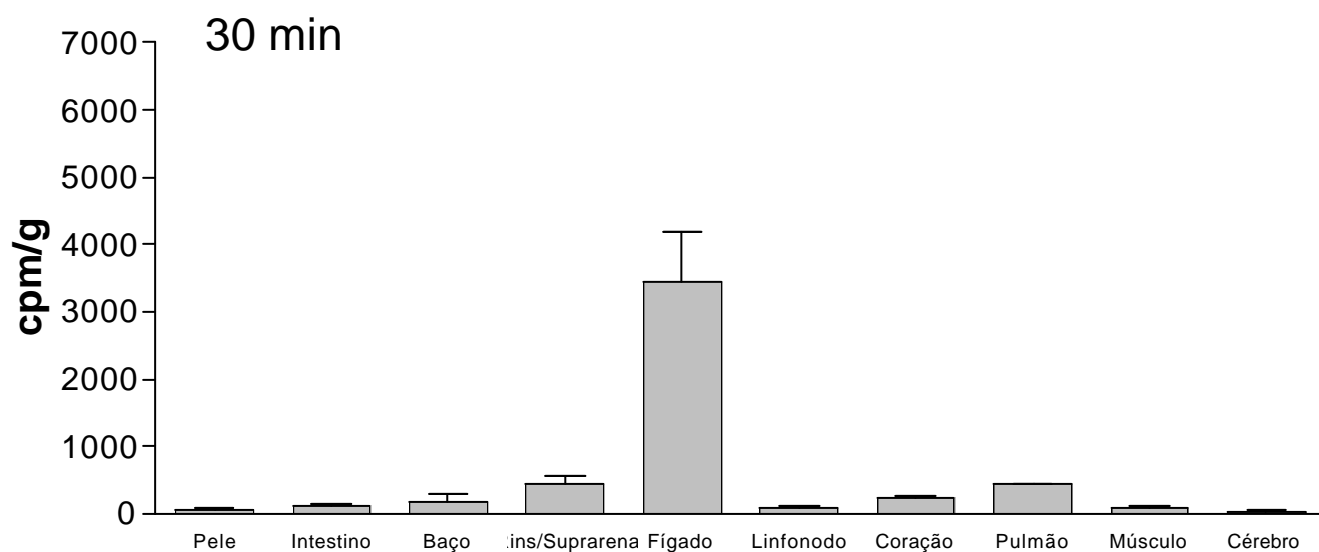
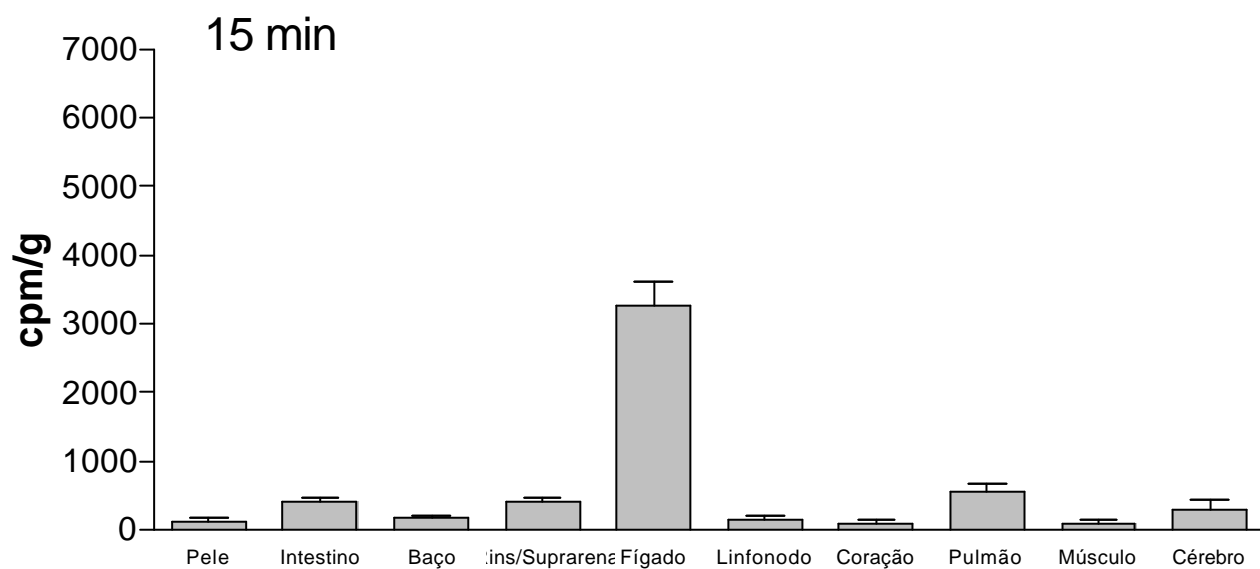
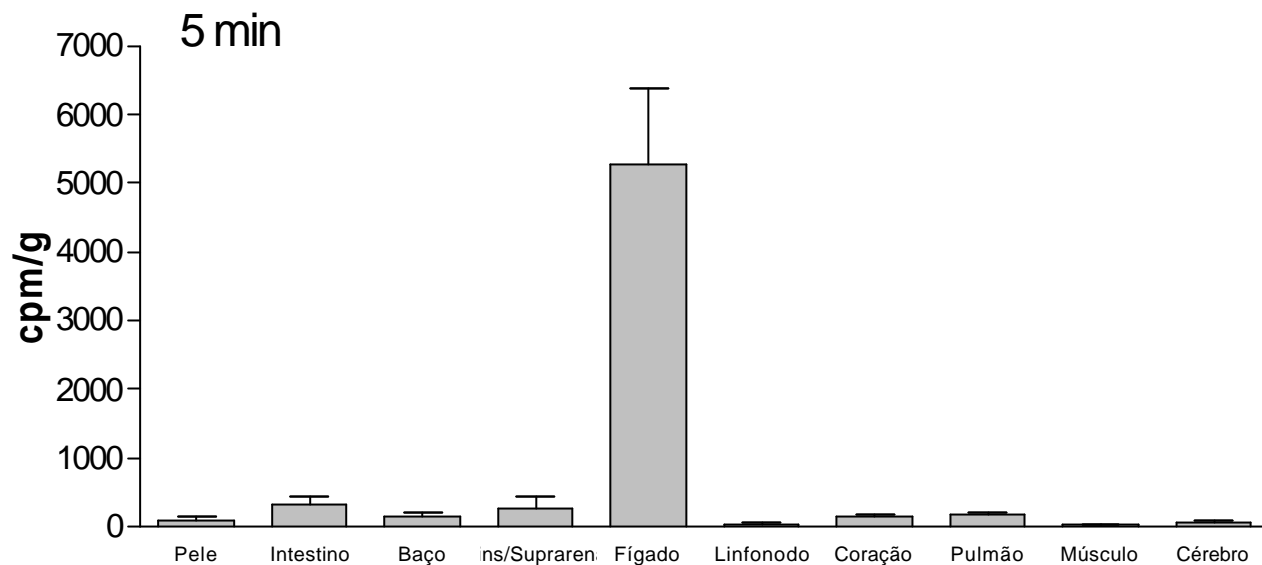


Figura 4. Cinética da depuração plasmática da nanoemulsão LDE/7KC marcada com ^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol administrado pela via endovenosa em camundongos C57Bl/6J.

BIODISTRIBUIÇÃO DA NANOEMULSÃO LDE/7KC

A biodistribuição da nanoemulsão LDE/7KC foi realizada pela retirada de diferentes órgãos, pesagem e extração lipídica para quantificação dos diferentes lipídios marcados radiativamente (^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol). Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 5.



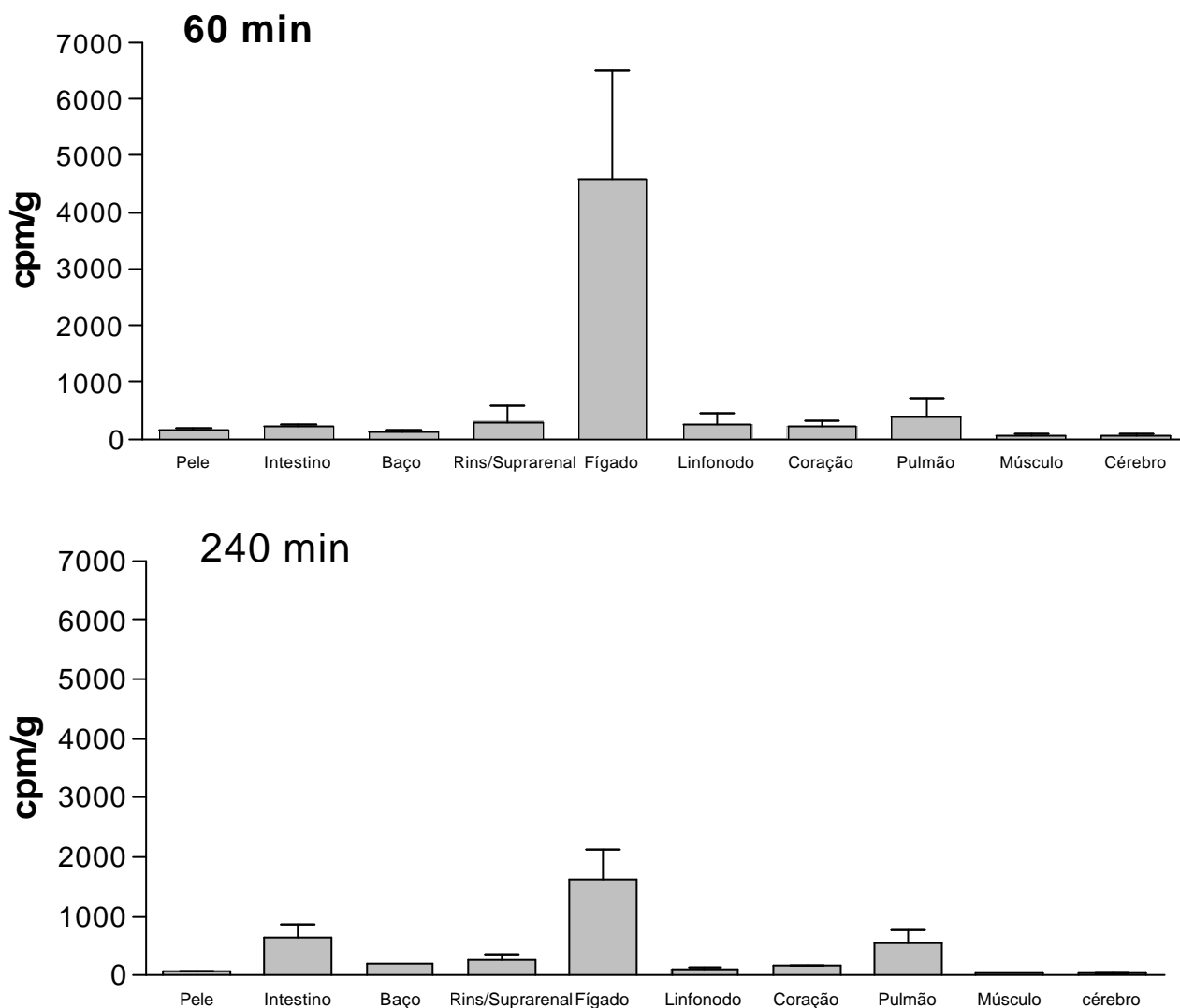


Figura 5. Biodistribuição tecidual da nanoemulsão LDE/7KC em camundongos C57Bl/6J. Captação tecidual de ^3H -7KC de LDE/7KC injetado pela via endovenosa. Após 5 minutos, 15 min, 30 min, 60 min e 240 min da administração endovenosa da nanoemulsão.

Devido à grande afinidade por componentes lipídicos e pela alta concentração de receptores Apo B/E, o fígado, como esperado, foi o órgão no qual houve o maior acúmulo dos compostos radioativos, sugerindo certa similaridade da nanoemulsão LDE/7KC com a lipoproteína natural.

CINÉTICA DE DEPURAÇÃO PLASMÁTICA DA NANOEMULSÃO LDE/7KC EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA B16F10

Camundongos C57Bl/6J de aproximadamente 2 meses de idade e pesando em média 20g, foram implantados com 5×10^4 células na região dorsal. Após o aparecimento da massa tumoral palpável (cerca de 10 dias) os camundongos foram inoculados com a nanoemulsão LDE/7KC com ^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol no plexo retro-orbital. Após diferentes períodos o sangue foi coletado e os animais sacrificados e retirado os seus órgãos internos e a pele.

A figura 6 mostra a cinética de depuração plasmática nos animais portadores de melanoma, nos quais houve um padrão semelhante ao dos animais do grupo controle (figura 4), com um decaimento plasmático de ^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol associado à distribuição tecidual da nanoemulsão.

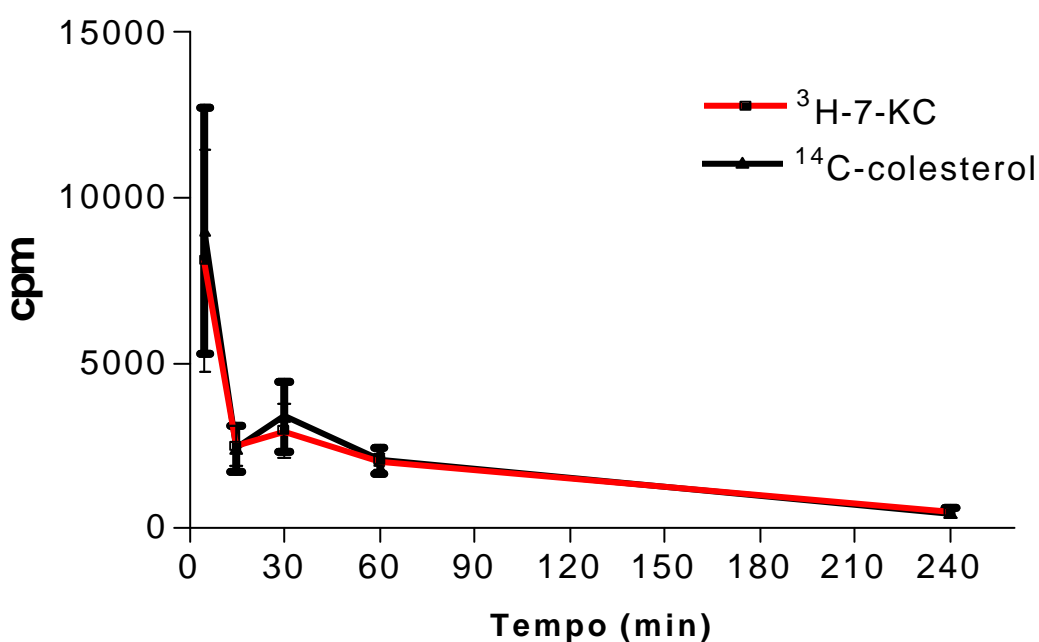


Figura 6. Cinética da depuração plasmática da nanoemulsão LDE/7KC (^3H -7KC e ^{14}C -Colesterol) em camundongos C57BL/6J implantados com 5×10^4 células de melanoma (B16F10).

A comparação entre o ^3H -7KC da nanoemulsão LDE/7KC entre os grupos controle (figura 4) e com implante tumoral (figura 6) estão representados na figura 7, para esta comparação os cpms foram convertidas em porcentagem, em relação ao cpm inicial. Nota-se um decaimento inicial mais rápido nos animais portadores de melanoma nos primeiros quinze minutos, após o que as curvas se tornam semelhantes.

