

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**Associação do quimioterápico paclitaxel a uma  
microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de  
toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em  
modelo animal**

*DEBORA GARCIA RODRIGUES*

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo  
2004

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

Recebido em  
02/09/10  
Karinê  
Lilac

Dados: 1401721  
DBDCA: 26633  
TERMINAL OK

**Associação do quimioterápico paclitaxel a uma  
microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de  
toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em  
modelo animal**

*DEBORA GARCIA RODRIGUES*

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo  
2004

DEDALUS - Acervo - CQ



30100006129

**Ficha Catalográfica**

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

Rodrigues, Debora Garcia

R696as Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol (LDE) : estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo animal / Debora Garcia Rodrigues. -- São Paulo, 2004.  
110p.

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

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

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

616.0756 CDD

DEBORA GARCIA RODRIGUES

Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol  
(LDE): estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo  
animal

Comissão Julgadora  
Da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão  
Orientadora

---

1°. Examinador

---

2°. Examinador

---

3°. Examinador

---

4°. Examinador

São Paulo, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2004 .

17964

## DEDICATÓRIA

---

*Dedico a ...*

*Aos meus pais, Anna e Waldemar, pelo incentivo  
e apoio em todas as etapas de minha vida.*

*Ao meu marido Marcelo e minhas duas princesas,  
Julia e Luise, simplesmente, por existirem.*

## AGRADECIMENTOS

---

### **Agradeço...**

Ao Prof. Tit. Raul C. Maranhão, pela indispensável orientação durante a realização deste trabalho, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, em especial aos Drs. Denise, Claudete e Emerson pela paciência, amizade e pela ajuda na execução e discussão dos resultados deste trabalho.

Aos companheiros de pós-graduação Ana Cristina, Caroline, Raquel, Edilson e Ricardo pela paciência, amizade e ajuda na discussão dos resultados

Ao Dr. Durvanei A. Maria e a Prof. Dr. Olga M. Ibáñez do Instituto Butantã pela amizade, colaboração na realização dos experimentos e ajuda na discussão dos resultados.

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

A todos os professores das disciplinas de pós-graduação, pela ajuda, paciência e o ensino que proporcionaram um amadurecimento pessoal e intelectual.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho com o seu apoio prático ou intelectual ou simplesmente pela amizade e incentivo.

## **APOIO FINANCEIRO**

---

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## **EPÍGRAFE**

---

***“O saber se aprende com os mestres.  
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”***

**Cora Coralina.**



## SUMÁRIO

---

Lista de figuras.....	<i>i</i>
Lista de tabelas.....	<i>iv</i>
Lista de abreviaturas.....	<i>v</i>
Resumo.....	<i>vii</i>
Summary.....	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lipoproteína de baixa densidade e câncer .....	1
1.2 LDL como agente direcionador de fármacos .....	4
1.3 LDE – microemulsão rica em colesterol .....	7
1.4 Paclitaxel .....	11
1.5 Paclitaxel – novas formulações e síntese de pró-fármacos.....	15
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Reagentes .....	20
4.2 Preparo da LDE.....	21
4.3 Síntese do oleato de paclitaxel .....	22
4.3.a Preparação do cloreto de oleíla .....	22
4.3.b Reação entre cloreto de oleíla e paclitaxel.....	23
4.4 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa...	25
4.5 Análise por ressonância magnética nuclear .....	25
4.6 Associação de paclitaxel e oleato de paclitaxel a LDE.....	26
4.7 Determinação da eficiência de associação do paclitaxel e oleato depaclitaxel a LDE.....	27
4.7.1 Separação por coluna Sephadex G 25.....	27
4.7.2 Separação por ultracentrifugação .....	28
4.8 Diálise da associação LDE-oleato de paclitaxel .....	29
4.9 Avaliação do tamanho da partícula de LDE-oleato de paclitaxel .....	29

4.10	Cultura de células .....	30
4.11	Ensaio de citotoxicidade .....	30
4.12	Captação Celular de [ <sup>14</sup> C]LDE e da associação [ <sup>14</sup> C]-LDE-[ <sup>3</sup> H] oleato de paclitaxel por células NCI H-292 .....	31
4.13	Captação celular de [ <sup>14</sup> C]-LDE e da associação [ <sup>14</sup> C]-LDE-[ <sup>3</sup> H] paclitaxel na presença de LDL nativa .....	32
4.14	Teste de toxicidade em camundongos C57BL/6J .....	33
4.15	Manutenção de células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J .....	33
4.16	Estudo de biodistribuição – captação tecidual de [ <sup>14</sup> C]-LDE.....	34
4.17	Estudo cinético e de biodistribuição – captação tecidual de [ <sup>14</sup> C]-LDE-[ <sup>3</sup> H]-oleato de paclitaxel .....	34
4.18	Extração lipídica – determinação da radioatividade nos tecidos.....	36
4.19	Avaliação da eficácia antitumoral .....	37
4.20	Determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo <i>in vitro</i> .....	38
4.21	Análise estatística .....	39
5.	RESULTADOS .....	40
5.1	Síntese do oleato de paclitaxel .....	40
5.2	Determinação da eficiência de associação do paclitaxel e do oleato de paclitaxel a LDE .....	47
5.3	Determinação da estabilidade da associação LDE-oleato de oleato de paclitaxel e LDE-paclitaxel .....	49
5.3.1	Distribuição das partículas de LDE-paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel .....	49
5.3.2	Diálise da associação LDE-oleato de paclitaxel.....	50
5.3.3	Avaliação do diâmetro da partícula de LDE-oleato de paclitaxel .....	50
5.4	Captação celular de LDE e LDE-oleato de paclitaxel .....	54
5.5	Avaliação da citotoxicidade do oleato de paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel em células NCI H292 .....	57
5.6	Teste de toxicidade em camundongos C57BL/6J .....	62
5.7	Estudo cinético e de captação tecidual de [ <sup>14</sup> C]-LDE e [ <sup>14</sup> C]-LDE-[ <sup>3</sup> H]-oleato de paclitaxel .....	64
5.8	Análise do ciclo celular .....	69

5.9	Avaliação da eficácia antitumoral de LDE-oleato de paclitaxel.....	71
6.	DISCUSSÃO .....	81
7.	CONCLUSÕES .....	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## **LISTA DE FIGURAS**

---

**FIGURA 1.** Estrutura química do paclitaxel

**FIGURA 2.** Reação de acoplamento do paclitaxel com cloreto de oleíla

**FIGURA 3.** Cromatograma do produto de reação de esterificação do paclitaxel obtido por HPLC.

**FIGURA 4.** Curvas de calibração do paclitaxel e do oleato de paclitaxel, obtidas por HPLC.

**FIGURA 5.** Espectros do oleato de paclitaxel, paclitaxel e ácido oleíco obtidos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

**FIGURA 6.** Espectro de fragmentação do principal produto da reação de esterificação do paclitaxel, analisado por LC-ESI/MS/MS.

**FIGURA 7.** Espectro de fragmentação do paclitaxel, analisado por LC-ESI/MS/MS.

**FIGURA 8.** Perfil de eluição do complexo LDE-fármaco.

**FIGURA 9.** Distribuição dos componentes da associação LDE-fármaco após incubação com plasma humano.

**FIGURA 10.** Diálise de 1 mL de LDE-oleato de paclitaxel contra 20 mL de plasma humano e solução tris HCl.

**FIGURA 11.** Variação do diâmetro médio da partícula da partícula de LDE-oleato de paclitaxel em 30 dias.

**FIGURA 12.** Captação de LDE por células tumorais NCI-H-292.

**FIGURA 13.** Captação de LDE-oleato de paclitaxel por células tumorais NCI-H292.

**FIGURA 14.** Efeito sobre o crescimento celular provocado pelo oleato de paclitaxel e por paclitaxel, solubilizados em Cremophor EL:etanol.

**FIGURA 15.** Efeito sobre o crescimento celular provocado pelo oleato de paclitaxel associado a LDE, sem e com adição de Cremophor e do paclitaxel em sua formulação comercial.

**FIGURA 16.** Efeito sobre o crescimento celular provocado pela adição de LDE e do veículo da formulação comercial: Cremophor EL.

**FIGURA 17.** Decaimento plasmático de oleato de paclitaxel associado ao oleato de colesterol-LDE, injetados por via endovenosa.

**FIGURA 18.** Captação tecidual da LDE administrada por via endovenosa e por via intraperitoneal em camundongos *C57BCL6*.

**FIGURA 19.** Captação tecidual do [<sup>3</sup>H]-olpaclitaxel associado a [<sup>14</sup>C]-éster de colesterol-LDE após administração por via intraperitoneal em camundongos *C57BCL6*.

**FIGURA 20.** Representação do efeito da formulação LDE-oleato de paclitaxel sob o conteúdo de DNA nas fases do ciclo celular de células da linhagem B16F10, e respectivo controle, células não tratadas.

**FIGURA 21.** Evolução da massa tumoral de camundongos tratados com 15 mg/Kg e 60 mg/Kg de LDE-oleato de paclitaxel, 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial e dos respectivos controles, LDE e solução de NaCl 0,9 %.

**FIGURA 22.** Percentagem de sobrevivência em resposta ao tratamento com 15 mg/Kg e 60 mg/Kg de oleato de paclitaxel associado à LDE, 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial e salina em função do tempo.

**FIGURA 23.** Representação da evolução da massa tumoral em um camundongo do grupo controle: solução de NaCl 0,9 % no 14º, 19º, 22º e 26º dia, após o início do tratamento.

**FIGURA 24.** Representação da massa tumoral de um camundongo no grupo controle, LDE no 14º, 19º, 22º e 26º dias após o início do tratamento.

**FIGURA 25.** Representação da evolução da massa tumoral de um camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg no 14º, 19º, 22º e 26º dia, após o início do tratamento.

**FIGURA 26.** Representação da evolução da massa tumoral de um camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 60 mg/Kg no 14º, 19º, 22º e 26º dia, após o início do tratamento.

**FIGURA 27.** Camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg no 26º dia após o início do tratamento. Tricotomia do tumor em processo de remissão em comparação com um tumor do grupo controle.

## **LISTA DE TABELAS**

---

**TABELA 1** - Índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) das preparações de oleato de paclitaxel, paclitaxel, Cremophor EL, LDE-oleato de paclitaxel e LDE.

**TABELA 2** - Doses letais 10, 50 e 90 e dose máxima tolerada, determinada em camundongos *C57BL/6J* das formulações de LDE-oleato de paclitaxel, paclitaxel em sua formulação comercial, Cremophor EL/etanol e LDE.

**TABELA 3**- Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel associado a LDE em camundongos *C57BL/6J* após administração por via endovenosa.

**TABELA 4.** Atividade anti-tumoral de LDE-oleato de paclitaxel vs paclitaxel em sua formulação comercial em um modelo de tumoral murino

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ACAT	Acil Co A colesterol aciltransferase
APO	Apoliproteína
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CPM	Contagens por minuto
CrEL	Cremophor EL
DHA	Ácido docosahexaenóico
DL	Dose letal
DMSO	Dimetilsufóxido
DMT	Dose máxima tolerada
ESI	Electrospray
HCL	Ácido clorídrico
HMG CoA redutase	3-hidroxil-3-metilglutaril Co A redutase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC <sub>50</sub>	Índice de citotoxicidade 50 %
LC-ESI/MS/MS	Cromatografia líquida – espectrometria de massa sequencial com ionização por electrospray
LDE	Microemulsão rica em colesterol
LDE-olpaclitaxel	Oleato de paclitaxel associado à LDE
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMA	Leucemia mielóide aguda
MEOH	Metanol
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2)2-5-difenil brometo tetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	Instituto Nacional de Câncer – Estados Unidos
PBS	Tampão Fosfato
POPOP	1,4 bis [2-(5 fenil oxazol)] benzeno
PPO	2,5 difeniloxazol
rLDL	Receptores da lipoproteína de baixa densidade



RMN	Ressonância magnética nuclear
TFR	Taxa fracional de remoção
TMS	Trimetilsilano
UI	Unidade internacional
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## RESUMO

---

RODRIGUES, D. G. **Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo animal.** São Paulo, 2003. 110p. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Depois de ser injetada na circulação, a microemulsão rica em colesterol (LDE) é captada pelos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL), os quais são super expressados em algumas células neoplásicas. Portanto, a LDE pode ser utilizada como veículo no direcionamento de agentes quimioterápicos para tecidos neoplásicos. O paclitaxel, uma droga de ação anti-neoplásica conhecida, é utilizado em câncer avançado de ovário e mama. Além dos efeitos colaterais causados pelo fármaco, o veículo usado para sua solubilização, é responsável por importantes reações de hipersensibilidade. Neste estudo, a adição do grupo oleila a molécula de paclitaxel foi proposta com a finalidade de se aumentar a lipofilicidade do fármaco e permitir uma associação estável com a LDE. A pureza e o rendimento da reação foram obtidos por HPLC, RMN e espectrometria de massa. A estabilidade do complexo foi avaliada através de diálise contra plasma, ultracentrifugação e variação do tamanho da partícula. O seu mecanismo de captação, atividade citostática e mecanismo de ação foram testados em linhagens celulares de câncer, NCI-H292 e B16F10. A toxicidade aguda foi determinada em camundongos saudáveis e a biodistribuição, farmacocinética e atividade anti-tumoral foram determinadas em camundongos inoculados com tumor de melanoma B16. LDE-oleato de paclitaxel é estável, contudo sua atividade citostática é diminuída quando comparado à sua preparação comercial, fato que pode ser atribuído a citotoxicidade do veículo da formulação comercial. LDE-oleato de paclitaxel aumenta a fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, assim como a formulação comercial o faz. A tolerabilidade do complexo aos camundongos foi surpreendente, de tal forma que a dose letal (DL<sub>50</sub>) é dose vezes maior do que a da formulação comercial (DL<sub>50</sub>=364 and 31,8 mg/kg, respectivamente). LDE concentrou o paclitaxel aproximadamente quatro vezes mais no tumor do que nos tecidos normais adjacentes. A eficácia terapêutica do complexo é maior do que a do fármaco comercial, e é atribuída ao retardamento do crescimento do tumor, aumento da sobrevida e % de cura dos animais tratados. Em conclusão, LDE-oleato de paclitaxel é um complexo estável com índice terapêutico superior ao da preparação comercial.

## SUMMARY

---

RODRIGUES, D. G. **Association of the paclitaxel to a cholesterol-rich microemulsion (LDE): toxicity, biodistribution and therapeutic activity studies in animal model.** São Paulo, 2003. 113p. Tese. Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo.

After being injected in the blood stream, a cholesterol-rich microemulsion (LDE) is taken up by the low-density lipoprotein (LDL) receptors, that it is overexpressed in some neoplastic cells. Therefore, LDE may serve as vehicle to chemotherapeutic agents directed against neoplastic tissues. Paclitaxel, an antineoplastic drug is used in advanced ovarian and breast cancers. Besides to the drug side effects, the vehicle used for its solubilization in aqueous media, conveys important hypersensitivity reactions. In this study, it was promoted the addition of an oleyl group to the paclitaxel molecule to increase lipophylicity and allow a stable association with the LDE particle. The sterification reaction yield and the purity were assessed by HPLC, RMN and mass spectrometry. The stability of the complex was tested by dialysis against plasma, ultracentrifugation and particle size measurement. The cellular uptake, the cytostatic activity and action mechanism were tested in NCI-H292 and B16F10 cancer cell lineages. Single dose acute toxicity was determined in healthy mice and the biodistribution, pharmacokinetics, and antitumor activity of the complex were evaluated in B16 melanoma bearing mice. LDE-paclitaxel oleate was stable but the cytostatic activity of the drug in the complex was diminished compared with the commercial preparation. This was largely due to the cytotoxicity of the vehicle Cremophor EL used in the commercial preparation. LDE-paclitaxel oleate showed to arrest the G<sub>2</sub>/M phase of cell cycle, similarly to commercial paclitaxel. The tolerability of LDE-paclitaxel oleate to mice was remarkable, such that the lethal dose (LD<sub>50</sub>) was twelfefold greater that of the commercial formulation (LD<sub>50</sub>=364 and 31,8 mg/kg, respectively). LDE concentrates paclitaxel in the tumor roughly fourfold relative to the normal adjacent tissues. The therapeutic efficacy of the complex is pronouncedly greater than that of the commercial paclitaxel, as indicated by the reduction in tumor growth and the increase in median survival and % cure of the treated mice. In conclusion, LDE-paclitaxel oleate is a stable complex with superior therapeutic index compared with the commercial preparation.

# Introdução

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1 LIPOPROTEINAS DE BAIXA DENSIDADE E CÂNCER

A lipoproteína de baixa densidade (LDL), produto final da degradação da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), está envolvida no transporte da maior parte do colesterol no organismo. A LDL é uma partícula esférica composta por um núcleo de éster de colesterol e triglicerídeos, circundados por uma monocamada de fosfolípidos e colesterol livre. A sua ligação aos receptores de LDL (rLDL) se faz por meio de domínios presentes na apolipoproteína B-100. A apo B-100 se encontra ancorada na monocamada de fosfolípidos e representa aproximadamente 20 % do peso da partícula (EISENBER *et al.*, 1980).

A meia-vida plasmática da LDL é de 2 a 3 dias. O fígado é o principal órgão de remoção plasmática da LDL, sendo responsável por 70 % de sua degradação. Entretanto, quase todos os tecidos do organismo expressam rLDL. Esses receptores encontram-se em regiões específicas, depressões da membrana celular denominados "coated pits", que são revestidos por proteínas denominadas clatras. Após a interação da lipoproteína com os receptores, essa região sofre invaginação, formando vesículas endocíticas. O envoltório de clatrina dissocia-se e ocorre fusão de várias vesículas formando os endossomos. A diminuição do pH nesses endossomos promove o desligamento do complexo receptor-LDL com o retorno do receptor à superfície celular. Segue-se a fusão de lisossomos com a vesícula e a degradação dos seus componentes (GOLDSTEIN *et al.*, 1979).

O rLDL, cuja estrutura protéica é composta por uma única cadeia de 839

resíduos de aminoácidos, está presente em uma grande variedade de tecidos e apresenta maior atividade justamente naqueles tecidos onde o colesterol é mais requisitado. O número de rLDL na superfície das células é regulado pelo requerimento de colesterol para síntese de membranas, hormônios esteróides e ácidos biliares.

A demanda de colesterol ainda pode ser suprida por síntese endógena e pode ser monitorada através do aumento da atividade da enzima 3-hidroxil-3-metilglutaril Co A redutase (HMG CoA redutase). A HMG CoA redutase é a enzima-chave da biossíntese de colesterol. O excesso de colesterol intracelular ativa a ação da enzima acil Co A colesterol aciltransferase (ACAT) que esterifica o colesterol, o qual é estocado na forma de gotículas (ERICKSON *et al.*, 1980).

Quando as células estão desprovidas de colesterol, ocorre em resposta aumento de expressão do rLDL e aumento da atividade da HMG CoA redutase. A síntese intracelular de colesterol e dos receptores B/E varia na razão inversa da captação do colesterol plasmático. O rLDL está sujeito à regulação retroativa ("feedback") e sua regulação é o principal fator para o controle da concentração plasmática de LDL (BROWN & GOLDSTEIN, 1981).

Em 1978, HO *et al.*, em um estudo pioneiro, observaram um aumento na atividade do rLDL nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA), em relação às células mononucleares de indivíduos saudáveis. Neste estudo ficou demonstrado que o aumento de receptores nas células neoplásicas era um fenômeno muito intenso, podendo ser de 3 a 100 vezes maior do que o número de receptores presente em células normais,

Em 1981, GAL *et al.* mostraram que as células de linhagem neoplásica (carcinoma epidermoidal vaginal, carcinoma epidermoidal cervical e adenocarcinoma

endometrial) expressavam cerca de 15 a 30 vezes mais rDL do que as células de linhagem normal (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais de glândula endometrial

Posteriormente, vários estudos confirmaram o aumento de expressão de rLDL em células neoplásicas, entre eles, melanoma (VERSLUIS *et al.*, 1996) câncer de mama (RUDLING *et al.*, 1986), câncer de bexiga (UEYAMA *et al.*, 1990), células de glioma (RUDLING *et al.*, 1983), linhagens celulares de glioblastomas (MALETINSKA *et al.*, 2000) e BELLOT *et al.* 2001) e linhagens de câncer gástrico (TOKUI *et al.*, 1995).

O aumento de expressão de rLDL pode ser explicado pelo fato de que células neoplásicas apresentam uma rápida proliferação, exigindo uma demanda maior de colesterol e fosfolípidos para a síntese de novas membranas celulares. Em tese, esta demanda, seria suprida por síntese endógena ou via degradação de lipoproteínas de baixa densidade do plasma, o que explicaria o aumento no número de rLDL e a hipocolesterolemia verificado em algumas neoplasias (HENRIKSON *et al.*, 1989, BUDD & GINSBERG, 1986).

Vários estudos tem demonstrado as alterações no metabolismo lipídico de pacientes com câncer. Entre eles: estudos que demonstram uma relação entre a diminuição nos níveis de colesterol plasmático e a progressão da doença (PEKKANEN *et al.*, 1991, IRIBARREN *et al.*, 1995). Estudos que exploram a hipocolesterolemia encontrada em pacientes com câncer, através da comparação com indivíduos normais (BARCLAY *et al.*, 1955, BASES *et al.*, 1965. e NYDEGGER *et al.*, 1972), ou ainda, estudos que demonstram uma normalização dos níveis plasmáticos de colesterol em pacientes com câncer após tratamento e remissão da doença (NIENDORF *et al.*, 1995, HUNGRIA *et al.*, 1995).

## 1.2 LDL COMO AGENTE DIRECIONADOR DE FÁRMACOS

A possibilidade de se utilizar a LDL como um agente direcionador de fármacos para as células neoplásicas tem sido explorada desde meados dos anos 80 por diversos grupos (RUDLING *et al.*, 1983, LUNDBERG, 1987, CHRIS DE SMIDT *et al.*, 1990, SAMADI-BABOLI *et al.*, 1993, TOKUI *et al.*, 1995, XIAO *et al.*, 1999). Essa utilização está baseada em três hipóteses que envolvem propriedades inerentes da partícula de LDL e do seu receptor (SAMADI - BABOLI *et al.*, 1993):

1 - A LDL pode ser capaz de transportar grandes quantidades de fármacos lipofílicos que podem ter efeitos citotóxicos;

2- A internalização do fármaco na LDL protegeria o mesmo contra o ataque de biomoléculas plasmáticas e água;

3- O fármaco incorporado na LDL teria maior concentração nas células neoplásicas que apresentam aumento de expressão de rLDL em relação às células normais.

Apesar de todas as vantagens que o emprego da LDL como agente direcionador de fármacos possa oferecer, sua utilização na clínica ainda continua bastante limitada. O maior obstáculo para sua aplicação está relacionado com a sua natureza endógena o que incorre na necessidade de isolamento do soro humano.

A obtenção de LDL humana em altas concentrações é um procedimento de alta complexidade, além da possibilidade de se contrair doenças infecciosas como hepatite e AIDS e das diferenças de composição entre as lipoproteínas. Uma vez isolada, ainda existe a dificuldade de manipular e armazenar a LDL. A LDL é relativamente instável devido aos processos de oxidação lipídica e principalmente pelas



propriedades anfipáticas da apolipoproteína B-100, que acaba ocasionando a agregação das partículas. Além disso, a introdução de um fármaco na partícula pode resultar na perda da apoB-100 e, conseqüentemente, da propriedade de sua ligação aos rLDL, além de poder alterar ou até mesmo quebrar a sua estrutura (RENSEN *et al.*, 1997).

O primeiro relato de incorporação bem sucedida de um agente antineoplásico à LDL data de 1984, nele IWANICK *et al.* prepararam um complexo de LDL com o antibiótico daunomicina, contendo em média, 8 nmol de daunomicina/mg de apolipoproteína. Neste estudo, ficou comprovado que o procedimento de associação do fármaco à LDL utilizado não modificava estruturalmente o fármaco, mantendo as propriedades inerentes à partícula. Posteriormente, um estudo realizado por MASQUELIER *et al.* mostra que a associação de um agente derivado da doxorubicina com LDL era captado pelas células neoplásicas, via rLDLs. (MASQUELIER *et al.*, 1986).

Em 1990, VITOLS *et al.* associaram um derivado insolúvel da mitoclomina à LDL. Neste estudo ficou comprovada que a entrada do complexo LDL-fármaco em células de ovário de hamster normais e mutantes para rLDL foi mediada via rLDL, além disso o complexo teve o mesmo comportamento plasmático que a LDL humana em camundongos. Ainda em 1990, derivados oleicos do metrotexato e da fluoridina foram associados à LDL com o aumento do tempo de meia vida plasmática do fármaco (de SMIDT & BERKEL, 1990). Em 1993, um derivado lipofílico do eliptinium, oleato de eliptinium, foi associado à LDL numa proporção de 400 moléculas por partícula. O complexo formado mostrou ser metabolizado preferencialmente pelos rLDL *in vitro*, com aumento da atividade antitumoral demonstrado em um modelo animal (SAMADI-BABOLI *et al.*, 1993).

Atualmente existem vários estudos bem sucedidos de associação de

antineoplásicos à LDL, entre eles: doxorubicina (KADER *et al.*, 1998, CHU *et al.*, 2001), derivados lipofílicos N-substituídos da daunorubicina (VERLUIIS *et al.*, 1998) e derivados lipofílicos da adriamicina (MASQUELIER *et al.*, 2000). Existe também um estudo onde a incorporação de um radiofármaco hidrofóbico marcado com  $^{125}\text{I}$  captado pelos rLDL em três linhagens de tumores cervicais humanos (XIAO *et al.*, 1999).

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

A dificuldade de se isolar a apoB-100 do plasma, além da ausência de apoB recombinante no mercado, provavelmente devido ao seu tamanho e propriedades físicas, tem sugerido a troca da apo B-100 pela apoE. Entre outras vantagens, a apo E apresenta uma alta afinidade pelos rLDL e é vendida comercialmente. Estudos realizados por RENSEN *et al.* (1997) demonstraram que lipossomas ligados a apoE recombinantes eram captados expressivamente pelo fígado e glândulas adrenais de ratos. Em outro estudo, VERLUIIS *et al.*, (1998) mostraram que lipossomas ligados a apo E permitem o direcionamento específico de um derivado lipofílico da daunorubicina em tumores experimentais em camundongos.

Recentemente um estudo onde se utilizou uma microemulsão lipídica com peptídeos anfifílicos demonstrou excelentes resultados *in vitro*. Os peptídeos anfifílicos em questão se ligam aos mesmos domínios da apo B do receptor de LDL (BAILLIE *et al.*, 2002).

### 1.3 LDE – MICROEMULSÃO RICA EM COLESTEROL

Em trabalho publicado em 1993, MARANHÃO *et al.*, demonstraram que uma microemulsão lipídica com composição semelhante a LDL humana, com exceção da parte protéica (LDE), ligava-se aos rLDL, sendo captada pelas células. O objetivo inicial deste estudo era a avaliação do uso da LDE como ferramenta de investigação da hipercolesterolemia relacionada à arteriosclerose. Surpreendentemente, os resultados obtidos em ratos mostraram que a LDE apresentava resposta metabólica semelhante à da LDL natural, sugerindo que estivesse sendo captada pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação.

Apesar da LDE não ter proteína, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. A apo E serve então de ponte para a LDE ligar-se ao receptor, sendo assim captada pela célula (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO *et al.*, 1997). Corroborando estes dados, recentemente, estudos realizados em uma linhagem de células de câncer de pulmão mucoepidermoidal demonstraram através, de dois experimentos que a LDE é captada pelos rLDL. Num primeiro experimento, quantidades crescentes de LDL natural adicionados ao meio diminuíram a captação celular da LDE e num segundo experimento, a substituição de soro fetal bovino por um soro fetal deficiente de lipoproteínas, fez com que as mesmas células aumentassem a expressão de rLDL e captassem mais LDE. (MARANHÃO *et al.*, 2002).

Em outro estudo foi demonstrado que a LDE tinha uma taxa de remoção

plasmática superior à da LDL em ratos, indicando que a LDE tem mais afinidade pelos rLDL do que a própria LDL natural (HIRATA *et al.*, 1999). Este resultado confirma a teoria de que o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, a qual tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 presente na lipoproteína natural.

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

Com os elementos que se dispunha sobre o comportamento da LDE, levantou-se a hipótese de que a LDE pudesse substituir a LDL natural como veículo para direcionar os fármacos antineoplásicos para os tecidos malignos, evitando órgãos e tecidos normais (MARANHÃO *et al.*, 1992; MARANHÃO *et al.*, 1994).

