



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA**  
**CELULAR**

**DANIELLE CRISTINNE AZEVEDO FEIO**

**AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM**  
**A RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A**  
**TERAPÊUTICA DO CÂNCER**

**BELÉM-PA**

**2014**

DANIELLE CRISTINNE AZEVEDO FEIO

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A  
RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA  
DO CÂNCER

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutorado em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Patrícia Danielle Lima de Lima

BELÉM-PA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A  
RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO  
CÂNCER

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador:

---

Profª. Dra. Patrícia Danielle Lima de Lima  
Departamento de Biologia, UEPA.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

---

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

---

Prof. Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas  
Departamento de Biologia, UEPA.

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.  
Lembrai-vos de que as grandes proezas da história  
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho

À Deus por me abençoar a cada dia.

A minha orientadora Prof<sup>ta</sup>. Patrícia, pelos ensinamentos, dedicação, carinho e amizade.

Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional.

E ao Paulo meu amor, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES**

- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica, Instituto de Ciências Biológicas.
- Centro Nacional de Primatas (CENP) - Ministério da Saúde.
- Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Instituto do Coração (INCOR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP.

### **FONTES FINANCIADORAS**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – bolsa de doutorado.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Lima, meus sinceros agradecimentos pela orientação, ensinamentos, suporte, paciência e amizade nesses anos de trabalho.

Ao professor Dr. Rommel Burbano, pela oportunidade e acolhida no seu grupo de pesquisa e na permissão para a utilização das instalações do Laboratório de Citogenética Humana, obrigado “tio” por tudo.

Ao professor Dr. Raul Maranhão pela oportunidade de desenvolvimento do projeto que culminou nesta tese de doutorado, assim como, pelo acolhimento e permissão da utilização das instalações do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Instituto do Coração (INCOR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP.

Ao Prof. Dr. Lacy Brito pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

A Dr. Ana Paula Negreiros, pela ajuda nas análises das lâminas e disponibilidade para a realização deste estudo.

A equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, que receberam essa paraense de abraços abertos e ajudaram em tudo durante minha estadia em São Paulo, especialmente as doutoras Priscila, Elaine, Deborah e Aleksandra que mesmo sem me conhecer já ajudava esclarecendo minhas dúvidas via e-mail e celular.

Ao Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, a todos os seus professores e funcionários. E principalmente a Universidade Federal do Pará, a qual de realizar a graduação, mestrado e doutorado.

A CAPES por concessão de uma bolsa de estudos.

Ao médico veterinário do CENP José Augusto Muniz, pesquisador responsável pela minha permanência na instituição durante todo período experimental. Obrigado pela recepção cordial e colaboração em nosso trabalho.

Aos médicos veterinários Aline Imbeloni e Wellington Bandeira, que contribuíram de maneira direta no cuidado com os animais e no Laboratório de análises clínicas do CENP.

A aluna iniciação científica Nayara Oliveira, obrigada pela disponibilidade e desejo em ajudar.

A todos os funcionários do CENP, especialmente os responsáveis pelo galpão experimental I, Obádias possuía um cuidado todo especial com os animais, assim como os funcionários do complexo clínico-cirúrgico, Carla, Seu Miguel, Patrícia e Dona Rosa que muitas vezes preocupou-se com o fato de ser três da tarde e não ter almoçado, sempre fazendo o mingau salvador.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do CENP, Seu Osvaldo pela confecção maravilhosa das lâminas histopatológicas, Seu Alfredo e Seu Geraldo, obrigado pela força e pela inestimável colaboração.

Aos amigos da minha turma de biomedicina que estão sempre presentes na minha vida.

A Leilane que muitas vezes disponibilizou seu tempo para ajudar no experimento, apenas por amizade, a Laine que também foi de grande ajuda nos idas chaves do experimento.

Ao Paulinho meu amor, pelo carinho e dedicação. E principalmente por estar sempre presente com seu companheirismo, compreensão e muita paciência.

A minha família, papai (Gilberto), mamãe (Núlcia), irmãos (Thais, Arison, Dannilo, Rodrigo e Fábio) e Kátia, por todo o amor e o apoio incondicional em todos os momentos de minha formação, seja acadêmica ou familiar.

Assim como aos meus tios, avós e primos que contribuíram para a minha formação familiar.

Finalmente, agradeço em especial aos animais utilizados neste experimento. Almejamos que os resultados obtidos justifiquem sua utilização.

## SUMÁRIO

<b>INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER .....	2
1.2 TERAPIA MEDICAMENTOSA CÂNCER .....	3
1.3 NANOTECNOLOGIA.....	6
1.4 PACLIATAXEL .....	9
1.5 NANOEMULSÕES E QUIMIOTERAPICOS.....	11
1.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS .....	15
1.7 PRIMATAS NÃO HUMANOS .....	17
1.8 PADRÃO DE NORMALIDADE HEMATOLÓGICA EM <i>Cebus apella</i> E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO FRENTE A DROGAS .....	18
1.9 JUSTIFICATIVA.....	20
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS .....	24
3.2 AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS .....	26
3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS .....	27
3.4 ANESTESIA E EUTANÁSIA .....	27
3.5 COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE .....	27
3.6 PREPARAÇÕES E DERIVATIZAÇÃO DAS NANOEMULSÃO .....	28
3.7 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA PLASMÁTICA DA LDE.....	29
3.8 ANÁLISE COMPARTIMENTAL DOS DADOS CINÉTICOS .....	30
3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO TECIDUAL DO <sup>3</sup> H-COLESTEROL ÉSTER DA LDE .....	30
3.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO .....	31
3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO.....	32

3.12 ANÁLISE DA ANATOMIA PATOLÓGICA E MORFOLOGICA .....	32
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS.....	34
4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS .....	35
4.3 ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA NANOEMULSÃO LDE EM <i>Cebus apella</i> .....	37
4.4 ANÁLISE DA CINÉTICA DA NANOEMULSÃO LDE MARCADA COM [3H]- COLESTEROL ÉSTER EM <i>Cebus apella</i> .....	38
4.5 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO .....	39
4.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO.....	42
4.6 ANÁLISE DA ANATOMIA PATOLÓGICA E MORFOLOGICA.....	45
5. DISCUSSÃO .....	50
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS .....	50
5.2 BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL E CINÉTICA PLASMÁTICA DA NANOEMULSÃO LDE.....	51
5.3 PADRÕES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS .....	53
5.4 PADRÕES DE ANATOMIA PATOLÓGICA.....	57
6. CONCLUSÃO .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>74</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<sup>3</sup> H	Trício
Apo B	ApolipoproteínaB-100
Apo E	Apolipoproteína E
CDKI	Inibidor da Cinase Dependente de Ciclina
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
CENP	Centro Nacional de Primatas
CEPAE	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CN	Animais que receberam solução salina - Controle Negativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CP1	Animais que receberam Paclitaxel comercial na dose de 175 mg/m <sup>2</sup>
CP2	Animais que receberam Paclitaxel comercial na dose de 250 mg/m <sup>2</sup>
CPB	Grupo Cinética Plasmática e Biodistribuição
DDS	Drug delivery system
dH	Escala decimal de Hering
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EXP.1	Animais que receberam LDE-Oleato de Pacliixel na dose de 175 mg/m <sup>2</sup>
EXP.2	Animais que receberam LDE-Oleato de Pacliixel na dose de 250 mg/m <sup>2</sup>
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GGT	Gama-glutamyltransferase
h	Horas
H/E	hematoxilina e eosina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL-C	High-density lipoproteincholesterol
Iarc	International Agency for Research on Cancer
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto nacional do Câncer
INCOR	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LDE	Nanoemulsão artificial rica em colesterol
LDE-PTX	LDE-oleato de Paclitaxel
LDH	Lactatodesidrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
Máx.	Máximo
MDR	Resistência múltiplos fármacos
Mín.	Mínimo
MPV	Volume Plaquetário Médio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
rpm	Rotações por minuto
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SUS	Sistema Único de Saúde
TGO	Aspartatoaminotransferase
TGP	Alanina aminotransferase
UFPA	Universidade Federal do Pará
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do Paclitaxel .....	9
Figura 2–Mecanismo de ação do paclitaxel. (A) Ligação de fármacos antimitóticos em diferentes locais dos microtúbulos. (B) Representação estrutural da $\alpha$ -tubulina (verde) e $\beta$ -tubulina (azul) ligada ao paclitaxel (vermelho).....	10
Figura 3 – Estrutura das partículas da LDL e LDE (tamanho entre 25 e 50 nanômetros). Na figura A é demonstrado a estrutura da partícula de LDL com a presença da Apolipoproteína B100. Figura B estrutura da LDE sem a presença de Apolipoproteína.....	12
Figura 4 -(A) Recintos de alvenaria revestidos de azulejo e tela metálica, utilizados para alojar os animais, onde se evidencia as gaiolas individuais, (B)Visão externa do galpão experimentaldo CENP.....	25
Figura 5 – Procedimento de coleta sanguínea por venopunção da veia femoral esquerda .....	28
Figura 6 – Lesões descamativas inflamatórias observadas nas regiões da mão e no pé, respectivamente, em animais do grupo controle positivo 1 e 2.....	33
Figura 7 – Característica do pêlo de dois diferentes animais ao final do período experimental. (A) e (B) – Animal pertencente ao grupo experimental 2. (C) e (D) – Animal pertencente ao grupo controle positivo 2.....	34
Figura 8 – Biodistribuição tecidual da LDE em <i>Cebus apella</i> , através da captação tecidual de [3H]-colesterol éter injetado pela via endovenosa após 24 horas.....	30
Figura 9 – Curva de decaimento cinética do [3H]-colesterol livre plasmáticos de LDE em <i>Cebus apella</i> . .....	32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores normais dos constituintes hematológicos de <i>Cebus apella</i> em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.....	18
Tabela 2 - Valores normais de marcadores bioquímicos de <i>Cebus apella</i> em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos .....	20
Tabela 3 - Divisão dos diferentes grupos controle e experimentais de acordo com o tratamento.....	26
Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimentais .....	35
Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos .....	41
Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos .....	44
Tabela 7 – Análise histopatológicas dos órgãos e tecidos do sistema digestório, sistema respiratório, sistema tegumentar e sistema nervoso.....	47
Tabela 8 – Análise histopatológicas dos órgãos e tecidos do sistema hepato-biliar, sistema excretor, reprodutor e sistema linfático .....	48