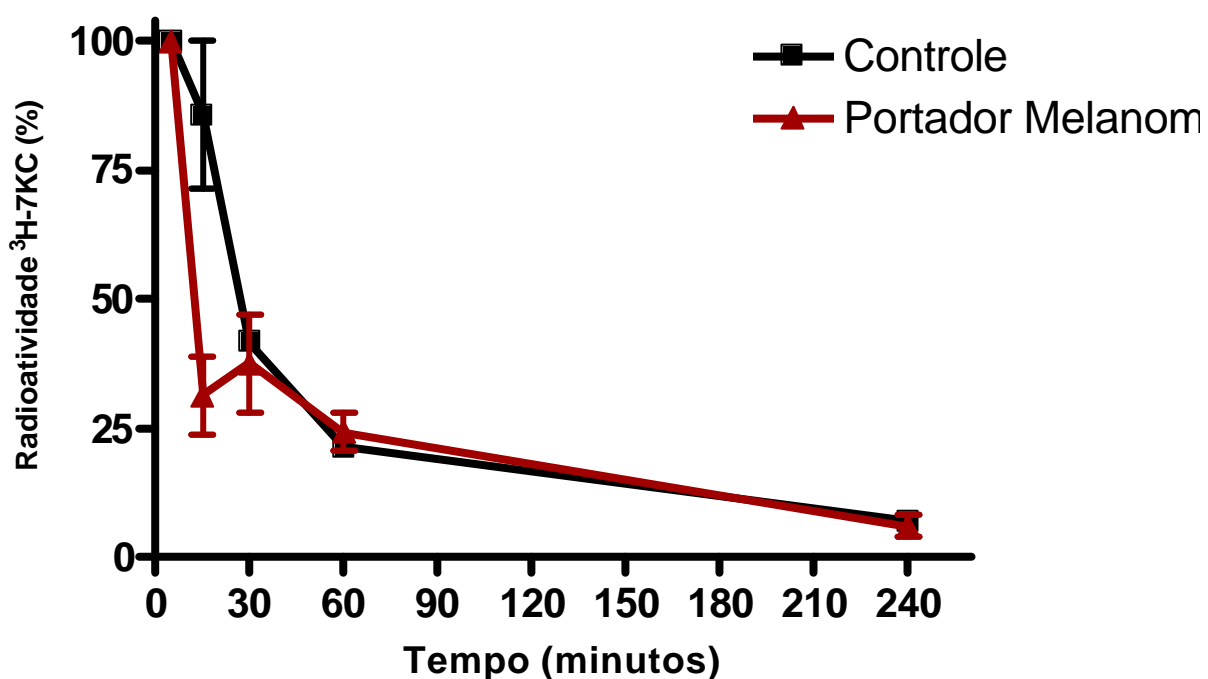
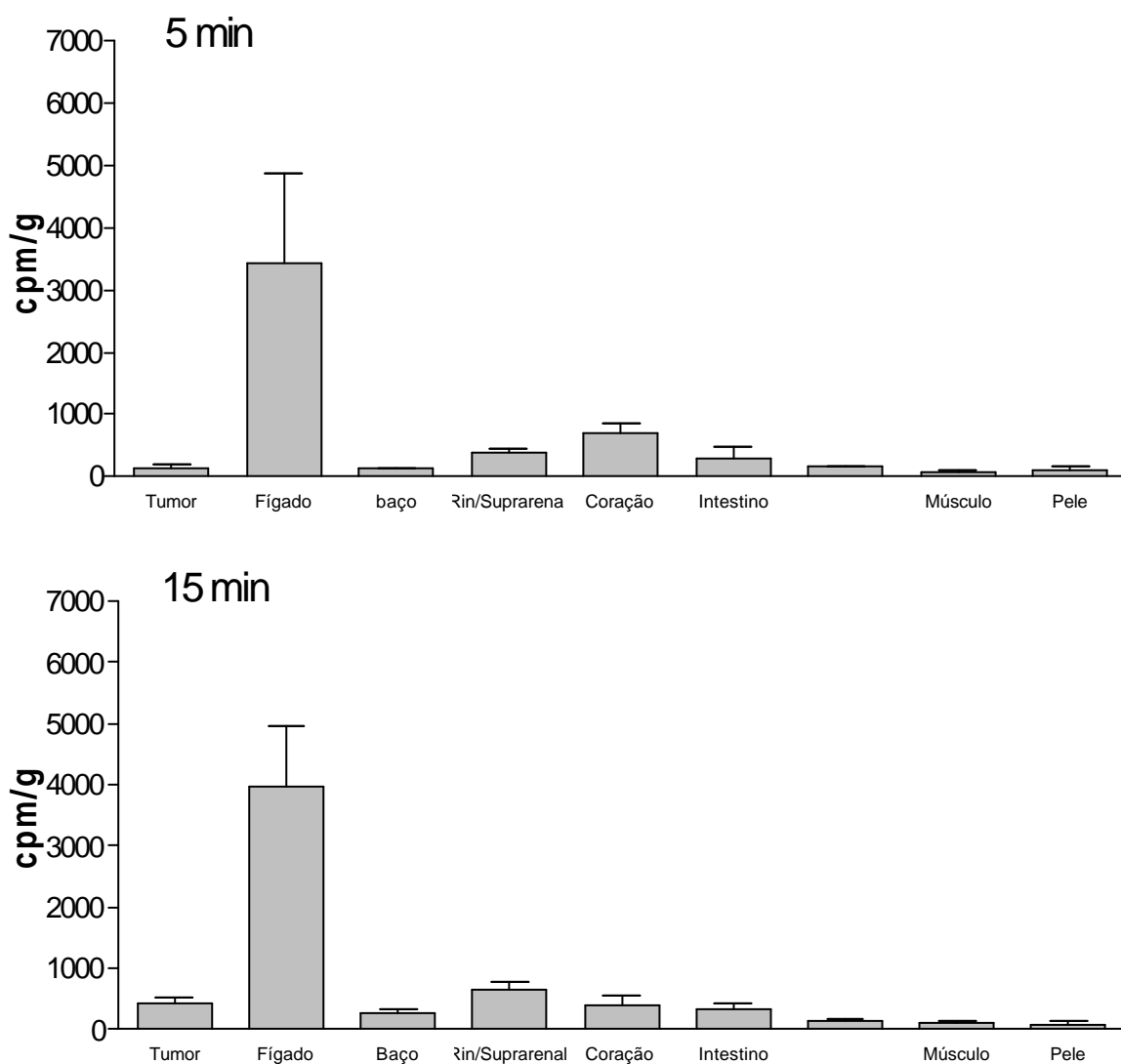


Figura 7. Cinética da depuração plasmática da nanoemulsão LDE/7KC (^3H -7KC) em camundongos C57BL/6J controle e portadores de melanoma.

BIODISTRIBUIÇÃO DE LDE/7KC EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA B16F10

A nanoemulsão LDE/7KC foi administrada endovenosamente pelo plexo retro-orbital nos camundongos portadores de melanoma. A figura 8 demonstra a distribuição tecidual de lipídios marcados radioativamente incorporados à partícula.



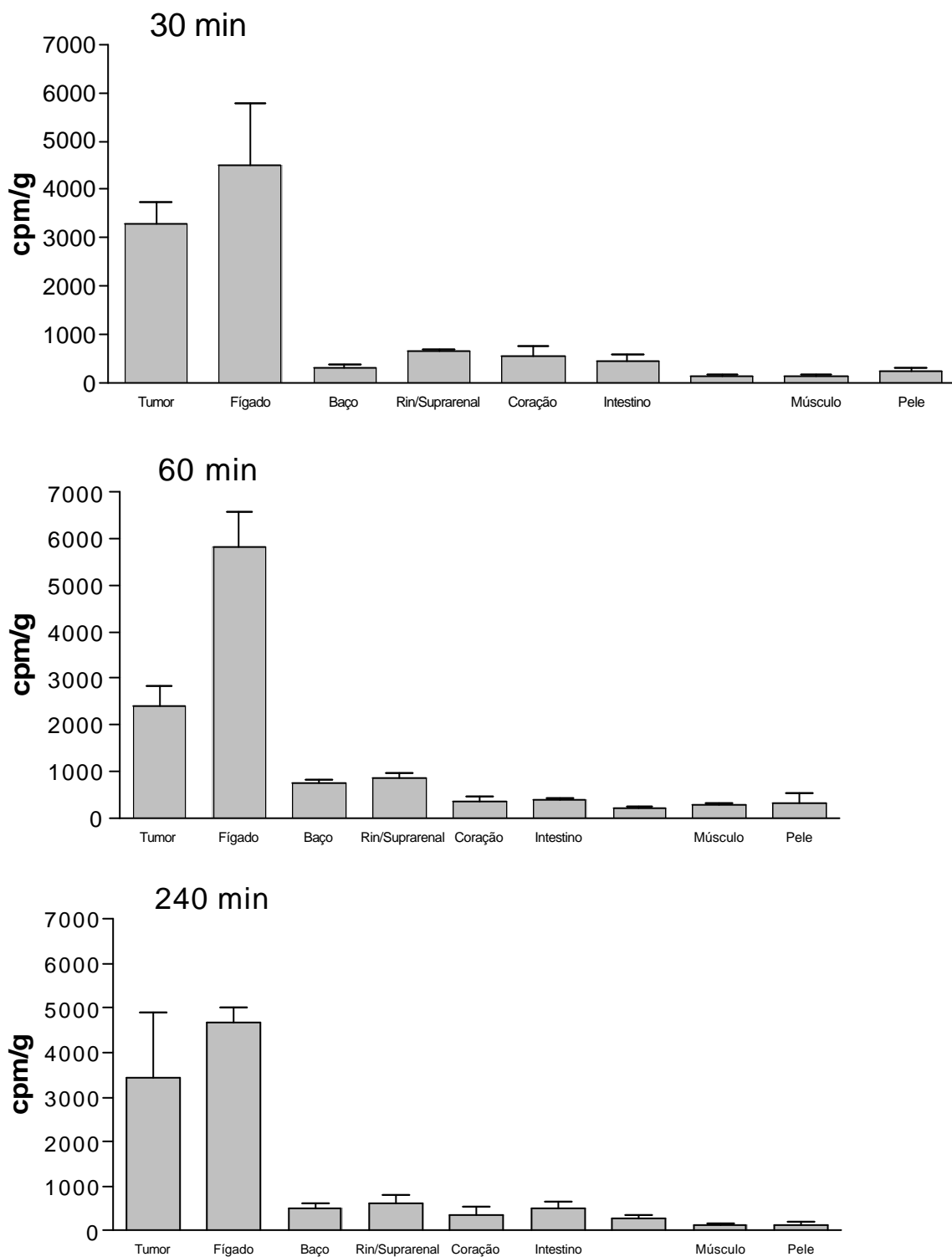


Figura 8. Biodistribuição tecidual de LDE/7KC em camundongos C57BL/6J implantados com 5×10^4 células de melanoma B16F10. Captação tecidual de ^3H -7KC de LDE/7KC administrado via endovenosa, os valores correspondem ao tempo de 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 240 minutos após a aplicação da emulsão.

Assim como nos animais controles que não receberam o implante tumoral, o fígado foi o órgão de maior captação da nanoemulsão LDE/7KC nos primeiros 60 minutos, seguido pelo tumor. Após 240 minutos a captação da nanoemulsão LDE/7KC pelo fígado e tumor são estatisticamente iguais, demonstrando o direcionamento deste composto ($p < 0,05$.ANOVA).

Os dados apresentados na figura 9 demonstram em separado a captação da nanoemulsão pelo fígado e pela massa tumoral. Nossos resultados mostram que com o passar do tempo há acúmulo de ^3H 7-KC na massa tumoral.

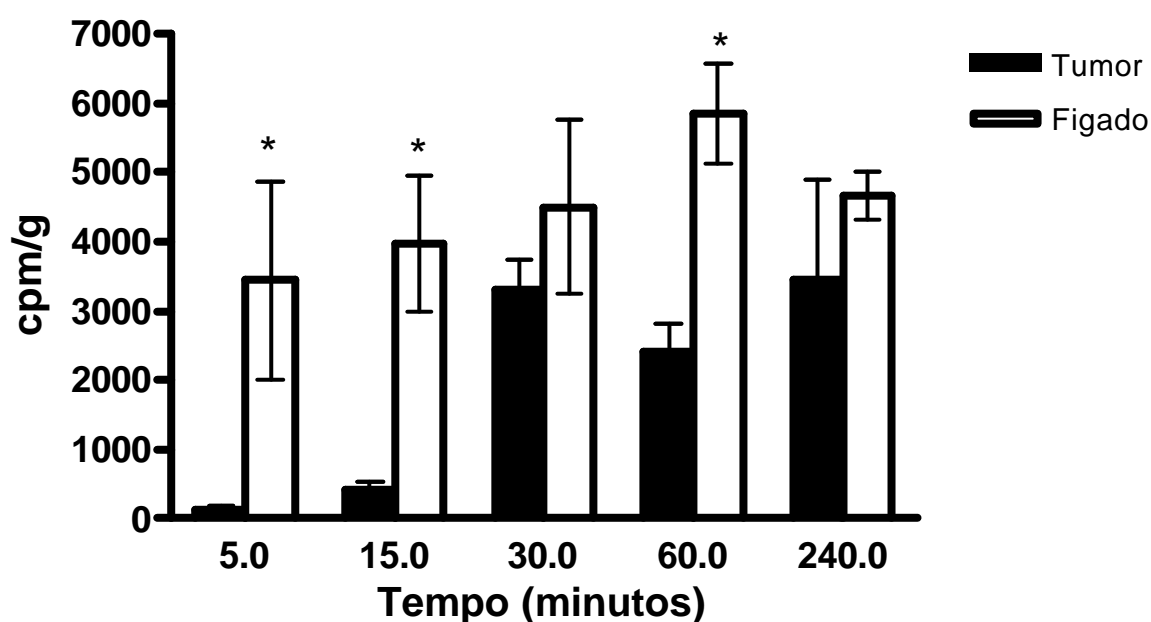


Figura 9. Distribuição da nanoemulsão LDE/7KC no fígado e no tumor em camundongos C57Bl/6J. Captação tecidual de ^3H -7KC de LDE/7KC administrado via endovenosa. ANOVA, $p < 0,05$.

AÇÃO ANTI-TUMORAL DA NANOEMULSÃO LDE/7KC EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA B16F10

Os camundongos C57Bl/6J foram injetados com 5×10^4 células B16 F10 no dorso em uma região previamente tricotomizada. Após o desenvolvimento visível e palpável do tumor, cerca de 10 dias (diâmetro médio de 0,5cm), a massa corporal e o volume do tumor foram medidos. Utilizamos, primeiramente, uma dose única intraperitoneal seguindo as mesmas concentrações dos experimentos da dose letal e máxima dose tolerável. A figura 10 mostra a progressão tumoral nas diferentes concentrações de tratamento com a nanoemulsão LDE/7KC. A dose máxima de 20 mg/Kg demonstrou efeito inibitório significativo quando comparado as demais concentrações administradas.

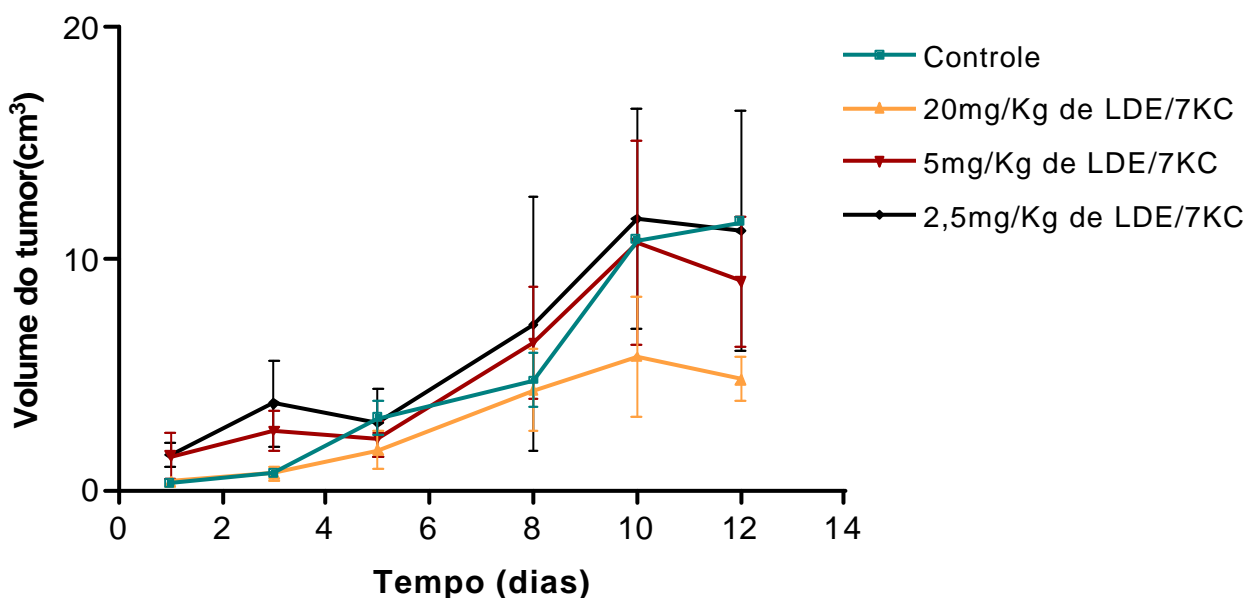


Figura 10. Gráfico do volume tumoral após diferentes tratamentos com a nanoemulsão LDE/7KC nos tumores (B16F10) em camundongos C57Bl/6J. $p < 0,05$, Teste de variação de ANOVA.