Os agentes antineoplásicos seriam incorporados à LDE; a microemulsão seria injetada na circulação, onde iria adquirir a apo E e ligar-se preferencialmente aos rLDL das células neoplásicas, onde estes receptores estão em número muito maior comparativamente às células normais. Desta forma a LDE iria dirigir o fármaco à célula neoplásica, realizando o velho sonho da terapêutica, de aumentar a eficiência do tratamento quimioterápico, ao mesmo tempo reduzindo os seus efeitos colaterais devastadores.

Esta hipótese foi primariamente comprovada em pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA). Verificou-se que a LDE foi removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA do que nos controles. Em contrapartida, após os

pacientes serem tratados com esquemas quimioterápicos convencionais e atingido completa remissão da doença, a remoção plasmática da LDE tomava-se mais lenta, normalizando-se. Isto mostrava que as células de LMA, com receptores em número muito maior, provocaram remoção acelerada da microemulsão. Quando estas foram destruídas pela quimioterapia, a remoção era normalizada. Neste trabalho, também mostrou-se a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de células de LMA de maneira direta, através de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio<sup>99m</sup>. Neste experimento ficou comprovado que 70 % da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas (MARANHÃO *et al.*, 1994).

Recentemente, confirmou-se a captação e concentração da LDE em tumores sólidos. Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama, mostraram que a LDE se concentra nos tecidos neoplásicos. Em câncer de ovário, por exemplo, a captação da LDE foi em média 10 vezes maior do que no tecido normal (ADES *et al.*, 2001), enquanto que em carcinoma de mama, a captação tumoral foi 4,5 vezes, em média, maior do que a do tecido mamário normal (GRAZIANI *et al.*, 2002). Estes experimentos comprovam, portanto, que é possível direcionar um veículo feito artificialmente para o tecido neoplásico.

A confirmação da hipótese de que a LDE era captada preferencialmente pelas células neoplásicas, levou o grupo para a segunda etapa do trabalho, ou seja, a incorporação de um quimioterápico à LDE. Inicialmente o fármaco de escolha foi a carmustina, visto que a mesma apresenta um alto grau de lipofilicidade e pela facilidade de obtenção no mercado farmacêutico.

Experimentos realizados pelo grupo demonstraram que a associação de carmustina à LDE era estável. Ensaio realizado em cultura de células mostraram que a atividade citostática do fármaco era preservada e que a associação LDE-

carmustina era captado pelas células via rLDL. A biodistribuição em ratos e a cinética plasmática em pacientes de LDE-carmustina não era alterada pelo procedimento de associação. A captação tecidual do complexo em tumores de ovário e mama era maior do que no tecido normal. Finalmente, em um estudo clínico piloto ficou comprovado que altas doses do complexo não provocavam efeitos adversos significativos (MARANHÃO *et al.*, 2002).

Estudos clínicos de fase I/II com a preparação de LDE-carmustina, conduzidos em colaboração com o Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês, demonstraram um efeito anti-tumoral com melhora importante na qualidade de vida de pacientes com mieloma múltiplo e em outros tipos de tumores avançados, tais como ovário e mama, além de uma surpreendente diminuição de efeitos colaterais, onde doses acima de 150 % da dose máxima convencional (200 mg/Kg), resultou em toxicidade mínima (Dados não publicados).

Dois estudos, contudo, mostraram que a associação de um fármaco à LDE não é um procedimento simples. A daunorubicina, por exemplo, demonstrou ter um baixo índice de incorporação. Apesar disto, o complexo LDE-daunorubicina provocou a morte de 46,7 % de células blásticas neoplásicas e 20,2 % das células normais de medula óssea cultivadas, demonstrando especificidade do complexo para as células neoplásicas (DORLHIAC-LLACER *et al.*, 2001). Em outro estudo, a taxa de associação de uma sonda marcada radioativamente à LDE foi tão baixa que inviabilizou qualquer estudo posterior (BYDLOWSKI, *et al.*, 1995).

Em estudos desenvolvidos com oleato de etoposídeo associado à partícula de emulsão, observou-se que a modificação química (introdução de um grupo oleila), aumentando a lipofilicidade do fármaco, não alterou sua atividade citotóxica e, além

disso, elevou de 50 % para aproximadamente 98 % a taxa de associação à LDE. Além disto a tolerabilidade ao fármaco foi aumentada, como demonstrado em estudo de toxicidade realizado em camundongos (VALDUGA *et al.*, 2003).

#### 1.4 PACLITAXEL

Paclitaxel é o fármaco precursor de uma nova classe de agentes estabilizantes de microtubulos, os taxanos. A sua descoberta foi fruto de um trabalho muito laborioso que envolveu a investigação de aproximadamente 12.000 compostos naturais pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) em 1963. Neste trabalho diferentes extratos eram testados contra um painel de tumores experimentais e, no final, apenas aqueles que apresentavam alguma atividade antiproliferativa eram selecionados (ROWINSKY *et al.*, 1990).

Paclitaxel foi extraído primariamente no começo dos anos 60 a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia*. Sua forma pura somente foi obtida em 1969 e sua estrutura foi descrita pela primeira vez apenas em 1971 (WANI *et al.*, 1971). O seu desenvolvimento foi inicialmente dificultado pelo suprimento limitado da árvore e pela baixa solubilidade da molécula em água, o que de fato, retardou em muito a sua disponibilização para o mercado farmacêutico. A solução para o escasso suprimento de paclitaxel foi encontrada em meados dos anos 80, a partir do desenvolvimento de um método de produção semi-sintética pelo qual o fármaco era obtido a partir de um precursor não citotóxico extraído das folhas e outros componentes de teixos mais abundantes, como o *Taxus baccata* (HORWITZ, 1992).

Paclitaxel não era um agente de reconhecida importância até o final dos anos

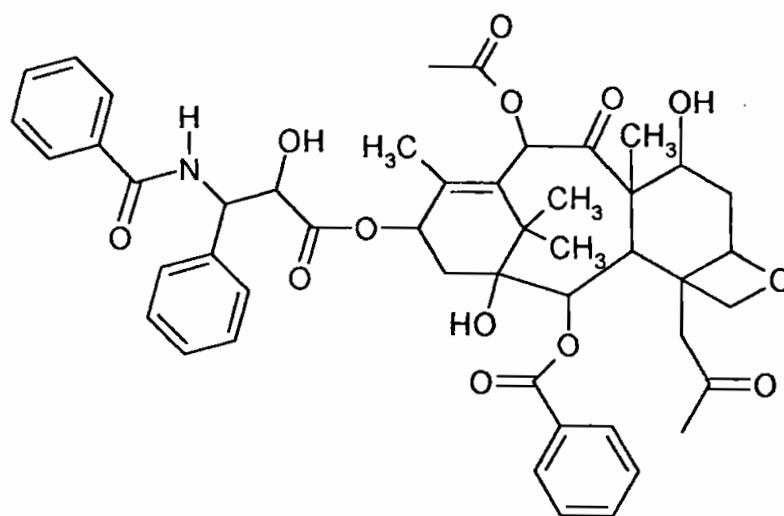
70, quando descobriu-se que ele possuía um mecanismo de ação único. (SCHIFF e HORWITZ, 1980). Na verdade o interesse neste agente cresceu substancialmente quando o NCI divulgou resultados de experimentos de regressão tumoral, onde Paclitaxel mostrou ter uma atividade anti-tumoral bastante significativa.

O paclitaxel tem atividade anti-neoplásica em carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, colo, cabeça, células não-pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi associados com AIDS (ROWINSKY *et al.*, 1994). Em vários países, entre eles o Brasil, paclitaxel é utilizado como tratamento de primeira linha em câncer refratário de ovário e segunda linha em câncer de mama.

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

O mecanismo preciso pelo qual o paclitaxel é transportado para dentro das células é desconhecido. Supõe-se que, devido à sua natureza hidrofóbica, paclitaxel possa entrar na célula por difusão passiva. Esta hipótese é suportada pelos achados de experimentos onde o paclitaxel é adicionado juntamente com azida sódica sob células em cultura. A azida sódica é responsável pela diminuição do nível de ATP celular, quando ela é acrescentada ao meio de cultura, a concentração intracelular de Paclitaxel não é afetada (MANFREDI *et al.*, 1984).





Paclitaxel

**Figura 1.** Estrutura química do paclitaxel

A estrutura do paclitaxel consiste em um anel taxano que confere atividade citostática à molécula (WANI *et al.*, 1971) e uma cadeia lateral estero-específica com dois anéis aromáticos conectados por uma amida. Estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que paclitaxel exibe pequeno grau de flexibilidade, dependendo da polaridade do sistema solvente. Em solventes apolares como o clorofôrmio, ele sofre agregação dependendo da sua concentração. Este efeito de agregação está diretamente ligado à formação de pontes de hidrogênio dos quatro grupos funcionais de sua estrutura. Essas ligações podem ser coordenadas, ocorrendo ligações intra e extramoleculares, o que por sua vez acaba se propagando e provocando a

precipitação das moléculas. A formação de pontes de hidrogênio pode contribuir para o seu mecanismo de ação, ou seja, o fármaco estabilizaria os microtubulos através da formação de pontes associadas entre o fármaco e os microtúbulos (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 1994).

Sabe-se que paclitaxel é solúvel em uma variedade de solventes orgânicos incluindo o etanol, metanol, benzeno, clorofórmio e outros, porém tais solventes não são administrados em humanos, com exceção do etanol (TRISSEL, 1997). Paclitaxel é praticamente insolúvel em água, com um valor aceitável de solubilidade em água de aproximadamente 0,6 mM (TARR e YALKOWSKY, 1987). A falta de grupos ionizáveis na molécula não permite que se manipule o pH com o intuito de aumentar a sua solubilidade.

Uma solução para a comercialização do paclitaxel pela indústria farmacêutica foi a sua solubilização em um sistema de solvente utilizado pelo NCI chamado de diluente 12. O diluente 12 é composto por partes iguais de etanol e do surfactante Cremophor EL, um derivado poli-oxietilado de óleo de castor. A forma comercial do paclitaxel foi denominada originalmente de Taxol®.

Para administração, o conteúdo de cada frasco tem que ser diluído. A concentração final recomendada para administração de paclitaxel é de 0,3 a 1,2 mg/mL. Após ser diluída, as partículas de paclitaxel começam a precipitar vagarosamente. A estabilidade estimada do paclitaxel após diluído é de 12-24 h, por esta razão é recomendado que se utilize a solução dentro de 12 h com um filtro em linha para remover possíveis precipitados de paclitaxel .

Um dos maiores problemas associados com a formulação do paclitaxel é que o seu veículo, Cremophor EL, é tóxico. Embora ele também seja utilizado para solubilizar outros fármacos, tais como ciclosporina e tenoposide, a quantidade

requerida do diluente nestas formulações é inferior a utilizada para solubilizar paclitaxel. (TRISSEL, 1997). Os efeitos colaterais causados pelo Cremophor EL incluem reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (WEISS *et al.*, 1990 e ROWINSKY *et al.*, 1990). Cremophor EL também tem influência na função do endotélio e músculos, causando vasodilatação, dificuldade de respirar, letargia e hipotensão (LIEBMANN *et al.*, 1993 e SCOTT *et al.*, 1993). No intuito de se amenizarem estes efeitos e de se reduzir a incidência de reações de hipersensibilidade, medidas profiláticas são adotadas durante o tratamento com o paclitaxel, como o uso de anti-histamínicos e corticosteróides ao longo da infusão (SHARMA *et al.*, 1995).

## 1.5 PACLITAXEL – NOVAS FORMULAÇÕES e SÍNTESE DE PRÓ-FARMÁCOS

Tentativas de se retirar Cremophor da formulação para aumentar o índice terapêutico do paclitaxel, incluem modificações na estrutura da molécula com a finalidade de torná-la hidrossolúvel ou promover a dissolução do fármaco em outros veículos menos tóxicos. Entre as tentativas de se substituir o veículo da formulação, podemos destacar a utilização de veículos ou transportadores de menor toxicidade, como as ciclodextrinas (SHARMA *et al.*, 1995), lipossomas (SHARMA *et al.*, 1994, 1998), emulsões (LUNDBERG *et al.*, 1997, KAN *et al.*, 1999), micelas poliméricas (ZHANG *et al.*, 1997), nanopartículas (CAVALLI *et al.*, 2000, FONSECA *et al.*, 2002, MU & FENG, 2003 ) e moléculas conjugadas (LI *et al.*, 1998).

Existe apenas um estudo de associação de paclitaxel à LDL natural na

literatura. Nesse estudo ficou demonstrado que a associação do paclitaxel à LDL natural é extremamente instável no plasma (MASQUELIER *et al.* 2000), com liberação do fármaco nos primeiros minutos após a administração endovenosa.

Uma outra alternativa apresentada para se diminuir a toxicidade do fármaco disponível comercialmente é a modificação química da molécula de paclitaxel. Vários autores tem proposto a síntese de derivados do paclitaxel. (DEUTSH *et al.*, 1989, MATHEW *et al.*, 1992, GEORG *et al.*, 1994). Em tese, a introdução de grupos que promovem o aumento de hidrofiliabilidade da molécula, permitiriam sua solubilização em veículos aquosos, enquanto que a introdução de grupos que aumentem a sua lipofiliabilidade, permitiriam que a mesma seja associada a transportadores de natureza lipídica.

Num estudo pioneiro realizado em 1984, MELLADO *et al.* mostraram que era possível sintetizar derivados de paclitaxel com atividade biológica, utilizando preferencialmente o sítio C-7 da molécula. Em 1992, MATHEW *et al.* sintetizaram vários amino-derivados C-2 e/ou C-7 de paclitaxel. Neste estudo, foram utilizados grupamentos protetores da posição C-2, com a finalidade de gerar apenas derivados C-7. Ficou comprovado através destes experimentos que derivados C-7 eram efetivos na polimerização dos microtúbulos, enquanto os derivados C-2 apresentaram baixa atividade na polimerização. A atividade citotóxica permaneceu inalterada nos dois grupos. (MATHEW *et al.*, 1992). Uma explicação plausível para a manutenção da atividade citotóxica do derivados C-2 é a ação de enzimas intracelulares que promovem a hidrólise da ligação éster com restabelecimento da atividade da molécula.

Recentemente bons resultados tem sido obtidos através da modificação química do paclitaxel. No primeiro deles, BRADLEY *et al.* (2001) acoplaram um ácido graxo natural, o ácido docosahexaenoico (DHA), através de uma ligação éster ao

grupo C-2 do paclitaxel. O objetivo era aumentar a atividade farmacológica do paclitaxel através do incremento do tempo de circulação plasmática do fármaco e, conseqüentemente, aumento do tempo de exposição ao tumor. DHA-paclitaxel mostrou ser menos tóxico que o paclitaxel, com uma excepcional propriedade antiproliferativa. No tratamento de pacientes com tumores sólidos obteve-se resposta parcial em 11 de 22 pacientes. Atualmente, estudos de Fase II com uma dose cerca de 4,6 vezes maior do que a dose máxima aprovada de paclitaxel estão em andamento.

Em outro estudo, FENG *et al.* (2002) sintetizaram uma série de derivados C-2 de paclitaxel através do acoplamento com aminoácidos ligados ao polietileno glicol. O pró-fármaco resultante é mais solúvel do que o paclitaxel, além de ser mais citotóxico e de apresentar um aumento da eficácia antitumoral comprovada em um modelo animal. Em um estudo recente, LUNDBERG *et al.* (2003) descreveram melhora nos parâmetros cinéticos e diminuição de toxicidade de um derivado lipofílico do paclitaxel associado à uma emulsão lipídica recoberta com polietilenoglicol.

Justificativa

---

## JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores realizados com as associações, LDE-carmustina e LDE-etoposide mostraram que a LDE é um veículo promissor para o direcionamento de fármacos de ação antineoplásica. A substituição do Cremophor por um veículo que além de promover uma diminuição da toxicidade, direcione o paclitaxel às células neoplásicas é sem dúvida uma proposta muito atraente.

A melhora no procedimento de associação LDE-fármaco foi recentemente otimizado após o acoplamento de um grupo oleico à molécula de etoposide. Neste sentido, objetivando-se uma associação estável, é necessário que se investigue procedimentos de incorporação do paclitaxel à LDE e se necessário, procedimentos que aumentem a lipofilicidade da molécula.

O funcionamento do sistema LDE-fármaco é dependente de sua estabilidade no plasma, da interação com o rLDL e da manutenção das propriedades farmacológicas do fármaco. A avaliação do funcionamento do sistema LDE-paclitaxel nos permitirá oferecer condições mais seguras para a otimizar os subseqüentes ensaios farmacológicos e terapêuticos. É necessário, portanto, que se tenha um entendimento mais aprofundado das características físico-químicas e biológicas da associação LDE-paclitaxel, através de ensaios de estabilidade, citotoxicidade e captação celular, além de estudos de toxicidade, farmacocinéticos, biodistribuição e atividade anti-tumoral em modelo animal.

Objetivos

---



## OBJETIVO

- Desenvolver a metodologia de associação do paclitaxel à LDE, se necessário, desenvolver a metodologia de modificação do paclitaxel para torná-lo mais lipofílico e incorporar o fármaco modificado à LDE;
- Avaliar a estabilidade da associação LDE-paclitaxel, *in vitro* e *in vivo*;
- Investigar o papel dos receptores de LDL na captação celular da LDE e da associação LDE-paclitaxel;
- Verificar a citotoxicidade do oleato de paclitaxel e da associação LDE-paclitaxel em comparação com o fármaco em sua formulação comercial;
- Investigar o mecanismo de ação da associação LDE-paclitaxel;
- Avaliar em modelo animal a toxicidade da associação LDE-paclitaxel;
- Avaliar em modelo animal de tumor induzido, a cinética plasmática, biodistribuição e eficácia anti-tumoral da associação LDE-paclitaxel.

Material e métodos

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

A trioleína e o colesterol foram adquiridos da Nu-Check (Elysian, MN). A fosfatidilcolina e o oleato de colesterol foram adquiridos da Lipid Products (Surrey, UK), o [ $^{14}\text{C}$ ]-oleato de colesterol e o [ $^3\text{H}$ ]-oleato de éter de colesterol da Amersham Internacional (Surrey, UK). Para verificar o grau de pureza dos lípides utilizou-se cromatografia em camada delgada (0,5 mm de espessura), utilizando-se sílica gel 60 H e sistema de solvente de hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1).

O Taxol® foi adquirido da Bristol Myers Squibb (1 mL contém 6 mg de Paclitaxel, 527 mg de Cremophor EL, 49,7% v/v etanol, USP), paclitaxel cristalino foi adquirido da Calbiochem® (Calbiochem-Novabiochem Corporation, LaJolla), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide (MTT) e óleo de castor polietoxilado (Cremophor EL) e demais solventes orgânicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). [ $^3\text{H}$ ]-Paclitaxel foi adquirido da Moravek Radiochemicals (Brea, CA).

A linhagem celular de origem humana NCI H-292 (adenocarcinoma epidermoidal de células não pequenas de pulmão) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz, (São Paulo, Brasil). A linhagem celular de origem murina B16 F10 (melanoma) e os camundongos isogênicos C57BL/6J foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Imunogenética do Instituto Butantã (São Paulo, Brasil).

#### 4.2. Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por MARANHÃO *et al* (1993). Em um frasco de vidro foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1,0 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A seguir, a mistura foi evaporada 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, com potência de 125 Watts, por 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 50 e 55 °C.

A microemulsão 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 microemulsão, 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 2.000 mL de tampão-tris HCl 0,01 M, pH 8,05. A emulsão foi então esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Bedford, MA) e armazenada em frascos estéreis a 4 °C por até 30 dias.

#### 4.3. Síntese do oleato de paclitaxel

O oleato de paclitaxel foi sintetizado em duas etapas a partir de uma adaptação do método de LUNDBERG *et al.* (1994):

##### 4.3.a. Preparação do cloreto de oleíla

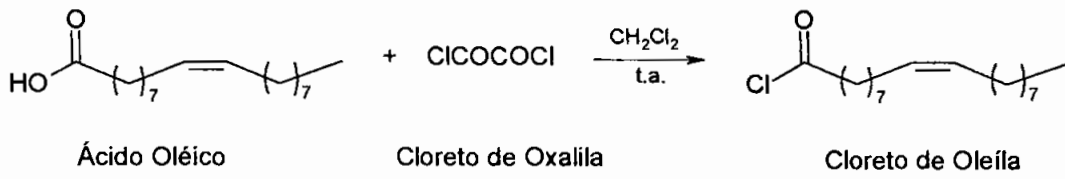
Foram dissolvidos 378 mg (1,34 mmol) de ácido oléico em diclorometano e adicionaram-se 35  $\mu$ L (4,02 mmol) de cloreto de oxalíla dissolvido em diclorometano, sob atmosfera de nitrogênio. Secou-se o solvente e o produto foi imediatamente utilizado.

##### 4.3.b. Reação entre cloreto de oleíla e paclitaxel

O cloreto de oleíla preparado anteriormente foi dissolvido em 10 mL de acetonitrila anidra e à temperatura ambiente; adicionou-se rapidamente sobre esta solução uma mistura de 1 g (1,11 mmol) de paclitaxel e 32  $\mu$ L (3,17 mmol) de trietilamina dissolvidos em 50 mL de acetonitrila anidra. Deixou-se sob agitação por 45 minutos. Lavou-se a fase orgânica com solução de HCl 0,5N, depois água e por último uma solução de cloreto de sódio. O produto foi seco com sulfato de magnésio e

filtrado. O solvente foi removido em rotaevaporador. Obteve-se um sólido ligeiramente amarelado ao qual adicionou-se lentamente uma mistura de 1:10 diclorometano/hexano, sob agitação. Obteve-se um precipitado branco, que foi filtrado e lavado com hexano anidro e seco a vácuo. O paclitaxel modificado foi denominado oleato de paclitaxel.

Primeira etapa: Preparação do cloreto de oleíla



Segunda etapa: Reação entre cloreto de oleíla e paclitaxel

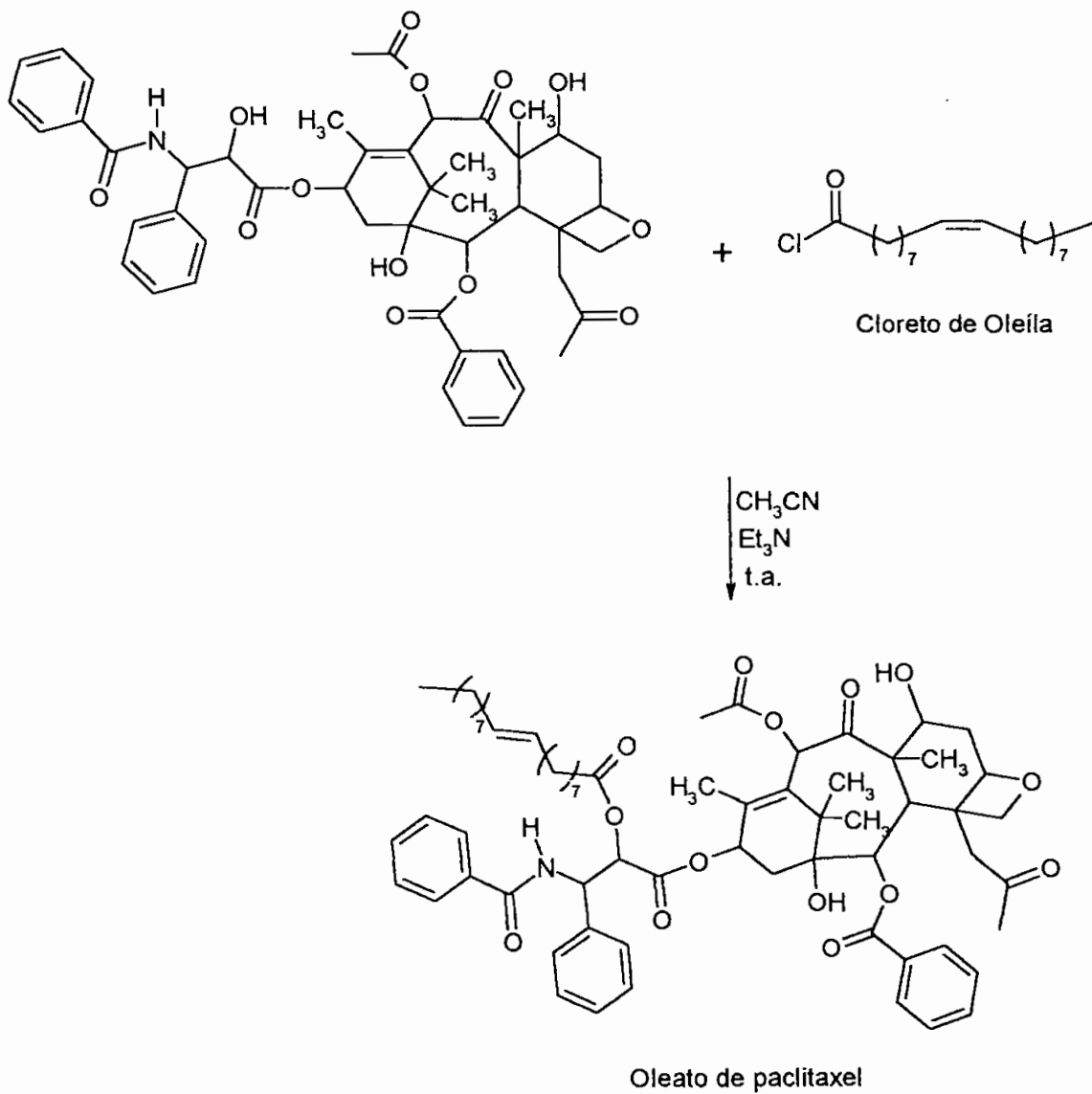


Figura 2. Reação de acoplamento do paclitaxel com cloreto de oleíla

#### 4.4 *Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.*

A detecção do produto de reação, oleato de paclitaxel foi obtida por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) acoplada à espectrometria de massa seqüencial ou em *tandem* com sistema de ionização da amostra por electrospray (LC-ESI/MS/MS). Os experimentos foram realizados em espectrômetro triplo quadrupolo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) acoplado a um HPLC Shimadzu LC-10AD Class VP no Laboratório de Lesões em Biomoléculas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - SP, em colaboração com o Dr. Paolo Di Mascio.

A análise do produto da reação de esterificação, oleato de paclitaxel foi realizada por HPLC em fase reversa numa coluna 250 x 4,6 mm, Luna C<sub>8</sub>(2) (Phenomenex, Torrance, CA), com fluxo de 1,0 mL/min, usando metanol/acetonitrila 10:90 como fase móvel. A quarta parte do eluente (250 µL/min) da coluna foi para o espectrômetro, produzindo um ionspray entre as fases onde os íons positivos foram separados e detectados. O paclitaxel e o oleato de paclitaxel foram analisados com potenciais de 3,5 kV para o capilar de ESI e uma voltagem de 20 V no cone. As análises foram realizadas utilizando os seguintes modos: varredura total do scan (*full scan*) de *m/z* 700 a 1400.

#### 4.5. *Análise por ressonância magnética nuclear*

Os dados de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional (RMN 1D e RMN 2D) de hidrogênio (1H RMN) foram obtidos em um aparelho Bruker DPX-300 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.



Utilizou-se clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão descritos em partes por milhão em relação ao trimetilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. É colocada entre parênteses a multiplicidade dos sinais (s= singlete, d = dubleto, t = tripleto, m = multiplete, dd = duplo dubleto) e a constante de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

#### *4.6 . Associação de paclitaxel e oleato de paclitaxel a LDE*

O paclitaxel foi associado a LDE numa razão 5:1 em massa de lipídios e fármaco. O paclitaxel foi dissolvido em 300  $\mu$ L de etanol, sob agitação até completa solubilização. A LDE foi adicionada à solução de paclitaxel a um volume final de 3,0 mL. A incorporação foi realizada por sonicação por 30 minutos com temperatura variando entre 50 e 55 °C em banho de água. As preparações foram realizadas no mesmo dia dos respectivos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22  $\mu$ m. A associação LDE-fármaco foi denominado LDE-paclitaxel.

A associação do oleato de paclitaxel a LDE foi realizada seguindo o método acima descrito. A associação LDE-oleato de paclitaxel foi denominado LDE-olpaclitaxel.