## RESUMO

Sistema de nanopartículas à base de lipídios têm sido usados como veículos experimentais para agentes quimioterápicos no tratamento do câncer. Recentemente essas preparações de nanopartículas foram testadas também em modelos animais de doenças inflamatórias cardiovasculares crônicas, doenças reumáticas entre outras. Acredita-se que esses sistemas supostamente atenuem os graves efeitos tóxicos de agentes quimioterápicos antineoplásicos. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da associação do paclitaxel a um sistema de nanopartículas à base de lipídios no tratamento crônico em primatas não-humanos, da espécie *Cebus apella*, por meio de extensas documentações e métodos detalhados da análise toxicológica através de bioquímica sérica, parâmetros hematológicos e histopatológicos. As nanopartículas a base de lipídios (LDE) eram constituída por ésteres de colesterol esterificado e colesterol, lectina e treolin, com adição de paclitaxel. Foram estudados dezoito *Cebus apella*; sendo que três animais foram tratados apenas com solução salina, administrada por via intravenosa, a cada três semanas, durante seis ciclos de tratamento; seis animais foram tratados com o paclitaxel associado a LDE no mesmo regime de administração, com três animais recebendo a dose mais baixa do fármaco ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) e três com a dose mais elevada ( $250 \text{ mg/m}^2$ ); seis animais foram tratados com o paclitaxel na forma comercial, sendo que três receberam as doses mais baixas ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) e outros três com doses mais elevadas ( $250 \text{ mg/m}^2$ ). Três semanas após o último ciclo de tratamento foram submetidos a eutanásia por dosagem letal de anestésico, e os fragmentos de tecidos foram recolhidos para a análise histopatológica. Em três animais não-tratados, a cinética plasmática da LDE foi determinada após a injeção intravenosa do colesterol radioativo ( $^3\text{H}$ ), seguido de coleta de sangue ao longo de 24 horas. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE/BIO008-11). No grupo LDE-paclitaxel, nenhuma toxicidade clínica foi observada, o peso, assim como o consumo de alimentos foram semelhantes aos animais pertencentes ao grupo controle. O tratamento foi interrompido após o segundo ciclo em quatro animais de grupo que recebeu o paclitaxel na forma comercial, devido a elevada toxicidade clínica, entretanto dois animais completaram os 6 ciclos de tratamento. Esses dois animais apresentaram perda de peso, náuseas e vômitos, diarreia, lesão inflamatória descamativa, perda de 70% do pelo corpóreo e diminuição da atividade física. A dose de paclitaxel  $175 \text{ mg/m}^2$  é usado em quimioterapia contra o câncer com uma toxicidade considerável, enquanto que a dose a  $250 \text{ mg/m}^2$  é intolerável e mostra toxicidade considerável nos pacientes. O uso de LDE como transportador de fármaco, em ambos as doses neutralizou consideravelmente a toxicidade do fármaco em primatas não humanos da espécie *Cebus apella*, intimamente relacionadas a sujeitos humanos. Isso foi observado não só devido as manifestações clínicas, bioquímicas e hematológicas, mas também pela análise histopatológica do estômago, intestino delgado e grosso, esôfago, pâncreas, traqueia e da vesícula biliar. Os resultados suportam a hipótese de que os sistemas de nanopartículas à base de lipídios utilizado como transportadores de droga pode oferecer ferramentas valiosas na diminuição da toxicidade e aumentar a segurança dos agentes quimioterápicos, assim como, amplia a sua utilização em outras doenças crônicas que não o câncer.

**Palavras-chaves:** Nanopartículas. LDE. Paclitaxel. Toxicidade. *Cebus apella*.

## ABSTRACT

Lipid-based nanoparticle systems have been used as vehicles for chemotherapeutic agents in experimental cancer treatments. More recently, those preparations have also been assayed in animal models of cardiovascular, rheumatic and other chronic inflammatory diseases. In general those systems reportedly attenuate the severe toxicities of chemotherapeutic agents. This study was aimed to investigate the effects of associating paclitaxel to a lipid-based nanoparticle system upon the organism of a non-human primate, *Cebus apella*, by extensively documenting the toxicity by serum biochemistry, hematological and detailed histopathological methods. The lipid nanoparticles (LDE) were constituted of cholesterol esters and esterified cholesterol, lecithin and triolin, with addition of paclitaxel. Eighteen *Cebus apella* were studied; three animals were treated with LDE only, without paclitaxel, as ministered intravenously every three weeks, during six treatment cycles; six animals were treated with paclitaxel associated to LDE at the same administration scheme, three with the lower ( $175\text{mg}/\text{m}^2$ ) and three with higher ( $250\text{mg}/\text{m}^2$ ) paclitaxel doses; six animals were treated with commercial paclitaxel, three with the lower and three with the higher doses levels. Three weeks after the treatment cycle the animals were euthanized by lethal anesthetic dose, and tissues fragments were collected for histopathological analysis. In three non-treated animals, the plasma kinetics of LDE's labeled with radioactive cholesterol was determined after intravenous injection and blood sampling over 24 hours. The ethics committee in research with experimental animals UFPA (BIO008-11) approved the project. In the LDE-paclitaxel group, no clinical toxicity appeared, and the weight food consumption curve were similar to controls. Treatment was interrupted after the second cycle in four animals of commercial paclitaxel group for very high clinical toxicity but the remaining two complete the 6-cycle-treatment. Those two animals presented weight loss, nausea and vomiting, diarrhea, escame decamation, 70% fur loss and loss of physical activity. The  $175\text{mg}/\text{m}^2$  paclitaxel dose is used in cancer chemoterapie with considerable toxicity, while the  $250\text{ mg}/\text{m}^2$  dose shows intorable toxicity to the patients. The use of LDE as carrier in both those levels was almost complete neutralized the toxicity of the drug in this species more closed related to human subjects. This was observed not only by clinical, biochemical and hematological profiles but also by the histopathological analysis of stomach, small and large intestine, esophagus, pancreas, trachea and gallbladder. The current results support the assumption that lipid-based nanoparticles systems used was drug carriers can offer valuable tools decrease the toxicity and increase the safety of the chemotherapeutic agents, while extending the use to chronic diseases other than cancer.