O tratamento com a nanoemulsão LDE/7KC na dose única de 20mg/Kg levou a uma diminuição de 59% do volume tumoral, além de aumentar a sobrevivência dos camundongos como observado na figura 11.

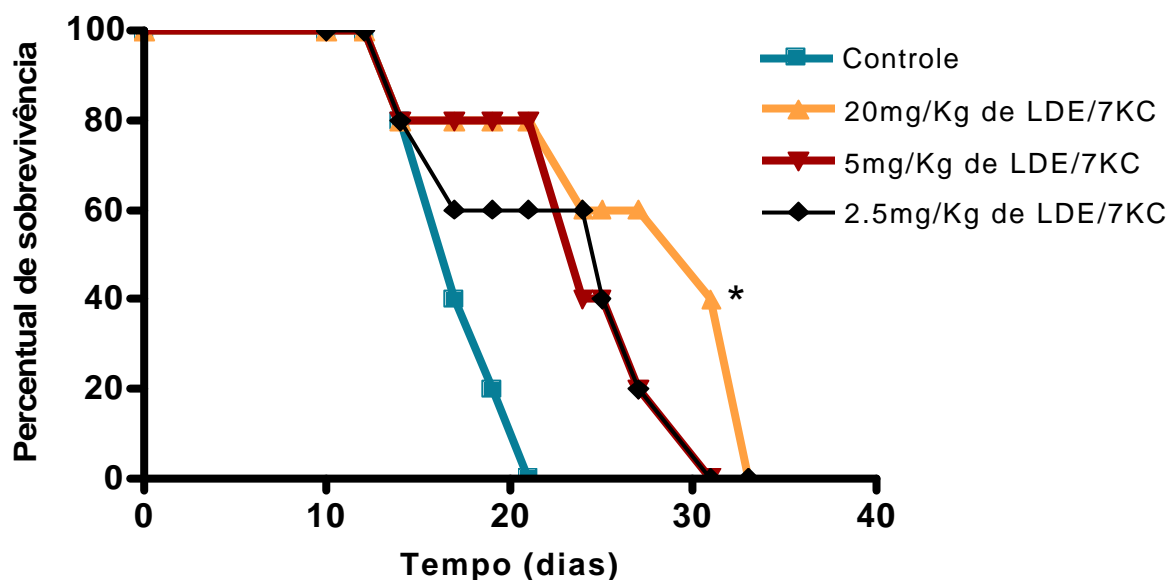


Figura 11- Percentual de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 após a administração intraperitoneal da nanoemulsão LDE/7KC. * $p < 0,01$ - Análise de Contingência.

Levando em consideração a regressão significativa da massa tumoral com o tratamento na dose única de 20mg/Kg da nanoemulsão LDE/7KC, fracionamos esta dose, em pequenas quantidades diárias, no intuito de analisar a resposta ao tratamento e diminuir o volume injetado. A figura 12 mostra os resultados deste experimento de doses fracionadas da nanoemulsão LDE/7KC na concentração de 2mg/Kg diários por 10 dias de tratamento.

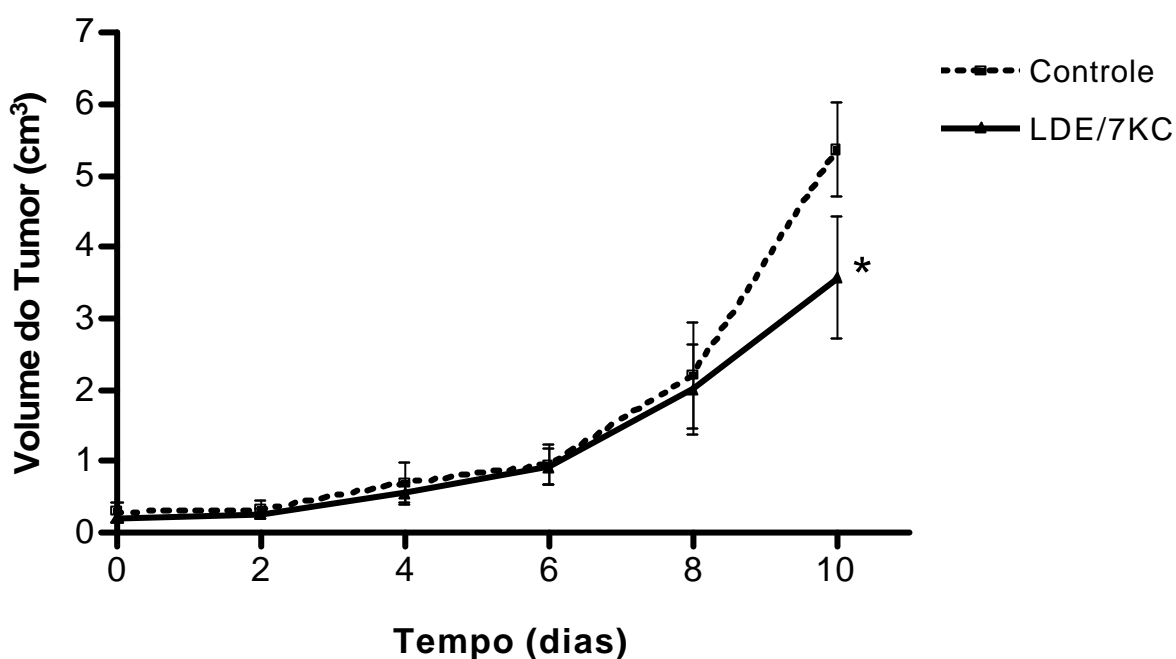


Figura 12- Gráfico do volume tumoral após diferentes tratamentos com a nanoemulsão LDE/7KC nos tumores (B16F10) em camundongos C57Bl/6J.
* $p < 0,05$, test t de Student.

A dose diária induziu a uma diminuição de 34% do volume tumoral, sendo menos eficaz que a dose única, que reduziu 59% do tumor. A partir deste resultado administramos LDE/7KC em dias alternados. A figura 13 demonstra o resultado obtido com esta estratégia terapêutica; neste experimento, também comparamos o efeito da LDE neste modelo experimental. A taxa de sobrevivência está mostrada na figura 14.

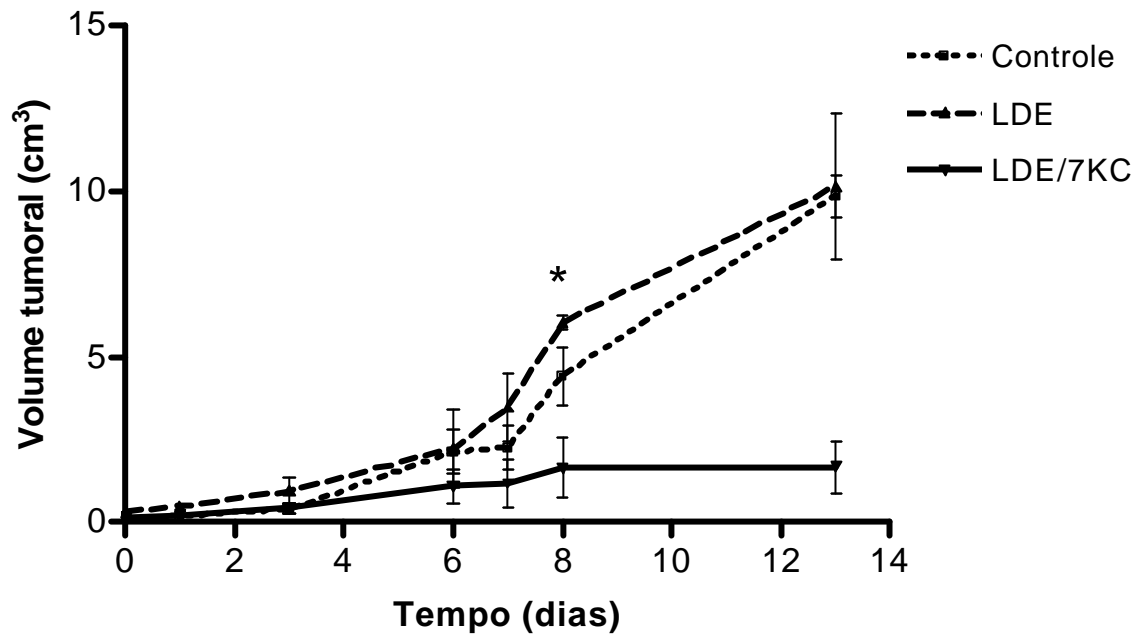


Figura 13- Gráfico do volume tumoral após diferentes tratamentos com a nanoemulsão LDE/7KC nos tumores (B16F10) em camundongos C57Bl/6J. A administração de doses em dias alternados de 2mg/Kg da nanoemulsão LDE/7KC. * $p < 0,05$, ANOVA.

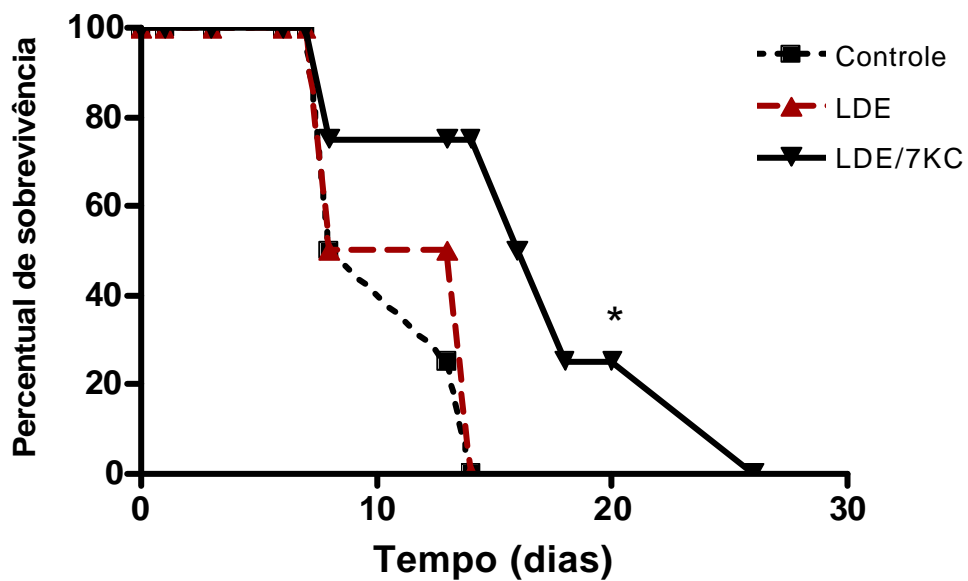


Figura 14- Percentual de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 após a administração intraperitoneal da nanoemulsão LDE/7KC. * $p < 0,01$ - Análise de Contingência.

SINERGISMO FARMACOLÓGICO ENTRE SINVASTATINA E A NANOEMULSÃO LDE/7KC

Sinvastatina é comumente utilizada como hipolipemiante, devido ao bloqueio da síntese endógena do colesterol. Desta maneira as células, principalmente as hepáticas, aumentam o número de receptores para LDL, captando mais lipoproteínas e diminuindo o colesterol circulante. Levando em consideração estes efeitos, os animais foram tratados com a sinvastatina associada à nanoemulsão LDE/7KC, já que a emulsão atua via receptores de LDL. A hipótese seria que a diminuição intracelular de colesterol causado pela administração de sinvastatina, aumentaria a captação da nanoemulsão LDE/7KC, pelo aumento do número de receptores B/E.

As figuras 15, 16 e 17 são representativas dos experimentos realizados com dose de 5 mg/Kg/dia de sinvastatina associado a doses em dias alternados de 2mg/Kg da nanoemulsão LDE/7KC, onde foram analisados os seguintes parâmetros: volume tumoral e taxa de sobrevivência. Nossos resultados mostram que o tratamento com LDE/7KC isoladamente e associada à sinvastatina não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Surpreendentemente, a sinvastatina *per se* apresentou um efeito inibitório sobre o crescimento tumoral comparável ao da nanoemulsão; porém a taxa de sobrevida foi maior no tratamento com LDE/7KC.

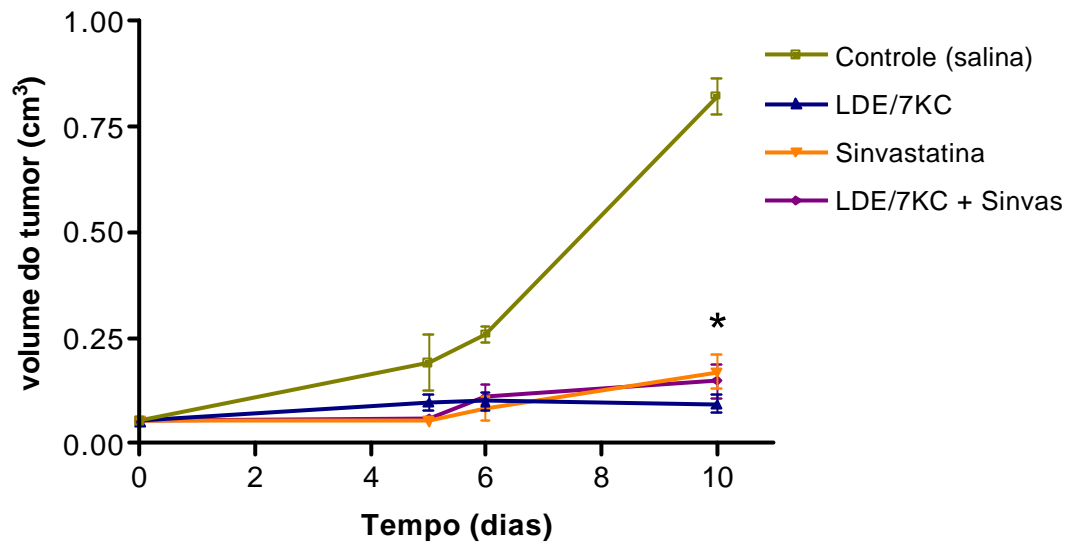


Figura 15- Gráfico do volume tumoral após diferentes tratamentos com a nanoemulsão LDE/7KC nos tumores (B16F10) em camundongos C57Bl/6J. *Análise estatística, ANOVA, $p < 0,05$.

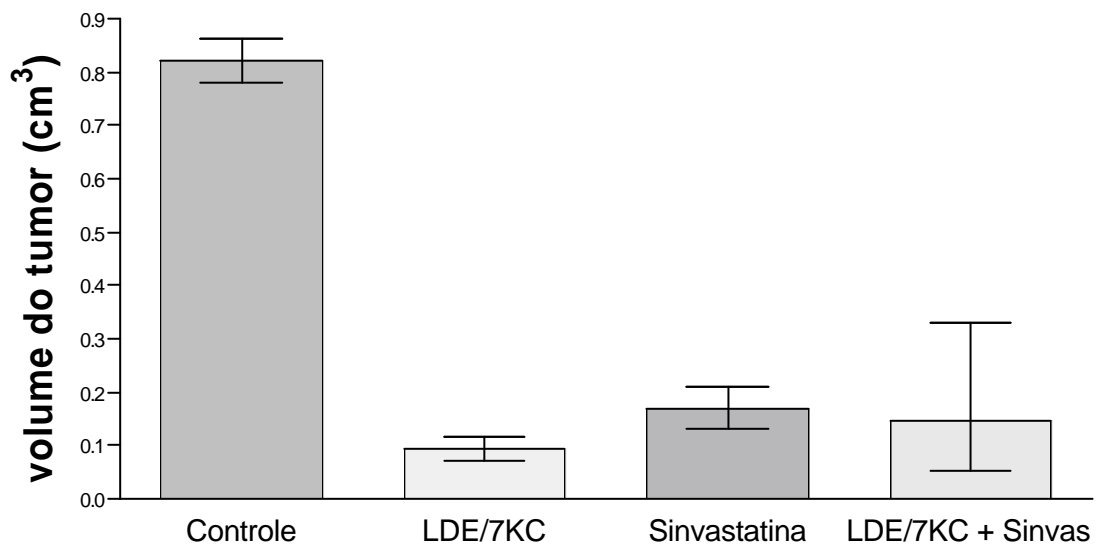


Figura 16- Gráfico comparativo nos camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma, tratamento com doses diárias de 5mg/Kg/dia de sinvastatina e doses alternadas de 2mg/Kg de LDE/7KC, e sinvastatina associada a LDE/7KC.