#### 4.7. Determinação da eficiência de associação do paclitaxel e oleato de paclitaxel a LDE

A determinação da eficiência de associação de paclitaxel e oleato de paclitaxel na LDE foi avaliada através da separação da fração do fármaco associado a LDE e não associado (fármaco livre) através dos seguintes métodos:

##### 4.7.1 Separação por Coluna Sephadex G25

Este método é uma adaptação do método proposto por LUNDBERG *et al.*, 1997. 200  $\mu$ L das soluções de [ $^{14}$ C]-LDE:[ $^3$ H]-paclitaxel e [ $^{14}$ C]-LDE:[ $^3$ H]-olpaclitaxel foram eluídas em coluna Sephadex G25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) recolhendo-se 1 mL dos eluatos por tubo, utilizando-se seqüencialmente os seguintes eluentes: 7 mL de solução de NaCl 0,9 %; 1,0 mL de DMSO e 11 mL DMSO 30 % em solução de NaCl 0,9 %. A quantificação do paclitaxel e oleato de paclitaxel foi realizada por dois métodos: Cromatografia líquida de alta eficiência e contagem dos elementos radioativos por cintilação líquida.

Para análise em HPLC, 20  $\mu$ L das amostras obtidas na coluna foram injetados em um sistema de HPLC (Shimatzu, TO, Japão) com coluna  $C_8$  de fase-reversa (LUNA, Phenomex, Torrance), pré-coluna  $C_{18}$  (Supelco, Bellefonte), em fase móvel de metanol:acetonitrila (10:90) e fluxo de 1,0 mL/min. O espectro foi obtido a 227 nm.

Para a determinação da radioatividade das frações obtidas da coluna de Sephadex G25, 50  $\mu$ L das amostras foram adicionados em frascos de cintilação

contendo 7,0 mL de solução cintiladora (5g de PPO, 0,5 de POPOP, 333 mL de triton X-100 e tolueno q.s.p. 1.000 mL). A radioatividade foi medida pela contagem líquida de cintilação em aparelho Tri-Carb modelo 1900 TR (Packard Instr. Co., Meriden).

#### 4.7.2 - Separação por ultracentrifugação

1 mL de [<sup>14</sup>C]-LDE:[<sup>3</sup>H]-paclitaxel e [<sup>14</sup>C]-LDE:[<sup>3</sup>H]- oleato de paclitaxel foram incubados com 2,5 mL de plasma humano por 1 h à 37 °C. Após o período de incubação, adicionou-se 6,5 mL de solução Tris HCl pH 8,05 e a densidade da solução foi ajustada para 1,21 g/mL com KBr, através da seguinte equação:

$$\text{Eq. 1: } g \text{ KBr} = (df - di) \times V \times 1,579$$

$df$  = densidade final,

$di$  = densidade inicial,

$V$  = volume desejado.

A seguir, a solução foi ultracentrifugada em ultracentrifuga Beckman, rotor Swi 41, 200.000 g, por 2 horas, à 4 °C. Após a ultracentrifugação o paclitaxel livre é precipitado. Enquanto que no sobrenadante, encontra-se o paclitaxel associado à LDE. A percentagem de radioatividade correspondente aos elementos marcados em cada fração foram determinada por cintilação líquida (2.7.1).

#### 4.8 Diálise da associação LDE-oleato de paclitaxel

1,0 mL de [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE- $^3\text{H}$ -oleato de paclitaxel, foi dialisado contra 20 mL de plasma e solução Tris HCl pH 7,4 através de membrana de diálise (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO), sob agitação magnética, por 144 h à 37°C. Durante este período, amostras de 5  $\mu\text{L}$  da associação foram coletadas do interior da membrana nos seguintes tempos: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72, 96 e 144 h e após o final do experimento amostras de 100  $\mu\text{L}$  do plasma e da solução Tris HCl foram retiradas para análise. A quantificação dos elementos radioativos nas amostras foi realizada por cintilação líquida como previamente descrito (2.7.1)

#### 4.9 Avaliação do tamanho de partícula de LDE- do oleato de paclitaxel

O diâmetro das partículas da LDE e LDE-oleato de paclitaxel foi determinado por espalhamento de luz em analisador de potencial Zeta (Brookhaven Instruments Co., Holtscille-NY). Todas as amostras foram mantidas à 4 °C e diluídas e filtradas momentos antes da análise. Para avaliar a estabilidade da preparação, o diâmetro de partícula, das amostras foi avaliado em função do tempo, por até 30 dias.

#### 4.10 Cultura de células

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células de carcinoma mucoepidermoidal de pulmão da linhagem NCI-H292. As células foram mantidas em estufas umidificadas (5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de ar), à 37 °C, em meio de cultura RPMI-1640, sem glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2 g/L), 10 % de soro fetal bovino, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de monocamada em garrafas de 75 ou 25 cm<sup>2</sup> e repicadas a cada dois dias.

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, as células foram submetidas à ação de uma solução de tripsina-versene (0,2 %) e mantidas de 2 a 3 minutos em estufa umidificada. As células foram destacadas da parede da garrafa com adição de 10 mL de meio RPMI 1640 enriquecido. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 r.p.m. por 3 minutos. O botão celular foi novamente suspenso em 10 mL de meio e foram distribuídos 100 µL da suspensão celular a cada poço da placa de microcultura (96 poços) a uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células/mL.

#### 4.11. Ensaio de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das formulações foi utilizado o método de determinação de viabilidade celular MTT (MOSMANN *et al.*, 1983). Para realização do ensaio 44,0 mg de MTT são dissolvidos em 8,8 mL de tampão-fosfato pH 8,0 e filtrado

em filtro Millipore 0,22 µm. Quando as células apresentaram de 70 a 75 % de confluência; as seguintes formulações foram adicionadas às células em diferentes concentrações, que variaram de 0,003 a 30 µg/µL:

1. Paclitaxel + veículo<sup>1</sup>
2. oleato de paclitaxel + veículo<sup>1</sup>,
3. LDE-oleato de paclitaxel,
4. LDE-oleato de paclitaxel + veículo<sup>1</sup>
5. Controles: veículo<sup>1</sup> e LDE

<sup>1</sup> veículo: 527 mg de Cremophor EL, 49,7% v/v etanol.

As placas foram mantidas em estufa por 48 h. Após esse período o meio foi retirado e foram adicionados 10 µL de MTT e 90 µL de RPMI a cada poço da placa. As placas foram mantidas por 4 h em estufa, quando então o meio foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados para completa solubilização dos cristais de MTT. A leitura das placas foi realizada após 1 h da adição do DMSO, em leitor de ELISA (Microplate BIORAD, CA,) a 570 nm e 655 nm.

O índice de citotoxicidade, índice que expressa a dose necessária para manter a viabilidade de 50 % das células, (IC<sub>50</sub>) foi determinado através da equação (1):

$$\text{Eq 2: IC}_{50} = \frac{\text{média das absorvâncias das amostras} \times 100}{\text{média das absorvâncias dos controles}}$$

#### 4.12 Captação de [<sup>14</sup>C]-LDE e da associação [<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel por Células NCI H-292

As células foram semeadas em placas de Petri com 5 cm de diâmetro, na densidade de 10<sup>5</sup> células/placa, em RPMI-1640 contendo 10 % de SFB e incubadas em estufa à 37 °C, por 24 h. No dia seguinte, o meio foi substituído por RPMI-1640 suplementado com plasma deficiente de lipoproteínas (LPDS), preparado como descrito por GOLDSTEIN *et al.*, (1976). No terceiro dia, as células subconfluentes foram submetidas à incubação em triplicata, com concentrações crescentes (0,01 a 1,0 mg/mL) de [<sup>14</sup>C]-LDE ou da associação [<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel à 37 °C, por 4 h. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com solução PBS 0,1 mM, ambas as soluções à 37 °C. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução de tripsina a 0,05 % às células antes de incubá-las à 37 °C, em estufa com agitação mecânica, por 15 minutos. A monocamada de células foi assim removida e o 'pellet' transferido para tubos Eppendorf sendo estes centrifugados a 14000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e 0,2 mL de NaOH a 0,5 M foram adicionados ao 'pellet', que foi então submetido à agitação em vortex por 30 segundos, causando a ruptura das células.

A radioatividade presente no homogenato de células foi medida após a adição de líquido de cintilação como descrito anteriormente (4.7.1)

#### 4.13 Captação celular de [<sup>14</sup>C]-LDE e da associação [<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-olpaclitaxel na presença de LDL nativa

Este experimento foi desenvolvido em células NCI H-292, em condições

anteriormente descritas (2.12), exceto pela adição de LDL nativa, obtida do plasma de doadores saudáveis e normolipidêmicos por ultracentrifugação seqüencial. Concentrações crescentes (0,01 a 1,0 mg/mL) de LDL humana foram concomitantemente adicionadas com concentrações fixas (0,2 mg/mL) de LDE ou LDE-olpaclitaxel radioativamente marcados. A captação celular de LDE foi medida como descrito anteriormente (4.7.1).

#### *4.14. Teste de toxicidade em Camundongos C57BL/6J*

O estudo de toxicidade da associação LDE-oleato de paclitaxel, paclitaxel em sua formulação comercial e respectivos controles, LDE e Cremophor-EL foi realizado em camundongos fêmeas C57BCL6, pesando aproximadamente 20 - 25 g de acordo com protocolo estabelecido por ZHANG et al. (1997). Para realização dos ensaios, doses que variaram de 5 mg/Kg à 400 mg/Kg foram injetadas intraperitonealmente em cinco animais por grupo. Todas as doses foram ajustadas com base no peso corpóreo dos animais. Após a administração, os animais foram pesados diariamente por 30 dias. Observações diárias da sobrevivência dos animais foram realizadas no mesmo período. A DL<sub>10</sub>, DL<sub>50</sub>, DL<sub>90</sub>, que representam as doses letais responsáveis pela morte de 10, 50 e 90 % dos animais, respectivamente, foram determinadas através da interpolação entre % de camundongos mortos em cada grupo e respectivas doses. A dose máxima tolerada (DMT) corresponde a dose administrada a um grupo de animais, no qual foi observada uma redução de no máximo 15 % de seu peso inicial e sobrevivência de todos os animais.



#### 4.15. Manutenção de células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J

Tumores originários de células de melanoma B16 F10 foram mantidos através de transplantes seriados em camundongos fêmeas C57BL/6J. Camundongos pesando entre 20 e 25 g foram mantidos em ciclos normais de luz-escurecimento, com ração e livre acesso à água. Para a manutenção do modelo, tecidos tumorais foram retirados periodicamente e transplantados em outro grupo de camundongos através do seguinte método. Após excisado, o tecido tumoral foi macerado em solução fisiológica estéril ( $9 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) e filtrado. Células viáveis foram analisadas pelo método de exclusão em azul de trypan. Aproximadamente  $100 \mu\text{L}$  contendo  $5 \times 10^4$  de células viáveis em solução de fosfato tamponada foram injetadas subcutaneamente na região dorsal de camundongos fêmeas. Em média, dez dias após a inoculação, os tumores podiam ser visualizados macroscopicamente.

#### 4.16 Estudo de biodistribuição – captação tecidual de [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE

Aproximadamente  $100 \mu\text{L}$  de LDE (4,5 nCi) marcada radioativamente com [ $^{14}\text{C}$ ]- oleato de colesterol foram injetados endovenosamente ou intraperitonealmente em um grupo de camundongos fêmeas C57BL/6J. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por 18 h. No final deste período os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de aproximadamente 200 – 250 mg dos seguintes

tecidos: pele, tumor, fígado, cérebro, baço, pulmão, testículos, rins, coração e intestino foram retiradas e conservadas em solução de NaCl 0,9 % à 4 °C até se dar início aos procedimentos de extração lipídica.

#### *4.17 Estudo cinético e de biodistribuição – captação tecidual de [<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-olpaclitaxel*

Aproximadamente 100 µL de LDE (4,5 nCi) marcada radioativamente com [<sup>14</sup>C]-oleato de colesterol associada ao [<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel foram injetados intraperitonealmente em um grupo de camundongos fêmeas CD57BL/6J. Aproximadamente 300 µL de amostra de sangue foram colhidos em tubos de Eppendorf contendo 2 µL de heparina sódica, em intervalos pré-determinados, 5 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 24 h após a administração. No final deste período os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de aproximadamente 200 – 250 mg dos seguintes tecidos: tumor, fígado e pele foram retiradas e conservadas em solução de NaCl 0,9 % à 4 °C até se dar início aos procedimentos de extração lipídica.

As amostras de sangue foram centrifugadas à 3.000 r.p.m., durante 10 minutos para obtenção do plasma. Alíquotas de 100 µL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação e a radioatividade foi medida utilizando procedimentos anteriormente descritos (4.12).

Para representar a remoção das partículas, foi utilizado o parâmetro

denominado taxa fracional de remoção (TFR), em  $h^{-1}$ , dos componentes marcados, o qual é calculado a partir da média ponderada das respectivas taxas fracionais de transferência (k). Foram traçadas curvas de remoção plasmática dos componentes radioativos e calculadas as taxas fracionais de remoção (TFR) dos mesmos, com a utilização de um programa desenvolvido para análise de cinética. (MESQUITA, 1994).

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

#### 4.18 Extração Lipídica – determinação da radioatividade nos tecidos:

Os lípidos foram extraídos dos tecidos coletados seguindo o método convencional descrito por FOLCH *et al* (1957). Os fragmentos foram limpos em condições adequadas sob placa de gelo, em seguida pesados (mg), e então macerados de forma que ficassem com o aspecto pastoso. Os fragmentos foram transferidos para tubos grandes (20x160) onde foram adicionados 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio e deixados em repouso "overnight" à 4 °C. As amostras foram filtradas; lavadas com 2,5 mL de clorofórmio (2x) e foram adicionados 7 mL de água bidestilada. A fase sobrenadante foi aspirada à vácuo e então descartada. Foram adicionados 4 mL de "Clear Folch" ( $CHCl_3$ / MEOH/  $H_2O$ , na proporção de 3:48:47); deixados mais uma vez em repouso "overnight" à temperatura ambiente e novamente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram secas sob fluxo de

nitrogênio (N<sub>2</sub>), dissolvidas em solução de FOLCH e transferidas para tubos menores, lavando várias vezes, agitando-se bem o tubo de extração e mais uma vez seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 500 µL de solução de FOLCH em gelo. Os componentes marcados da associação LDE-oleato de paclitaxel, foram separados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de silicagel 60H (Sigma S-6628), onde foram aplicados 100 µL de amostra. Hexano/éter etílico/ácido acético, na proporção 70:30:1, foi utilizada como fase móvel. As placas foram reveladas com iodo sublimado, demonstrando as áreas das bandas referentes às frações lipídicas. As faixas correspondentes às bandas de interesse foram removidas para frascos de cintilação e adicionados 7 mL de solução cintiladora para análise (4.7.1.)

#### 4.19 Avaliação da eficácia antitumoral

A atividade antitumoral foi verificada seguindo o protocolo estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer (PLOWMAN *et al.*, 1997). Um grupo de camundongos fêmeas C57BL/6J inoculadas com tumor de melanoma B16 F 10 (como descrito em 2.17) foi utilizado neste experimento. Após dez dias grupos homogêneos, com tumores de aproximadamente 60 mm<sup>3</sup>, foram separados em gaiolas. No 11º, 14º e 19º dia após a inoculação do tumor, doses de 15 mg/Kg ou 60 mg/Kg de LDE-oleato de paclitaxel, 15 mg/Kg de Taxol® e respectivos volumes de LDE e solução de NaCl 0,9 % foram administrados intraperitonealmente. O peso e o tamanho do tumor foram avaliados três vezes por semana usando um paquímetro até o 34º dia após o início do experimento. Após este período analisou-se apenas a sobrevivência do animal até 45º dia.

A massa do tumor foi estimada através da seguinte equação:

$$\text{Eq.3: } \text{massa tumoral} = \frac{\text{comprimento em mm} \times (\text{largura})^2}{2}$$

#### 4.20. Determinação do conteúdo de DNA por Citometria de Fluxo *in vitro*

Células da linhagem de melanoma B16 F10 foram incubadas por 24 horas com LDE-olpaclitaxel e paclitaxel na sua formulação comercial como descrito no ensaio de citotoxicidade. O conteúdo de DNA foi determinado pelo seguinte procedimento: após a incubação as células foram lavadas com PBS, descoladas com tripsina e resuspendidas em tampão de lise (375 µL de tripsina 0,03 g/L, 10mM de solução Tris PH 8,0). Depois de 15 minutos de incubação à temperatura ambiente as amostras foram incubadas com a solução de neutralização contendo inibidor de tripsina 0,5 g/L, ribonuclease A 0,1 g/L e espermina 1,2 g/L. As amostras foram fixadas com etanol 70 % à 4° C por 18 horas. Após centrifugadas, o precipitado foi transferido para tubos de citometria de fluxo e incubado por 30 minutos no escuro com 18 ug/mL de iodeto de propidium. A quantidade de células nas diferentes fases do ciclo, nível de apoptose e conteúdo de DNA na fase S foram obtidas através de imagens capturadas em citômetro de Fluxo (Scalibur-Becton e Dickson) e analisadas em Software Cell-Quest. As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, fase S e G -M) foram analisadas em software Modi-fit.

#### 4.21 Análise Estatística

Para a análise dos dados dos experimentos onde foram comparados mais de dois grupos com distribuição não paramétrica, utilizamos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. O teste Mann-Whitney, foi utilizado para analisar os dados obtidos dos experimentos onde comparamos as medidas de centralidade entre dois grupos independentes, com distribuição não paramétrica. Quando a distribuição dos dados foi paramétrica, utilizou-se o teste *T*. Basicamente, o tipo de teste estatístico utilizado foi escolhido em função da distribuição, número de grupos a serem comparados e das hipóteses a priori estabelecidas.

Foi calculada a área sob a curva dos ensaios de avaliação da modulação do crescimento do tumor, para verificar o efeito dos tratamentos no crescimento tumoral em função do tempo, para tanto utilizamos o programa Gpip (Graphpad Inplot, Version 4.0).

Todos os valores foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão, considerando-se como nível crítico para significância valores  $< 0.05$ .

Resultados

---

## RESULTADOS

### 5.1 Síntese do oleato de paclitaxel

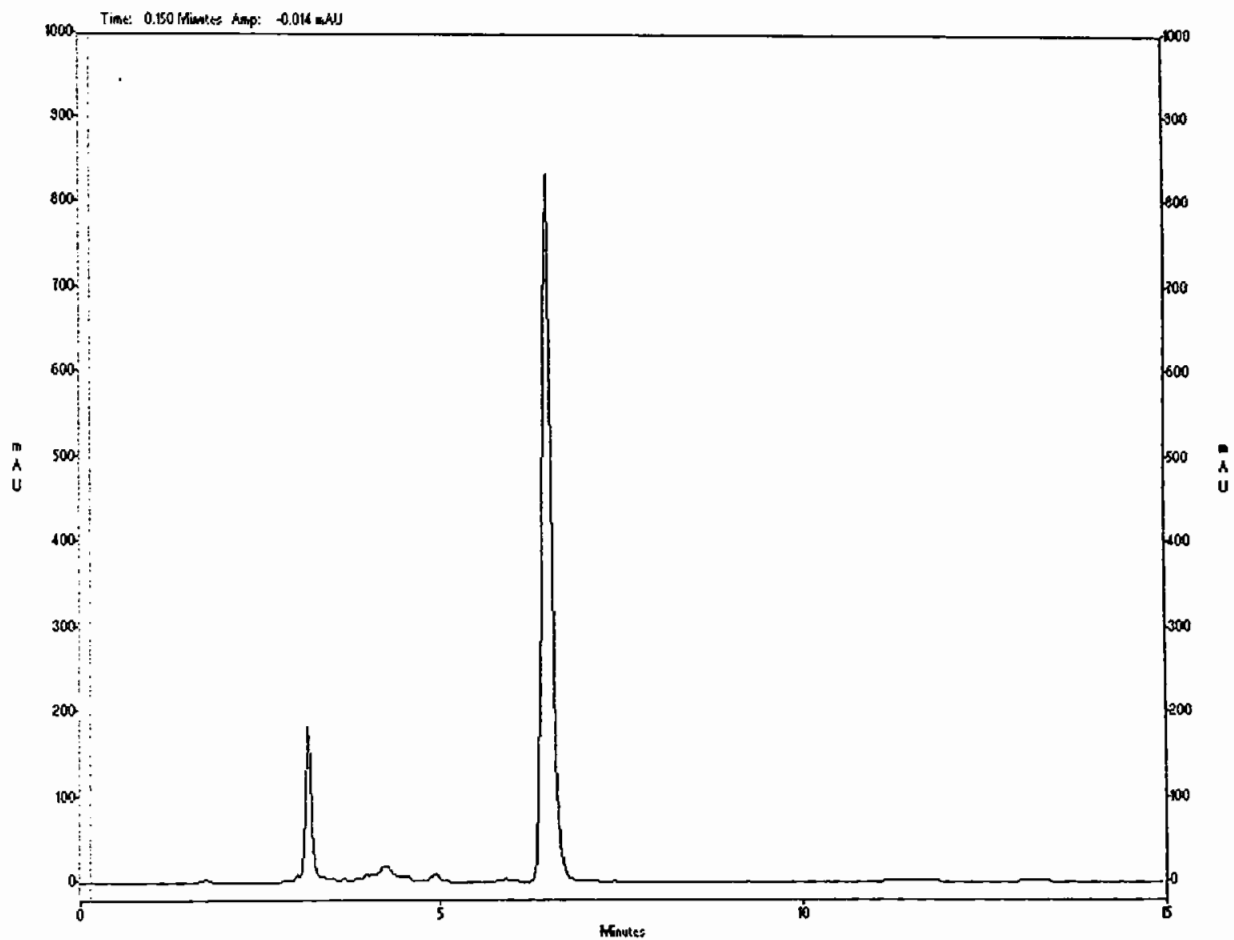
O produto obtido através da reação de esterificação, oleato de paclitaxel, foi analisado por três técnicas. A primeira análise, foi feita em HPLC, e está representada na figura 3. O primeiro pico, com tempo de retenção de 3,0 min, representa o paclitaxel e o segundo pico com tempo de retenção de 6,0 min, representa o produto de reação, oleato de paclitaxel. Figura 4 mostra as curvas de calibração utilizadas para o cálculo das concentrações de paclitaxel e oleato de paclitaxel, nas amostras. O rendimento da reação variou entre 75 à 94 % e foi estimado através da diferença entre as áreas dos picos que representam o paclitaxel e oleato de paclitaxel nos cromatogramas.

A análise da estrutura do oleato de paclitaxel foi obtida ainda por ressonância magnética nuclear (figura 5) e HPLC acoplado à espectrometria de massa (figuras 6 e 7). Figura 5 mostra os espectros de ressonância magnética do ácido oleico, paclitaxel e do produto de reação, oleato de paclitaxel. A confirmação de que o grupo oleila encontra-se ligado a molécula de paclitaxel foi obtida pela presença de um tripleto em 0,8 ppm referente ao CH<sub>3</sub> terminal da cadeia, um multiplete em 1,2 ppm referente a cadeia lateral do ácido oléico e um multiplete em 5,2 ppm referente aos hidrogênios da ligação dupla C=C.

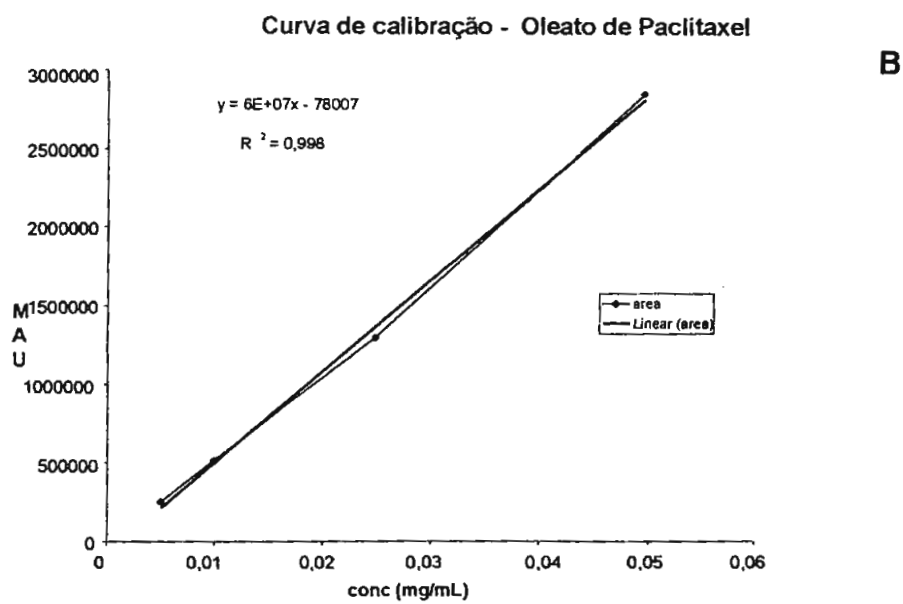
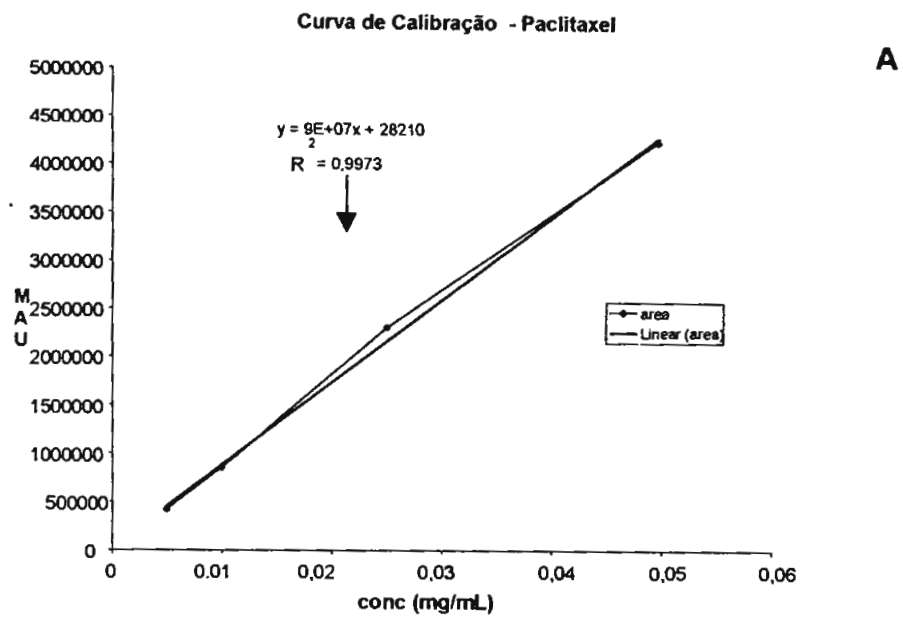
Figura 6 mostra o espectro de massa do produto de reação, oleato de paclitaxel. Os três picos da figura representam respectivamente, o oleato de paclitaxel m/z (massa/carga 1118) e dois fragmentos gerados pela força de



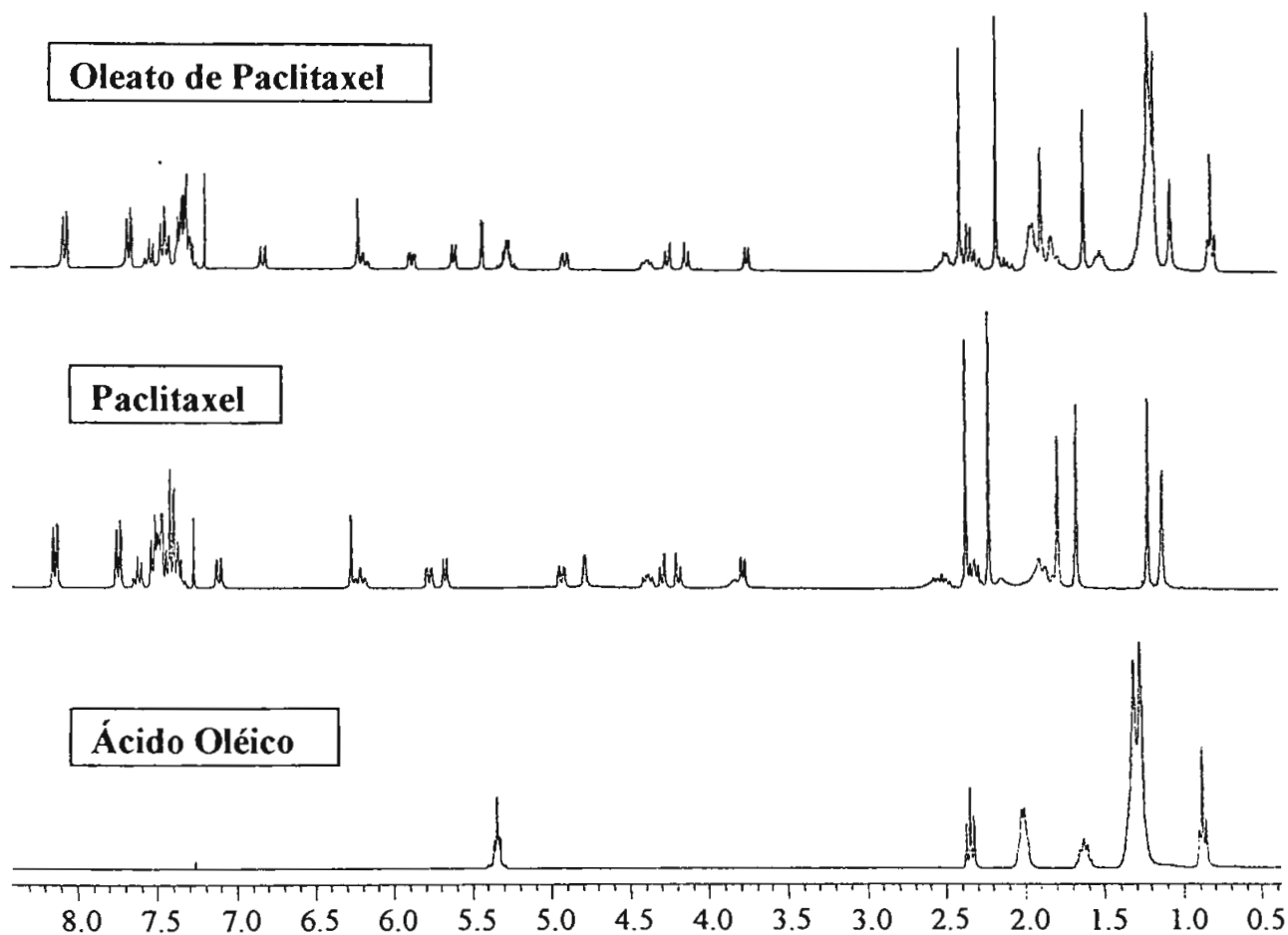
ionização (m/z 854 e 551). Na figura 7, os dois picos representam o paclitaxel (m/z 854) e um fragmento gerado pela força de ionização (m/z 569), respectivamente.