**Keywords:** Nanoparticles. LDE. Pacliatxel. Toxicity. *Cebus apella*.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças crônicas, o câncer configura-se como um problema de saúde pública e pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. É considerado, desde 2003, importante causa de morte no Brasil. A estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, aponta a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

No estado do Pará estima-se para todos os tipos de neoplasias malignas no ano de 2014 a incidência em homens será de 103,19 novos casos por 100 mil habitantes e nas mulheres esses valores comparativamente são ainda maiores com uma estimativa de 115,37 novos casos por 100 mil habitantes, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2014).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan (2012), da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A expectativa é de que o número de casos de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas (FERLAY et al, 2013).

É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujos controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas – cultural, social e economicamente – até às mais desiguais. As abordagens orientadas para enfrentar esse problema de saúde são, necessariamente, múltiplas, incluindo: ações de educação para saúde em todos os níveis da sociedade; prevenção orientada para indivíduos e grupos; geração de opinião pública; apoio e estímulo à formulação de legislação específica para o enfrentamento de fatores de risco

relacionados à doença; e fortalecimento de ações relacionadas a produção e desenvolvimento de novos medicamentos.

## 1.1 CÂNCER

O câncer é frequentemente considerado uma doença do ciclo celular, pois a sua desregulação é uma das alterações mais frequentes, ocorrendo principalmente ativação dos proto-oncogenes e inativação dos supressores tumorais do ciclo celular, levando a proliferação celular descontrolada. (PARK & LEE, 2002).

Com o objetivo de evitar acúmulos de defeitos genéticos, controles moleculares são responsáveis pela decisão de proceder ou adiar a divisão celular. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são as principais proteínas reguladoras da transição das fases do ciclo celular, sendo compostas por uma família de proteína cinase serina/treonina que são ativadas ou inativadas em pontos específicos por eventos de fosforilação. Os níveis de proteínas CDKs permanecem estáveis durante o ciclo celular, já suas proteínas de ativação, as ciclinas podem estar fosforiladas ou desfosforiladas, desta forma ativando as CDKs. As CDKs têm ainda, sua atividade negativamente regulada por inibidores denominados de CDKI (inibidor da cinase dependente de ciclina) (VERMEULEN et al, 2003; VIALARD et al, 2001). Outro controle molecular presente no ciclo celular são pontos de restrição ou de checagem, onde as decisões sobre a interrupção ou progressão das fases do ciclo são tomadas envolvendo um mecanismo de vigilância que verifica se os requisitos para a progressão da próxima fase do ciclo celular estão satisfatórios, caso contrário, mecanismos de inativação de CDKs são acionados para deter o processo proliferativo (FRIEDMAN et al., 2010). Assim, os pontos de restrição e as ciclinas monitoram a atividade molecular entre cada estágio do ciclo celular prosseguindo ou adiando a progressão caso aberrações genéticas ocorram (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

A diferença entre a divisão de células normais e tumorais está no fato das células normais se dividirem para suprir a necessidade do organismo, havendo um equilíbrio entre as células que nascem e morrem, enquanto as células tumorais têm um crescimento acelerado no início, seguido por uma fase, em que aglomeração celular passa a sofrer com a falta de nutrientes e de espaço. Nessa fase as células passam a

produzir o fator de angiogênese tumoral, possibilitando a produção de novos vasos sanguíneos e assim as células terão novamente o suprimento para continuar o crescimento acelerado. Este padrão de crescimento obedece a curva de crescimento Gompertziano, caracterizada pelo crescimento acelerado do volume tumoral em um curto período de tempo (BONASSA, 2012).

Tumores malignos são estruturas “*core-shell*” (núcleo/casca), pois apresentam o núcleo hipóxico rodeado por tecidos e células proliferativas. O microambiente do tumor é feito de tecidos complexos contendo matriz extracelular, fibroblastos ativados, células do sistema imunológico, pericitos, adipócitos, células epiteliais, células vasculares endoteliais linfáticas e numerosas proteínas, por exemplo (VAN KEMPEN et al. 2003; WEBER & KUO, 2012). As células de proliferação são muito vascularizadas, desorganizadas e descontínuas resultando em maior permeabilidade e retenção, efeito amplamente explorado para o direcionamento passivo de fármacos. Os principais fatores que contribuem para a progressão dos tumores em metástases são: resistência às drogas, mau prognóstico e resposta ineficaz aos tratamentos, incluindo as altas taxas de mobilidade celular, potencial de sobrevivência, a capacidade de degradar matriz extracelular do tecido, e a capacidade de se ajustar no ambiente o tecido novo (OTRANTO et al., 2012; KAPSE-MISTRY et al., 2014).

Os conhecimentos acumulados ao longo dos últimos 50 anos sobre o câncer agregaram importantes informações para compreender esse mal, que afeta indivíduos de ambos os sexos e em todas as faixas etárias. Descobertas relevantes acerca da genética, biologia molecular, vascularização, proliferação, invasão, respostas adaptativas do hospedeiro, diagnóstico e tratamento são alguns exemplos desse progresso, como citado anteriormente, que, muito embora tenham gerado enorme gama de estratégias capazes de reduzir os efeitos devastadores que um tumor possui sobre o organismo da pessoa afetada, ainda se mostram insuficientes para propiciar a cura em significativa parcela dos pacientes (HAJDU & VADMAL, 2013).

## 1.2 TERAPIA MEDICAMENTOSA DO CÂNCER

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Na terapia contra alguns tipos de câncer o principal é único método de

tratamento atualmente é a medicamentosa (quimioterapia anti-neoplásica), entretanto em muitos casos pode ser utilizado conjuntamente com a cirurgia e/ou radioterapia, para atingir e manter a remissão. A escolha do tratamento depende do tipo de tumor e do seu estágio de desenvolvimento. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar as células cancerosas, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento. Um dos problemas com os agentes anticâncer é a sua toxicidade e janela terapêutica estreita. Outra é a resposta muito pobre de alguns tipos de câncer, por exemplo, o câncer renal (WEINBERG, 2007).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Apesar de geralmente o corpo do indivíduo tratado recuperar-se destes inconvenientes após o tratamento, o uso clínico desses fármacos exige que seus benefícios sejam confrontados com sua toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável. Assim, é desejável na quimioterapia usar doses mais altas, capazes de atingir o maior nível de morte celular possível (ALMEIDA et al, 2005).

A quimioterapia convencional utiliza-se de fármacos que têm como alvo diversos processos fisiológicos das células, sendo estes geralmente relacionados às células que proliferam mais rapidamente, ou seja, aquelas que têm elevada taxa de mitose, uma característica presente na grande maioria dos diferentes tipos de neoplasias. Para seus efeitos ocorrerem, estes medicamentos precisam atingir seus alvos biológicos em quantidades suficientes, quer seja diretamente o DNA, a maquinaria de replicação desta molécula, os microtúbulos ou qualquer outro alvo relacionado à proliferação celular (FUKUMASU et al., 2008).

O tratamento do câncer através da quimioterapia inclui os chamados "regime de indução" e "regime de manutenção", que refere-se ao tratamento inicial da doença como objetivo de diminuir e impedir o crescimento do tumor através principalmente da indução da morte das células neoplásicas e a quimioterapia para reduzir as chances de recorrência do câncer ou de sobrevida de células neoplásicas ainda existentes, respectivamente. A quimioterapia de combinação utiliza o efeito sinérgico de múltiplos fármacos antineoplásicos que atuam através de diferentes mecanismos, mas devido aos

seus efeitos adversos limitam as doses dadas em conjunto nos regimes de quimioterapia (KAPSE-MISTRY et al, 2014).