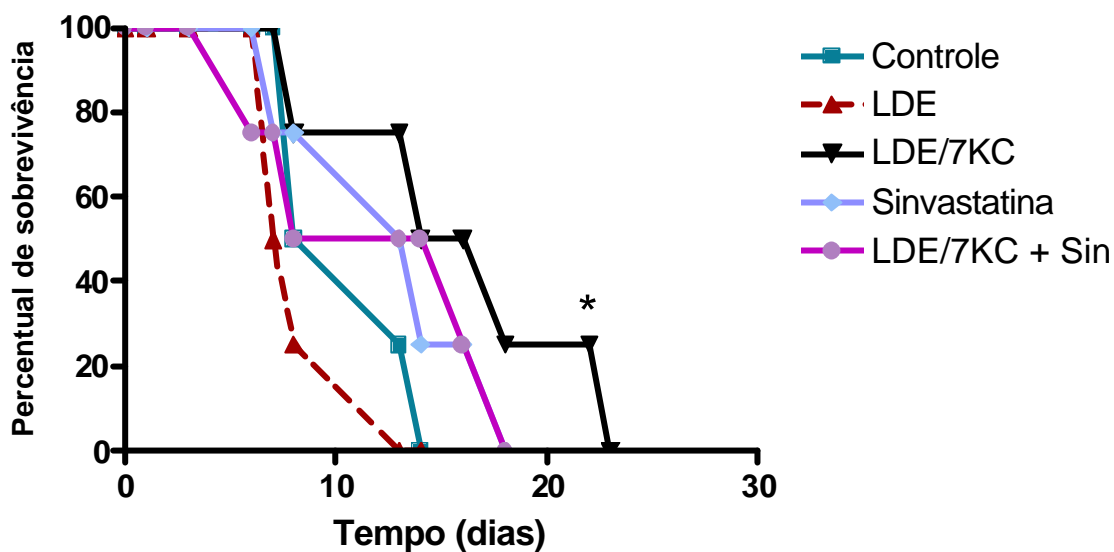


Figura 17- Percentual de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma B16F10 após a diferentes tratamentos. * $p < 0,01$ - Análise de Contingência.

A diminuição do crescimento dos tumores nos diferentes tratamentos com a nanoemulsão LDE/7KC nos levou a observar os efeitos da nanoemulsão sobre o fígado e a medula óssea e uma possível atividade tóxica.

ANÁLISE DO PERFIL DE ENZIMAS HEPÁTICAS DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Para avaliar os efeitos sobre o fígado foram avaliadas três enzimas, a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), a transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e a gama glutamil transferase (gama-GT).

A transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase (AST), está presente no hepatócito, na musculatura estriada (coração e músculos esqueléticos) e em menor concentração, em outros órgãos como rins, cérebro, pâncreas e em pequena quantidade na musculatura estriada tendo, portanto, maior especificidade para lesão hepática. Durante o catabolismo dos aminoácidos, a AST transfere grupos amino do glutamato ao oxalacetato, formando aspartato, o qual é usado como uma fonte de nitrogênio no ciclo da uréia.

A transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), também chamada de alanina aminotransferase (ALT), é uma enzima que está presente no hepatócito e em pequena quantidade na musculatura estriada tendo, portanto, maior especificidade para lesão hepática. Esta enzima catalisa a transferência do grupo amino da alanina ao alfa-cetoglutarato, resultando na formação de piruvato e glutamato.

A figura 18 mostra os valores de TGO plasmática dos camundongos normais, sem tratamento (grupo Controle), tratado com a nanoemulsão LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sinvastatina), tratados com LDE/7KC associada à sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin), camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co), tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sinvastatina) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

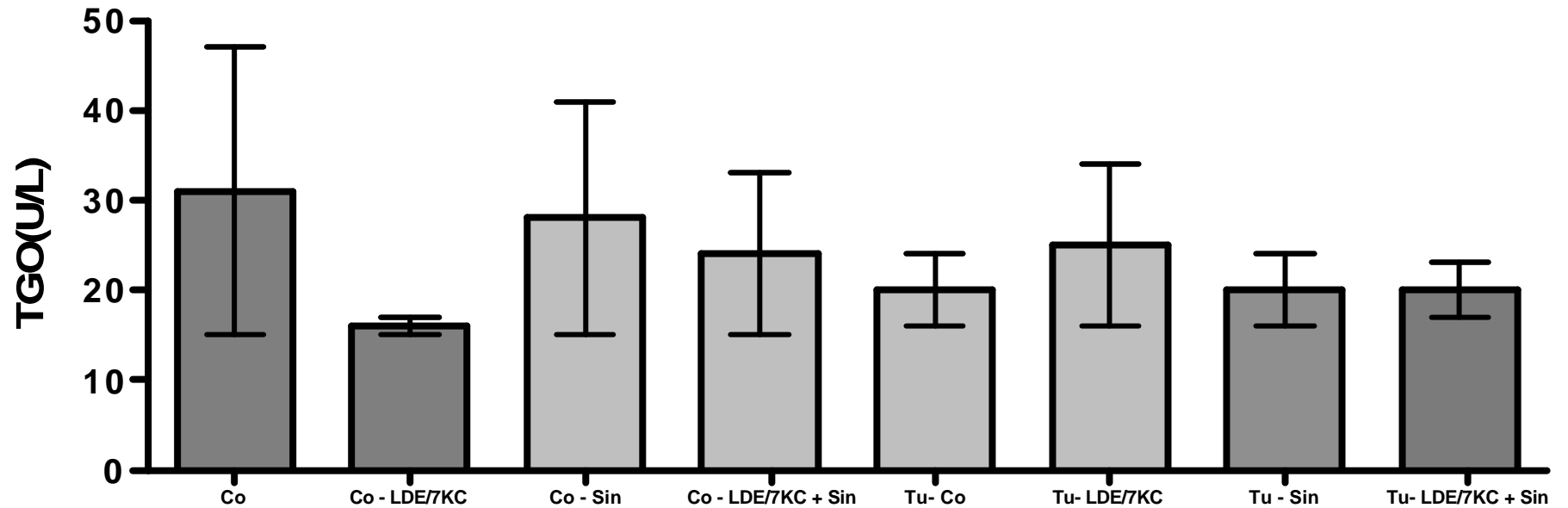


Figura 18- Gráfico da concentração da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) plasmática em camundongos C57BL6/J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

Os diferentes tratamentos não causaram diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática de TGO nos camundongos com implante tumoral. Nos animais sem tumor ocorreu, portanto uma diferença estatisticamente significativa do grupo de camundongos tratados com a nanoemulsão LDE/7KC em relação as demais condições de tratamento.

A figura 19 demonstra os valores de TGP dos grupos de animais normais e animais implantados com melanoma B16F10.

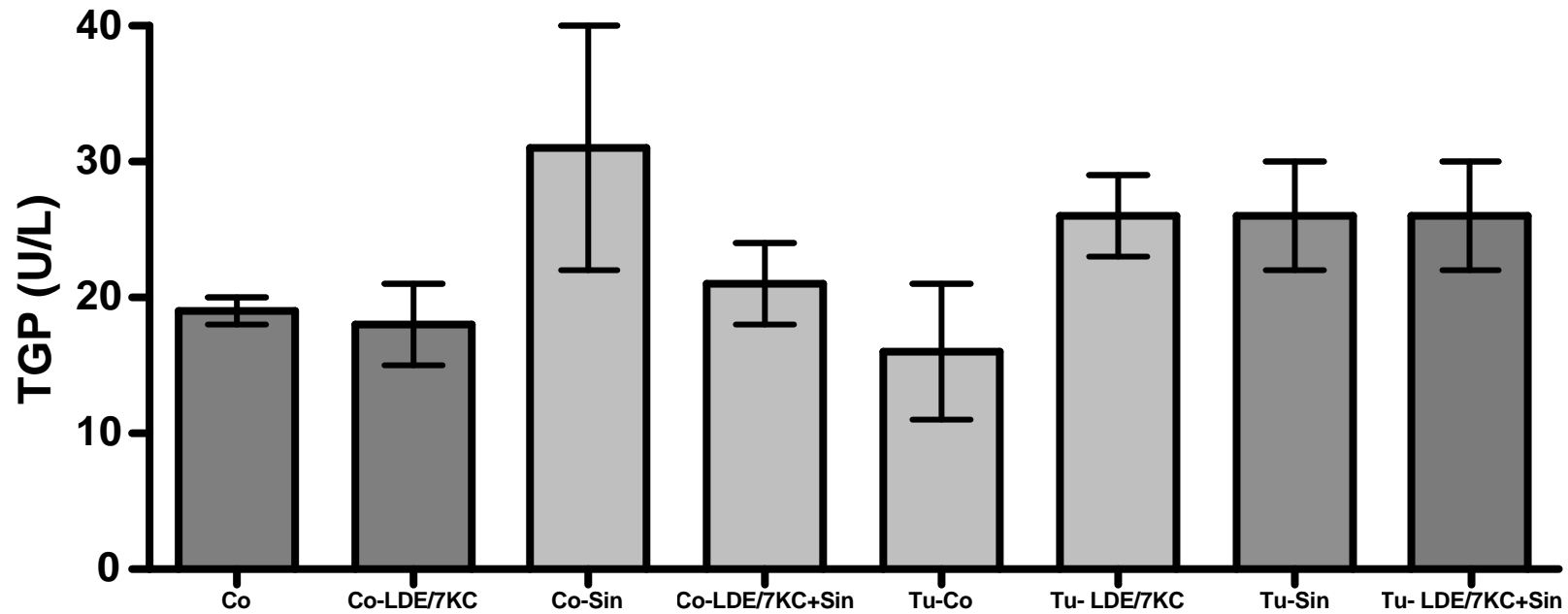


Figura 19- Gráfico da concentração da transaminase glutâmico pirúvica (TGP) plasmática em camundongos C57BL6/J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

As transaminases são normalmente enzimas intracelulares. Um aumento da concentração plasmática predominante de ambas leva ao diagnóstico de lesão hepatocelular, que pode ser aguda como nas hepatites virais, induzida por drogas ou auto-imune, ou doença hepática isquêmica ou crônica, como monitoradores na lesão induzida por etanol, doença hepática gordurosa, hepatite crônica viral, auto-imune ou induzida por drogas.

A gama-GT, gama glutamil transferase, está presente no fígado (tanto em epitélio biliar quanto em hepatócitos) e em outros órgãos, como pâncreas e rins. Esta enzima cataliza a transferência do ácido glutâmico de um peptídeo para outro, ligando-o sempre ao grupo gama-carboxílico. A quantificação de Gama-GT é útil na avaliação de hepatopatias agudas e crônicas, estando a atividade enzimática elevada nos quadros de colestase intra ou extra-hepáticas. Apesar de ser um marcador bastante sensível de doença hepatobiliar, é pouco específica, estando aumentada em outras doenças, como o *diabetes mellitus* e a insuficiência renal. Além disto, alguns medicamentos atuam como indutores, especialmente os barbitúricos, a difenil-hidantoína e os antidepressivos tricíclicos, além do etanol.

A figura 20 demonstra os valores plasmáticos de Gama-GT nos diferentes grupos experimentais: grupo controle e nos grupos de animais portadores de melanoma B16F10. Não houve diferença significativa na concentração plasmática de Gama-GT nos camundongos.

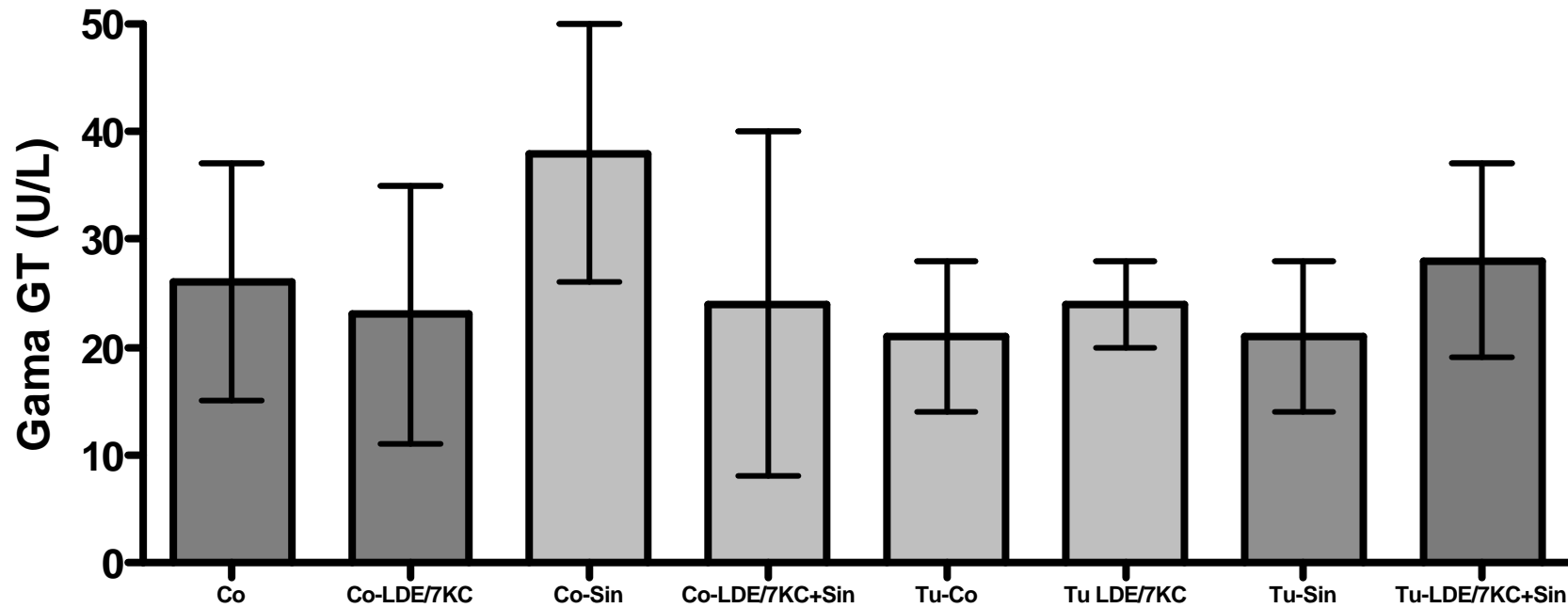


Figura 20- Gráfico da concentração da gama glutamil transferase (Gama-GT) plasmática em camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

ESTUDO DOS PARAMETROS HEMATOLÓGICOS

Alterações hematológicas quantitativas como anemia e mielossupressão em graus variados observados nos tratamentos com os quimioterápicos convencionais; levando isto em consideração, foram avaliados parâmetros hematológicos.

Após 10 dias sob os diferentes tratamentos, os camundongos do grupo controle e portadores de melanoma B16F10 foram submetidos à coleta de sangue, medula óssea e baço, com sedação e posterior sacrifício.

A avaliação da série vermelha, eritrograma, estão demonstradas nas figuras 21, 22 e 23; os resultados demonstram que nenhum dos tratamentos levou à anemia ou eritropenia.