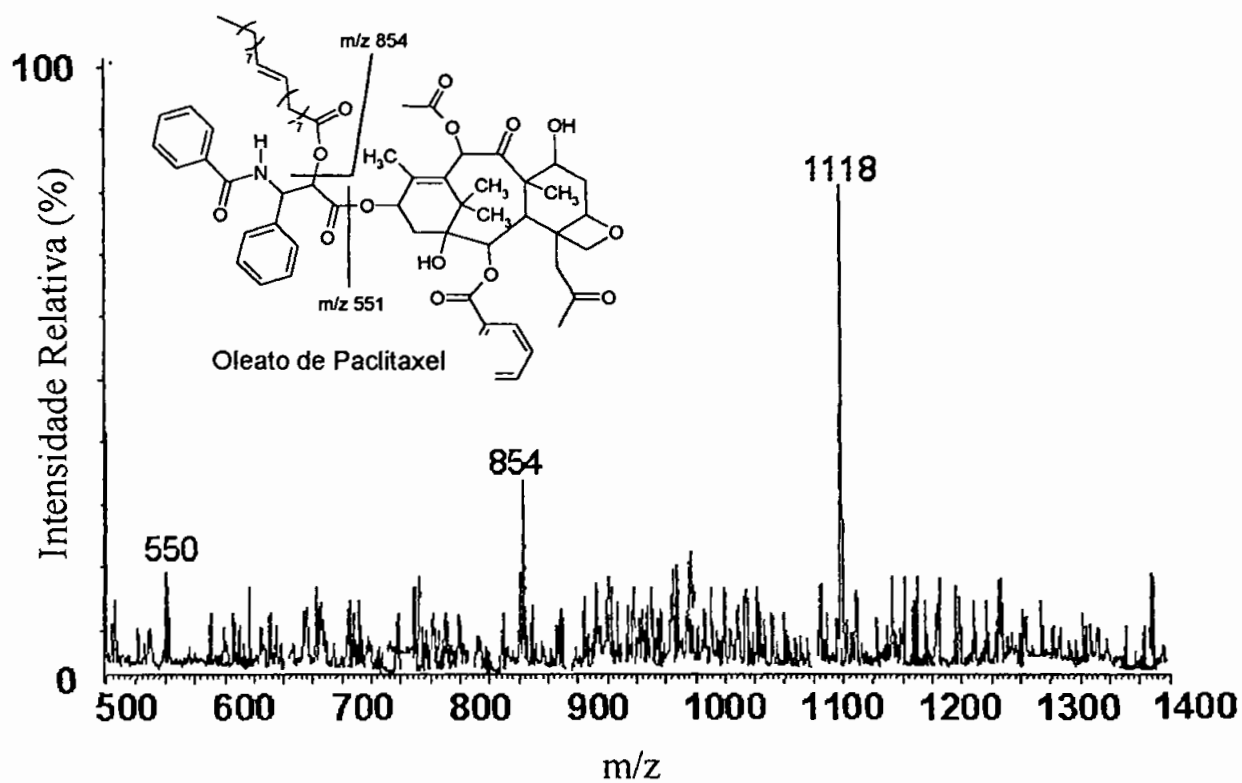
**Figura 3.** Cromatograma do produto de reação de esterificação do paclitaxel obtido por HPLC. O primeiro pico, com tempo de retenção 3,0 min, representa o fármaco não modificado (paclitaxel) e o segundo pico, com tempo de retenção de 6,0 min, o oleato de paclitaxel.



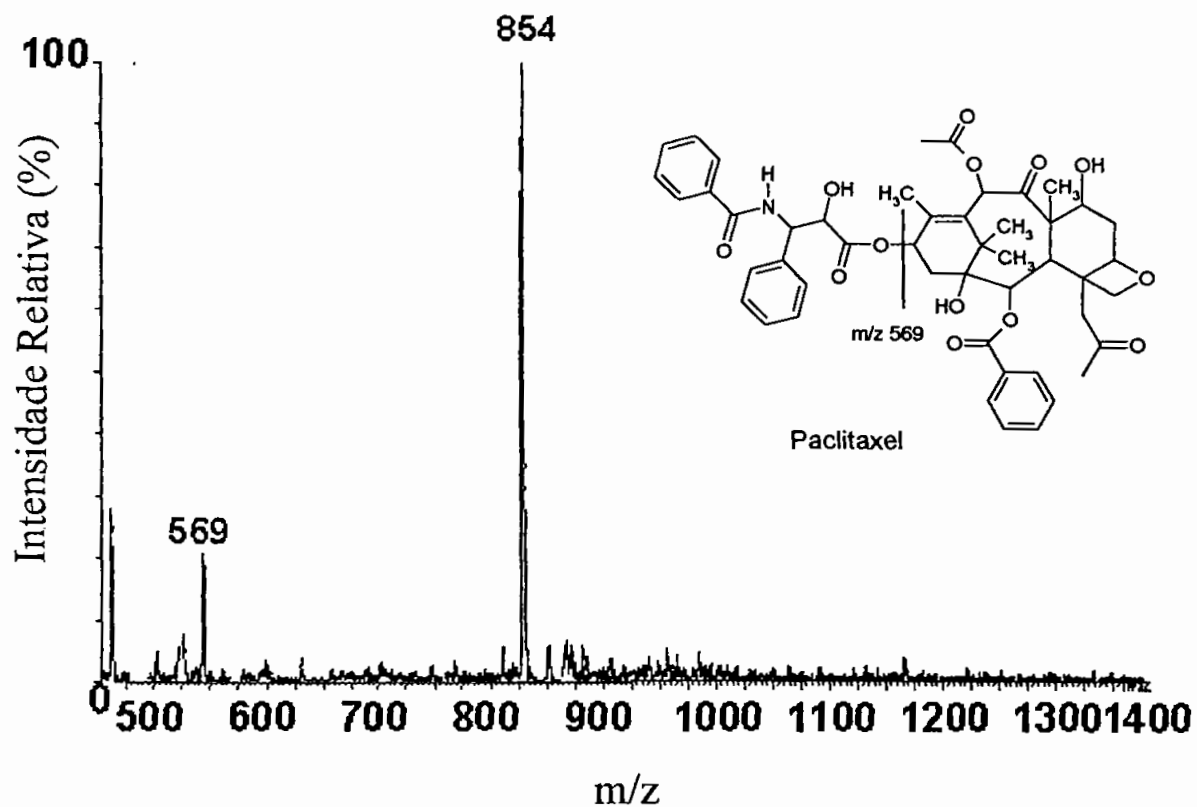
**Figura 4.** Curvas de calibração do paclitaxel (A) e do oleato de paclitaxel (B), obtidas por HPLC.



**Figura 5.** Espectros do oleato de paclitaxel, paclitaxel e ácido oleico obtidos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As análises foram realizadas conforme condições descritas no item 4.5

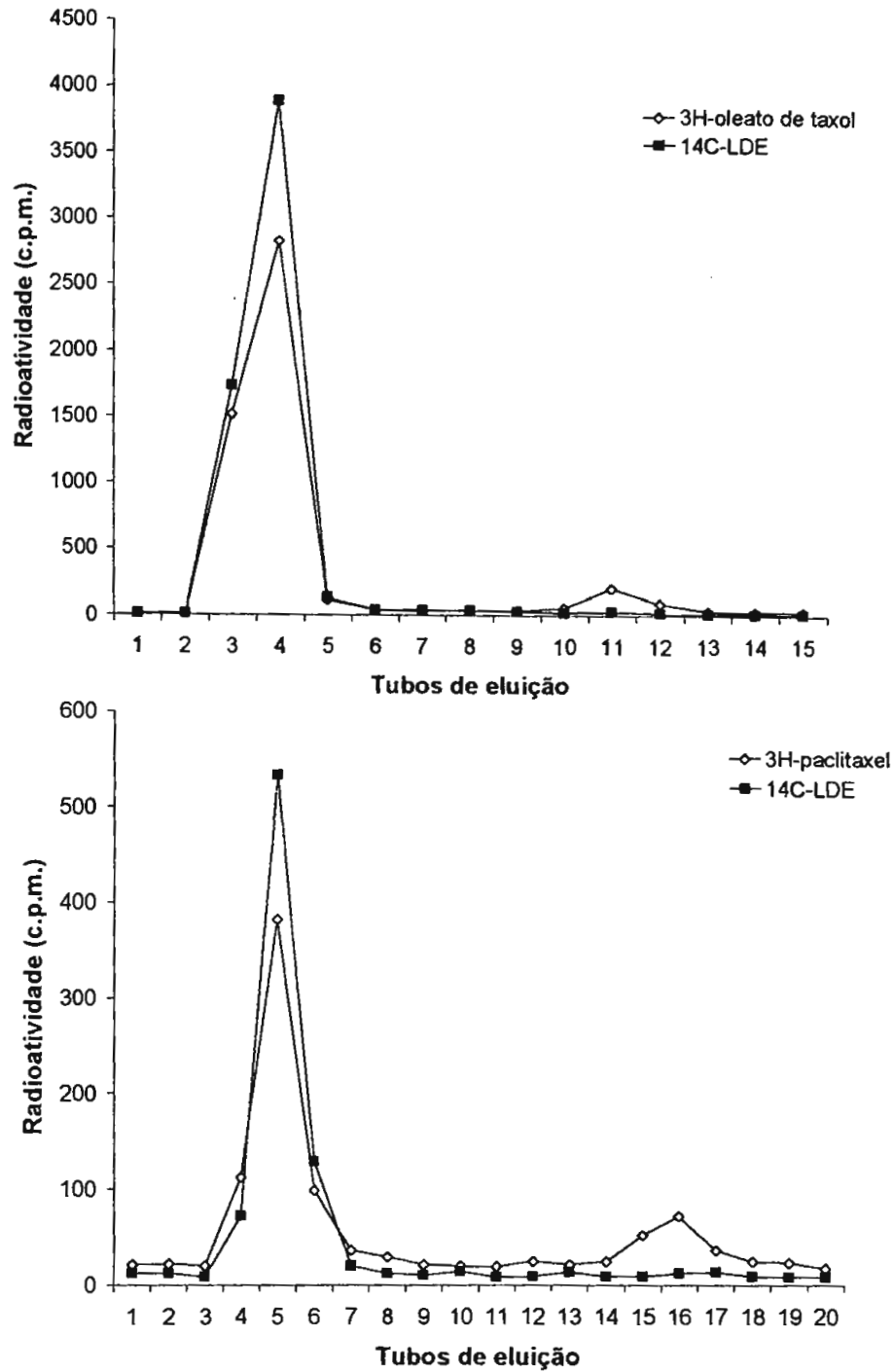


**Figura 6.** Espectro de fragmentação do principal produto da reação de esterificação do paclitaxel, analisado por LC-ESI/MS/MS. As análises foram realizadas conforme condições descritas no item 4.4.



**Figura 7.** Espectro de fragmentação do paclitaxel, analisado por LC-ESI/MS/MS. As análises foram realizadas conforme condições descritas no item 4.4.

**Nota da BCQ: No impresso, não consta a página 47**



**FIGURA 8.** Perfil de eluição do complexo LDE-fármaco, (A) eluição de [ $^3\text{H}$ ]-oleato de paclitaxel (■) associado a [ $^{14}\text{C}$ ]-oleato de colesterol – LDE (■) (B) [ $^3\text{H}$ ]-paclitaxel (■) associado a [ $^{14}\text{C}$ ]-oleato de colesterol – LDE (■). Os elementos marcados radioativamente foram quantificados por cintilação líquida.



### 5.3 Determinação da estabilidade da associação LDE-oleato de paclitaxel e LDE-paclitaxel

#### 5.3.1 Distribuição das partículas de LDE-paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel após incubação com plasma

A figura 9 mostra a distribuição das partículas de LDE-paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel, determinada após incubação com plasma, seguida por ultracentrifugação. A figura 9-A mostra que a maior parte da LDE continua no sobrenadante, contudo ocorre um alto índice de precipitação do paclitaxel, aproximadamente 39 %. Da mesma forma, a figura 9-B mostra que a maior parte da LDE continua no sobrenadante, no entanto, apenas 9 % do oleato de paclitaxel sai da partícula e precipita.

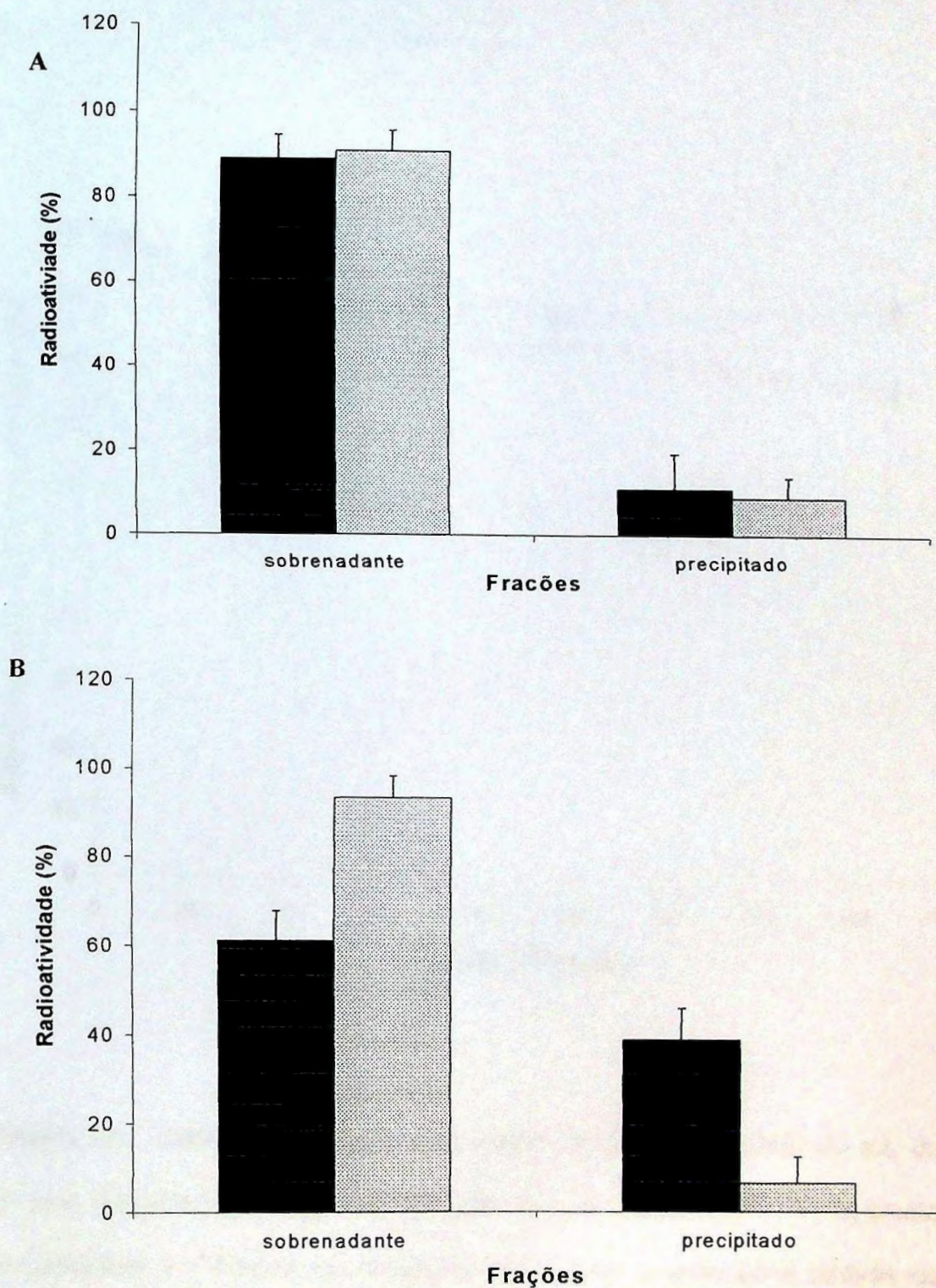
#### 5.3.2 Análise da estabilidade da associação LDE-oleato de paclitaxel *in vitro*

A estabilidade da associação de LDE-oleato de paclitaxel foi avaliada através de diálise contra plasma e solução tris HCl. A figura 10 representa a cinética de dissociação do oleato de paclitaxel durante 168 h. A taxa de dissociação do fármaco da LDE foi determinada através da quantificação dos elementos marcados radioativamente [<sup>3</sup>H]-olpaclitaxel e [<sup>14</sup>C]-oleato de colesterol – LDE. Na diálise contra o plasma, apenas 4 % do fármaco dissociou-se da LDE nas primeiras 24 horas, este índice subiu para 11 % em

48 h, permanecendo entre 16 – 23 % até o final do experimento. Na diálise contra a solução tris HCl, apenas 3 % do fármaco dissociou-se da LDE nas primeiras 24 horas, este índice subiu para 11 % em 48 h, permanecendo entre 10 – 12 % até o final do experimento.

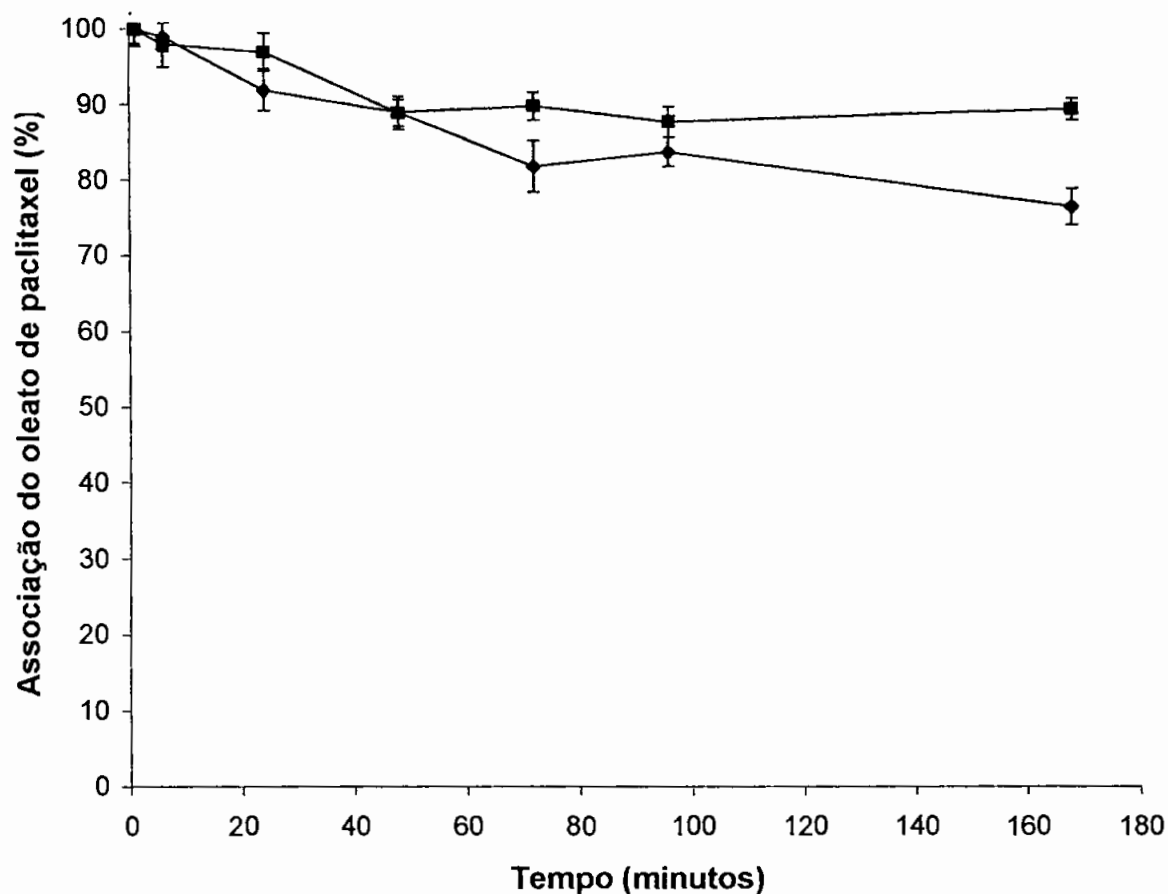
### 5.3.3 Avaliação do diâmetro da partícula de LDE-oleato de paclitaxel

A figura 11 representa a variação média do diâmetro da partícula de LDE-oleato de paclitaxel num intervalo de 30 dias. A partícula não apresentou variação representativa de tamanho nos primeiros 4 dias, entre o 4º e o 8º dia foi possível identificar uma diminuição média de 17 % no seu diâmetro, voltando a aumentar em até 26 % no final do experimento.

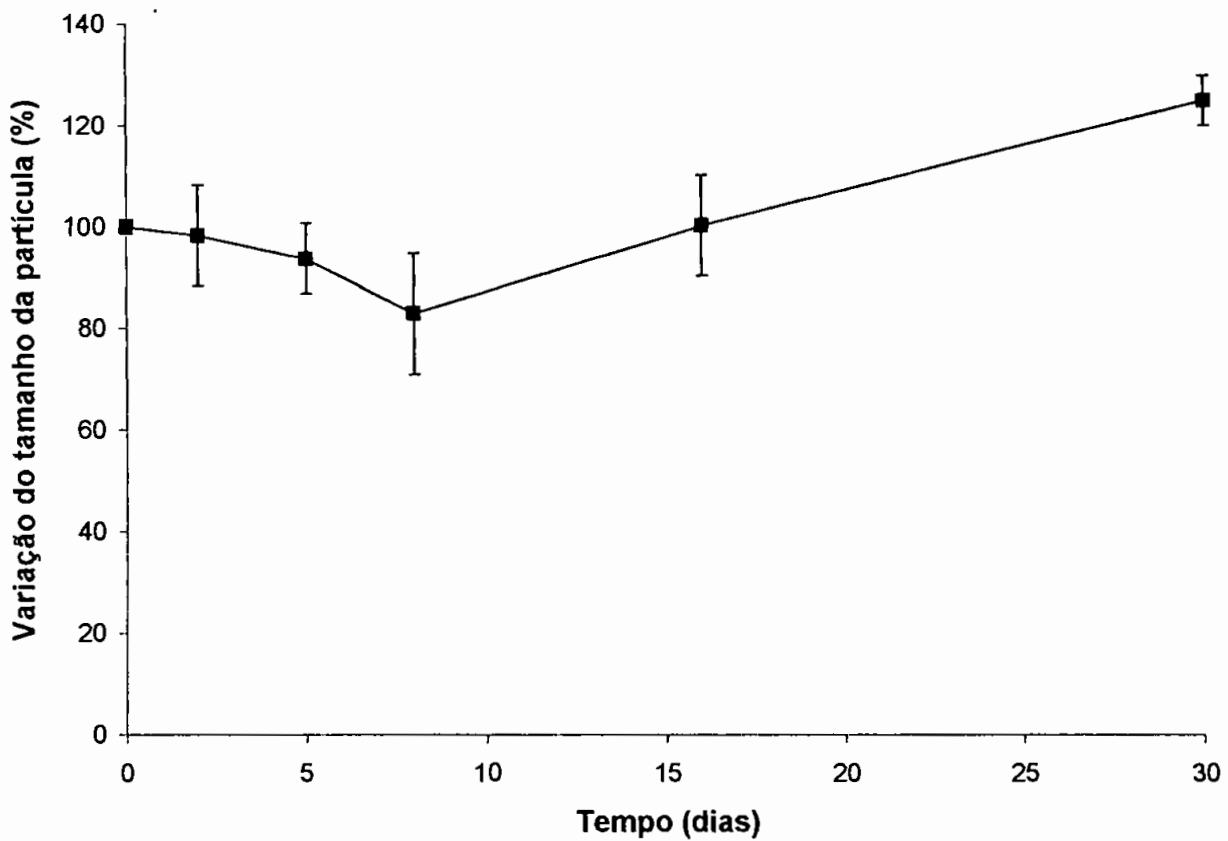


**Figura 9.** Distribuição dos componentes da associação LDE-fármaco após incubação com plasma humano. (A) Distribuição de [<sup>3</sup>H]-paclitaxel (■) e [<sup>14</sup>C]-oleato de colesterol-LDE (■) nas frações, sobrenadante e precipitado. (B) Distribuição de [<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel (■) e [<sup>14</sup>C]-oleato de colesterol-LDE (■). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão de três

experimentos realizados em duplicata.



**Figura 10.** Diálise de 1 mL de LDE-oleato de paclitaxel contra 20 mL de plasma humano (◆) e solução tris HCl (■). Os elementos marcados [ $^3\text{H}$ ]-oleato de paclitaxel e [ $^{14}\text{C}$ ]ester de colesterol-LDE foram quantificados através de cintilação líquida. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.