O regime de quimioterapia precisa equilibrar eficácia e toxicidade através de esquema de administração adequada. Regimes com doses elevadas tem efeitos mais tóxicos do que o regime padrão, com algumas melhorias de sobrevivência, entretanto podem causar atrasos no tratamento devido a toxicidade e muitas vezes interrupção precoce do tratamento. A abordagem da dose elevada é mais eficaz do que a abordagem padrão, uma vez que dificulta a formação de vasos sanguíneos que alimentam os tumores, com conseqüente redução do tumor após o tratamento, promovendo a “dormência” do mesmo, mantendo seu tamanho e impedindo seu crescimento (KAPSE-MISTRY et al, 2014).

Um regime de poli quimioterapia é baseado no fato de que as mutações que conferem resistência as drogas, não necessariamente irão conferir resistência a todos os agentes do esquema terapêutico e doses elevadas de regimes de quimioterapia podem ser administrada a doentes com câncer. Esta abordagem assume que, apesar da resistência padrão das doses de fármacos anticancerígenos, existe uma relação dose-resposta para os tumores e doses elevadas de quimioterapia podem ultrapassar a resistência (KAPSE-MISTRY et al, 2014).

Pode-se comparar o caminho a ser percorrido pelo medicamento, desde sua administração até sua chegada ao sítio neoplásico, com um labirinto, onde diversos desvios e caminhos sem saída existem e podem atrapalhar seu efeito esperado. Dentre estes “desvios”, citam-se os relacionados à farmacocinética, que são a ativação dos sistemas de biotransformação e a maior conjugação para excreção dos fármacos, e os desvios relacionados a possíveis alterações encontradas nas células neoplásicas, que são a diminuição do influxo do fármaco para dentro da célula; o aumento da expulsão do fármaco de dentro da célula; o bloqueio de apoptose induzida pelos fármacos e o aumento do reparo aos danos no DNA (LONGLY & JOHNSTON, 2005).

A resistência aos quimioterápicos é relacionada à heterogeneidade celular inerente dos tumores malignos e a alta capacidade das células neoplásicas de sofrerem mutação. Embora muitos tipos de câncer sejam inicialmente suscetíveis à quimioterapia, ao longo do tempo eles podem desenvolver resistência através de mecanismos como: mutações no DNA, alteração do alvo da droga, alteração do efluxo de drogas, as alterações metabólicas que promovem a inibição da droga e degradação com a conseqüente inibição da morte celular (HOUSMAN et al, 2014).

### 1.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma ciência relativamente nova (FEYNMAN, 1992), cujas aplicações rapidamente se expandiram para as áreas da saúde, em especial na oncologia, pelo fato das nanopartículas empregadas no combate ao câncer possuírem propriedades únicas, que conferem significativas vantagens sobre os métodos clássicos de tratamento, empregando a combinação de drogas administradas pela corrente sanguínea. Entre suas vantagens associadas ao tratamento neoplásico estão incluídos: (1) facilitação como veículos para drogas citotóxicas, (2) elevação da meia-vida dos agentes terapêuticos, (3) redução da toxicidade do tratamento, (4) aumento na eficiência e melhor resposta clínica (LEARY SP, et al. 2005).

A nanotecnologia se aplica a criação e manipulação de estruturas a partir de átomos ou moléculas individuais, com dimensões entre 1 e 100 nanômetros, o termo “nano” se refere a “nanômetro” (nm), a subunidade do metro correspondente a  $1 \times 10^{-9}$  metros (um milionésimo de milímetro ou um bilionésimo de metro), isto é, a matéria em dimensões atômicas e moleculares. Para se ter um parâmetro de comparação, o átomo possui um tamanho médio de 0,1 nm ( $10^{-1}$ ), o *Mycoplasma* possui cerca de 200 nm (aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ ) de diâmetro, a distância entre dois átomos de carbono em uma molécula, é da ordem de 0,12-0,15 nm e a dupla hélice do DNA possui um diâmetro aproximado de 2 a 5 nm (ALLHOFF, et al. 2010).

Os avanços obtidos nesse campo inauguram uma nova era de assistência na saúde, por possibilitarem a formulação de terapias personalizadas, o que pressupõe uma eficácia superior aos métodos convencionais de tratamento, pois “trata enfermos individuais, ao invés de tratar enfermidades”; isso representa, sem sombra de dúvida, um grande progresso da medicina tradicional, que se fundamenta na observação e análise sintomatológica da expressão clínica de uma doença específica afetando toda uma população de pessoas distintas entre si, as quais apresentam respostas idiossincráticas frente a uma mesma doença (SAKAMOTO et al., 2010).

O uso de nanopartículas como agentes no combate ao câncer foi proposto há mais de 35 anos (MARTY et al., 1978), mas seu emprego em ensaios clínicos só se difundiu a partir dos anos 80. A nanotecnologia empregada na terapia contra o câncer inclui um arsenal de materiais em dimensão nano, variando desde um nano a algumas centenas de nanômetros em pelo menos, uma dimensão. O resultado são nanopartículas

possuindo propriedades físicas e químicas únicas, baseadas nas modificações de sua forma e tamanho, sendo mais comumente desenhadas como veículos para carregar drogas ou agentes capazes de realçar imagens, a partir de conjugação química ou simplesmente por encapsulação.

Dentre os principais materiais usados no combate ao câncer, destacam-se os nanoveículos: como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas magnéticas, dendrímeros, lipossomas, micelas, etc. Nos últimos anos tem sido amplamente explorada para tratamento e diagnóstico por imagens do câncer. Estes nanoveículos são tidos também como vetores ideais para superar a resistência aos medicamentos e tornar os tratamentos mais efetivos, através do transportadores de drogas mediada principalmente por mecanismos de efluxo (AYERS & NASTI, 2012).

No caso dos materiais lipídicos, as principais formas empregadas tem sido os lipossomos, vesículas concêntricas bilamelares biodegradáveis, que possuem uma membrana fosfolipídica na sua porção mais externa, podendo ser utilizadas para transportar drogas hidrofílicas em seu interior ou drogas hidrofóbicas em sua camada fosfolipídica (FARAJI & WIPF, 2009). Esses compostos conseguem alcançar concentrações muito mais elevadas nos tecidos tumorais que em tecidos normais, reduzindo efeitos tóxicos e elevando a eficácia do tratamento. Essa eficácia está relacionada a alta necessidade de LDL, pelas células malignas, devido ao rápido crescimento e divisão celular. A primeira documentação do fato ocorreu em 1978, quando se observou que células de leucemia aguda captavam de 3-100 vezes mais LDL do que células normais (KRITCHEVSKY et al.,1991). Já alguns tumores sólidos, como câncer epidermóide cervical, captam 15 vezes mais LDL do que tecidos adrenais e 50 vezes mais do que o tecido ginecológico normal (FIRESTONE, 1994).

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez na década de 1960 (BANGHAM et al. 1965) e logo gerou consideráveis pesquisas como carreadores de drogas para formulações antimicrobianas e anticancerígenos. Os lipossomas consistem de nanopartículas que são de forma esférica, e composto por uma camada dupla de fosfolipídio que tem a capacidade de sintetizar e libertar moléculas hidrofílicas e lipofílicas. Uma vez que se assemelham a membranas celulares, eles não são imunogênicos (CATTEL et al. 2004). Uma das primeiras formulações antimicrobianas de lipossomas foi a anfotericina B. Os estudos clínicos demonstraram que a anfotericina B lipossomal tiveram uma eficácia semelhante, mas um melhor perfil de segurança em comparação com anfotericina B. convencional A incidência de efeitos adversos

relacionados com a perfusão bem como nefrotoxicidade foram significativamente menores no grupo de anfotericina lipossomal. A dosagem para a anfotericina B lipossomal variou de 3 a 6 mg/kg, em comparação com a anfotericina B convencional de  $0,6^{-1}$  mg/kg (WALSH et al., 1999; LEENDERS et al., 1997).