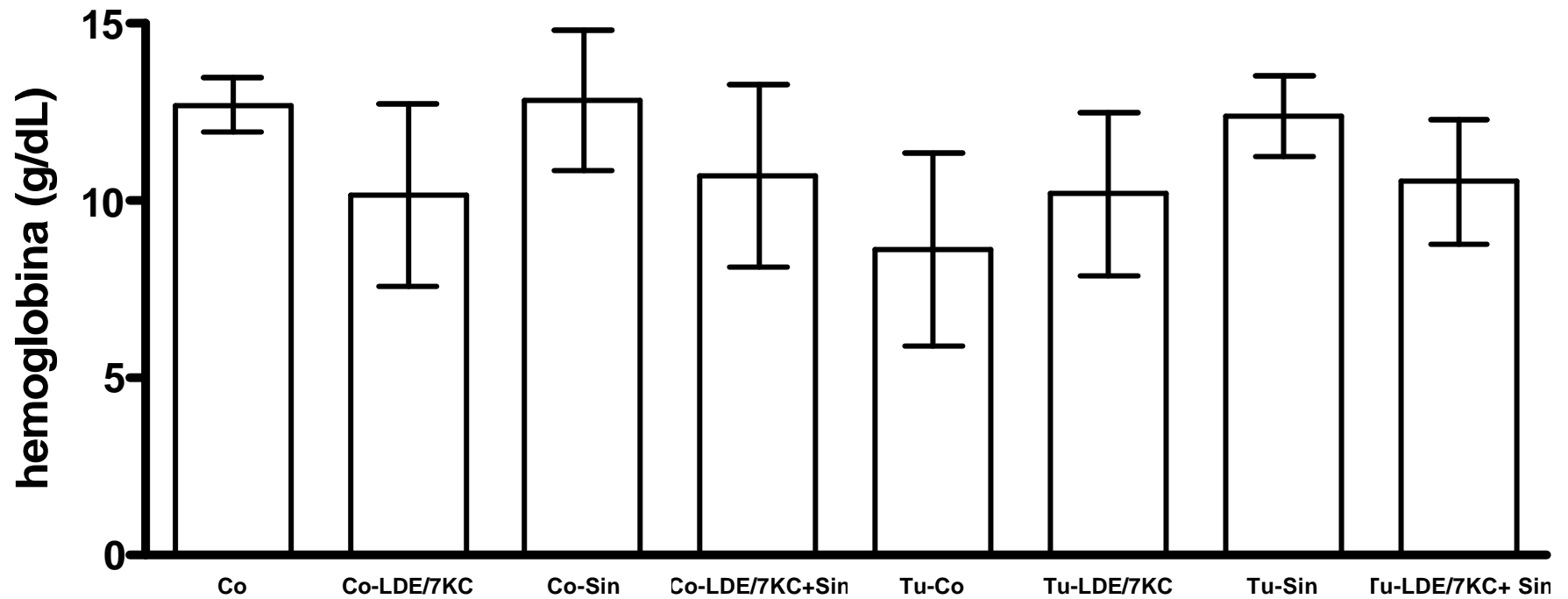


Figura 21- Gráfico da concentração de hemoglobina (g/dL) em camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

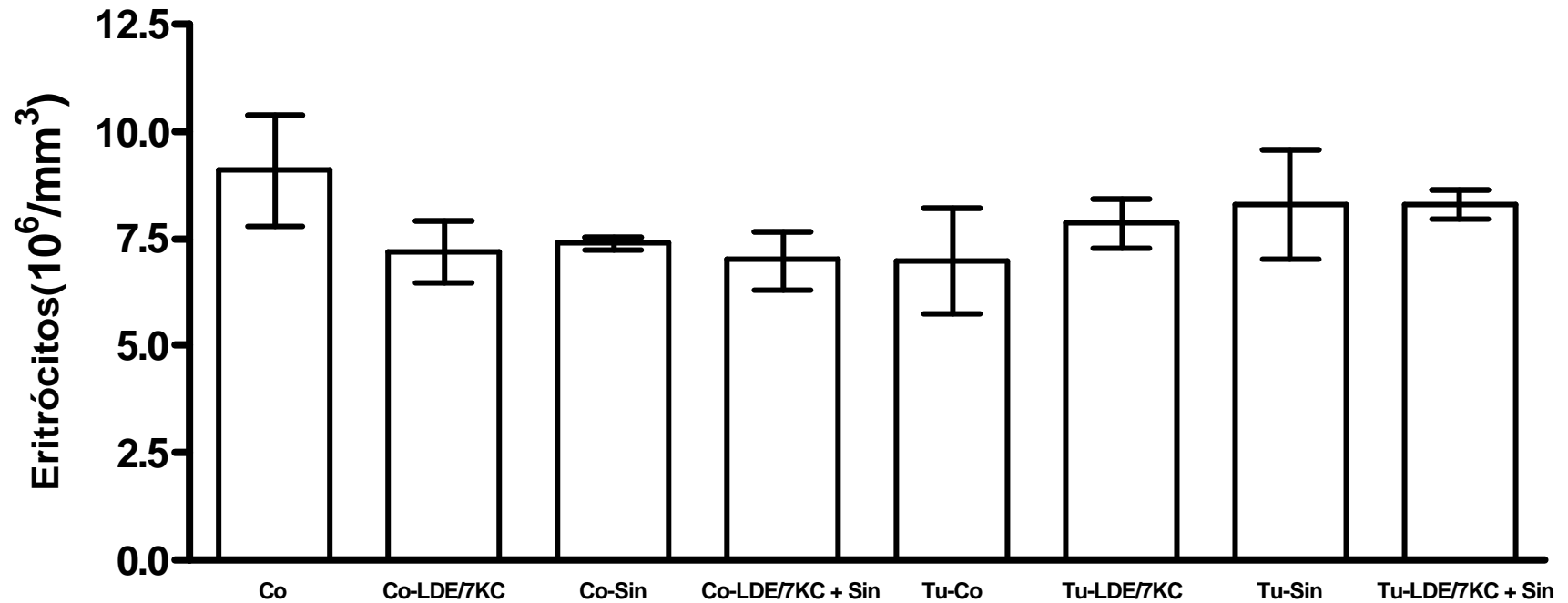


Figura 22- Gráfico da contagem de eritrócitos circulantes em camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) $n=7$, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) $n=7$, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

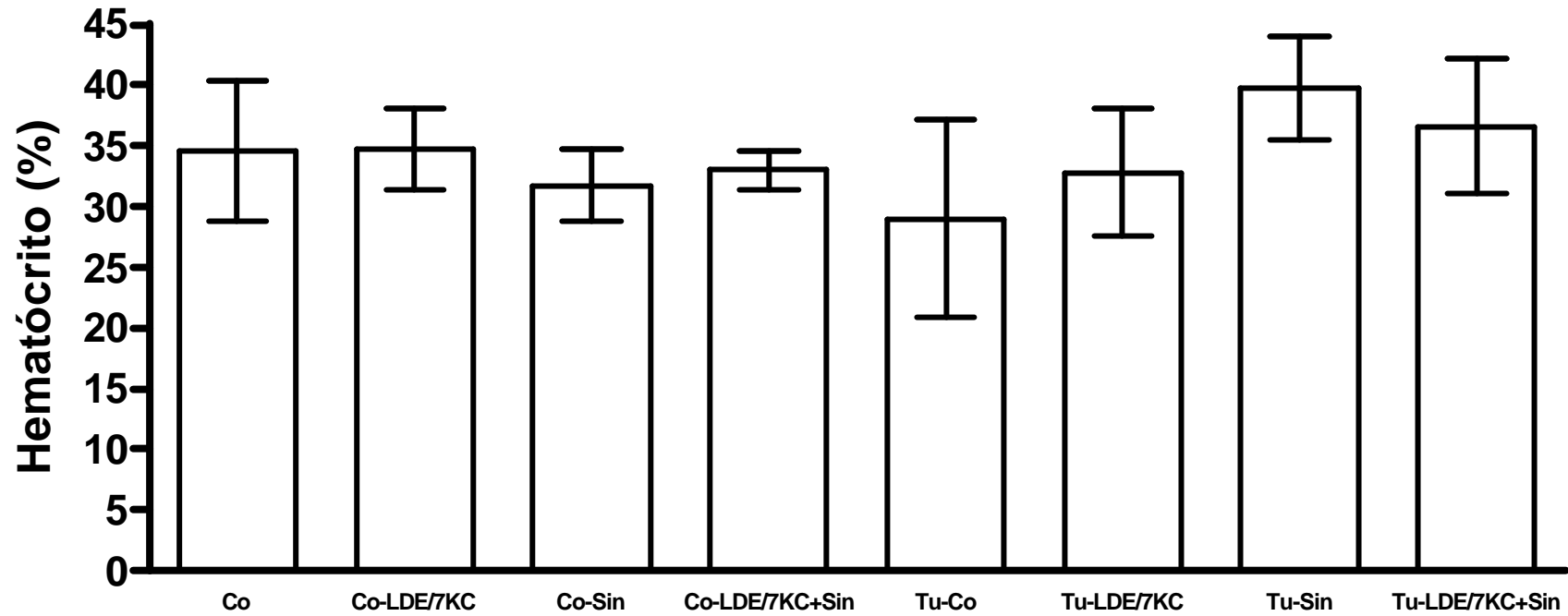


Figura 23- Gráfico dos hematócritos de camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

A série branca, leucograma, também foi analisada. O resultado da contagem total de leucócitos está apresentada na figura 24. A contagem diferencial apresentou diferença significativa apenas na contagem de eosinófilos, figura 25. Os camundongos com implante tumoral e tratados com LDE/7KC associado à sinvastatina diária e o grupo tratado com sinvastatina, apresentaram maior porcentagem de eosinófilos em relação aos demais animais portadores de tumor; porém, quando comparados aos camundongos controle, não houve diferença estatisticamente significativa.

A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos não foi estatisticamente diferente (dados não mostrados).

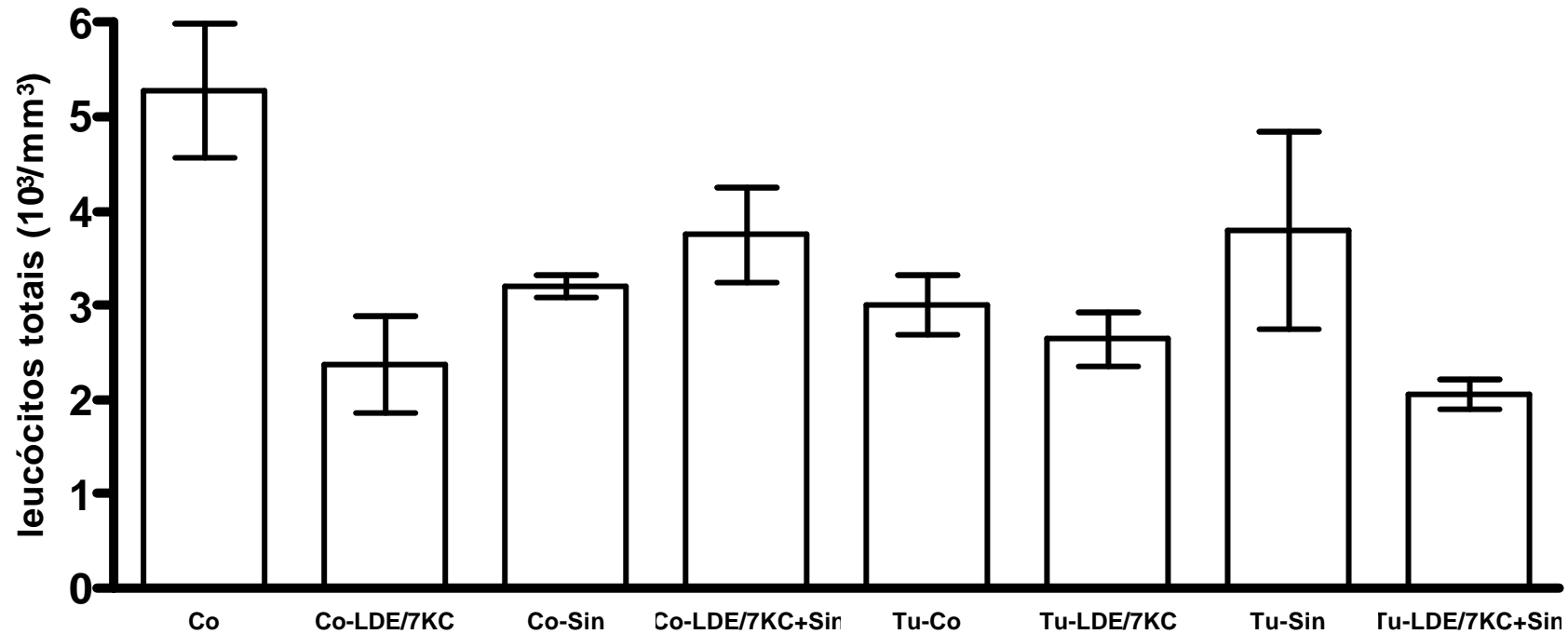


Figura 24- Gráfico do total de leucócitos em camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin).

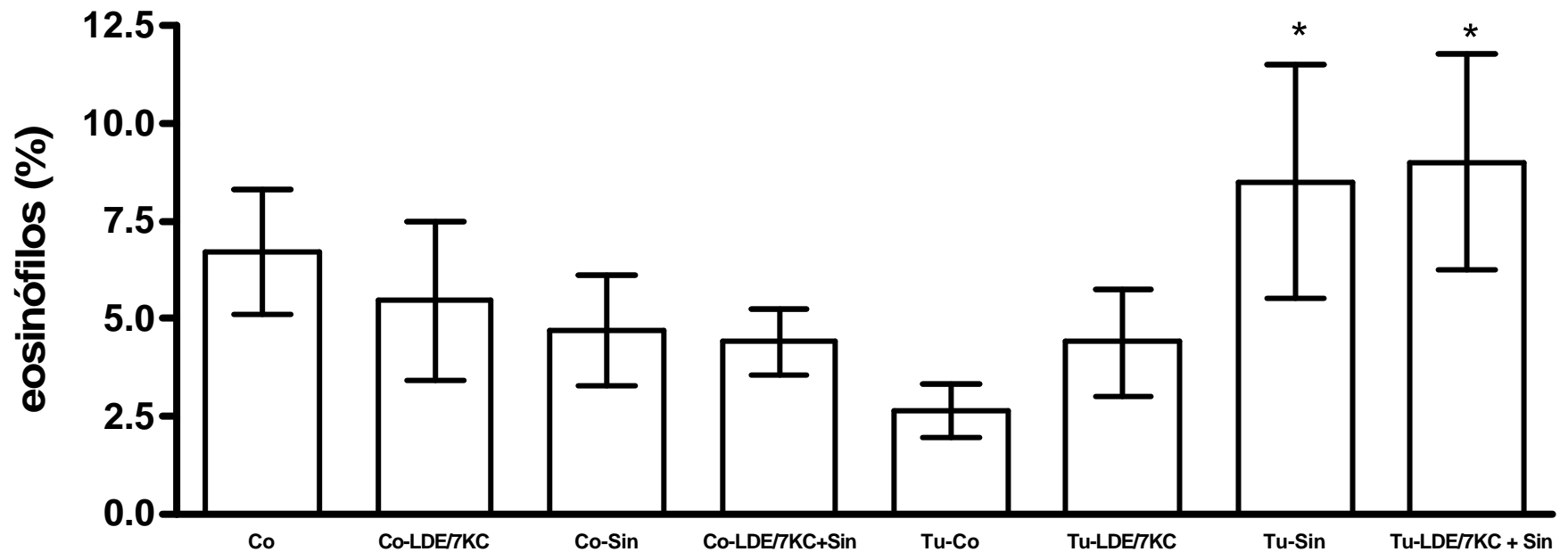
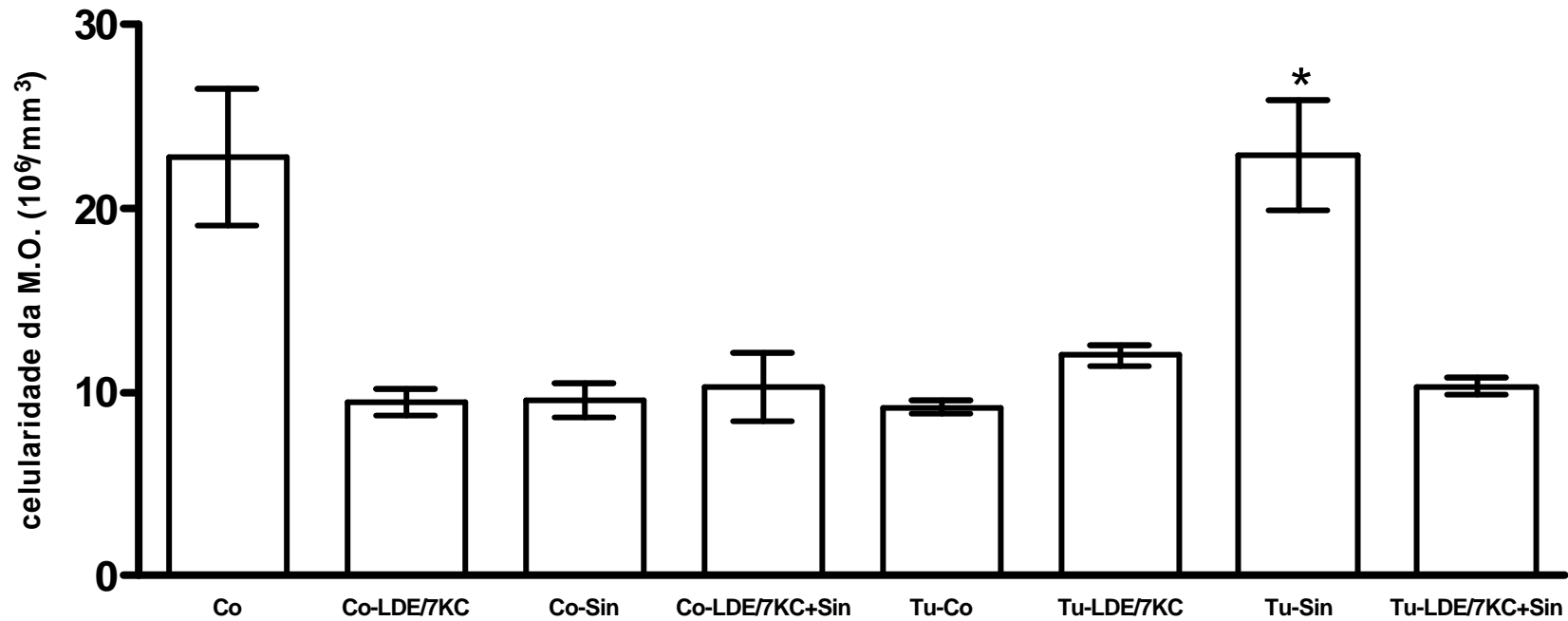