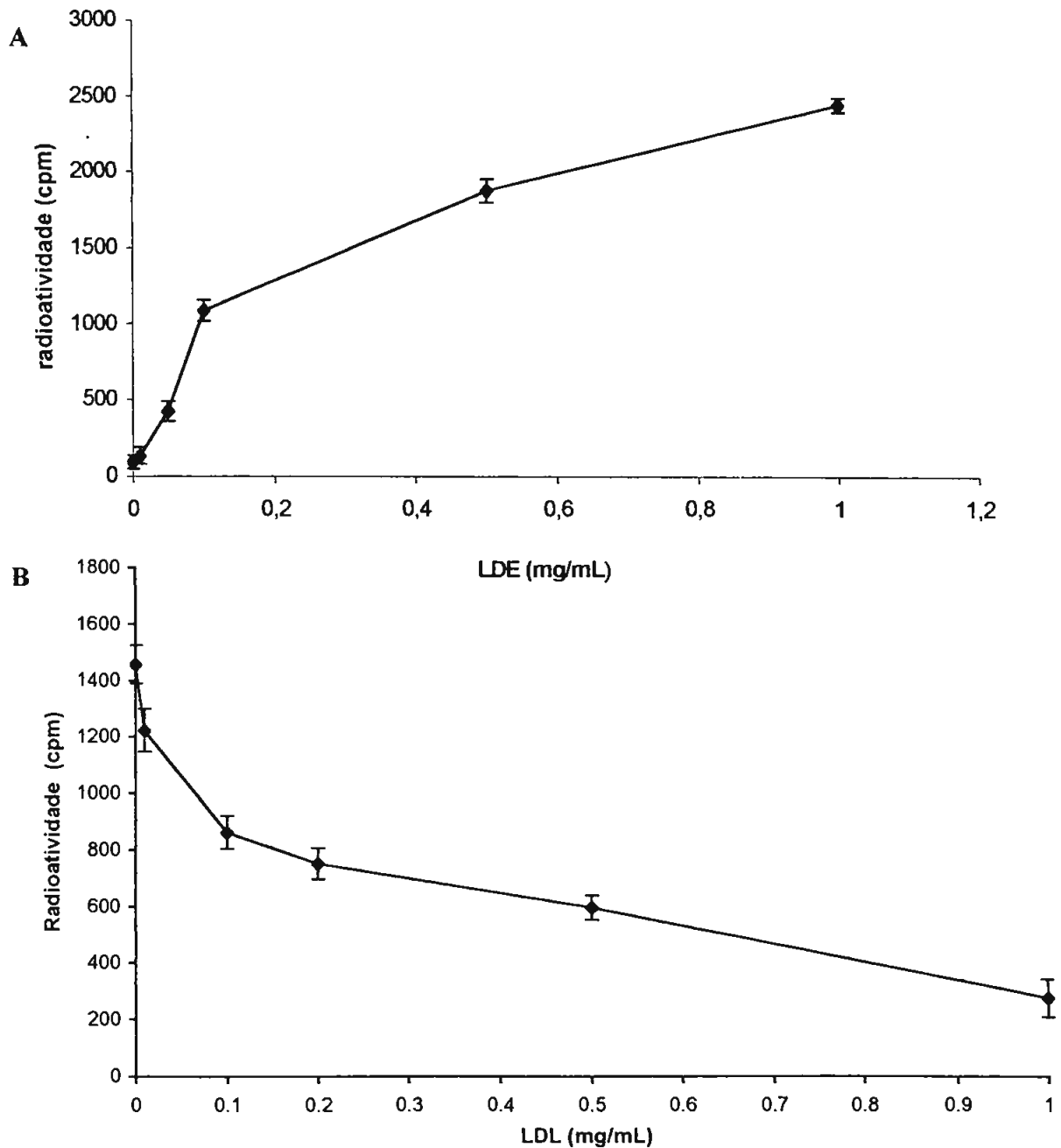


**Figura 11.** Variação do diâmetro médio da partícula da partícula de LDE-oleato de paclitaxel em 30 dias, avaliado por espalhamento de luz. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.

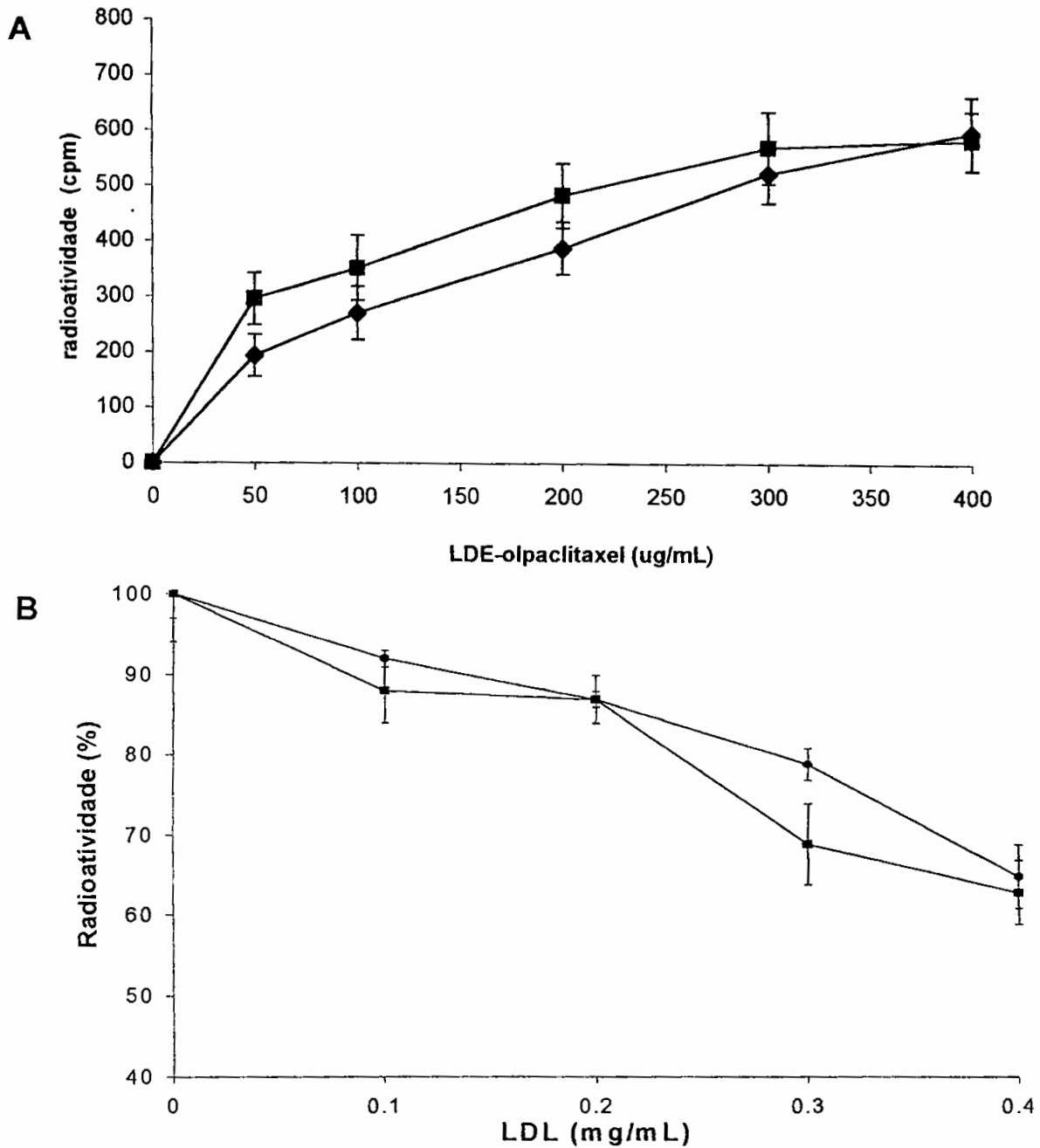
### 3.4 Captação celular da LDE e LDE-olpaclitaxel

A figura 12-A representa a captação de [ $^{14}\text{C}$ ]-oleato de colesterol LDE por células NCI H-292. O aumento da concentração de LDE no meio , promoveu um aumento de radioatividade no interior celular até alcançar um equilíbrio de saturação. A adição de concentrações crescentes de LDL, ao meio contendo uma concentração sub-saturante de LDE, provocou uma diminuição gradual da radioatividade acumulada no interior das células, indicando uma competição entre a lipoproteína natural e a emulsão pelos receptores celulares (Figura 12-B).

Na figura 13-A podemos observar o mesmo comportamento para a associação LDE-oleato de paclitaxel, onde o aumento da concentração de LDE-oleato de paclitaxel no meio, promove um aumento da captação de ambos os elementos pelas células até que um equilíbrio de saturação foi alcançado. A figura 13-B mostra que o aumento da concentração de LDL no meio, diminuiu gradualmente a captação de LDE e oleato de paclitaxel (figura 13-B).



**Figura 12-** Captação de LDE por células tumorais NCI-H-292. **(A)** As células foram incubadas com concentrações crescentes (0,01 a 1,0 mg/mL) de [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE. **(B)** Efeito da adição de concentrações crescentes de LDL (0,01 a 1,0 mg/mL) sobre a captação de LDE. A concentração de [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE foi fixada em 0,2 mg/mL. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata.



**Figura 13-** Captação de LDE-oleato de paclitaxel por células tumorais NCI-H292. **(A)** As células foram incubadas, com concentrações crescentes (0,05 a 0,4 mg/mL) de [<sup>14</sup>C]-LDE (♦)-[<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel (■). **(B)** Efeito da adição de concentrações crescentes de LDL (0,01 a 0,4 mg/mL) sobre a captação de LDE (♦)-oleato de paclitaxel (■). A concentração de LDE-oleato de paclitaxel foi fixada em 0,2 mg/mL. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata.

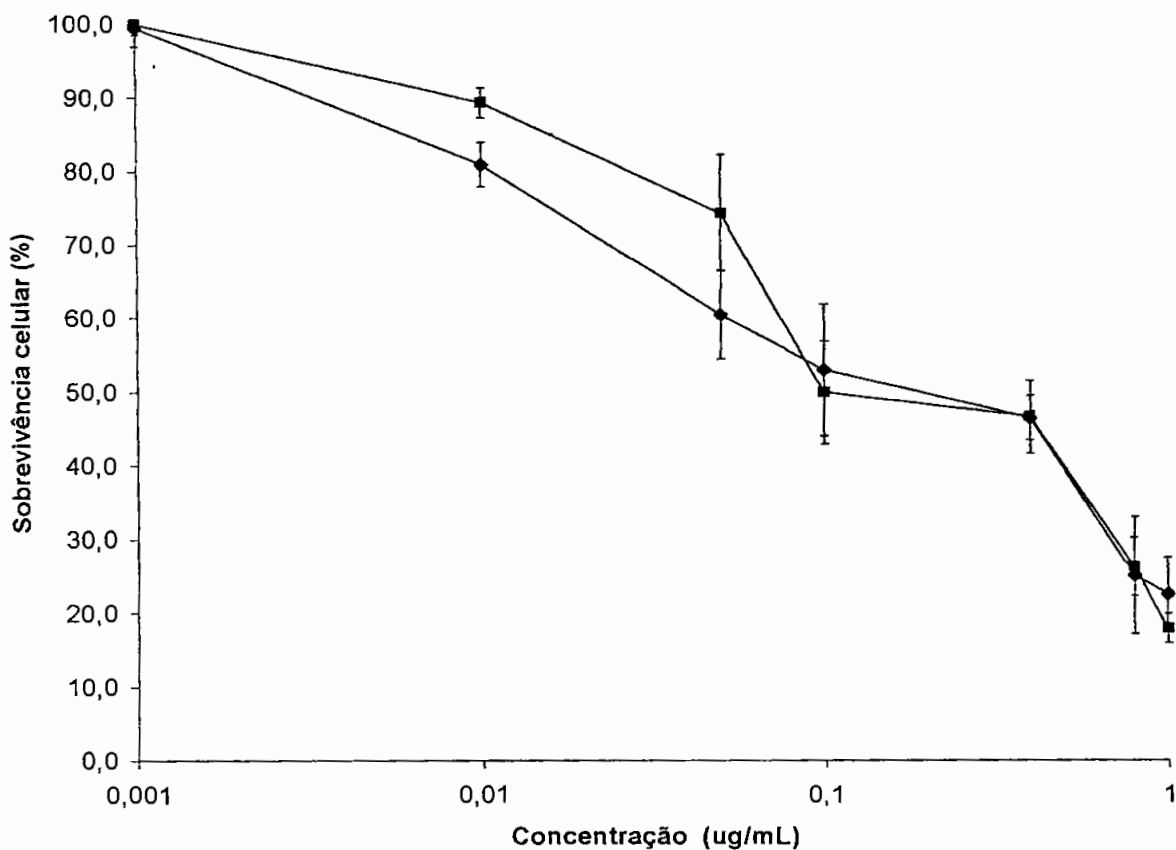


### 5.5 Avaliação da citotoxicidade do oleato de paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel em células NCI-H292

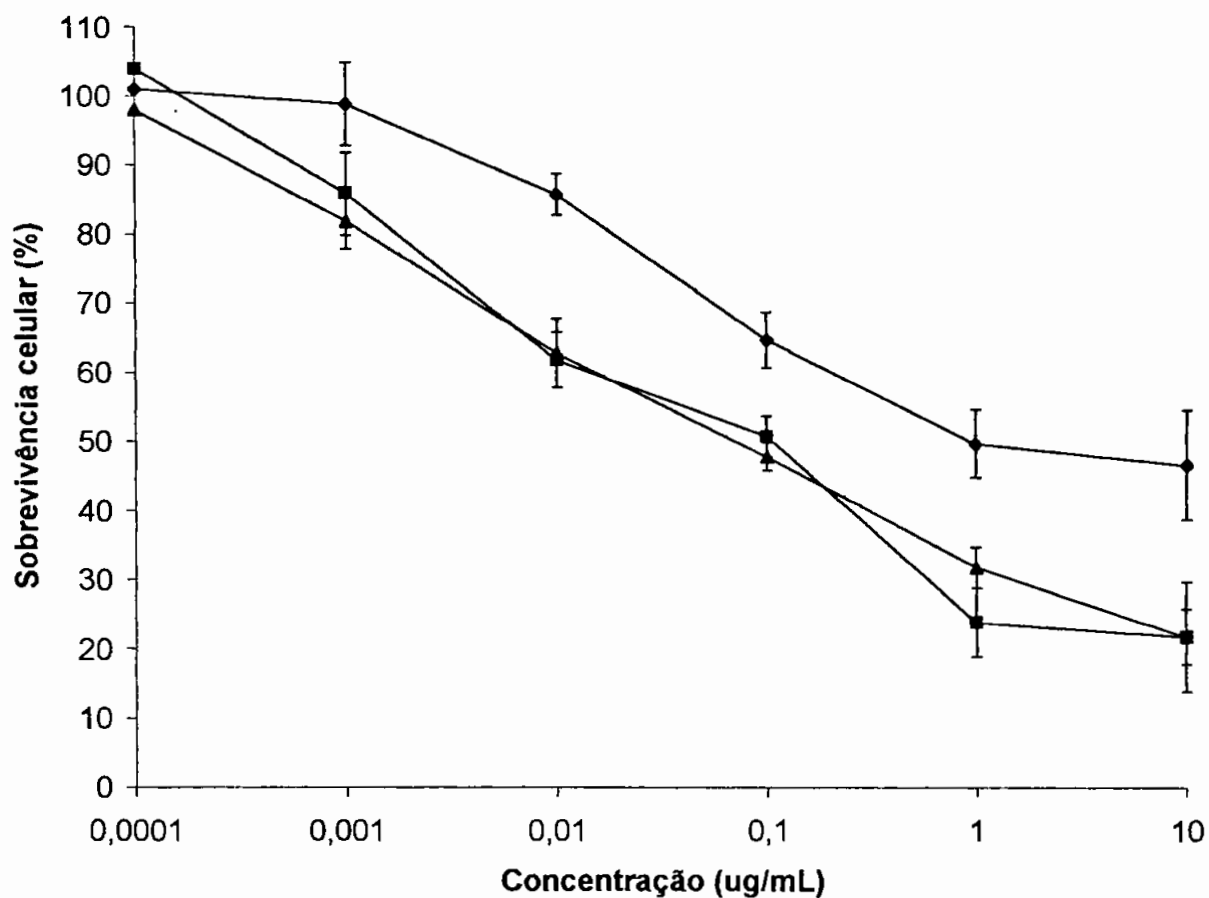
A figura 14 mostra as curvas dose-reposta do oleato de paclitaxel e do paclitaxel, solubilizados no veículo da formulação comercial, Cremophor EL:etanol. Observa-se que as duas curvas são similares ( $p = 0,523$ ), o que é refletido no índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) das formulações. O índice de citotoxicidade obtido através das curvas foi de  $0,11 \mu\text{g /mL}$  para oleato de paclitaxel e  $0,09 \mu\text{g/mL}$  para o paclitaxel (Tabela 1).

A figura 15 mostra que existe uma diminuição da citotoxicidade da associação LDE:oleato de paclitaxel comparada ao paclitaxel em sua formulação comercial ( $p = 0,015$ ). Esta diferença entre as duas curvas é reduzida quando se acrescenta o veículo da formulação comercial à LDE-oleato de paclitaxel ( $p = 0,756$ ). O índice de citotoxicidade obtido através das curvas foi  $1,00 \mu\text{g /mL}$  para LDE-oleato de paclitaxel,  $0,09 \mu\text{g/mL}$  para o paclitaxel em sua formulação comercial,  $0,15 \mu\text{g/mL}$  para LDE-oleato de paclitaxel após a adição do veículo (tabela 1).

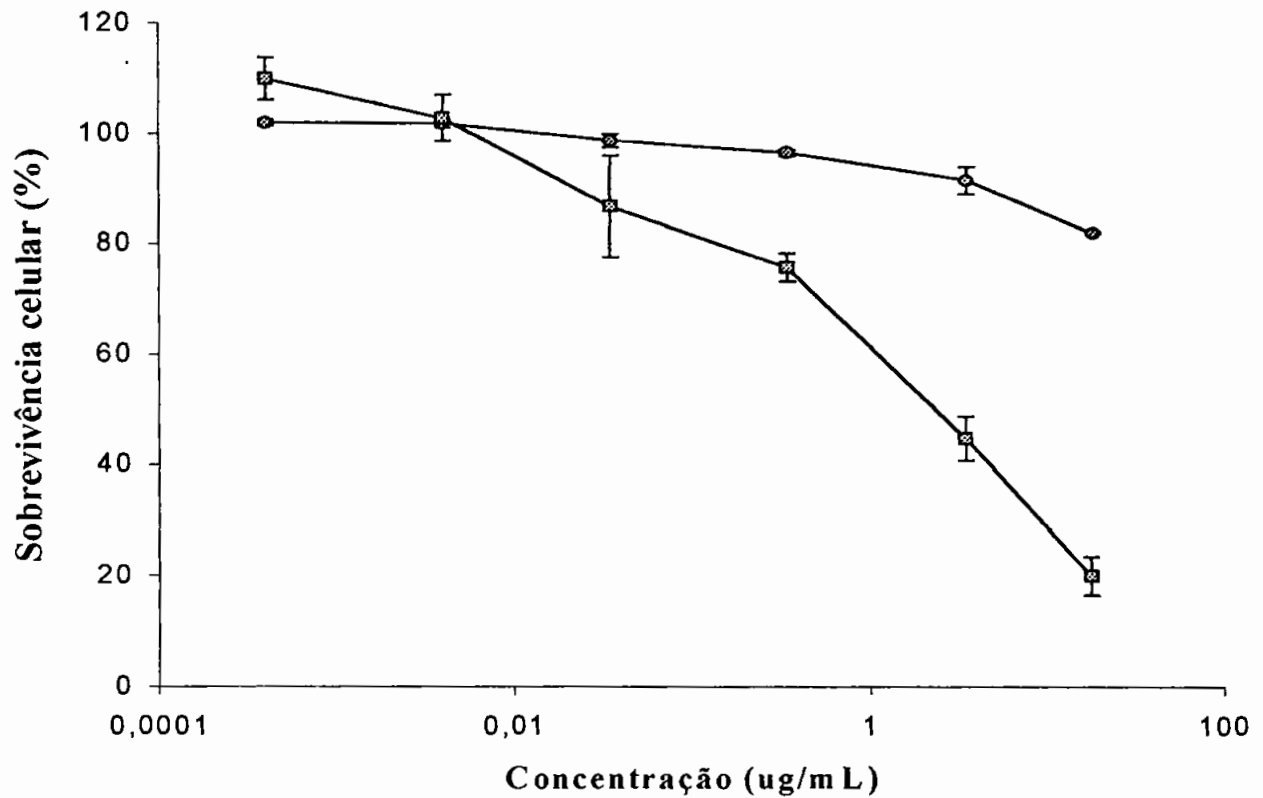
A figura 16 mostra a curva dose-resposta da LDE e do veículo comercial, Cremophor EL:etanol. Observa-se que o cremophor EL:etanol não é inócuo no sistema, tendo *per si* um efeito citotóxico nas concentrações utilizadas. O índice de citotoxicidade obtido através das curvas foi de  $>17,7 \mu\text{g /mL}$  para LDE e  $2,3 \mu\text{g/mL}$  para Cremophor EL (tabela 1).



**Figura 14** Efeito sobre o crescimento celular provocado pelo oleato de paclitaxel (♦) e por paclitaxel (■), solubilizados em Cremophor EL:etanol. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em quadruplicata.



**Figura 15** – Efeito sobre o crescimento celular provocado pelo oleato de paclitaxel associado à LDE, sem ( $\blacklozenge$ ) e com ( $\blacksquare$ ) adição de Cremophor EL/etanol) e do paclitaxel em sua formulação comercial ( $\blacktriangle$ ). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em quadruplicata.



**Figura 16** – Efeito sobre o crescimento celular provocado pela adição de LDE ( ● ) e do veículo da formulação comercial: Cremophor EL/etanol ( ■ ). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em quadruplicata.

**Tabela 1** – Índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) das preparações de oleato de paclitaxel, paclitaxel, Cremophor EL, LDE-oleato de paclitaxel e LDE

Preparações	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Oleato de paclitaxel <sup>2</sup>	0,11
Paclitaxel <sup>1</sup>	0,09
LDE-olpaclitaxel	1,00
LDE-olpaclitaxel + Cremophor <sup>2</sup>	0,15
LDE	>17,7
Veículo	2,3

<sup>1</sup> Paclitaxel em sua formulação comercial

<sup>2</sup> A concentração de Cremophor EL/etanol utilizada é a mesma concentração da preparação comercial de paclitaxel

## 5.6. Teste de toxicidade em Camundongos C57BL/6J

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda e crônica do paclitaxel em sua formulação comercial, LDE-oleato de paclitaxel e respectivos veículos, LDE e Cremophor EL:etanol estão representados na tabela 2. Neste estudo ficou demonstrado que a associação do fármaco à LDE promove uma redução significativa da toxicidade do mesmo. A dose letal responsável pela morte de metade dos animais para o oleato de paclitaxel associado a LDE é cerca de 12 vezes superior a dose do fármaco comercial, da mesma forma, a dose máxima tolerada é cerca de 13 vezes superior.

**Tabela 2** - Doses letais 10, 50 e 90 e Dose máxima tolerada, determinada em camundongos *C57BL/6J*, após aplicação via intra-peritoneal das formulações de: LDE-oleato de paclitaxel, paclitaxel em sua formulação comercial, Cremophor EL/etanol e LDE.

Formulação	Dose de Paclitaxel (mg/kg)			
	DL <sub>10</sub>	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DMT
LDE-olpaclitaxel	278	364	>420	200
LDE	400	>420	>420	*
Paclitaxel <sup>1</sup>	16	32	34	15
CrEL:etanol	79	34	89	*

<sup>1</sup>Paclitaxel em sua formulação comercial

\*Não determinada

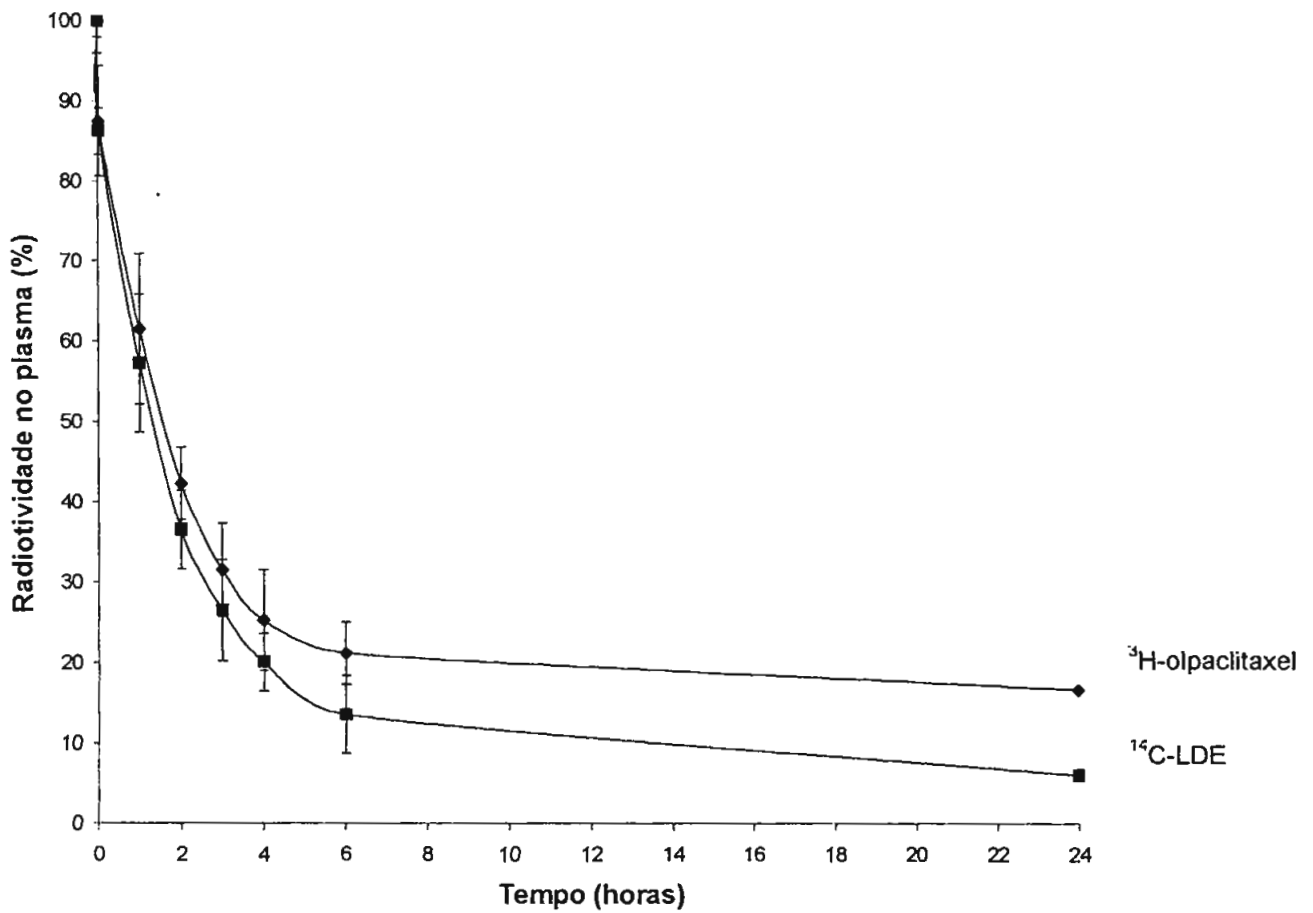
### 5.7. Estudo cinético e de captação tecidual de [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE e [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE-[ $^3\text{H}$ ]-oleato de paclitaxel

A figura 17 mostra a cinética plasmática de remoção do [ $^3\text{H}$ ]-oleato de paclitaxel associado a [ $^{14}\text{C}$ ]-LDE. Não existe diferença estatisticamente significativa entre a taxa fracional de remoção do oleato de paclitaxel ( $0,0717 \pm 0,0509$ ) e LDE ( $0,2136 \pm 0,1476$ ), o que indica que os dois componentes são provavelmente removidos da circulação juntamente ( $p = 0,3429$ ). Os parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel estão representados na tabela 3.

A figura 18 mostra a captação tecidual da LDE, marcada radioativamente com [ $^3\text{H}$ ]-éter de colesterol, injetada por via endovenosa (E.V.) e via intraperitoneal (I.P.). A captação da LDE por via E.V. foi maior no fígado, seguido pelo baço, tumor e rins. Enquanto que a captação da LDE injetada por via I.P. foi maior no fígado, seguido pelo tumor, baço e rins. A razão entre a captação tumoral e hepática foi cerca de  $0,55 \pm 0,17$  (I.P.) e  $0,40 \pm 0,20$  (E.V.). A captação tumoral foi cerca de oito (I.P.) e cinco (E.V.) vezes superior a do tecido normal contralateral (pele).

A figura 23 mostra a captação tecidual do [ $^3\text{H}$ ]-oleato de paclitaxel associado à [ $^{14}\text{C}$ ]-oleato de colesterol-LDE, injetados por via E.V. A razão entre a captação tumoral e hepática foi cerca de  $0,56 \pm 0,17$  para a LDE e  $0,59 \pm 0,40$  para o oleato de paclitaxel. A captação tumoral do oleato de paclitaxel foi cerca de quatro vezes superior a do tecido normal contralateral (pele).





**Figura 17.** Decaimento plasmático de  $^3\text{H}$ -oleato de paclitaxel (◆) associado à  $^{14}\text{C}$ -oleato de colesterol-LDE (■), injetados por via endovenosa. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão, (n = 8).