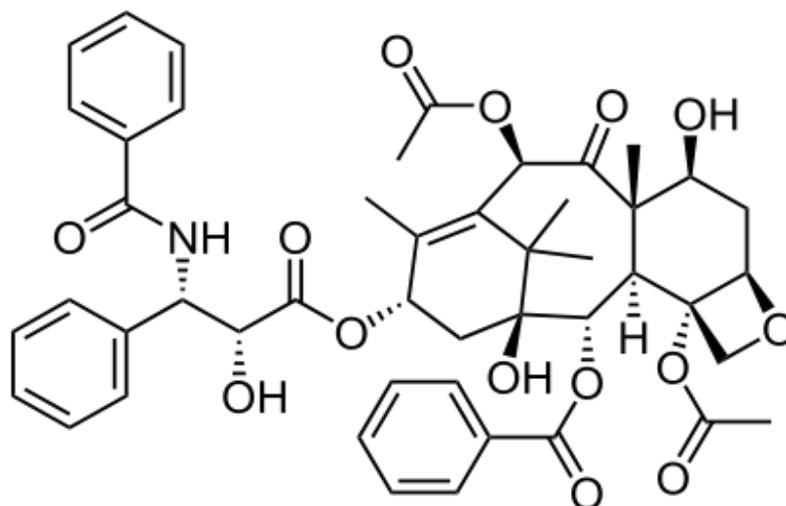
Tal natureza anfifílica e excelente biocompatibilidade dos materiais lipídicos fizeram dessas nanopartículas os primeiros carreadores de drogas citostáticas aprovados para emprego em terapia humana, pela agência americana reguladora de terapêuticas, a FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), que se trata da formação lipossomal contendo o agente terapêutico doxorubicina (Doxil®), utilizado no tratamento de AIDS (LO et al, 2009).

A forma lipossomal da doxorubicina teve eficácia semelhante, mas com aparente redução da toxicidade cardíaca associada com antraciclinas (O'BRIEN, 2004). Quando doxorubicina lipossomal foi comparada com a doxorubicina comercial no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda com cromossomo Filadélfia negativo (LLA-Ph-negativo), não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os dois tratamentos. Houve entretanto, a sugestão de uma maior probabilidade de falha de indução com doença refratária (17% contra 3%,  $p = 0,10$ ) e uma maior incidência de recaídas cumulativa (52% contra 32% aos 2 anos,  $p = 0,20$ ) no tratamento com a doxorubicina lipossomal. Mas o fato de maior destaque foi a toxicidade reduzida da doxorubicina lipossomal em comparação com o tratamento convencional. No entanto, a atividade antileucêmica inferior tem limitado o seu uso nesta doença (HUNAULT-BERGER et al., 2011). Esta falha de doxorubicina lipossomal é um lembrete para a importância dos testes farmacológicos de novas drogas associadas a nanotecnologia e principalmente do valor do desenvolvimento de estruturas diferentes do encapsulamento lipossomal usado na doxorubicina (PATHAK et al., 2014).

A relevância de tais nanopartículas lipídicas tem se refletido no grande número de publicações referentes a pesquisa envolvendo nanopartículas e drogas citostáticas, ficando evidente a importância das mesmas como metodologias promissoras tanto no diagnóstico quanto no combate ao câncer humano, com efeitos colaterais sensivelmente inferiores aqueles, observados em terapêutica quimioterápica sistêmica clássica por via endovenosa (BHOJANI, et al. 2010).

## 1.4 PACLIATAXEL

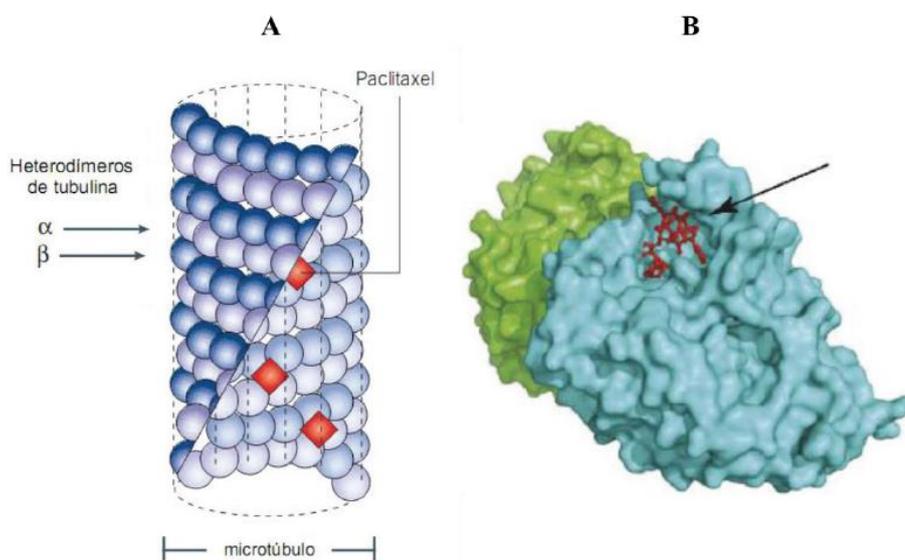
A descoberta do éster de alcalóide paclitaxel (Figura 1) foi através de um programa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, onde extratos de milhares de plantas foram avaliados para possíveis atividades anticâncer (ROWINSKY et al., 1994). Em 1963, um extrato bruto com atividade antitumoral foi isolado a partir da casca do tronco de *Taxus brevifolia*, uma planta encontrada no Noroeste dos Estados Unidos, que apresenta como uma de suas características um demorado crescimento, e o paclitaxel foi identificado como o constituinte ativo do extrato obtido desta planta (WANI et al., 1971). Já em 1979, aumentaram os interesses no agente após a descrição de seu mecanismo de ação em microtúbulos. Atualmente, o paclitaxel é obtido através da semi-síntese do produto originado das folhas de *Taxus baccata*, denominado de 10-deacetilbaccatin III conhecida como 10-DAB, que pode ser convertida em dois importantes fármacos o paclitaxel, como dito anteriormente, e o docetaxel (MANN, 2002).



**Figura 1** – Estrutura química do Paclitaxel. Fonte: Wikipedia, 2014.

Os taxanos são ésteres de alcalóides complexos, compostos por um sistema de anéis e com diversas ramificações laterais que são essenciais para a ação única contra os microtúbulos, por meio da ligação do paclitaxel ao componente  $\beta$ -tubulina do dímero  $\alpha$ -

$\beta$ -tubulina, proteínas essas que promovem e compõem a polimerização dos microtúbulos, impedindo assim, a sua despolimerização, através da estabilização da dinâmica microtubular (**Figura 2**). Como os microtúbulos são essenciais para a manutenção da forma, sendo um dos componentes do fuso mitótico e do transporte de organelas dentro da célula, a estabilização dos microtúbulos resulta em inibição da reorganização dinâmica normal, que constitui função essencial para a mitose celular. Em adição, a estabilização microtubular provocada pela droga pode levar a distorção da cadeia mitótica, resultando conseqüentemente na quebra dos cromossomos, bloqueando o ciclo celular no final da fase G2 e na Mitose, impedindo a proliferação das células neoplásica e conseqüentemente a morte das mesmas (ALBERT et al, 2004; SUN et al, 2009; LATASTE et al. 1984; GUERITTE-VOEGELEIN et al., 1991; RAO et al., 1994).



**Figura 2** – Mecanismo de ação do paclitaxel. (A) Ligação de fármacos antimitóticos em diferentes locais dos microtúbulos. (B) Representação estrutural da  $\alpha$ -tubulina (verde) e  $\beta$ -tubulina (azul) ligada ao paclitaxel (vermelho). Adaptado de BRANDÃO et al., 2010.

A atividade clínica mais importante dos taxanos ocorre em pacientes com câncer de ovário e mama. Entretanto sua utilização é mais ampla, sendo descrito sua aplicação em diversos tipos de neoplasias como: de colo uterino, cólon, cérebro, os cânceres do pulmão de não pequenas células e Sarcoma de Kaposi associados com a AIDS (CORTES & PAZDUR 1995; RAO et al., 1995; MCGUIRE et al., 1996; KATSUMATA 2003; NOWAK et al., 2004).