Figura 25- Gráfico da porcentagem de eosinófilos de camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin). *Análise estatística, ANOVA, $p < 0,05$. Diferença estatística estabelecida entre os camundongos com implante tumoral.

Para uma avaliação dos efeitos tóxico-hematológicos, comumente observados em tratamentos quimioterápicos clássicos, como mielossupressão, avaliamos o aumento ou diminuição das populações celulares da medula óssea dos camundongos portadores do melanoma e tratados com a nanoemulsão LDE/7KC. Foram quantificados a celularidade total da medula óssea (figura 26) e a porcentagem de promielócitos, plasmócitos, blastos totais, eritroblastos e megacariócitos (dados não mostrados). Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem diferencial das células da medula óssea. A contagem de células totais da medula óssea demonstrou menor quantidade de células nos animais submetidos à LDE/7KC, LDE/7KC associado à sinvastatina e à sinvastatina *per se* comparado ao grupo sem tratamento. Interessantemente os camundongos portadores de melanoma tratados com sinvastatina apresentaram maior celularidade quando comparados aos demais camundongos portadores de melanoma e não portadores tratados, sendo estatisticamente iguais aos camundongos controle, sem tratamento.



F

Figura 26- Gráfico do número total de células da medula óssea de camundongos C57BL/6J. Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin). *Análise estatística, ANOVA, $p < 0,05$.

Esplenograma

Alterações no sistema imunológico estão relacionadas à progressão tumoral e a interação das drogas sobre os órgãos produtores e maturadores dos leucócitos. Dentre os locais de maturação de linfócitos, estudamos em particular o baço. O baço é o único órgão linfóide interposto na circulação sanguínea, além de ser o maior acúmulo de tecido linfóide no organismo (Junqueira e Carneiro, 1995). Devido ao contato íntimo com o sangue, o baço está pronto para responder a estímulos, positivos ou negativos, trazidos pelo sangue. Em roedores, ao contrário da espécie humana, o baço continua a ser um produtor de células hematológicas. A contagem da celularidade do baço é mostrada na figura 27. Os camundongos portadores de melanoma tratados com LDE/7KC, sinvastatina e LDE/7KC associada à sinvastatina apresentaram menor número de células em relação aos demais grupos, sendo iguais entre si.

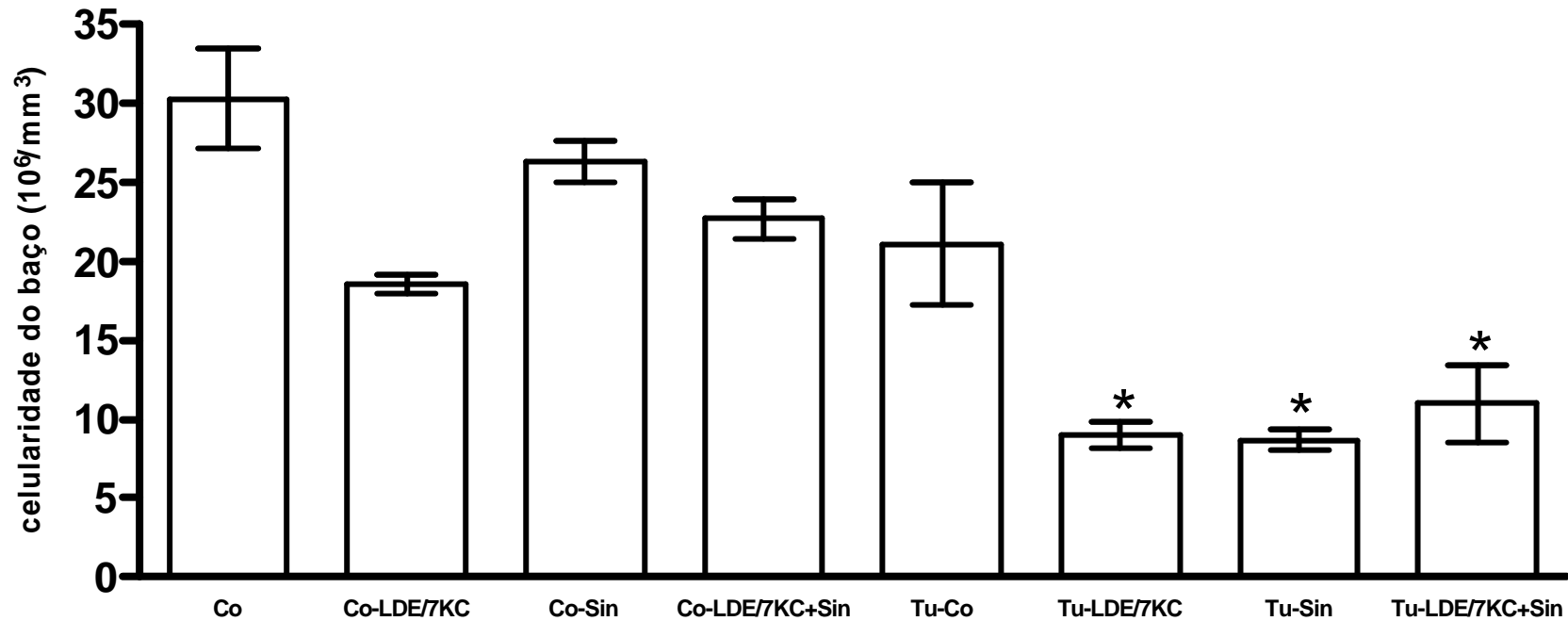


Figura 27- Gráfico do número de células do baço dos camundongos C57BL/6J Camundongos controle (Co), sem tratamento (grupo Controle) n=7, tratado com LDE/7KC (Co-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Co-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Co-LDE/7KC + Sin). Camundongos com implante tumoral, sem tratamento (Tu-Co) n=7, tratado com LDE/7KC (Tu-LDE/7KC), tratados com sinvastatina (Tu-Sin) e tratados com LDE/7KC associada a sinvastatina (Tu-LDE/7KC + Sin). *Análise estatística, ANOVA, $p < 0,05$.

Análise histopatológica dos tumores

A análise histopatológica foi realizada nos tumores e principais órgãos dos camundongos portadores de melanoma B16F10, tratados com a nanoemulsão LDE/7KC e grupo controle. Foram observados alterações histológicas, metástase e/ou depósito de melanina (dados não mostrados). Outro parâmetro analisado foi a inflamação associada ao tumor. A figura 28 exemplifica como foram realizados os achados deste estudo, infiltrado inflamatório leve (A), infiltrado inflamatório intenso (B), infiltrado inflamatório e resposta estromal moderada (C), e resposta estromal intensa (D).

Na figura 29 observa-se células tumorais, com pigmentação citoplasmática acastanhada, tipo melanótica. As áreas de necrose estão indicadas pelas setas. Os camundongos tratados com a nanoemulsão apresentaram maior porcentagem de área necrótica em relação ao grupo controle.

A coloração da musculatura lisa e fibras elásticas da túnica média dos vasos foi realizada pela técnica citoquímica de Verloff. Nota-se paredes vasculares íntegras e mantendo sua estrutura regular, fato este comum em todo o material examinado; no item C da figura 28 há um exemplo desta coloração. O tumores tratados com a nanoemulsão apresentaram menor porcentagem de vasos em relação ao volume tumoral.

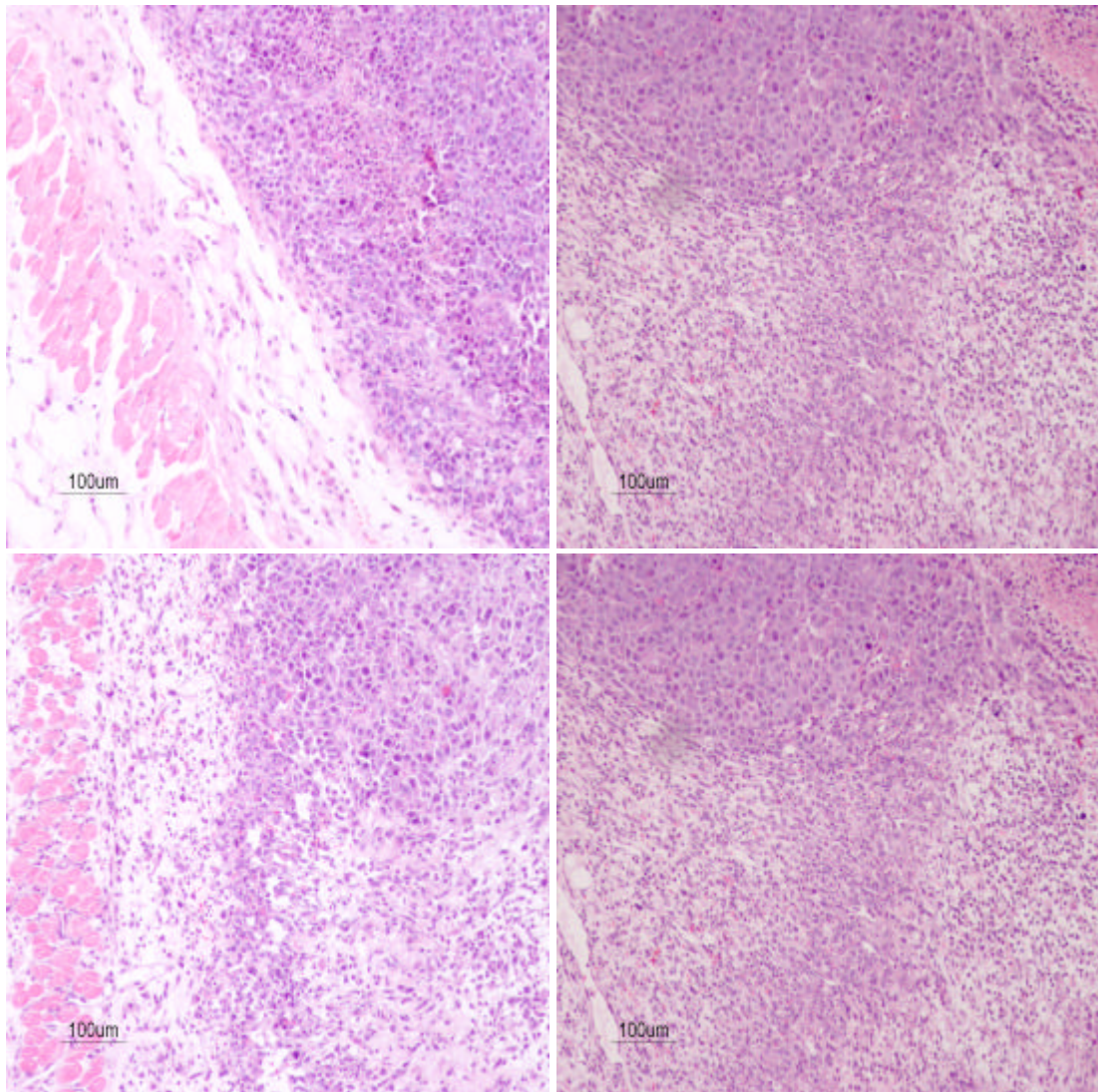


Figura 28- Cortes histológicos dos melanomas B16F10, coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. **(A)** infiltrado inflamatório leve, **(B)** infiltrado inflamatório intenso, **(C)** infiltrado inflamatório e resposta estromal moderada e **(D)** resposta estromal intensa. Aumento objetiva de 20X.

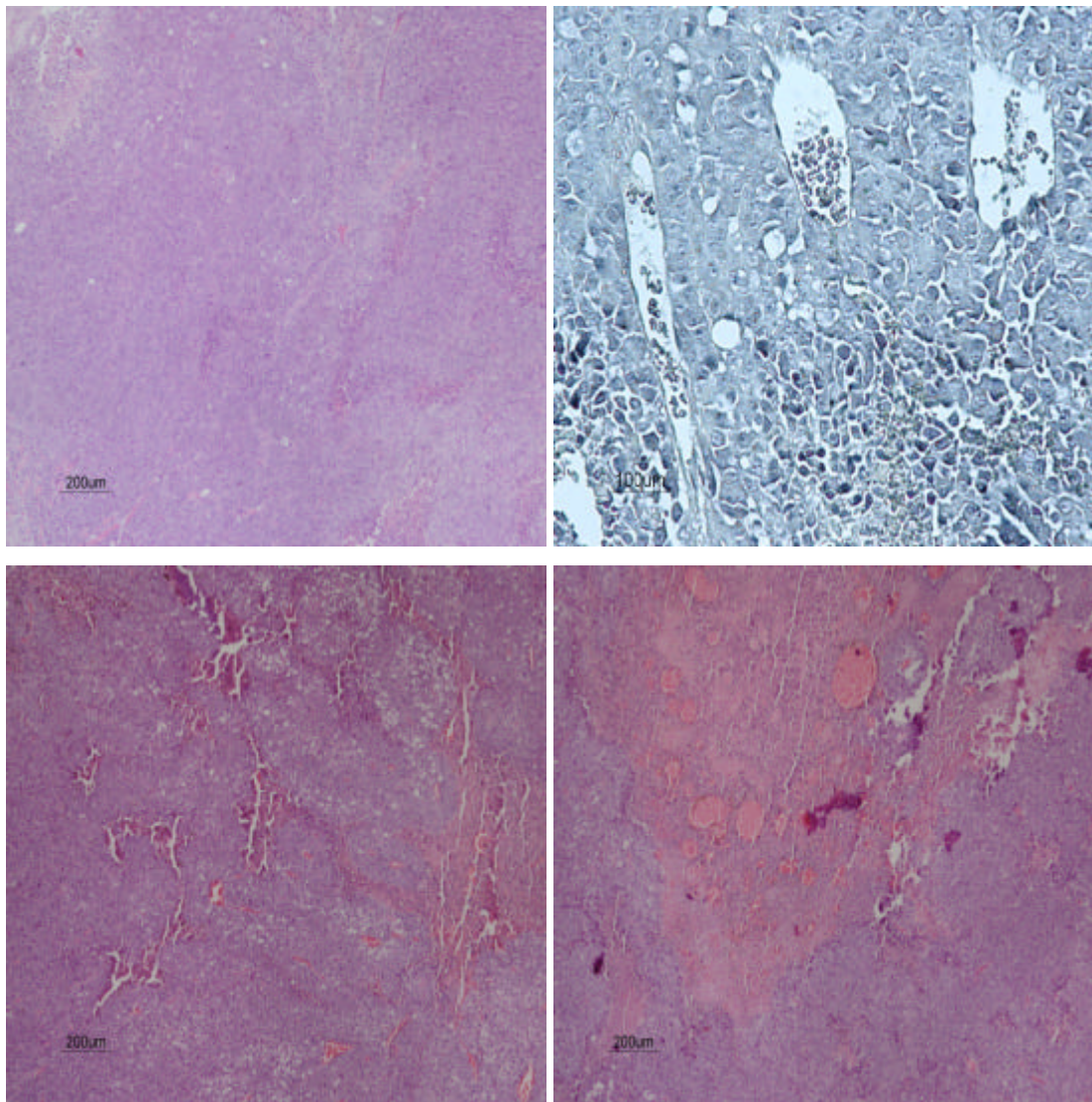


Figura 29- Cortes histológicos dos melanomas B16F10, coloração H.E..**(A)** Aspecto microscópico do tumor dorsal; **(B)** Análise dos vasos sanguíneos pela coloração de Verlooff, **(C)** Áreas de necrose (setas); **(D)** Outro exemplo de área com necrose (setas).