**Tabela 3:** Parâmetros farmacocinéticos do oleato de paclitaxel associado à LDE em camundongos B57CL6 após administração por via endovenosa

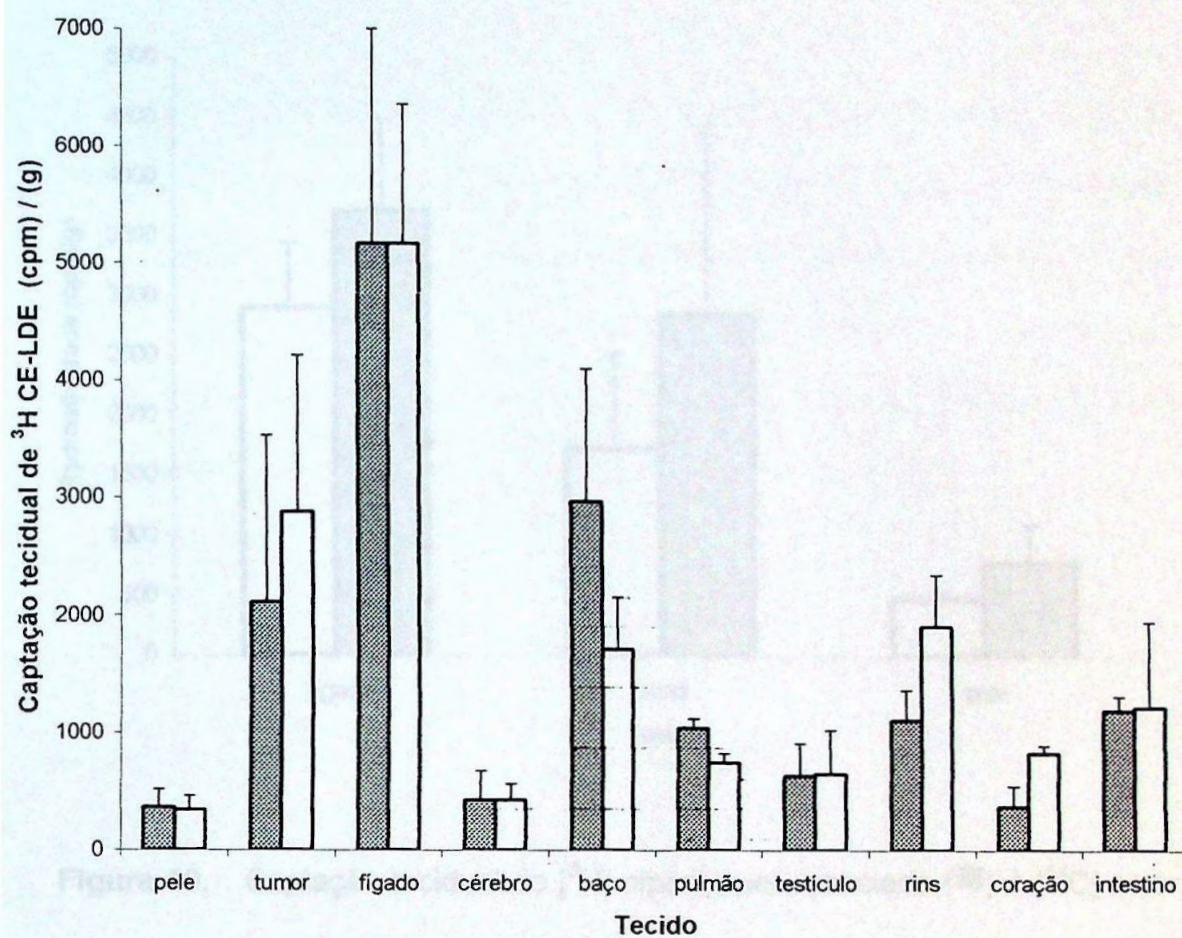
Parâmetros farmacocinéticos	Oleato de paclitaxel
<sup>1</sup> t <sub>1/2β</sub> (h)	2,4
<sup>2</sup> AUC (μg/mL/h)	2200,4
<sup>3</sup> CL (mL/kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	45,4
<sup>4</sup> Vd (L/kg <sup>-1</sup> )	157,2

<sup>1</sup>t<sub>1/2β</sub> tempo de meia-vida

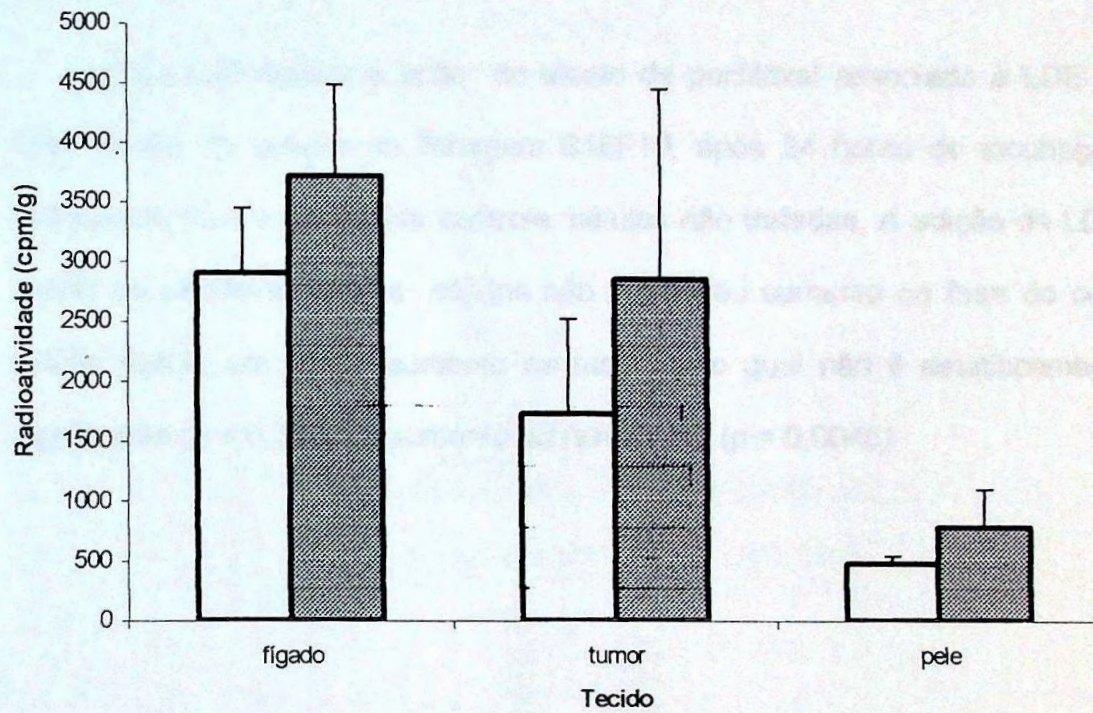
<sup>2</sup>AUC area sobre a curva (concentração plasmática vs tempo)

<sup>3</sup>CL 'clearance' total no corpo

<sup>4</sup>Vd volume de distribuição



**Figura 18.** Captação tecidual da LDE administrada por via endovenosa (■) e por via intraperitoneal (□) em camundongos *C57BCL6*. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 6$ ).

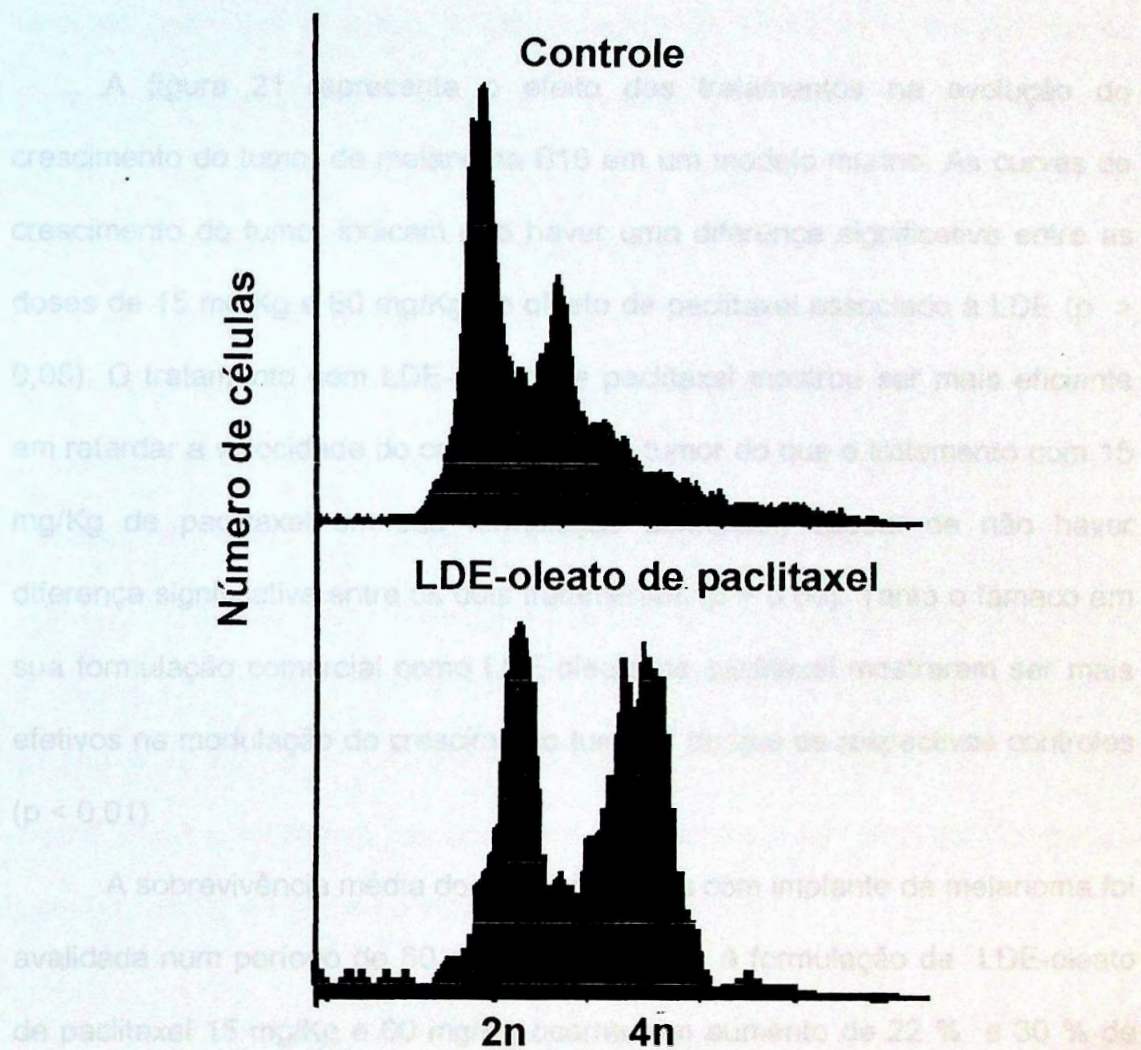


**Figura 19.** Captação tecidual do [<sup>3</sup>H]-olopacitaxel associado (■) à [<sup>14</sup>C]-ester de colesterol-LDE (□) após administração por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Os resultados são expressos em média ± erro padrão (n = 8).

### 5.8 Análise do ciclo celular

Figura 20 mostra a ação do oleato de paclitaxel associado à LDE no ciclo celular de células de linhagem B16F10, após 24 horas de incubação, comparada com o respectivo controle, células não tratadas. A adição de LDE-oleato de paclitaxel sob as células não promoveu aumento na fase do ciclo celular  $G_0/G_1$ , um ligeiro aumento na fase S, o qual não é estatisticamente significativo ( $p = 0,3836$ ) e aumento da fase  $G_2/M$  ( $p = 0,0045$ ).

## 5.9 Avaliação da eficácia antitumoral



**Figura 20.** Representação do efeito da formulação LDE-oleato de paclitaxel sob o conteúdo de DNA nas fases do ciclo celular de células da linhagem B16F10, e respectivo controle, células não tratadas.

### 5.9. Avaliação da eficácia antitumoral

A figura 21 representa o efeito dos tratamentos na evolução do crescimento do tumor de melanoma B16 em um modelo murino. As curvas de crescimento do tumor indicam não haver uma diferença significativa entre as doses de 15 mg/Kg e 60 mg/Kg de oleato de paclitaxel associado à LDE ( $p > 0,05$ ). O tratamento com LDE-oleato de paclitaxel mostrou ser mais eficiente em retardar a velocidade do crescimento do tumor do que o tratamento com 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial, apesar de não haver diferença significativa entre os dois tratamentos ( $p > 0,05$ ). Tanto o fármaco em sua formulação comercial como LDE-oleato de paclitaxel mostraram ser mais efetivos na modulação do crescimento tumoral do que os respectivos controles ( $p < 0,01$ ).

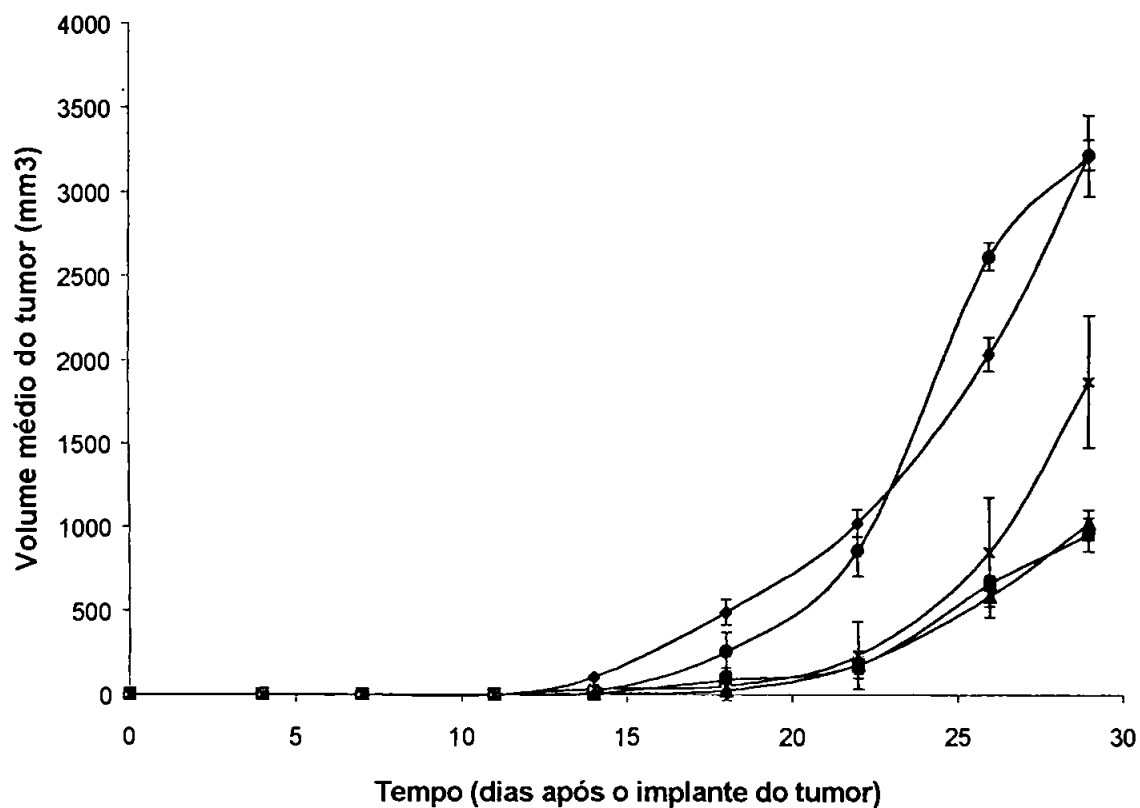
A sobrevivência média dos camundongos com implante de melanoma foi avaliada num período de 60 dias. Em resposta à formulação de LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg e 60 mg/Kg ocorreu um aumento de 22 % e 30 % de sobrevivência nos grupos, respectivamente. Para 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial 7 %, e nos respectivos controles, LDE e solução NaCl 0,9 % não houve sobrevivência no grupo após 45 dias (figura 22).

Na tabela 4 estão representados os índices de atividade antitumoral de 15 mg/Kg e 60 mg/Kg de oleato de paclitaxel associado à LDE, 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial e dos respectivos controles. A partir da média da massa tumoral das formulações no 14º, 19º, 23º, 27º e 31º dia foi possível determinar o índice de retardamento no crescimento do tumor. Este índice foi maior para LDE:oleato de paclitaxel na dose de 15 mg/Kg (7 dias) e

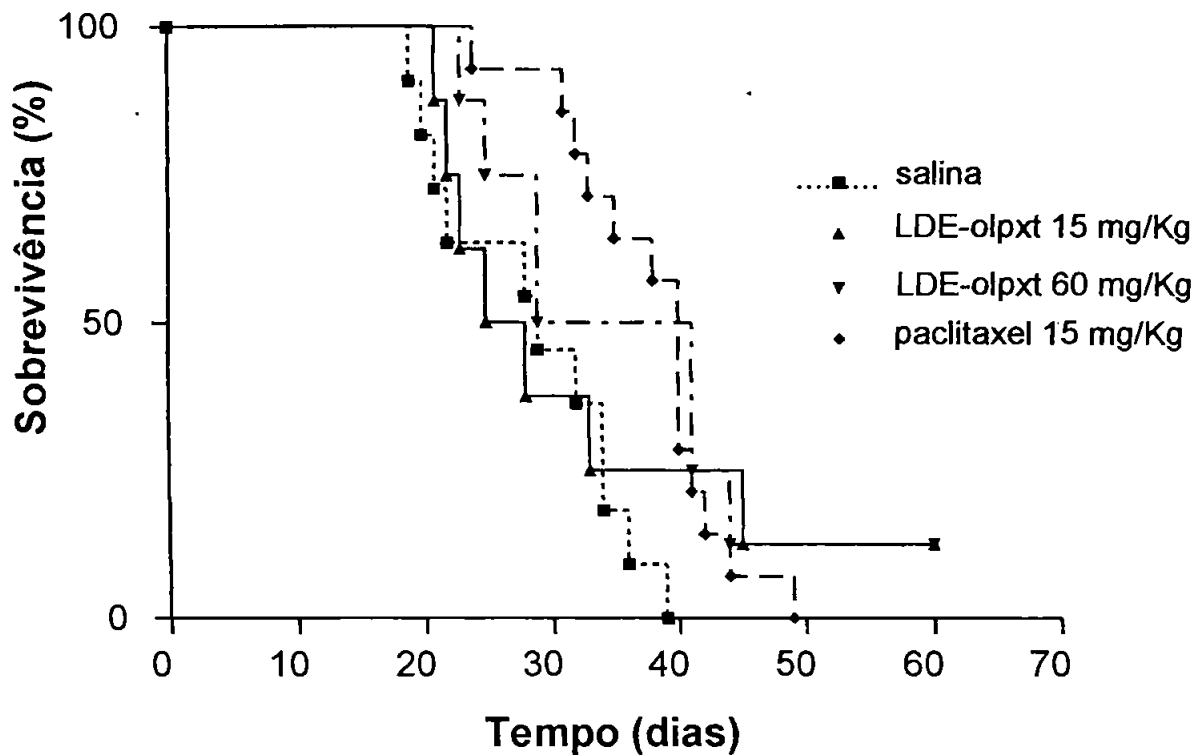
LDE:oleato de paclitaxel na dose de 60 mg/Kg (6 dias), comparado com o fármaco comercial (4 dias). A percentagem de mortalidade no 23º dia do experimento contudo foi de nenhum animal nos grupo de LDE:oleato de paclitaxel 15 e 60 mg/Kg e 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial, contra 40 % para a LDE e 27 % para a solução NaCl 0,9 %.

A evolução da massa tumoral de um dos camundongos nos grupos de LDE-oleato de paclitaxel 15 e 60 mg/Kg e dos respectivos controles foi documentada através de fotos. Figuras 23, 24, 25 e 26 representam animais tratados no 14º, 19º, 22º e 26º dia após o início do experimento dos grupos NaCl 0,9 % e LDE, LDE-oleato de paclitaxel 15 e 60 mg/Kg, respectivamente. A figura 27 mostra o tumor de um camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg em processo de remissão, documentado no 26º dia, nesta figura temos a tricotomia de um tumor em processo de remissão comparado com um tumor do grupo controle no mesmo período.





**Figura 21.** Evolução da massa tumoral de camundongos tratados com 15 mg/Kg ( ■ ) e 60 mg/Kg ( ▲ ) de oleato de paclitaxel associado à LDE, 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial ( x ) e dos respectivos controles LDE ( ● ) e solução de NaCl 0,9 % ( ◆ ). Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 8).



**Figura 22** Percentagem de sobrevivência em resposta ao tratamento com 15 mg/Kg e 60 mg/Kg de oleato de paclitaxel associado à LDE, 15 mg/Kg de paclitaxel em sua formulação comercial e salina em função do tempo. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 8).

**Tabela 4.** Atividade antitumoral de LDE-oleato de paclitaxel vs paclitaxel em sua formulação comercial em um modelo de tumoral murino.

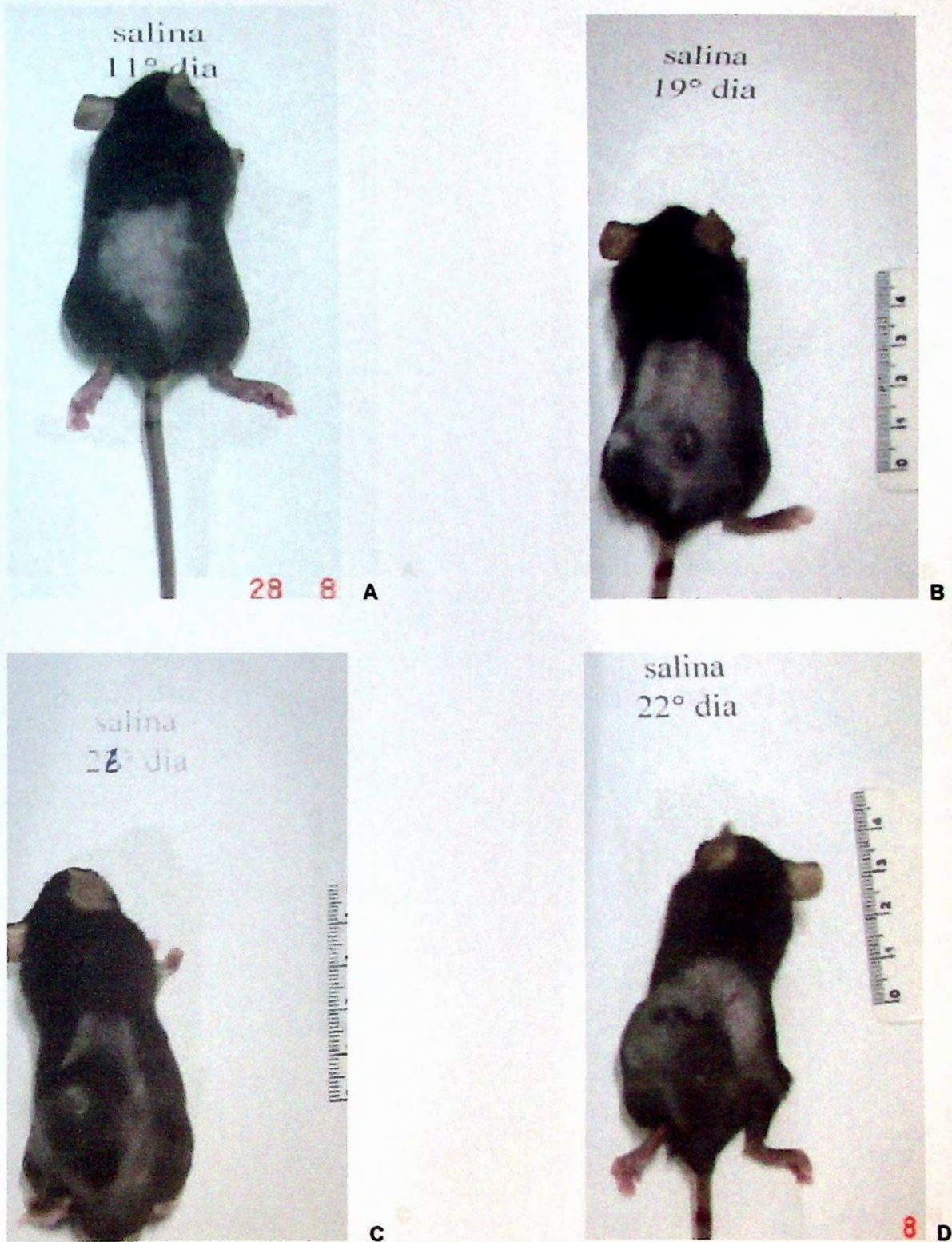
Fármacos e controles	Média da massa tumoral (mm <sup>3</sup> )						% Mortalidade 23° d.	% T/C 23° d.	% TGI 23° d.	% T-C 23° d.
	11	14	19	23	27	31				
NaCl 0,9 %	-	27	111	875	2564	3865	27	-	-	-
LDE	-	23	366	1694	2295	3464	40	194	-94	0
LDE-Olp <sub>xt</sub> 60mg/kg	-	50	33	313	570	1690	0	36	64	6
LDE-Olp <sub>xt</sub> 15mg/kg	-	8	110	209	554	1082	0	24	76	7
Paclitaxel <sup>1</sup> 15mg/kg	-	49	174	349	804	1980	0	40	60	4

<sup>1</sup> Paclitaxel em sua formulação comercial

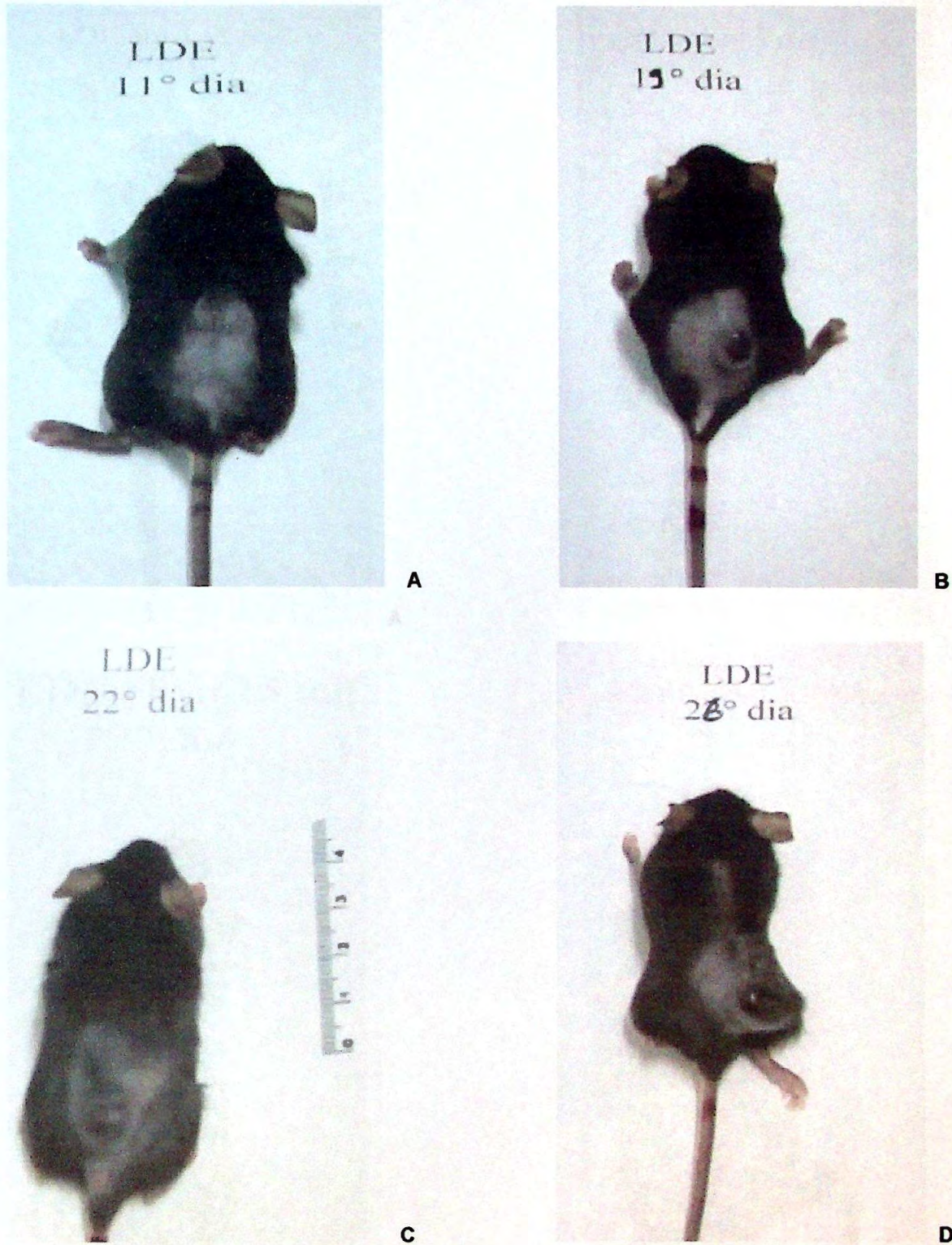
%T/C = (Média da massa tumoral dos animais tratados/ Média massa tumoral do controle) x 100

% TGI = 100 – (%T/C)

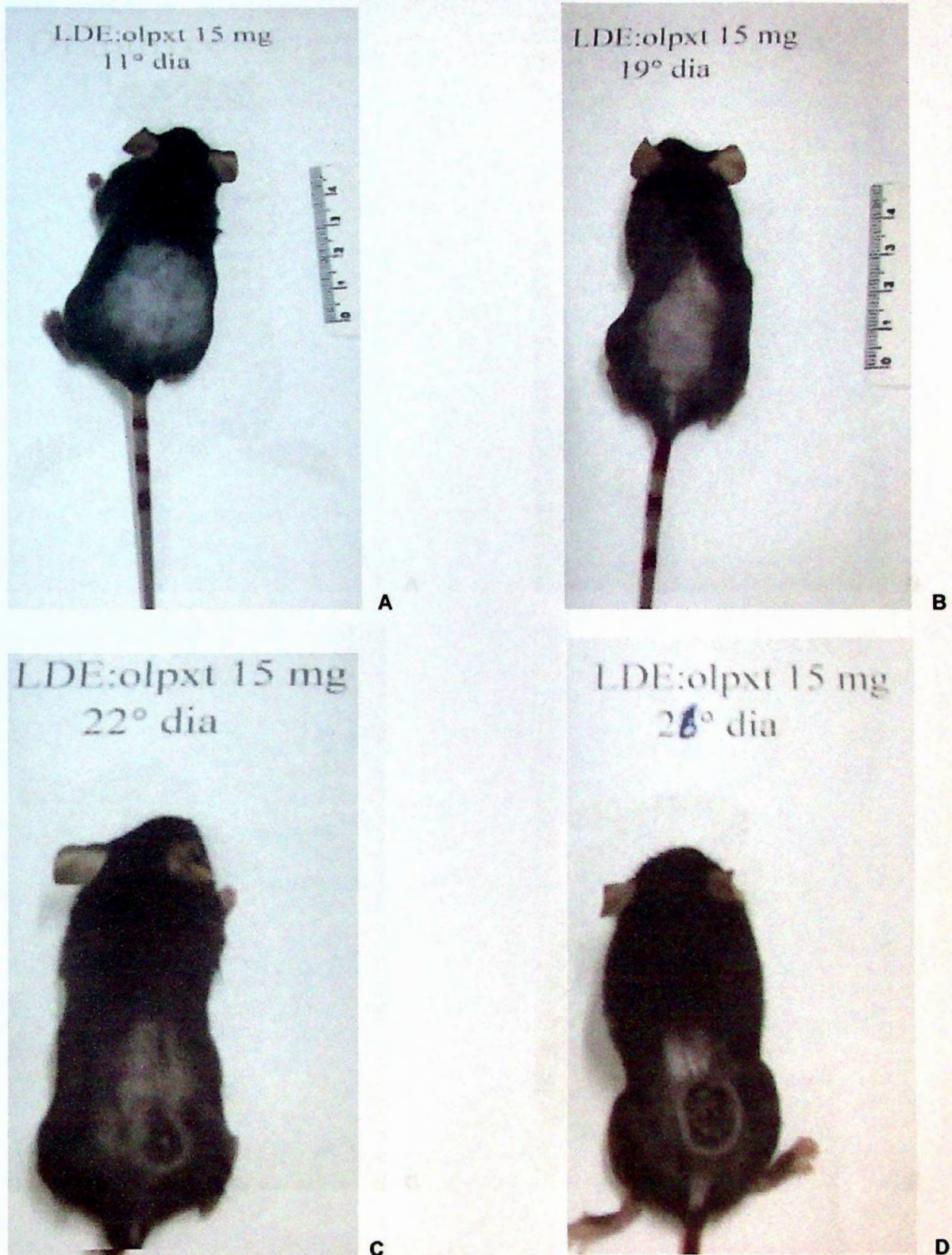
T – C = Índice de retardamento na progressão do tumor (tempo medio estimado para o grupo tratado (T) e o controle (C) alcançar um tamanho predeterminado (> 750 mg).