O paclitaxel, devido a sua significativa hidrofobicidade, tem na sua formulação comercial (Taxol®), o surfactante Cremophor EL e o etanol, que são utilizados como veículos para reter o fármaco nas micelas e mantê-lo em solução; estes solventes, entretanto, em especial o Cremophor EL, é considerado como a causa dos principais efeitos adversos reportados à utilização do Taxol®, assim formulações alternativas do PTX, sem o solvente são procuradas. O Cremophor EL afeta a distribuição do paclitaxel e é responsável pela farmacocinética não linear da droga, especialmente em doses mais elevadas (MA & MUMPER, 2013)

O metabolismo hepático e excreção biliar foram determinados como as principais vias de eliminação paclitaxel sistêmico (ROWINSKY et al, 1994), e metabólitos de paclitaxel foram identificados como 6 $\alpha$ -hidroxi-paclitaxel, 3'-p-hydroxy-paclitaxel e dihydroxypaclitaxel (DAILY & AQUILANTE, 2009).

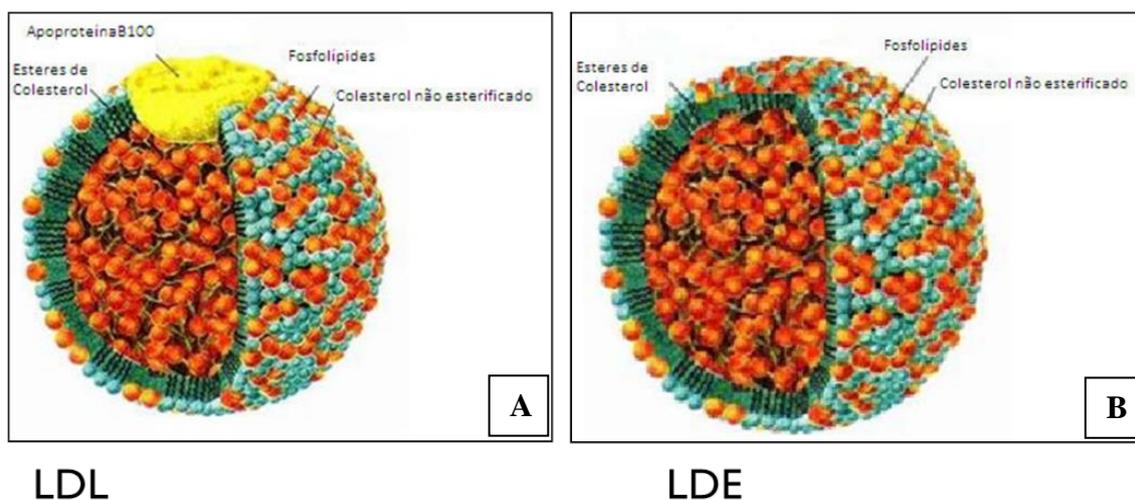
Os principais efeitos adversos encontrados na utilização do Taxol® foram reações graves de hipersensibilidade, atribuído principalmente ao Cremophor EL; aparecendo principalmente na forma de toxicidade hematológica, neutropenia grave, e neurotoxicidade, vistos principalmente como neuropatia periférica sensorial cumulativa. A segurança do Paclitaxel foi muito melhorada, com a utilização de pré-medicação de corticóides e anti-histamínicos H1 e H2, diminuindo as reações de hipersensibilidade e reduzindo a incidência em 3/4 de neutropenia, com a administração de fatores estimuladores de colônias de granulócitos e encurtando o tempo de infusão do paclitaxel de 24 para 3 horas. Por outro lado, a neurotoxicidade, a qual se acredita ser causada pelo paclitaxel ou Cremophor EL, não pode ser controlada e tornou a toxicidade um fator limitante da dose do medicamento (RODRÍGUEZ-ANTONA, 2010).

## 1.5 NANOEMULSÕES E QUIMIOTERAPICOS

Em experiências pioneiras no campo da Nanotecnologia aplicada às Ciências Médicas, realizadas no Laboratório no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo foi demonstrado, a partir de 1992, que nanopartículas sólidas, não-lipossomais, manufaturadas em laboratório podem concentrar-se nas células malignas de pacientes com leucemia mielocítica aguda, após injeção na corrente sanguínea (MARANHÃO et al., 1992; MARANHÃO et al.,1994).

As partículas das nanoemulsões são parecidas com as partículas da lipoproteína de baixa densidade LDL (*Low Density Lipoprotein*), que é um constituinte normal do sangue, além de ser a principal transportadora de colesterol para todos os tecidos. O colesterol, um dos principais constituintes da membrana celular, é obtido pela célula por síntese celular ou via captação de LDL. Há evidências que vários tipos de células neoplásicas possuem maior captação de LDL: medida da captação de LDL pelos tumores; diminuição da LDL plasmática em pacientes com câncer; aumento do número de receptores para LDL (LDL-r) em células tumorais. Devido a estes aspectos, há mais de três décadas estuda-se a possibilidade de veicular drogas através da LDL ou de substâncias que atuem similarmente a ela (FIRESTONE, 1993; FAVERO & BYDLOWSKI, 2008).

As lipoproteínas (LDL) que transportam colesterol no sangue, são esféricas, têm diâmetro na faixa de 25-50 nanômetros e consistem em um núcleo formado de ésteres de colesterol com pequena proporção de triglicérides envolto por uma monocamada de fosfolípides e colesterol livre, (ALMEIDA et al., 2010) contendo apenas uma apolipoproteína, a apoB-100 (Figura 3), que é uma das maiores proteínas monoméricas conhecidas, contendo aproximadamente 4536 aminoácidos. As apolipoproteínas possuem distribuição dinâmica entre diferentes lipoproteínas, isto é, uma mesma molécula pode ser translocada para diferentes complexos lipoprotéicos na circulação sanguínea (HEVONOJA, 2010).



**Figura 3:** Estrutura das partículas da LDL e LDE (tamanho entre 25 e 50 nanômetros). Na figura **A** é demonstrado a estrutura da partícula de LDL com a presença da

Apolipoproteína B100. Figura **B** estrutura da LDE sem a presença de Apolipoproteína. Fonte: Raul Maranhão.

As nanoemulsões, que foram denominadas de LDE, são manufaturadas sem proteína, mas após injeção na corrente sanguínea, adquirem a apolipoproteína E (apo E). A apo E adere à superfície das partículas da nanoemulsão e faz a ligação das partículas aos receptores da LDL, na membrana celular. Dessa maneira, as nanoemulsões são captadas para o interior da célula, através da endocitose mediada por receptores (ALMEIDA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2005; HIRATA et al., 1999).

As células das neoplasias malignas têm como característica apresentarem uma superexpressão dos receptores da LDL (GAL et al., 1981; HO et al., 1978; VITOLS et al., 1992). O aumento desses receptores é necessário para que as células aumentem a captação de colesterol e fosfolípidos, presentes na LDL, para síntese de membranas constituídas por esses lípidos, sendo requerida para a aceleração na taxa de mitose característica do processo proliferativo neoplásico. Os estudos de biodistribuição em modelos murinos de neoplasias mostraram o tropismo das nanopartículas pelos tecidos neoplásicos (TEIXEIRA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2008).

As nanoemulsões ao serem injetadas em pacientes com câncer concentraram nos tecidos neoplásicos, o que foi demonstrado em pacientes com leucemias agudas, linfomas Hodgkin e não-Hodgkin, mieloma múltiplo, carcinoma de ovário, de colo de útero e carcinoma mamário. Assim, foi demonstrado que é possível direcionar quimioterápicos aos tecidos neoplásicos através da sua associação às nanopartículas da LDE (AZEVEDO et al., 2005; DIAS et al., 2007; HUNGRIA et al., 2004; MARANHÃO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006).