A análise estatística demonstrou maior área de necrose nos melanomas tratados com a nanoemulsão LDE/7KC, sendo de $53,4\% \pm 7,8\%$, enquanto que o grupo controle apresentou uma área de necrose de $18,0\% \pm 5,54\%$, com $p < 0,05$ pelo método do Test t de Student.

Os parâmetros inflamatórios foram quantificados como leve, moderado e intenso, conforme a resposta do estroma ou infiltrado. A análise demonstrou muita variação caso a caso, sendo o resultado semelhante entre o grupo controle e tratado com LDE/7KC.

A avaliação da quantidade de vasos pelo volume tumoral demonstrou menor vascularização nos tumores tratados com LDE/7KC, $4,95\% \pm 4,27$, em relação ao grupo controle, com $9,8\% \pm 2,76\%$. A análise estatística foi realizada pelo Test t de Student, com $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

7-cetocolesterol é um oxisterol que tem, como um de seus efeitos, a indução de morte celular em várias linhagens tumorais (Favero, 2003, Lizard *et al*, 1999). Considerando as características químicas e biológicas do 7-KC, desenvolvemos uma nanoemulsão LDE contendo 7-KC (LDE/7KC). O efeito desta nanoemulsão foi testada, *in vitro*, em trabalho anterior (Favero, 2003). Os experimentos em cultura celular demonstraram efeito antiproliferativo, caracterizado alterações morfológicas, apoptose e autofagia (Favero, 2003). Morfologicamente, as células tratadas com LDE/7KC apresentaram alterações de citoesqueleto, com aumento da polimerização de actina, levando as células a apresentar um aspecto fusiforme. A morte celular foi caracterizada pela despolarização do potencial transmembranar mitocondrial, característica comum de apoptose, associada a intensa produção de figuras de mielina, vacúolos característicos de processo autofágico. No presente trabalho aprofundamos o estudo desta nanopartícula, avaliando *in vivo* os parâmetros tóxicos, farmacocinéticos e farmacoterapêuticos em camundongos C57Bl/6J, nos quais células de melanoma foram implantadas.

Inicialmente buscamos a dose letal. Iniciando com doses únicas intraperitoneais, chegamos à aplicação de 20mg/Kg em um volume final de 2mL. Neste estudo nenhum camundongo foi a óbito. Uma possível explicação para a sobrevivência dos animais, mesmo com o grande volume injetado, pode estar na tolerância sistêmica aos constituintes da emulsão, já

que os componentes dela estão presentes em nosso organismo, e à sua semelhança estrutural e funcional à LDL. Assim, os componentes da nanoemulsão poderiam ser convertidos nas vias metabólicas do fígado, por exemplo, a sais biliares, secreção esta rica em oxisteróis.

A emulsificação de 7-KC diminui sua toxicidade. Estudos com LDE com incorporação de quimioterápicos (Rodrigues *et al*, 2005; Maranhão *et al*, 1993, 1994, 1997) demonstram efeito de diminuição de toxicidade semelhante. Nossos estudos *in vitro* demonstraram que 7-KC possui uma toxicidade maior que LDE/7KC (Favero, 2003)

A mesma dosagem de 20mg/Kg induziu nos camundongos uma perda de massa corpórea compatível com a máxima dose tolerada. Os testes de toxicologia sugerem a avaliação da MDT para mostrar evidências primárias que possam apontar o potencial carcinogênico de uma substância. A maior dose experimental é baseada, assim, na máxima dose tolerada (MDT), definida como sendo aquela que não provoca no animal uma perda de peso superior a 10% e não induz mortalidade ou sinais clínicos de toxicidade.

O primeiro ensaio farmacocinético realizado foi a depuração plasmática nos camundongos controle e nos portadores do melanoma B16F10. O estudo demonstrou decaimento dos radiotraçadores de maneira estatisticamente igual e quando comparada aos estudos com LDE e LDL (Rodrigues *et al*, 2005), também mostraram semelhança. A inclinação da curva mostra que nos primeiros 60 minutos há um decaimento rápido,

sugerindo a sua distribuição entre os tecidos, diminuindo a emulsão circulante.

A biodistribuição da nanoemulsão LDE/7KC, nosso segundo parâmetro farmacocinético, mostrou um acúmulo da radioatividade em órgãos que expressam maior quantidade de receptores para LDL, em especial o fígado, o principal órgão relacionado ao metabolismo lipídico. A distribuição da nanoemulsão nos camundongos portadores do melanoma, assim como no grupo controle, apresentou o fígado como órgão de maior captação nos primeiros 60 minutos; porém, após 240 minutos, a captação pelo tumor foi estatisticamente igual à do fígado. Este resultado é justificado pela grande quantidade de receptores para LDL expressos na superfície das células do melanoma B16F10 (Rodrigues *et al.*,2005).

A eficácia da nanoemulsão LDE/7KC como agente anti-tumoral, foi avaliada primeiramente a partir de doses únicas intraperitoneais. Três dosagens foram utilizadas: 2,5mg/Kg; 5mg/Kg e 20mg/Kg. Apenas a dosagem de 20mg/Kg inibiu o crescimento tumoral, com um volume do tumor significativamente menor, com média final 59% menor que os melanomas do grupo controle. Associada a este controle da progressão tumoral, observamos também um aumento na taxa de sobrevivência dos camundongos comparado com o grupo não tratado, resultado estatisticamente significativo. Os animais tratados com 20mg/Kg de LDE/7KC sobreviveram até doze dias a mais que os camundongos sem tratamento. Os tratamentos com 2,5 e 5 mg/Kg de LDE/7KC também induziram a um aumento da taxa de sobrevivência dos animais, oito dias a mais

em relação ao grupo controle. Com a diminuição do volume tumoral e efeitos debilitadores como, por exemplo, a caquexia demoraram a acontecer, propiciando a uma taxa de sobrevivência maior.

Após esta etapa inicial, de aplicação de uma única dose em várias concentrações, resolvemos fracionar a dosagem de 20 mg/Kg, a que melhor resultado anti-tumoral apresentou, em dez aplicações diárias. Esta abordagem terapêutica propiciou uma redução de 34% do volume tumoral em relação ao grupo controle. Interessantemente, esta seqüência de aplicações levou a um resultado menos eficaz que a dose única. Uma possível explicação para a dose única ter obtido um resultado melhor, pode estar relacionada a uma ação do tipo dose de ataque, assim o tumor que ainda estava com um crescimento inicial demoraria para se restabelecer.

Uma terceira estratégia terapêutica foi a administração da mesma quantidade da dose única (20mg/Kg), porém fracionada e aplicada em dias alternados, ou seja, uma dose a cada 48 horas. O tratamento com doses intercaladas, foi o que levou a uma maior diminuição no crescimento final do tumor, em média, uma redução de 81% do volume do tumor comparado ao grupo controle. Os camundongos tratados com LDE/7KC sobreviveram, em média, treze dias a mais que os do grupo controle, resultado estatisticamente significativo pelo método de análise de contingência.

Assim, apesar de uma maneira geral todos os tratamentos levarem a uma diminuição significativa do crescimento do tumor e um aumento na taxa de sobrevivência, o melhor resultado foi obtido com as dosagens fracionadas em dias alternados.

Juntamente com os parâmetros macroscópicos, avaliamos cortes histológicos dos tumores, levando em consideração, principalmente, as áreas de necrose, infiltrado inflamatório, resposta estromal e vascularização. Os tumores foram avaliados caso a caso.

A análise individual demonstrou uma variação muito grande em relação à inflamação e à reação estromal; entretanto, quando associamos os casos dos tumores tratados com LDE/7KC, comparado-os aos não tratados, as análises estatísticas não demonstraram diferença significativa.

A reação estromal é formada por uma resposta primária à inflamação, promovendo a angiogênese e remodelamento de proteínas extra-celulares. Estes fatores são importantes para a criação de um microambiente capaz de sustentar o crescimento tumoral e metástase (van Kempen *et al*, 2005; Smolle *et al*, 1996).

Brown (1997) demonstrou que o infiltrado inflamatório dos melanomas (quando predominantemente linfocitários), é um dispositivo de prognóstico favorável aos portadores de melanoma; porém, as nossas observações não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os casos dos tumores tratados com LDE/7KC e não tratados

A diminuição do crescimento tumoral pode ser explicada, em parte, pela maior área de necrose no tratamento com LDE/7KC. Os tumores tratados com a nanoemulsão apresentaram uma área de necrose, em média, 35% maior que aos tumores dos camundongos do grupo controle. Esta morte tecidual provavelmente esteja associada à agressividade do 7-cetocolesterol, direcionado e acumulado nestes tumores. Há uma variedade

de mecanismos associadas à morte celular via 7-KC (Monier *et al*, 2003), associado geralmente a eventos apoptóticos, produção de espécies reativas de oxigênio e autofagia.

A nanoemulsão LDE/7KC também induziu uma menor porcentagem de vasos em relação ao volume total do tumor quando comparada ao grupo controle. A menor irrigação do tecido tumoral tratado com LDE/7KC pode estar associada à morte do parênquima tumoral, além da toxicidade do 7-KC sobre células musculares lisas da túnica média das arteríolas, como observado por Guyton *et al* (1990), Nassen e Heald (1987), Peng *et al* (1977), Taylor e Peng (1985). Outros estudos como o de Zwijsen *et al* (1992) que observaram que oxisteróis, além da morte celular, podem ativar e inibir as junções comunicantes (*gap junctions*) das células sobreviventes, alterando a comunicação célula a célula. Outra importante atividade relacionada à toxicidade de 7-KC a componentes dos vasos sanguíneos é a inibição da liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais, provavelmente através de efeitos diretos sobre a cavéola (Sleer *et al*, 2001). Cavéola é um microdomínio especializado da membrana celular envolvida no acúmulo e processamento de mensageiros celulares, além de ser essencial na regulação da enzima NO sintetase (Deckert, V. *et al*, 1998). O NO por sua vez é um importante vasodilatador. A diminuição do NO dos vasos dos tumores tratados por LDE/7KC promoveriam uma menor irrigação do tecido tumoral e conseqüentemente focos de necrose.

Paralelamente a avaliação histológica, realizamos alguns ensaios para observação de possíveis efeitos tóxicos de LDE/7KC. O fígado foi o

principal órgão de captação da nanoemulsão tanto no grupo controle quanto no dos camundongos portadores do melanoma; sabendo da intensa atividade metabólica do fígado, avaliamos a atividade de três enzimas hepáticas, associadas à intoxicação do fígado. Estas análises demonstraram que a nanoemulsão LDE/7KC, no período avaliado, não manifestou aumento nas unidades destas enzimas, ou seja, não houve toxicidade hepática. A análise microscópica do fígado mostrou lóbulos e a lâminas formadas pelos hepatócitos com morfologia normal.

Outro parâmetro estudado foi a possível toxicidade hematológica de LDE/7KC. Todos os animais não apresentaram condições anêmicas, com eritrograma normal. A avaliação dos leucogramas não apontou diferenças importantes na quantidade de leucócitos totais. A contagem diferencial dos glóbulos brancos apresentou diferença significativa apenas em relação a porcentagem de eosinófilos nos camundongos portadores de melanoma tratados com sinvastatina e LDE/7KC associada a sinvastatina. Estudos como o de Cormier *et al* (2006) mostram que a elevação no número de eosinófilos em tumores sólidos, como o melanoma, é um importante fator para demonstração de inflamação inicial e persistente sobre o tumor.

Para evidenciar possíveis danos a medula óssea fizemos o mielograma. Quando comparados aos camundongos do grupo controle, sem tumor, observa-se uma menor quantidade de células na medula óssea, porém quando comparados com os camundongos portadores do melanoma, não se observa diferença na celularidade da medula. Os animais portadores

do melanoma tratados com sinvastatina apresentaram celularidade semelhante ao grupo controle, sem o implante tumoral.

A avaliação do baço apontou uma diminuição da celularidade neste órgão em todos os camundongos portadores do melanoma. Em roedores o baço continua a ser um produtor hematopoiético, ou seja, provavelmente, o tumor induz a esta inibição.

Os dados de dose letal, MDT, enzimas hepáticas, hemograma completo, mielograma e esplenograma obtidos neste trabalho sugerem que a nanoemulsão LDE/7KC é uma substância segura para aplicação *in vivo*.

O sinergismo farmacológico entre uma molécula que é capaz de aumentar a quantidade de LDLr, como a sinvastatina, e a LDE/7KC também foi estudado. O tratamento diário com a sinvastatina induziu a um menor crescimento tumoral em relação ao controle. Uma extensa revisão (Sleijfer, 2005), sobre a utilização de estatinas como agente anti-tumorigênico, demonstra que as estatinas podem induzir a uma parada no ciclo de duplicação celular, apoptose, redução de fatores angiogênicos, inibição do crescimento endotelial, impedimento da adesão tecidual, inibição da migração e atenuação dos mecanismos de resistência.

Alguns trabalhos demonstram ação específica sobre melanoma, tendo um efeito anti-proliferativo com a utilização de outra estatina, a lovastatina (Sleijfer *et al*,2004). Há também estudos que demonstram um sinergismo da lovastatina potencializando TNF, cisplatina doxirubicina, todos experimentos em animais (Sleijfer *et al*,2004). Jakobisiak e Golab (2003)

sugerem em um artigo de revisão a possibilidade da utilização das estatinas como coadjuvante no tratamento de inúmeros tumores.

Em conclusão, 7-cetocolesterol é conhecido por sua citotoxicidade, além de ser o oxisterol de produção não enzimática mais abundante no corpo humano (Lyons e Brown, 1999). A utilização racional de um composto biológico concentrando-o em tecidos específicos foi o objeto deste estudo. Assim, o agente tóxico, 7-KC, foi complexado com uma emulsão com características funcionais à LDL, LDE, e direcionada aos locais com maior quantidade de receptores para LDL. A análise da concentração de componentes marcados da nanoemulsão LDE/7KC demonstrou a eficácia no direcionamento da molécula, propiciando também o efeito esperado.