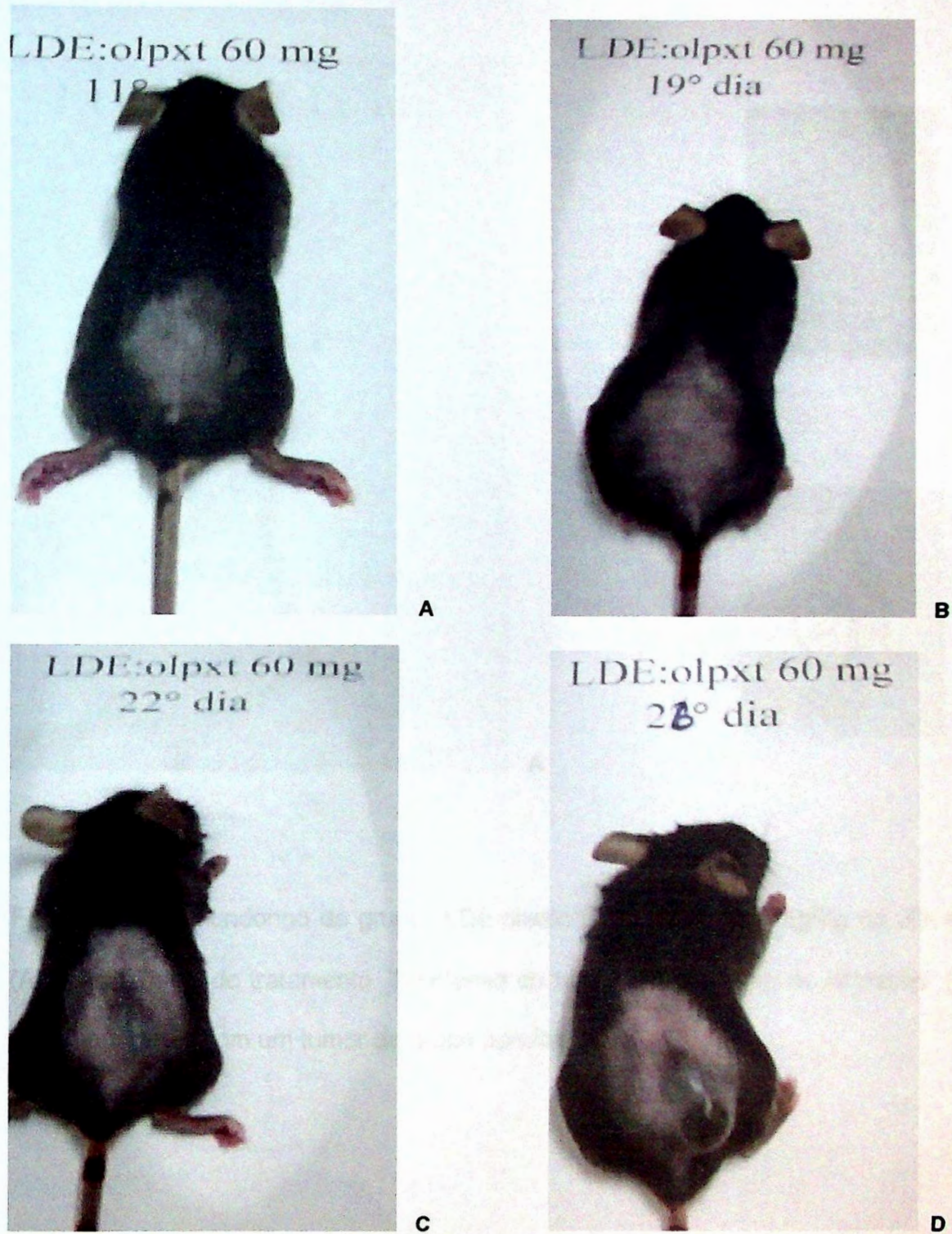
**Figura 23.** Representação da evolução da massa tumoral em um camundongo do grupo controle: solução de NaCl 0,9 % no 14º (A), 19º (B), 22º(C) e 26º (D) dia após o início do tratamento.



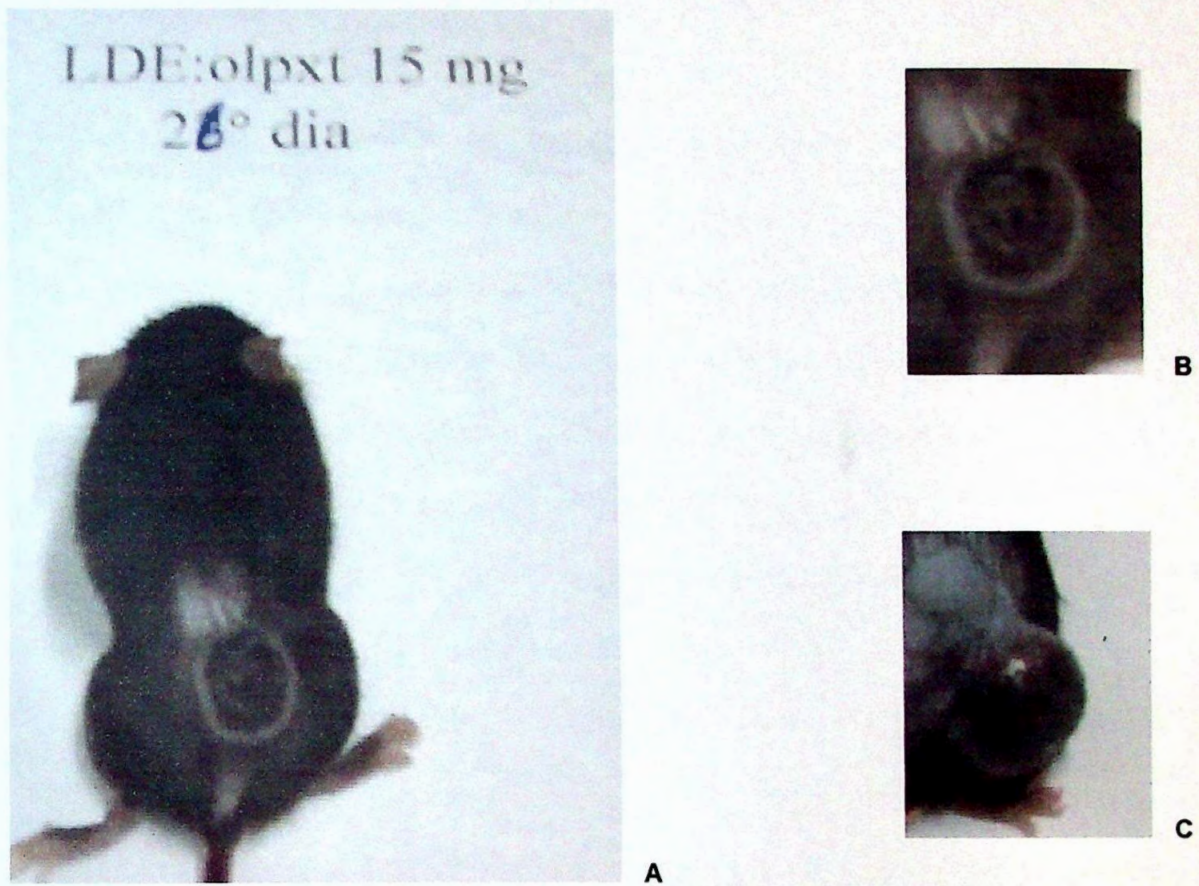
**Figura 24.** Representação da evolução da massa tumoral de um camundongo no grupo controle, LDE no 14° (A), 19° (B), 22° (C) e 26° (D) dia, após o início do tratamento.



**Figura 25.** Representação da evolução da massa tumoral de um camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg no 14º (A), 19º (B), 22º (C) e 26º(D) dia, após o início do tratamento.



**Figura 26.** Representação da evolução da massa tumoral de um camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 60 mg/Kg no 14º (A), 19º (B), 22º (C) e 26º (D) dia , após o início do tratamento.



**Figura 27.** Camundongo do grupo LDE-oleato de paclitaxel 15 mg/Kg no 26° dia (A) após o início do tratamento. Tricotomia do tumor em processo de remissão (B) em comparação com um tumor do grupo controle (C).



# Discussão

---

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

## DISCUSSÃO

A investigação do uso da LDE como direcionador de agentes antineoplásicos às células tumorais foi proposta inicialmente após a confirmação de que a mesma se concentrava preferencialmente em tecidos neoplásicos (MARANHÃO *et al.*, 1994). Imaginando-se uma situação ideal, do ponto de vista estratégico para o direcionamento de quimioterápicos às células tumorais, um fármaco associado à emulsão deve permanecer ligado de maneira estável, vindo a exercer sua ação citotóxica somente após a sua captação.

Uma das propriedades exigidas para que um fármaco seja associado de forma estável a LDE é que ele deva ser altamente lipofílico. Recentemente, quimioterápicos de maior lipossolubilidade como a carmustina, ou modificado quimicamente para adquirir esta propriedade, como o etoposide oléico, foram associados a LDE, apresentando um comportamento satisfatório (MARANHÃO *et al.*, 2002 e VALDUGA *et al.*, 2003).

O agente antineoplásico paclitaxel é um fármaco hidrofóbico que possui a propriedade de auto-agregação e conseqüente precipitação dependendo do meio e concentração utilizados (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1994). A sua baixa solubilidade em veículos aquosos resultou na sua dispersão em um veículo pouco tolerado, uma mistura de Cremophor EL e etanol. Por esta razão, a sua substituição por um veículo que além de ser bem tolerado, tem a propriedade de direcioná-lo às células neoplásicas é uma alternativa atraente.

O presente estudo foi desenhado com a finalidade de se associar o paclitaxel à LDE. Inicialmente se verificou que aproximadamente 75 % das

moléculas de paclitaxel se associavam à microemulsão de maneira satisfatória. No entanto, quando a associação foi incubada com o plasma verificou-se que 40 % do fármaco se dissociava da microemulsão após um curto período de incubação. Tendo em vista o eventual uso clínico da preparação, a sua baixa estabilidade implicaria na falha do sistema de direcionamento do fármaco. Neste sentido, o desenvolvimento de uma nova estratégia de associação do fármaco à LDE foi proposto.

A estratégia utilizada para se aumentar a estabilidade do sistema foi o acoplamento do fármaco ao ácido oléico. A reação de esterificação foi realizada em duas etapas. A confirmação da estrutura do produto obtido, oleato de paclitaxel e o rendimento da reação foram obtidos por duas técnicas: cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa seqüencial e ressonância magnética nuclear. A reação apresentou uma variação em seu rendimento, entre 74 e 94 %. O rendimento da reação mostrou ser dependente das condições atmosféricas e da presença de água na reação. Esta afirmação está baseada no fato de que, quando medidas extremas que promoviam a retirada de água da reação eram adotadas, tais como secagem de solventes e materiais utilizados, o rendimento da reação era aumentado.

A utilização de ésteres como pró-fármacos tem sido exaustivamente explorado pela literatura devido a simplicidade do acoplamento e da facilidade de hidrólise enzimática (MELLADO *et al*, 1984). Existem dois sítios reativos na molécula de paclitaxel: C-2 e C-7, sendo o primeiro sítio mais reativo. A análise do espectro de massa acusou a presença de um produto com massa de 1117, indicando que nas condições utilizadas ocorreu acoplamento do

oleato em um dos sítios apenas, provavelmente o sítio mais reativo e responsável pela atividade da molécula (C-2). Este dado foi confirmado pelo espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , onde o deslocamento químico do hidrogênio ligado ao C-2, passou para um campo mais baixo. É importante resaltar, que apesar do acoplamento ter ocorrido no sítio C-2, isto não ocasionou perda de atividade do fármaco.

O acoplamento do ácido oléico ao paclitaxel aumentou o índice de associação do mesmo a LDE, indicando uma maior afinidade da molécula de paclitaxel pela LDE após a sua modificação química. Tal fenômeno já havia sido observado para o fármaco etoposide. O rendimento da associação do etoposide a LDE aumentou de 50 % para quase 100 % após o acoplamento do ácido oléico (VALDUGA *et al.*, in press).

Uma das características desejadas em um sistema de direcionamento de fármacos é que o sistema seja capaz de retê-lo até alcançar as células alvo. Neste sentido, objetivando-se avaliar a estabilidade da associação LDE-oleato de paclitaxel, dialisamos a mesma contra o plasma e contra uma solução tampão por uma semana. Neste experimento, ao contrário do que foi obtido com o oleato de etoposide, onde a taxa de dissociação do fármaco da LDE nas primeiras 24 horas contra o plasma é de 58 %, (VALDUGA *et al.*, in press), apenas 3 % do oleato de paclitaxel se dissociou da LDE. Comparativamente com outros sistemas, como paclitaxel-LDL, onde a taxa de dissociação foi de 70 % em 24 horas (MASQUELIER *et al.*, 1999), ou da própria dissociação do fármaco do seu veículo comercial 12 % em 24 horas (CONSTANTINIDES *et al.*, 2000), podemos afirmar que a associação entre o oleato de paclitaxel e a LDE é bastante estável.

Os resultados obtidos por ultracentrifugação, após a incubação da associação LDE-paclitaxel e LDE-oleato de paclitaxel com plasma, mostraram que após 1 hora de incubação, aproximadamente 40 % do paclitaxel encontra-se precipitado, provavelmente pela alta afinidade da molécula por proteínas plasmáticas tais como, albumina e alfa-1 glicoproteína. Este índice é reduzido para 9 % após a modificação química do paclitaxel. Tal resultado é semelhante ao encontrado por LUNDBERG *et al.* (2003), onde a modificação química e conseqüente aumento da lipofilicidade da molécula, aumentou a estabilidade do sistema paclitaxel-transportador lipídico, diminuindo o índice de precipitação do fármaco.

A estabilidade da associação LDE:oleato de paclitaxel foi também avaliada através da variação média do diâmetro da partícula num intervalo de 30 dias. Não ocorreu variação do tamanho da partícula nos primeiros 7 dias, contudo a partir do 8º dia ocorre diminuição gradual no tamanho da partícula que pode ser justificada pela saída do fármaco. O aumento do tamanho da partícula no final do experimento pode ser justificado pelo eventual desarranjo da partícula.

Portanto, a conjunção de todas estas análises sustentam a hipótese de que a modificação do paclitaxel aumentou a taxa de associação a LDE e conferiu ao sistema a propriedade de ser uma formulação estável por um período superior ao necessário para que a maior parte dele desapareça do compartimento plasmático.

Recentemente foi demonstrado que a captação da LDE em células de mieloma RPMI B226 é mediada pelo rLDL (HUNGRIA *et al.*, 2004). Um ponto importante a ser investigado a seguir era se o procedimento de associação do

fármaco à LDE, poderia por força da energia emanada pela radiação ultrassônica, causar uma alteração estrutural da LDE, alterando dessa forma o mecanismo pelo qual a partícula é captada pelas células. Neste sentido, alguns experimentos foram realizados com a intenção de avaliar o mecanismo de captação da LDE por células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Nos estudos *in vitro* foram utilizadas células da linhagem de adenocarcinoma epidermóide de pulmão humano, NCI H-292. Recentemente, uma análise qualitativa dos receptores de LDL foi realizada nesta linhagem utilizando-se o método da imunoperoxidase, os resultados apontaram uma expressão significativa destes receptores (MARANHÃO *et al.*, 2002).

A comprovação de que LDE e LDE-oleato de paclitaxel são captadas via rLDL foi realizada através de dois experimentos. No primeiro deles células tumorais NCI H-292 foram expostas a concentrações crescentes de LDE e LDE-oleato de paclitaxel paralelamente. O aumento da concentração de LDE no meio promoveu um aumento na sua captação celular, até alcançar um estado de equilíbrio, num comportamento característico de ligação entre receptor e proteína. Da mesma forma, o aumento da concentração de LDE-oleato de paclitaxel no meio promoveu um aumento na captação celular de ambos os componentes, sugerindo que os dois elementos entram na célula pelo mesmo mecanismo.

No segundo ensaio a introdução de quantidades crescentes de LDL nativa ao sistema de incubação levou a diminuição da captação de LDE e LDE-oleato de paclitaxel. O aumento na concentração de LDL nativa no sistema, permite uma redução gradual da atividade dos receptores de LDL, fenômeno

característico de uma resposta de regulação metabólica ao aumento do “pool” intracelular de colesterol (GOLDSTEIN *et al.*, 1977). Portanto, a diminuição gradual da captação da LDE ou de LDE-oleato de paclitaxel na presença de LDL permite-nos supor que os mesmos são captados por esta linhagem via receptor de LDL.

Um importante fenômeno observado, que teoricamente poderia sustentar a hipótese de que a associação do fármaco a LDE é estável *in vivo* foi a investigação do comportamento da associação no compartimento plasmático. Neste sentido, a análise comparativa entre as curvas de decaimento plasmático da microemulsão marcada radioativamente e do fármaco, mostraram que existe semelhança entre a cinética de ambos os componentes. Esta afirmação é sustentada pelo fato de que não houve diferença significativa entre as taxas fracionais de remoção ( $p = 0,0689$ ), indicando, portanto que uma grande fração do fármaco acompanha a partícula de LDE até o sítio de ação.

Através das curvas de decaimento plasmático do oleato de paclitaxel associado à LDE, obtivemos ainda, os parâmetros farmacocinéticos do fármaco. Uma comparação destes parâmetros com os encontrados na literatura para paclitaxel em sua formulação comercial, no mesmo modelo animal, dose e via de administração, comprova que a modificação química e posterior associação do paclitaxel à LDE, diminuiu a velocidade de depuração plasmática do fármaco de 220 para  $45,4 \text{ ml/min}^{-1}/\text{kg}^{-1}$ , aumentou o seu tempo de meia-vida de 0,34 para 2,4 horas e a área sob a curva de 94,4 para  $2200 \text{ } \mu\text{g/mL/h}$  (EISEMAN *et al.*, 1994). Tal fenômeno pode oferecer uma vantagem

adicional ao sistema uma vez que a citotoxicidade do paclitaxel é muito dependente da duração da exposição das células ao fármaco e pouco dependente da sua concentração (GOBLE & BEAR, 2003).

Uma outra questão importante a ser respondida diz respeito ao mecanismo de ação do paclitaxel, era necessário investigar se o acoplamento do grupo oleíla ao fármaco ou se o procedimento de associação do fármaco à LDE promoveria uma mudança no seu mecanismo de ação, o que comprometeria o seu comportamento farmacológico. Esta questão foi elucidada através de dois experimentos: o primeiro deles, foi a avaliação do potencial citotóxico do oleato de paclitaxel e da associação LDE-oleato de paclitaxel em cultura de células tumorais, através de ensaio de MTT e o segundo a avaliação do conteúdo de DNA nas diversas fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

Através da comparação entre a citotoxicidade do oleato de paclitaxel e o fármaco disponível comercialmente ficou claro que a modificação química da molécula de paclitaxel não causou nenhuma diminuição da atividade citotóxica do quimioterápico. Este fenômeno pode ser confirmado pela similaridade das curvas de sobrevivência celular dos dois fármacos ( $p = 0,3855$ ) e por índices de citotoxicidade muito próximos  $IC_{50} = 0,11 \mu\text{g/mL}$  para oleato de paclitaxel e  $0,09 \mu\text{g/mL}$  para o fármaco comercial.

A curva de sobrevivência celular da associação LDE-oleato de paclitaxel pode ser considerada um exemplo típico de curva de dose-resposta. Propriedade esta inerente a compostos antineoplásicos. Entretanto, quando comparamos os resultados desta curva com a do fármaco comercial, observamos uma diminuição do efeito inibitório sobre o crescimento celular ( $p = 0,015$ ). Este resultado levou a investigação da natureza desta diferença. Foi



levantada a hipótese de que ela poderia ser devida em parte, ao veículo utilizado para a dissolução do paclitaxel. A atividade anti-proliferativa do Chremophor EL já foi descrita anteriormente por outros autores (REINECKE *et al.*, 1996, CSÓKA *et al.*, 1997 and NYGREN *et al.*, 1995). No presente estudo ela pode ser comprovada pela similaridade das curvas de sobrevivência de LDE-oleato de paclitaxel e do fármaco comercial após a adição do volume correspondente do veículo comercial sobre as respectivas diluições de LDE-oleato de paclitaxel ( $p = 0,756$ ). É importante ressaltar que diferentemente do que acontece em sistemas fechados de cultura celular, a concentração de cremophor EL utilizada no tratamento de pacientes com câncer é muito menor do que a necessária para que se possa atribuir ao mesmo, algum efeito citotóxico (SPARREBOM *et al.* 1998).

Existem várias evidências que indicam que o paclitaxel mata as células através da indução de apoptose que ocorre após a sua ligação aos microtúbulos. Em análise por citômetro de fluxo, a ligação do fármaco aos microtúbulos é sinalizada pelo aumento do conteúdo de DNA na fase mitótica ( $G_2/M$ ) e através do aumento da fase (S) que corresponde a maior síntese de genes sinalizadores de apoptose ou inibidores do crescimento (WANG *et al.*, 2000). Para elucidar qual o mecanismo envolvido na morte celular induzida pelo oleato de paclitaxel, análise do ciclo celular foram realizadas *in vitro* após 24 horas de co-incubação de LDE-oleato de paclitaxel e células de melanoma B16F10. Apesar de não ter sido observado aumento no índice de apoptoses, o que pode ser explicado pelo curto período de análise, o aumento significativo do conteúdo de DNA na fase ( $G_2/M$ ) e o ligeiro aumento na fase (S) indicam

que o fármaco modificado não perdeu a capacidade de se ligar aos microtúbulos, mantendo assim a sua propriedade farmacológica.

A toxicidade aguda e crônica de LDE-oleato de paclitaxel e do fármaco comercial foi determinada em camundongos C57BCL6 saudáveis. Através deste estudo foi evidenciada uma redução significativa da toxicidade do fármaco quando associado a LDE. Tal redução pode ser atribuída em sua maior parte a retirada do Chemophor da formulação ou pela nova biodistribuição do fármaco, criada após a sua associação à LDE. Corroborando estes dados, outros sistemas transportadores de paclitaxel, tais como lipossomas e emulsões de natureza lipídica demonstraram uma atenuação significativa dos efeitos tóxicos do fármaco (ALLEN, 1998 and SOUZA *et al.* 1993).

O modelo murino de tumor melanoma B16 é um dos modelos utilizados pelo NCI – USA na avaliação da atividade antitumoral de agentes antineoplásicos novos. Apesar de haver muitas diferenças entre o metabolismo lipídico dos camundongos e humano, tem sido bem documentado que a LDL é captada de maneira significativa por células de tumores de melanoma B16 *in vitro* e *in vivo* (PONTY *et al.*, 1993, VERLUIJS *et al.*, 1996, SETIAWAN *et al.*, 1996), além disto, este modelo tem sido utilizado para avaliação dos efeitos antitumorais de fármacos associados a LDL. Com base nestas propriedades, este foi o modelo animal escolhido em nossos estudos.

Em um primeiro instante era necessário comprovar que a captação da LDE era expressiva no tumor e identificar qual a via levaria a um aumento desta captação. Para tanto, foi realizado um estudo de biodistribuição da LDE marcada radioativamente após administração por via endovenosa e via

intraperitoneal. A captação da LDE por via endovenosa foi maior no fígado, seguido pelo baço, tumor e rins e por via intraperitoneal foi maior no fígado, seguido pelo tumor, baço e rins. Estes resultados estão de acordo com um estudo previamente publicada para captação de LDL, onde observou-se uma captação significativa de LDL por tecidos como fígado, tumor e baço no mesmo modelo (LOMBARDI *et al.*, 1989). Além disto, a razão de captação pelo tumor/fígado foi cerca de  $0,55 \pm 0,17$  (IP) e  $0,40 \pm 0,20$  (EV), valores estes muito parecidos com valores encontrados por VERLUIIS *et al.* (1996), onde a razão tumor/fígado observada para a captação de LDL marcada radioativamente com  $^{125}$ tiramina celobiose foi de  $0,48 \pm 0,06$ . De grande importância é a demonstração de que a LDE foi captada em média cinco (EV) e oito (IP) vezes mais do que no tecido contralateral normal adjacente, o que confirma a hipótese de que a LDE pode ser utilizada com veículo direcionador de fármacos antineoplásicos.