Em diferentes estudos, foram desenvolvidas preparações dos quimioterápicos de ação anticâncer como a carmustina (HUNGRIA et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004), o etoposídeo (AZEVEDO et al., 2005; LO PRETE et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006; VALDUGA et al., 2003) e paclitaxel (DIAS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; PIRES et al., 2009) associados às nanoemulsões. Para a obtenção de associações estáveis da LDE com os quimioterápicos, sendo necessário a sua prévia derivatização por meio da esterificação dos fármacos com ácido oléico (LO PRETE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

Esta estratégia resultou em moléculas mais lipofílicas com excelente rendimento de incorporação ao núcleo das nanopartículas. Em camundongos e ratos com implantação de tumores, as associações de nanoemulsões com carmustina, oleato de paclitaxel e oleato de etoposídeo reduziram drasticamente a toxicidade dos quimioterápicos e aumentaram a ação antitumoral e a sobrevida dos animais (TEXEIRA et al., 2004; LO PRETE et al., 2006).

Em testes clínicos, realizados em pacientes com câncer avançado e resistência a múltiplas drogas, demonstraram que tanto a carmustina quanto o etoposídeo e o paclitaxel passaram a apresentar toxicidade mínima quando associados às nanoemulsões, mesmo quando administrados em doses altas, superiores às utilizadas no tratamento convencional (PINHEIRO et al., 2006; HUNGRIA et al., 2004; MARANHÃO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005; DIAS et al., 2007; PIRES et al., 2009).

Mais recentemente, foi iniciado o desenvolvimento de preparações de oleato de daunorrubicina e oleato de metotrexato associados à LDE. As preparações LDE-oleato de daunorrubicina e LDE-oleato de metotrexato obtidas mostram um ótimo rendimento de incorporação e os conjugados LDE-quimioterápico também são estáveis por tempo prolongado, até pelo menos 6 meses. A daunorrubicina pertence à classe das antraciclinas, quimioterápicos utilizados no tratamento dos carcinomas de mama, vesícula, mama, endométrio, ovário, pulmão, estômago e tireóide, bem como sarcoma ósseo e de partes moles, tumores pediátricos, linfóides e mielocíticos (PRATT et al., 1994). O metotrexato tem amplo espectro de aplicações na terapêutica combinada de neoplasias, como carcinoma de cabeça e pescoço, leucemia linfocítica, osteossarcoma, câncer de mama, linfoma Burkitt, carcinoma de pulmão, epidermóide de cérvix, entre outros (PRATT et al., 1994).

A utilização da LDE como instrumento para diminuir, os graves efeitos tóxicos desses dois fármacos, como a inibição da resposta imunológica, toxicidade cardíaca, hepática, renal e hemorragias, entre outras, e aumentar sua atividade farmacológica tem, portanto, uma importância fundamental no aperfeiçoamento do arsenal terapêutico anticâncer. Em estudos recentes, foi demonstrado que o uso do sistema LDE como instrumento de veiculação de fármacos pode se estender além das aplicações sem Oncologia, para o tratamento da aterosclerose (MARANHÃO et al., 2008; SANTOS et al., 2003) e outros processos inflamatórios (LOURENÇO-FILHO et al., 2011).

Em estudos utilizando a LDE- marcada com [ $^{14}\text{C}$ ] em coelhos submetidos a dieta rica em colesterol, foi observado, que a captação de LDE no arco aórtico foi o dobro daquela observada nos animais do controle negativo, com alimentação regular. Já na análise do tratamento com a LDE-oleato de paclitaxel nos animais alimentados com a dieta rica em colesterol, observou-se a redução de 60% nas áreas de lesão na camada íntima-média das artérias carótidas, assim como a inibição da migração de macrófagos, da proliferação de células do músculo liso e invasão da camada íntima. Além disso, o tratamento com LDE-PTX não teve nenhuma toxicidade. Desta forma, a LDE-PTX proporcionou a regressão da aterosclerose sem toxicidade e mostrou notável potencial na terapêutica cardiovascular (MARANHÃO et al., 2008).

Em recente estudo o etoposídeo associado a LDE, demonstrou sua eficácia na redução das lesões ateroscleróticas de coelho, diminuindo fortemente a proliferação de VSMC (células de músculo liso vascular) na camada íntima e de macrófagos, assim como, a diminuição da produção de fatores pró-inflamatórias, tais quais o IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e MMP9. Os marcadores de proliferação e de lipoproteínas foram também inibidos pelo tratamento. De tal modo, esta nova formulação de etoposídeo pode oferecer uma estratégia promissora para o tratamento da doença cardiovascular aterosclerótica (TAVARES et al., 2011).

O tropismo de LDE também foi demonstrado em tecidos sinoviais inflamados, no qual a LDE marcada radioativamente foi 2,5 vezes mais concentrada nas articulações artríticas do que na articulação normal. Já o tratamento intra-articular com o LDE associado ao Metotrexato (LDE-MTX) induziu um padrão claro de resposta à dose, reduzindo a infiltração sinovial de leucócitos e vazamento de proteína, quando comparado com articulações artríticas não-tratadas (MELLO et al, 2013).

## 1.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos está intimamente relacionado à química medicinal. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) a química medicinal envolve a invenção, a descoberta, o planejamento, a identificação, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos aplicados ao processo de pesquisa de

desenvolvimento (P&D). Fica claro a importância do estabelecimento de interfaces fundamentais entre as ciências químicas, biológicas, farmacêuticas, médicas, físicas e computacionais (GUIDO et al., 2010).

A descoberta ou síntese de uma molécula com potencial fármaco e a sua correlação com um alvo biológico apropriado constitui o início do processo. Por lei, a segurança e a eficácia dos fármacos devem ser definidas antes de sua comercialização. Em fase posterior, são realizados, além dos estudos *in vitro*, os estudos *in vivo*, que caracterizarão os efeitos biológicos da molécula em animais (testes pré-clínicos) antes que possam ser iniciados estudos clínicos em seres humanos (BERKOWITZ, 2006 & GUIDO et al, 2010).

Os estudos pré-clínicos têm como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas *in vitro* e em animais *in vivo* para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, a farmacocinética é testada em animais. O composto é submetido a testes de toxicidade a curto e longo prazo em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam ser definidas dentro de uma relação dose-resposta (FERREIRA et al., 2009).

A duração do teste pré-clínico toxicológico está relacionada com a provável duração terapia medicamentosa. Assim, torna-se importante a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do composto, sobre as seguintes situações: fertilidade, reprodução, teratogenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (GRAHAME-SMITH & ARONSON, 2004).

Também são realizados nesta fase testes relacionados com a estabilidade do novo composto, possibilidade de produção em larga escala, bem como estudos de formulação. Nos ensaios pré-clínicos avalia-se tanto a toxicidade dos candidatos à fármacos, como a cinética destes no organismo dos animais. Esses estudos são realizados por meio da administração de doses do protótipo a fármaco e posterior monitoração destes no organismo do animal, por meio de coletas programadas de sangue e urina, para determinação de concentrações plasmáticas do fármaco e metabólitos gerados e eliminados pela urina. O material coletado é, então, avaliado por métodos analíticos, como radioensaio e tipos relacionados de ensaio de saturação, diversas técnicas de separação envolvendo cromatografia e/ou espectrometria de massa, associadas a sistemas detectores de alta sensibilidade para a determinação quantitativa dos componentes separados (RANG et al., 2011).

## 1.7 PRIMATAS NÃO HUMANOS

O primata não humano da espécie *Cebus apella* é conhecido popularmente como macaco prego e pertence à subordem *Anthropoidea*, superfamília *Platyrrhini*, família *Cebidae* e gênero *Cebus*. Essa espécie é encontrada na região leste e sul da Colômbia, sul da Venezuela, Guianas, leste do Equador, grande parte do Brasil, Bolívia e Paraguai (NAVES et al., 2006).

Os macacos do gênero *Cebus* são indivíduos de tamanho médio, pesam entre 2,5 e 5,0 quilogramas, apresentam o corpo robusto e exibem dimorfismos sexuais. Seu tamanho corpóreo é de até 60 centímetros, e possui grande capacidade de adaptação a diferentes habitats (FERREIRA, 2009).