As possibilidades da utilização da nanoemulsão LDE/7KC como agente no tratamento do câncer são promissoras, por direcionar este composto ao tumor em uma estratégia na qual o próprio veículo também seria um agente tóxico, sem afetar as células normais.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- A nanoemulsão LDE/7KC apresentou a mesma cinética plasmática entre os camundongos sem implante tumoral e portadores do melanoma.
- LDE/7KC apresenta a mesma cinética de depuração plasmática em camundongos que LDE ou LDL.
- A análise da biodistribuição tecidual da nanoemulsão nos camundongos controle e portadores de melanoma apontaram o fígado como o principal órgão de direcionamento de LDE/7KC.
- Há acúmulo de LDE/7KC no tumor.
- LDE/7KC induziu a uma inibição de até 81% do crescimento dos tumores, na dependência da dosagem e tipo de administração. Os melhores resultados foram obtidos com doses fracionadas e administradas em dias intercalados.
- O efeito anti-tumoral é devido, pelo menos em parte, à indução de necrose e diminuição da quantidade de vasos na área do tumor, observada após a administração de LDE/7KC.
- O tratamento com LDE/7KC não levou a aparecimento de sinais de toxicidade, avaliados pelo estudo de enzimas hepáticas, hemograma, medula e baço.
- Concluindo, a LDE/7KC é uma nanopartícula promissora para ser utilizada como agente anti-tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, R. Selected Studies on Arteriosclerosis. C.C. Thomas, Springfield, IL., 1950.

Baranowski, A., Adams, C. W., High, O. B., and Bowyer, D. B. Connective tissue responses to oxysterols. *Atherosclerosis*, 41: 255-266, 1982.

Bjorkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J.Clin.Invest*, 110: 725-730, 2002.

Boissonneault, G. A. and Heiniger, H. J. 25-Hydroxycholesterol-induced elevations in ⁴⁵Ca uptake: permeability changes in P815 cells. *J.Cell Physiol*, 125: 471-475, 1985.

Borelli, P.; Mariano, M.; Brojevic, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions mice. *Nutrition Research*. v.15, p.1477-85, 1995.

Breuer, O., Sudjana-Sugiaman, E., Eggertsen, G., Chiang, J. Y., and Bjorkhem, I. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase is up-regulated by the competitive inhibitor 7-oxocholesterol in rat liver. *Eur.J.Biochem.*, 215: 705-710, 1993.

Brown, A. J., Watts, G. F., Burnett, J. R., Dean, R. T., and Jessup, W. Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J.Biol.Chem.*, 275: 27627-27633, 2000.

Brown, M. Staging and prognosis of melanoma. *Semin.Cutan.Med.Surg.*, 16: 113-121, 1997.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. Lowering plasma cholesterol by raising ldl receptors. 1981. *Atheroscler.Suppl*, 5 : 57-59, 2004.

Chang, J. Y., Phelan, K. D., and Chavis, J. A. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Res.Bull.*, 45: 615-622, 1998.

Chen, H. W. Role of cholesterol metabolism in cell growth. *Fed.Proc.*, 43: 126-130, 1984.

Christ, M., Ji, Y. H., Moog, C., Pannecoucke, X., Schmitt, G., Bischoff, P., and Luu, B. Antitumor activity of oxysterols. Effect of two water-soluble monophosphoric acid diesters of 7 beta-hydroxycholesterol on mastocytoma P815 in vivo. *Anticancer Res.*, 11: 359-364, 1991.

Christ, M., Luu, B., Mejia, J. E., Moosbrugger, I., and Bischoff, P. Apoptosis induced by oxysterols in murine lymphoma cells and in normal thymocytes. *Immunology*, 78: 455-460, 1993.

Cormier, S. A., Taranova, A. G., Bedient, C., Nguyen, T., Protheroe, C., Pero, R., Dimina, D., Ochkur, S. I., O'Neill, K., Colbert, D., Lombardi, T. R., Constant, S., McGarry, M. P., Lee, J. J., and Lee, N. A. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J.Leukoc.Biol.*, 79: 1131-1139, 2006.

Deckert, V., Brunet, A., Lantoine, F., Lizard, G., Millanvoye-van Brussel, E., Monier, S., Lagrost, L., David-Dufilho, M., Gambert, P., and Devynck, M. A. Inhibition by cholesterol oxides of NO release from human vascular endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 18: 1054-1060, 1998.

Erickson, S. K., Cooper, A. D., Matsui, S. M., and Gould, R. G. 7-Ketocholesterol. Its effects on hepatic cholesterologenesis and its hepatic metabolism in vivo and in vitro. *J.Biol.Chem.*, 252: 5186-5193, 1977.

Favero, G. M. Efeito citotóxico causado por emulsão lipídica contendo 7-cetocolesterol (O_{XLE}) em cultura de células tumorais. Dissertação, Faculdade de Medicina da USP. ; São Paulo, 2003

Favero, G. M. ; Maria, D. A. ; Otake, A. H. ; Maranhão, R. C. ; Bydlowski, S. P. . Pharmacokinetics and Antineoplastic Effect of a 7-Ketocholesterol-Containing Emulsion (LDE/7KC). In: IV São Paulo Research Conference Cancer Today: From Molecular Biology to Treatment, 2005, São Paulo. APPLIED CANCER RESEARCH Supplement number 2 November 2005, 2005.

Firestone, R. A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconjug.Chem.*, 5: 105-113, 1994.

Fornas, E., Fortea, A., Renau, J., and Camanas, A. Cholesterol oxygenated derivatives induce erythrocyte accumulation and endothelium alterations in the aorta of rats. Turnover of endothelial cells in the apparently intact areas remains unchanged. *Exp.Pathol.*, 31: 105-112, 1987.

Fredrickson, D. S. and Ono, K. The in vitro production of 25- and 26-hydroxycholesterol and their in vivo metabolism. *Biochim.Biophys.Acta*, 22: 183-184, 1956.

GARCIA, P. B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilidade celular e da hematopoese. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1992.

Gelmon, K. A., Eisenhauer, E. A., Harris, A. L., Ratain, M. J., and Workman, P. Anticancer agents targeting signaling molecules and cancer cell environment: challenges for drug development? *J.Natl.Cancer Inst.*, 91: 1281-1287, 1999.

Ginsburg, G. S., Small, D. M., and Atkinson, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J.Biol.Chem.*, 257: 8216-8227, 1982.

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Brown, M. S., Innerarity, T. L., and Mahley, R. W. Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins. *J.Biol.Chem.*, 255: 1839-1848, 1980.

Goldstein, J. L., Basu, S. K., and Brown, M. S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.*, 98: 241-260, 1983.

Guyton, J. R., Black, B. L., and Seidel, C. L. Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. A model of the atherosclerotic core region. *Am.J.Pathol.*, 137: 425-434, 1990.

Hevonoja, T., Pentikainen, M. O., Hyvonen, M. T., Kovanen, P. T., and Ala-Korpela, M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim.Biophys.Acta*, 1488: 189-210, 2000.

Higley, N. A. and Taylor, S. L. The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured L cells. *Food Chem.Toxicol.*, 22: 983-992, 1984.

Ho, Y. K., Smith, R. G., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, 52: 1099-1114, 1978.

Holmes, R. P. and Yoss, N. L. 25-Hydroxysterols increase the permeability of liposomes to Ca²⁺ and other cations. *Biochim.Biophys.Acta*, 770: 15-21, 1984.

Hsu, R. C., Kanofsky, J. R., and Yachnin, S. The formation of echinocytes by the insertion of oxygenated sterol compounds into red cell membranes. *Blood*, 56: 109-117, 1980.

Huang, P. S. and Oliff, A. Drug-targeting strategies in cancer therapy. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 11: 104-110, 2001.

Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins (Review). *Int J Oncol.* 1055-69, 2003.

Kandutsch, A. A., Chen, H. W., and Heiniger, H. J. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science*, 201: 498-501, 1978.

Kolsch, H., Lutjohann, D., Tulke, A., Bjorkhem, I., and Rao, M. L. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, 818: 171-175, 1999.

Kritchevsky, S. B., Wilcosky, T. C., Morris, D. L., Truong, K. N., and Tyroler, H. A. Changes in plasma lipid and lipoprotein cholesterol and weight prior to the diagnosis of cancer. *Cancer Res.*, 51: 3198-3203, 1991.

Lackner, K. J., Schettler, G., and Kubler, W. Plasma cholesterol, lipid lowering, and risk for cancer. An update of the results from epidemiologic studies and intervention trials. *Klin.Wochenschr.*, 67: 957-962, 1989.

Lin, C. Y. and Morel, D. W. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. *J.Lipid Res.*, 37: 168-178, 1996.

Lizard, G., Lemaire, S., Monier, S., Gueldry, S., Neel, D., and Gambert, P. Induction of apoptosis and of interleukin-1 β secretion by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.*, 419: 276-280, 1997.

Lizard, G., Moisant, M., Cordelet, C., Monier, S., Gambert, P., and Lagrost, L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J.Pathol.*, 183: 330-338, 1997.

Lizard, G., Gueldry, S., Sordet, O., Monier, S., Athias, A., Miguet, C., Bessedé, G., Lemaire, S., Solary, E., and Gambert, P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.*, 12: 1651-1663, 1998.

Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 19: 1190-1200, 1999.

Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 19: 1190-1200, 1999.

Lizard, G., Miguet, C., Bessedé, G., Monier, S., Gueldry, S., Neel, D., and Gambert, P. Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembrane potential and of the cytosolic release of cytochrome c occurring during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Free Radic.Biol.Med.*, 28: 743-753, 2000.

Lyons, M. A. and Brown, A. J. 7-Ketocholesterol. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 31: 369-375, 1999.

Maerker, G. and Jones, K. C. Unusual product ratios resulting from the gamma-irradiation of cholesterol in liposomes. *Lipids*, 26: 139-144, 1991.

Maranhao, R. C., Cesar, T. B., Pedroso-Mariani, S. R., Hirata, M. H., and Mesquita, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*, 28: 691-696, 1993.

Maranhao, R. C., Garicochea, B., Silva, E. L., Dorlhiac-Llacer, P., Cadena, S. M., Coelho, I. J., Meneghetti, J. C., Pileggi, F. J., and Chamone, D. A. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, 54: 4660-4666, 1994.

Maranhao, R. C., Roland, I. A., Toffoletto, O., Ramires, J. A., Goncalves, R. P., Mesquita, C. H., and Pileggi, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*, 32: 627-633, 1997.

Monier, S., Samadi, M., Prunet, C., Denance, M., Laubriet, A., Athias, A., Berthier, A., Steinmetz, E., Jurgens, G., Negre-Salvayre, A., Bessede, G., Lemaire-Ewing, S., Neel, D., Gambert, P., and Lizard, G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 303: 814-824, 2003.

Moog, C., Frank, N., Luu, B., and Bertram, B. Metabolism of new anticancer oxysterol derivatives in rats. *Anticancer Res.*, 13: 953-958, 1993.

Mosley, S. T., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Falck, J. R., and Anderson, R. G. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 78: 5717-5721, 1981.

Muldoon, M. F., Manuck, S. B., and Matthews, K. A. Lowering cholesterol concentrations and mortality: a quantitative review of primary prevention trials. *BMJ*, 301: 309-314, 1990.

Naseem, S. M. and Heald, F. P. Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. *Biochem.Int.*, 14: 71-84, 1987.

Osada, K., Hoshina, S., Nakamura, S., and Sugano, M. Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *J.Agric.Food Chem.*, 48: 3823-3829, 2000.

Parish, E. J., Chitrakorn, S., Luu, B., Schmidt, G., and Ourisson, G. Studies of the oxysterol inhibition of tumor cell growth. *Steroids*, 53: 579-596, 1989.

Peng, S. K., Taylor, C. B., Tham, P., Werthessen, N. T., and Mikkelsen, B. Effect of auto-oxidation products from cholesterol on aortic smooth muscle cells: an in vitro study. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 102: 57-61, 1978.

Peng, S. K., Taylor, C. B., Hill, J. C., and Morin, R. J. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis*, 54: 121-133, 1985.

Peng, S. K., Hill, J. C., Morin, R. J., and Taylor, C. B. Influence of cholesterol oxidation derivatives on membrane bound enzymes in cultured aortic smooth muscle cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 180: 126-132, 1985.

Peng, S. K., Morin, R. J., Tham, P., and Taylor, C. B. Effects of oxygenated derivatives of cholesterol on cholesterol uptake by cultured aortic smooth muscle cells. *Artery*, 13: 144-164, 1985.

Plowman J, D. D. H. M. S. H. A. M. 1. Human tumor xenograft models in NCI development. In: Teicher BA (ed) *Anticancer drug development: preclinical screening, clinical trials and approval*. Totowa: 2007.

Ponty, E., Favre, G., Benaniba, R., Boneu, A., Lucot, H., Carton, M., and Soula, G. Biodistribution study of ^{99m}Tc-labeled LDL in B16-melanoma-bearing mice. Visualization of a preferential uptake by the tumor. *Int.J.Cancer*, 54: 411-417, 1993.

Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L., and Mahley, R. W. Identical structural and receptor binding defects in apolipoprotein E2 in hypo-, normo-, and hypercholesterolemic dysbetalipoproteinemia. *J.Clin.Invest*, 71: 1023-1031, 1983.

Rao, M. L., Lutjohann, D., Ludwig, M., and Kolsch, H. Induction of apoptosis and necrosis in human neuroblastoma cells by cholesterol oxides. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 893: 379-381, 1999.

Rhinds, D. and Brissette, L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 31: 915-931, 1999.

Rosenfeld, W. D. Anaerobic Oxidation of Hydrocarbons by Sulfate-reducing Bacteria. *J.Bacteriol.*, 54: 664-665, 1947.

Sellers, W. R. and Fisher, D. E. Apoptosis and cancer drug targeting. *J.Clin.Invest*, 104: 1655-1661, 1999.

Sevanian, A., Shen, L., and Ursini, F. Inhibition of LDL oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity by dihydropyridine calcium antagonists. *Pharm.Res.*, 17: 999-1006, 2000.

Sleer, L. S., Brown, A. J., and Stanley, K. K. Interaction of caveolin with 7-ketocholesterol. *Atherosclerosis*, 159: 49-55, 2001.

Sleijfer, S., van der, G. A., Planting, A. S., Stoter, G., and Verweij, J. The potential of statins as part of anti-cancer treatment. *Eur.J.Cancer*, 41: 516-522, 2005.

Smith, L. L., Teng, J. I., Lin, Y. Y., Seitz, P. K., and McGehee, M. F. Sterol metabolism--XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J.Steroid Biochem.*, 14: 889-900, 1981.

Smith, L. L and Johnson, B. H. Biological activities of oxysterols. *Free Radic.Biol.Med.*, 7: 285-332, 1989.

Smolle, J., Hofmann-Wellenhof, R., and Fink-Puches, R. Melanoma and stroma: an interaction of biological and prognostic importance. *Semin.Cutan.Med.Surg.*, 15: 326-335, 1996.

Taylor, C. B., Peng, S. K., Werthessen, N. T., Tham, P., and Lee, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am.J.Clin.Nutr.*, 32: 40-57, 1979.

Torchilin, V. P. Drug targeting. *Eur.J.Pharm.Sci.*, *11 Suppl 2* S81-S91, 2000.

Tornberg, S. A., Holm, L. E., Carstensen, J. M., and Eklund, G. A. Cancer incidence and cancer mortality in relation to serum cholesterol. *J.Natl.Cancer Inst.*, *81*: 1917-1921, 1989.

van Kempen, L. C., van Muijen, G. N., and Ruiter, D. J. Stromal responses in human primary melanoma of the skin. *Front Biosci.*, *10*: 2922-2931, 2005.

Yoshida, T., Matsuzaki, Y., Haigh, W. G., Fukushima, S., Ikezawa, K., Tanaka, N., and Lee, S. P. Origin of oxysterols in hepatic bile of patients with biliary infection. *Am.J.Gastroenterol.*, *98* : 2275-2280, 2003.

Zhou, Q., Smith, T. L., and Kummerow, F. A. Cytotoxicity of oxysterols on cultured smooth muscle cells from human umbilical arteries. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, *202*: 75-80, 1993.

Zwijssen, R. M., Oudenhoven, I. M., and de Haan, L. H. Effects of cholesterol and oxysterols on gap junctional communication between human smooth muscle cells. *Eur.J.Pharmacol.*, *228*: 115-120, 1992.