A maior captação da LDE pelo tumor após administração IP pode ser explicada pelo fato de que esta via aumenta a distribuição da mesma em regiões próximas ao tumor, aumentando assim a superfície de contato. Por esta razão escolhemos esta foi a via de escolha para os estudos de modulação do crescimento do tumor realizados posteriormente.

Uma pergunta importante a ser respondida era se a associação do fármaco a LDE iria interferir na dinâmica de distribuição, verificada nos experimentos onde a LDE foi captada isoladamente. Para isso, analisamos a captação da partícula de LDE com o oleato de paclitaxel associado. Os resultados obtidos indicaram que a LDE continuava sendo captada de maneira expressiva por órgãos como o fígado e tumor. Além disto, a razão entre a

captação tumoral/hepática da LDE associada ao fármaco foi cerca de  $0,56 \pm 0,17$  após administração endovenosa. Esta razão é similar a encontrada nos experimentos onde apenas a partícula de LDE foi injetada. No que diz respeito a captação do fármaco foi obtida uma razão tumor/fígado de  $0,59 \pm 0,40$ , indicando que provavelmente o oleato de paclitaxel atingiu estes órgãos juntamente com a partícula. De importância, é o fato de que a LDE concentrou o oleato de paclitaxel cerca de quatro vezes mais no tecido neoplásico do que na pele que circundava a região do tumor.

Finalmente, a atividade antitumoral da formulação foi avaliada comparativamente com a do fármaco em sua formulação comercial e respectivos controles em experimentos de modulação do crescimento tumoral. Através da análise das curvas de crescimento do tumor é possível afirmar que LDE-oleato de paclitaxel mostrou ser mais efetiva em retardar o crescimento tumoral do que a formulação comercial. Não houve uma diferença significativa entre as doses de 15 e 60 mg/Kg de oleato de paclitaxel ( $p > 0,05$ ). Este fenômeno deve ser melhor explorado e possivelmente está relacionado com o esquema posológico adotado, administração de altas doses, em intervalos curtos e a possível saturação dos rLDL no tecido neoplásico.

O fato de que, neste estudo, não alcançamos ganhos terapêuticos com aumento das doses pode ainda estar relacionado com observações encontradas na prática clínica. Recentemente, observou-se que a infusão semanal de paclitaxel em doses mais baixas em contraposição a doses mais altas à cada três semanas é mais efetiva no tratamento dos pacientes acometidos por câncer de ovário e mama (THOMAS & ROSENBERG, 2002, LUCK & ROCHE, 2002). Esse esquema de tratamento expõe um maior número

de células tumorais em processo de divisão aos efeitos citotóxicos do fármaco. Além de limitar o aparecimento de células resistentes à quimioterapia e aumentar os efeitos apoptóticos e anti-angiogênicos do fármaco (MARCHETTI *et al.*, 2002)

O aumento da sobrevivência média dos animais tratados com LDE-oleato de paclitaxel e a formulação comercial indicam que a formulação proposta aumentou a eficiência do fármaco. Camundongos não tratados, morrem em média 35 – 40 dias após o início do experimento (ENTIN *et al.*, 2003). Análise da literatura nos permite afirmar que mesmo com outros esquemas posológicos ou com outros inóculos iniciais de células de melanoma, o limite da sobrevivência dos camundongos, utilizando-se como tratamento paclitaxel em sua formulação comercial, não ultrapassa os 50 dias após o início do estudo (SHARMA *et al.*, 1998, CONSTANTINIDES *et al.*, 2000, KALECHMAN *et al.*, 2000, e ENTIN *et al.*, 2003). Neste sentido, o registro de 20 % dos animais vivos após 50 dias do início do experimento, para o tratamento LDE-oleato de paclitaxel é um dado importante.

O modelo tumoral de melanoma B16 é conhecido por ser um tumor sólido de alta atividade proliferativa e metástase. No momento em que o tumor alcança 5 mm, micrometástases já são observadas nos pulmões dos animais (OPHIR *et al.*, 1999). Animais tratados, nos quais ocorreu o desaparecimento do tumor primário e não morreram por metástase em até 150 dias após a inoculação são considerados curados (ENTIN *et al.*, 2003). Não existe registro de remissão total ou cura de animais tratados com paclitaxel em sua formulação comercial sozinho. Somente quando se associa ao tratamento um imunomodulador (KALECHMAN *et al.*, 2000) ou são realizadas manobras que

aumentem a permeabilidade vascular, como pulsos elétricos em regiões próximas ao tumor (ENTIN *et al.*, 2003), temos alguns relatos de cura. Em nossos experimentos, verificou-se que através do tratamento com LDE-oleato de paclitaxel foi alcançado remissão total em dois camundongos, um tratado com 15 mg/Kg e outro com 60 mg/Kg.

O aumento do índice terapêutico do fármaco pode ser atribuído a diminuição de sua toxicidade e ao aumento de sua atividade antiproliferativa. O que pode ser justificado pelo direcionamento do fármaco às células tumorais ou até mesmo pelo aumento do tempo de exposição. Através da análise das curvas de crescimento do tumor é possível afirmar ao fármaco, proporcionado pela ligação do mesmo a LDE.

Conclusões

---

## CONCLUSÃO

- A modificação estrutural do paclitaxel e posterior associação à LDE, originou uma formulação estável, *in vitro* e *in vivo*;
- Os elementos da associação LDE-oleato de paclitaxel são captados juntamente por células de linhagem neoplásica, via receptor de LDL;
- A manutenção da atividade anti-proliferativa do fármaco foi confirmada pelo ensaio de citotoxicidade e pelo resultado obtido por citometria de fluxo;
- A associação LDE-oleato de paclitaxel é menos tóxica do que o fármaco disponível comercialmente;
- Os elementos da associação LDE-oleato de paclitaxel são removidos juntamente do compartimento plasmático e concentrados de maneira expressiva nos tecidos neoplásicos;
- A associação aumentou a eficácia terapêutica do paclitaxel como demonstrado em modelo tumoral murino;



## Referências bibliográficas

---

- ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J.S.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol. Oncol.* v.81, n.1, p.84-87, 2001.
- ALLEN T. M., HANSEN C., MARTIN F., REDEMANN T.G., YAU-YOUNG. A, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1066, p. 29-36, 1991.
- BARCLAY, M; ESCHER, G. C.; KAUFMAN, R. J.; KIDDER, E. D.; PETRMANN, M. L. Human plasma lipoproteins in normal women and in women advanced carcinoma of breast. *Cancer*, v.8, p. 253-60, 1995.
- BAILLIE G., OWENS M.D., HALBERT G.W. A synthetic low density lipoprotein capable of supporting U937. *J. Lipid Res.*, v. 43, n.1, p.69-73, 2002.
- BALASUBRAMANIAN S.V., ALDERFER J.L. AND STRAUNBINGER R.M.. Solvent and concentration-dependent molecular interactions of Taxol (Paclitaxel). *J. Pharm. Scien.*, v.83, n.10, p.1470-1475, 1994.
- BASES, RE, KRAKOFF, I.H. Studies of serum cholesterol levels in leukemia. *J. Reticul Soc.* v.2, p.8-14, 1965
- BRADLEY M. O., SWINDELL C.S., ANTHONY F.H., WITMAN P. A., DEVANESAN P., WEBB N.L., BAKER S.D. WOLFF A.C., DONEHOWER R.C., Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. *J. Control. Rel.* v.74, p. 233-236, 2001.

- BROWN, M.S.; KOVANEN, P. T.; GOLDSTEIN, J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoproteins receptors. *Science*, v. 212, p. 628-35, 1981.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Scavenging for receptors. *Nature*, v.343, p. 508-509, 1990
- BUDD, D.; GINSBERG, H. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Cancer*, v. 58, p. 1361-1365, 1986.
- BYDLOWSKI S.P., VINAGRE C.G., BRAVO L.M., DEBES A. A., MARANHÃO R.C. Synthetic oligonucleotide does not bind to lipid emulsion resembling low-density lipoprotein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.772, p.252-254, 1995.
- CAVALLI R.; CAPUTO O.; GASCO MR. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur. J. Sci. Vol. V.10*, n.4, p. 305-9, 2000.
- CHU A. C., TSANG S.Y., LO E.H., FUNG K.P., Low density lipoprotein as a targeted carrier for doxorubicin in nude mice bearing human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*, v.70, n.5, p. 591-601, 2001
- CONSTANTINIDES P.P., LAMBERT K.J., TUSTIAN <sup>a</sup>K., SHNEIDER B., LALJI S. MA W., WENTZEL B., KESLLER D., WORAH D., QUAY S.C. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm. Res.*, v.17, n.2, p.175-182, 2000
- CSOKA K., DHAR, S., FRIDBORG, H. LARSSON, R., NYGREN, P. Differential activity of Cremophor EL and Paclitaxel in patients, tumor cells and human carcinoma cell lines *in vitro*. *Cancer*, v.79, n.15, p.1225-33, 1997.

- DE SMIDT P.C., VAN BERKEL T.J., Prolonged serum half-life of antineoplastic drug by incorporation into the low density lipoprotein. *Cancer Res.* v.50, n.23, p. 7476-82, 1990
- DEUTSCH H.M., GLINKSKI J.A., HERNANDEZ M., HAUGWITZ R.D., NARAYANAN V.L., SUFFNESS M., ZALKOW L.H., Synthesis of congeners and prodrugs. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. *J.Med. Chem.*, v. 32, p.788-792, 1989
- DORLHIAC-LLACER, P. E.; MARQUEZINI, M. V.; TOFFOLETTO, O.; CARNEIRO, R. C. G.; MARANHÃO, R. C.; CHAMONE, D. A. F. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz J. Med. Biol. Res.*, v. 34, p. 1257-1263, 2001.
- ENTIN I., PLOTNIKOV A., KORENSTEIN R., KEISARI Y. Tumor growth retardation, cure, and induction of antitumor immunity in B16 Melanoma-bearing mice by low electric field-enhanced chemotherapy. *Clin. Cancer*, v.9, p.3190-3197, 2003.
- EISENBERG S., Plasma lipoprotein conversions: the origins of low-density and high-density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci.* v.348, p. 30-47,1980.
- EISEMAN J.L., EDDINGTON N.D., LESLIE J., MacAULEY C., SENTZ D.L., ZUHOWSKI M., KUJAWA J.M., YOUNG D., EGORIN M.J., Plasma pharmacokinetics in CD2F1 mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* V.34, p.465-471, 1994
- ERICKSON S.K., COOPER A. D., Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in human liver. In vitro detection and some characteristics of the enzyme. *Metabolism.* v.10, p. 991-996,1980.

- FENG X., YING-JIN Y., WU J.C., Synthesis and evaluation of water-soluble paclitaxel prodrugs. *Biorg. Med. Chem. Let.* v.12, p.3301-3303, 2002.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE S.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* v. 226, n.1, p.497-509, 1957
- FONSECA C., SIMOES S., GASPAR R., paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release.* v.83, n.2, p.273-286, 2002
- GAL, D.; MACDONALD, P. C.; PORTER, J. C.; SMITH, J. W.; SIMPSON, E. R. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. *Cancer Res.*, v. 41, p. 473-477, 1981.
- GEORG G.I., ALI S.M., BOGE T.C., DATTA A., FALBORG L. Selective c-2 and c-4 deacylation and acylation of taxol: The first synthesis of a c-4 substituted taxol analogue. *Tetrahedron Letters.* V.35, n. 48, p.8931-8934, 1994
- GINSBURG G.S., SMALL D.M., ATKINSON D., Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Preprotein-free models of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, v.57, p.8216-8227, 1982.
- GOBLE S., BEAR H.D., Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. *Surg Clin North Am.* v.83, n.4, p.943-71, 2003

- GOLDSTEIN, J. L.; BASU S. K.; BRUNSCHEDÉ G. Y.; BROWN, M. S. Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell*, v. 7, n. 1, p. 85-95, 1976.
- GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; ANDERSON, R. G. W. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, v. 10, p. 351-364, 1977.
- GOLDSTEIN, J. L.; ANDERSON, R. G.; BROWN, M. S. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, v. 279, p. 679-85, 1979.
- GRAZIANI S. R., IGREJA F. A. F., HEGG R., MENEGHETTI C., BRANDIZZI L. I., BARBOZA R., AMÂNCIO R. F., PINOTTI J. A., MARANHÃO R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer, *Gin. Onc.*, v.85, p.493-497, 2002.
- HALBERT, G. W.; STUART, J. F. B.; FLORENCE, A T. The incorporation of lipide-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. *Int. J. Pharm.*, v. 21, p. 219-232, 1984.
- HENRIKSSON, P.; ERIKSSON, M.; ERICSSON, S.; RUDLING, M.; STEGE, R.; BERGLUND, L.; ANGELIN, B.; Hypocholesterolemia and increased elimination of low-density lipoproteins in metastatic cancer of prostate. *Lancet ii*, p. 1178-1180, 1989.
- HIRATA, R. D., HIRATA, M. H., MESQUITA, C. H., CESAR, T. B., MARANHÃO, R. C., Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, v. , 1437, 53, 1999

- HO, Y. K., SMITH, R. G.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* v. 52, p. 1099-1104, 1978.
- HORWITZ, S.B.. Mechanism of action of taxol. *Science.*, v.13, p. 134-36, 1992
- HORWITZ S.B., COHEN D., RAO S., RINGEL I., SHEN H.J., YANG C.P. Taxol: mechanisms of action and resistente. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*,v.15, p.55-61, 1993
- HUNGRIA, T.M.V.; CHIATTONE, C.S.; BARROS, J.C.; LATRILHA, M.C.; PILEGGI, F.; CHAMONE, D.A. F.; MARANHÃO, R.C. Plasma lipids and apolipoproteins in multiple myeloma patients. *Blood.* v.86, p. 836- ,1995.
- HUNGRIA T.M.V., LATRILHA M.C., RODRIGUES D.G., BYDLOWSKI S.P., CHIATTONE C.S., MARANHÃO., Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v.53, p.51-60, 2004.
- IRIBARREN, C., REED, D.M., CHEN R., YANO K., DWYER J.H., Low serum cholesterol and mortality, which is the cause and which is the effect. *Circulation* v.92, p. 2396-2405, 1995.
- IWANIK, M.J., SHAW K.V., LEDWITH B.J., YANOVICH S., SHAW J.M., Preparation and interaction of a low-density lipoprotein: Daunomycin complex with P388 leukemic cells. *Cancer Res.*, v.44, p.1206-15, 1984
- KALECHMAN Y.K., LONGO D.L., CATANE R., SHASI A., ALBECK M., SERDINI B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (Taxol)+AS101 in

a murine model of B16 melanoma: association with ras-dependent signal transduction pathways. *Int. J. Cancer*. V. 86, p.281-288, 2000

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

KAN, P., CHEN, Z. LEE,C. CHU,I.. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system, *J. Control. Release*. v.58, p. 271-8, 1999

LI C. Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates. *Adv .Drug Deliv.*, v.54, n.5, p. 695-713, 2002

LIEBAMANN J., COOK J.A., MITCHELL J.B. Cremophor EL, solvente for paclitaxel and toxicity. *Lancet*, v.342, n.8884, p.873-877, 1993

LOMBARDI P., NORATA G., MAGGI F.M., CANTI G. FRANCO P., NICOLIN A CATAPANA A. Assimilation of LDL by experimental tumours in mice. *Biochim. Biophys. Acta*. V.1003, p.301-306, 1989

LUCK H.J., ROCHE H. Weekly paclitaxel: na effective and well-tolerated treatment in patients with advanced breast cancer. *Crit. Ver. Oncol. Hematol*: S44: p.15-30, 2002.

LUNDBERG BO. Preparation of Drug-Low Density Lipoprotein Complexes for Delivery of Antitumoral Drugs via the Low Density Lipoprotein Pathway. *Cancer Res*. v.47, p4105-4108, 1987.



- LUNDBERG B. B., Preparation of drug-carrier emulsions stabilized with phosphatidylcholine-surfactant mixture. *J. Pharm. Sci.*, v.83, n.1, p.72-75, 1994
- LUNDBERG B. B. A Submicron Lipid Emulsion Coated with Amphipathic Polyethylene Glycol for Parenteral Administration of Paclitaxel (Taxol). *J. Pharm. Pharmacol.* v.49, p.16-21, 1997.
- LUNDBERG B.B., RISOVI V. RAMASWAMY M. WASAN K.M., A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J. Control. Release*, v.86, p.93-100, 2003.
- MALETINSKA, L.; BLAKELY, E. A; BJORNSTAD, K. A; DEEN, D. F.; KNOFF, J.; FORTE, T. M. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density-lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res.*, v. 60, p. 2300-2303, 2000.
- MANFREDI, J.J., HORWITZ, S.B. Taxol: na antimetabolic agent with a unique mechanism of action. *Pharmacol. Ther.*, v.25, p.83-125, 1984
- MARANHÃO, R. C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.; LLACER, P. D.; PILEGGI, F. J. C.; CHAMONE, D. A. F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for treatment of the disease. *Brazilian J Med Biol Res*, v.25, p.1033-7, 1992.
- MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO-MARIANI, S. R.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H.; Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lipids*, v. 28, p. 691-6, 1993.

- MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E. L.; LLACER, P. D.; CADENA, S. M. S.; COELHO, I. J. C.; MENEGHETTI, J. C.; PILEGGI, F. J. C.; CHAMONE, D. A. F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Research*, v. 54, p. 4660-66, 1994.
- MARANHÃO, R.C., ROLAND, I.A., TOFFOLETTO, O., RAMIRES, J.A., GONÇALVES, R.P., MESQUITA, C. H., PILEGGI, F. Plasma kinetic behaviour in hiperlipidemic subjects of a lipid microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*, v. 32, n.6, p. 627-33, 1997.
- MARANHÃO, R. C.; GRAZIANI, S. R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R. F.; LATRILHA, M. C.; RODRIGUES, D. G.; COUTO, R. D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A. C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chem. Pharmacol* v.49, n.6, p. 487-98, 2002
- MARCHETTI P., URIEN S. CAPPELINI G. A., RONZINO G., FICORELLA C. Weekly administration of paclitaxel: theoretical and clinical basis. *Crit. Ver. Oncol. Hematol.* v.44S, p.3-13, 2002
- MASQUELIER M., VITOLS S., PETERSON C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo fate of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Research*, v. 46, n.8, p.3842-3847, 1986.
- MASQUELIER M., VITOLS S., PALSSON M., MARS U. LARSON B.S., PETERSON C.O. Low Density lipoprotein as a carrier of cytostatics in cancer chemotherapy: study fo stability of drug-carrier complexes in blood. *J. Drug Target*, v.8, n.3, p.155-164, 2000.

- MASQUELIER M., TIRZITIS G., PETERSON C.O., PALSSON M., AMOLINS A., PLOTINIEC M., PLOTNIECE A., MAKAROVA N., VITOLS S.G. Plasma stability na cytotoxicity of lipophilic daunorubicin derivates incorporated into low density lipoproteins. *Eur. J. Med. Chem.* v.35, n.4, p.429-38, 2000.
- MATHEW A.E. MEJILANO M.R., NATH J.P., HIMES R.H., STELLA V.J. Synthesis and Evaluation of Some Water-Soluble Prodrugs and Derivates of Taxol with Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* v.35, p.145-151, 1992.
- MELLADO W., MAGRI N.F., KINGSTON D.G.I., GARCIA-ARENAS R., ORR G., HORWITZ S.B. Preparation and biological activity of taxol acetates. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* v.124, n.2, p.329-336, 1984.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MU L. & FENG S.S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Control Release*, v.86, n.1, p.33-48, 2003
- NIENDORF A., NAGETE H., GERDING D., MEYER-PANNWN O., GEBBARDI A., Increased LDL receptor mRNA expression in colon cancer is correlated with a rise in plasma cholesterol levels after curative surgery. *Int. J. Cancer*, vol.61, p.461-464, 1995.
- NYDEGGER U.E. BUTLER. Serum lipoprotein levels in patients with cancer. *Cancer Res.* v.32, n.8., p.1756-1760, 1972

- NYGREN P, CSOKA K, JONSSON B, FRIDBORG H, BERGH J, HAGBERG H, GLIMELIUS B, BRODIN O, THOLANDER B, KREUGER A, ET AL. The cytotoxic activity of Taxol in primary cultures of tumour cells from patients is partly mediated by Cremophor EL. *Br. J. Cancer.* v.71, n.3, p. 478-481, 1995.
- OPHIR, R., MOALEM, G. PECHT, M., SHASHOUA M., RASHID, G. BEM-EFRAIM, S., TRAININ, N., BURSTEIN, Y., KEISARI Y., THF-2 mediated reduction of pulmonary metastases and augmentation of immunocompetence in C57BL/6 mice bearing B16-melanoma. *J. Immunother.*, v.22, p. 103-113, 1999.
- OWENS M. D., BAILLIE G. HALBERT G.W., Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int. J. Pharm.* v. 228, p.109-117, 2001
- PEKKANEN J., NISSINEN A., VARTANEN B., SALONEN J.L, PUNSAR S., KARNOVEN M.J., Changes in serum cholesterol levels and mortality, a 30-follow-up, the finnish cohorts of the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* v.139, p. 155-165, 1999
- PLOWMAN J., DYKES D.J., HOLLINGSHEAD M., SIMPSON-HERREN, ALLEY M.C. Human tumor xenograft models in NCI development, in *Anticancer Drug Development :Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval* (B.A. Teicher ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, p.101-125, 1997
- PONTY E., FAVRE G., BENANIBA R., BONEU <sup>a</sup>, LUCOT H., CARTON M., SOULA G. Biodistribution study of <sup>99m</sup>Tc-labeled LDL in B16-melanoma-bearing mice. Visualization of a preferential uptake by the tumor. *Int. J. Cancer.* v.54, p.411-417, 1993

- REINECKE, P., CORVIN J., GABBERT H.,E., GERHAZ C.,D. Antiproliferative effects of Paclitaxel (Taxol) on human renal clear cell carcinomas *in vitro*. *Eur. J. Cancer*. v.33, n.7, p.1122-1129, 1997
- RENSSEN P. C., SCHIFFELERS R.M., VERSLUIS A.J., BIJSTRBOSCH M.K., VAN KUIJK-MEUWISSEN M. E., VAN BERKEL T.J. Human recombinant apolipoprotein E-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol Pharmacol*. v.52, n.3, p.445-455, 1997.
- ROWINSKY E.K., CAZENAVE L.A. AND DONEHOWER R.C.. Taxol - a novel investigational antimicrotubule agent. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.82, p.1247-1259, 1990.
- RUDLING M.J., COLLINS V.P., PETERSON C.O . Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells *in vitro* by the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res.*, v.43, p.4600-4605, 1983.
- RUDLING M.J., STAHL L, PETERSON C.O., SKOGG L. Content of low density lipoprotein receptors in breast cancer tissue related to survival of patients. *Br. Med. J.*, v.292, p. 580-582, 1986.
- SAMADI-BABOLI, M.; FAVRE, G.; CANAL, P.; SOULA, G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. *Br. J. Cancer* v. 68, p. 319-326, 1993.
- SCHIFF PB, HORWITZ SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.77, n.3, p.1561-1565, 1980.

- SETIAWAN Y., MOORE D. ALLEN B.J., Selective uptake of boronated low-density lipoprotein in melanoma xenografts achieved by diet supplementatio. *Br. J. Cancer.* v.74, p.1705-1708, 1996
- SHARMA A., MAYHEW E., STRAUNBINGER R.M.. Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm. Res.* v.1, p.889-896, 1994.
- SHARMA A., CONWAY W.D. AND STRAUNBINGER R.M.. Reverse-phase-high-performance liquid chromatographic determination of tail in mouse plasma. *J. Chrom.*, v.655, p.315-319, 1994.
- SHARMA U.S., BALASUBRAMANIAN S.V., STRAUBINGER R.M. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complex with cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* v.84, p.1223-1230, 1995.
- SHARMA D., CHELVI .T.P. KAUR J. RALHAN R., Thermosensitive liposomal taxol formulation: heat-mediated targeted drug delivery in murine melanoma. *Mel. Res.* v. 8, p. 240-244, 1998
- SMIDT P.C. van BERKEL T.J., Characteristics of association of oleoyl derivatives of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate with low-density lipoproteins (LDL). *Pharm Res.* v.9, n.4, p.565-569,1992.
- SOUZA, L., MARANHÃO, R.C., SHREIRER, S., CAMPA, A. In vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with triglyceride-rich emulsion. *J. Antimicrob. Chemother.* v.32, p.123-132, 1993
- SPARREBOOM, A., VERWEIJ J., BURG, M.E.L., LOOS, W.J. BROUWER, E., VIGANO, L., LOCATELLI A., VOS A., NOOTER, K., STOTER, G., GIANNI L. Disposition of Cremophor EL In human limits the potential for modulation of the multidrug resistance phenotype *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* v.4, p. 1937-42, 1998

- TATIDIS L., MASQUELIER M., VITOLS S. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Bioch. Pharm.* v. 63, n.12, p.2169-80, 2002.
- TARR, B.D., SAMBANDAN, T.G., YALKOWSKY, S.H.. A new parenteral emulsion for the administration of Taxol. *Pharm. Res.*, v.4, p. 162-165, 1987
- THOMAS H., ROSENBERG P. Role of weekly paclitaxel in the treatment of advanced ovarian cancer. *Crit. Ver. Oncol. Hematol.* S43, p.43-51, 2002.
- TRISSEL L.A , Pharmaceutical Properties of Paclitaxel and their effects on preparation and administration. *Pharmacotherapy* v.17, n.5S, p. 133S-139S, 1997.
- TRISSEL L. A., XU Q. MARTINEZ J.F. Compounding and extended-stability admixture of Paclitaxel for long-term infusion. *International Journ. Pharm. Compoundig.* v.1, p.49-53, 1997
- TOKUI T. TAKATORI T., SHINOZAKI N., ISHIGAMI M., SHIRAISHI A. IKEDA T., TSURUO T., Delivery and cytotoxicity of RS-1541 in St-4 human gastric cancer cells in vitro by the low-density-lipoprotein pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* v. 36, n.1, p.1-6, 1995.
- UEYAMA Y., MATSUZAWA U., YAMASHITA S., FUNASHASHI T. SAKAI N., NAKAMURA T. KUBO M. TARUI S. Hypocholesterolemic factor from gallbladder cancer cells. *Lancet*, v. 336, p.707-709, 1990.
- VALDULGA C.J., FERNANDES D.C., PRETE A N., AZEVEDO C.H.M., RODRIGUES D.G. , MARANHÃO R.C. Use of a Cholesterol-Rich

Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposide. *J. Pharm. Pharmac.* v.55, p.1615-1622, 2003.

VERSLUIS, A. J.; GEEL, VAN P. J.; OPPELAAR, H.; BERKEL, VAN T. J. C.; BIJTERBOSCH, M. K.; Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells *in vitro* and *in vivo* in mice. *Br. J. Cancer*, v. 74, p. 525-532, 1996.

VERLUIJS A.J., RENSEN P.C., RUMP E.T., VAN BERKEL T.J., BIJSTERBOSCH M.K., Low density lipoprotein receptor-mediated delivery of a lipophilic daunorubicin derivative to B16 tumours in mice using apolipoprotein E-enriched liposomes. *Br. J. Cancer*. v. 78, n.12, p.1607-1614, 1998.

VITOLS, S.; SODERBERG- REID, K.; MASQUELIER M.; SJOSTROM B.; PETERSON C., Low density lipoprotein for delivery of a water-insoluble alkylating agent to malignant cells. *In vitro* and *in vivo* studies of a drug-lipoprotein complex. *Br. J. Cancer*, v. 62, n.5, p. 724-9, 1990.

WANG T., WANG H., SOONG Y., Paclitaxel-Induced cell death. *Cancer*. v.88, n.11, p.2619-2628, 2000.

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

WEISS R.B., DONEHOWER R.C., WIERNIK P.H., OHNUMA T., GRALLA R.J., TRUMP D.L., BAKER J.R., VANECHO D.A., VONHOFF D.D. AND



LEYLAND-JONES B.. Hypersensitivity reactions from taxol. *J. Clin.Oncol.*, v.8, p.1263-1268, 1990.

ZHANG X., BURT H.M., MANGOLD G., DEXTER D., VON HOLF D., MAYER L., HUNTER W.L.. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti-cancer Drugs*. v.8, p.696-701, 1997.

XIAO W., WANG L., RYAN J.M., PATER A., LIU H., Incorporation of na (125)I-labeled hexa-iodinated diglyceride analog into low-density lipoprotein and high specific uptake by cells of cervical carcinoma cell lines. *J. Drug Target*. v.152, n.3, p. 250-256, 1999.