A utilização crescente dos primatas da espécie *Cebus apella* em pesquisas científicas tem ocorrido graças a sua homologia com o *homo sapiens*, dessa forma demonstrando sua relevância na investigação de mecanismos patológicos e fisiológicos nas áreas de hematologia, imunologia, virologia e oncologia (VASCONCELOS, 2008).

O uso de primatas não humanos como modelos experimentais *in vivo*, por sua vez, é de grande importância em trabalhos de aplicação à saúde humana, devido as suas semelhanças anatômicas, bioquímicas e filogenéticas com os primatas humanos, gerando resultados que podem ser interpretados de forma mais próxima e segura para os fenômenos em seres humanos. Além disso, o tamanho do animal e seus órgãos tornam possível a repetição de diagnósticos tais como exames endoscópicos, coleta de amostras de sangue e biopsia de um mesmo animal por um longo período, e a sua longevidade permite a exposição aos carcinógenos ou fármacos por longos intervalos de tempo (TAKAYAMA et al., 2008).

Dessa forma, a experimentação animal reveste-se de importância incomensurável nas pesquisas científicas, contribuindo de maneira marcante para a ciência e a tecnologia. Sua vasta contribuição nos diferentes campos científicos tem promovido ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e de tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (TAKAYAMA et al., 2008).

## 1.8 PADRÃO DE NORMALIDADE HEMATOLÓGICA EM *Cebus apella* E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO FRENTE A DROGAS.

A avaliação hematológica permite analisar o estado de saúde do organismo, diagnosticar doenças, realizar prognósticos, acompanhar a evolução do tratamento, possibilita a avaliação da resposta terapêutica e o índice de toxicidade de diversos fármacos (NAVES et al., 2006). O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico, pois permite uma análise laboratorial que estabelece aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma), contagem e a diferenciação, e das plaquetas (plaquetograma) no sangue (FAILACE, 2009).

A tabela 1 apresenta os valores considerados normais do hemograma dos *Cebus apella* adultos mantidos em cativeiros.

**Tabela 1** – Valores normais dos constituintes hematológicos de *Cebus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.

<b>Constituintes hematológico</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
<b>Hematócrito (%)</b>	45,27	3,6	37,65	52,7
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	5,92	0,45	4,4	7,05
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	15,01	0,78	13,8	16,2
<b>VCM (fl)</b>	71,63	2,26	65	79
<b>HCM (pg)</b>	23,47	0,8	20	26
<b>CHCM (g/dl)</b>	32,81	1,78	25	38
<b>Leucócitos(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	7,72	1,84	4,3	12,15
<b>Plaquetas(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	323,14	54,79	291,50	354,78
<b>Basófilos (%)</b>	0,21	0,27	0	1
<b>Eosinófilo (%)</b>	0,82	1,01	0	5
<b>Bastões (%)</b>	0	-	-	-
<b>Segmentados (%)</b>	63,16	5,98	51	72
<b>Linfócitos (%)</b>	36,78	5,96	28	49
<b>Monócitos (%)</b>	2,06	2,16	0	10

Fonte: adaptado de NEVES et al., 2006; RIVIELLO e WIRZ, 2001; WIRZ et al., 2008.

Os valores de referência do hemograma completo para humanos possuem valores muito próximos ou semelhantes ao serem comparados com os de *Cebus apella*, como por exemplo: valores de hemoglobina total de 13,5 a 17,5 g/dl em homens e de 13,8 a 16,2 em *Cebus apella*, já nos leucócitos totais em humanos variam de 5.000 a 11.000  $\mu\text{L}$  e em *Cebus apella* de 4.300 a 12.150  $\mu\text{L}$  (HOFFBRAND et al, 2013)

O hematócrito é a proporção do volume ocupado pelas hemácias no sangue total. Os índices hematimétricos descrevem as características médias dos eritrócitos, que são: o volume corpuscular médio (VCM) que é o volume médio dos eritrócitos; o índice de hemoglobina corpuscular médio (HCM), caracteriza a quantidade média de hemoglobina contida em cada célula; o índice de concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM), sendo a concentração de hemoglobina média das hemácias. Todos estes indicadores são preciosos na caracterização das hemácias, como macrocíticas, microcíticas, normocrômicas ou hipocrômicas, contribuindo para a caracterização dos diversos tipos de anemias (HOFFBRAND et al, 2013).

A avaliação dos potenciais efeitos hepatotóxicos de drogas terapêuticas sobre os vários sistemas orgânicos baseia-se principalmente na avaliação de biomarcadores de dano hepático. Ensaios pré-clínicos atualmente incluem uma combinação da avaliação de enzimas no soro como Alanina aminotransferase (TGP), Aspartato aminotransferase (TGO), Gama-glutamil transferase (GGT) entre outros, que assim são utilizados como sinalizadores celulares de dano hepático (OZER et al., 2008).

Outros marcadores bioquímicos são importantes na avaliação de drogas terapêuticas, como: os marcadores da lesão hepatobiliar, que são as proteínas séricas, a proteína total, albumina e a bilirrubina total; marcadores para lesão cardíaca - Lactato desidrogenase (LDH); marcadores da função pancreática – amilase; avaliação do perfil eletrolítico (Sódio, Potássio e Cloro); além de outras provas bioquímicas como Glicose, Globulina, Colesterol, Triglicérides, Cálcio e etc. (BURTIS et al., 2008).

A análise da ureia e da creatinina como biomarcadores de lesão celular associado a drogas terapêuticas ainda continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal (SODRÉ et al., 2007).

Os valores considerados dentro dos padrões de normalidade para *Cebus apella* de alguns marcadores bioquímicos como: TGO, TGP, GGT, ureia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, colesterol e albumina estão na tabela 2.

**Tabela 2** – Valores normais demarcadores bioquímicos de *Cebus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.

<b>Marcadores bioquímicos</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
<b>TGO (U/L)</b>	42,22	8,78	29,5	58
<b>TGP (U/L)</b>	34,38	7,97	24	48
<b>GGT(U/L)</b>	71,06	14,32	34	94,5
<b>Ureia (mg/dl)</b>	13,44	4,82	7,0	26
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,71	0,13	0,41	0,91
<b>Bilirrubina Total (mg/dl)</b>	0,51	0,05	0,5	0,7
<b>Proteína total (mg/dl)</b>	7,25	0,5	6,6	8,6
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	136	26,44	98	184
<b>Albumina (mg/dl)</b>	63,85	4,91	54,1	69,7

Fonte: Adaptado de Riviello & Wirz (2001).

Os valores de referência dos marcadores bioquímicos para humanos possuem valores muito próximos ou semelhantes ao serem comparados com os de *Cebus apella*, como por exemplo: valores de Gama-glutamil transferase (GGT) de 12 a 73 U/L em homens e de 34 a 94,51 em *Cebus apella*, já nos valores de Bilirrubina total em humanos variam de 0,20 a 0,80 mg/dL e em *Cebus apella* de 0,5 a 0,7 mg/dL, os valores de referência apresentados são os adotados para humanos no Laboratório Hermes Pardini (2014).

## 1.9 JUSTIFICATIVA

Avanços na pesquisa do câncer tem resultado no aumento de conhecimentos específicos sobre alterações celulares e moleculares da doença em suas diferentes formas, proporcionando que novas estratégias para o tratamento da doença sejam propostos. Como o tratamento e a cura do câncer ainda são um desafio para a ciência, o sistema de veiculação de drogas alvo-específica (*Drug delivery system*) para o tratamento do câncer tem ganhado destaque nas pesquisas médicas da atualidade. Alvos

específicos e terapias direcionadas são hoje alternativas para o melhor desempenho de fármacos, muitas vezes já existentes e pouco utilizados na prática clínica por apresentarem graves efeitos adversos. O foco principal do desenvolvimento de sistemas veiculação de drogas alvo-específicas em câncer (*Cancer drug delivery*) não é mais simplesmente o acondicionamento de fármacos em novas formulações para diferentes vias de administração, mas sim uma terapia direcionada, para atingir um determinado alvo, com aumento dos níveis terapêuticos e melhora da seletividade do tratamento. Além disso, as abordagens não visam apenas complementar a quimioterapia tradicional e a radioterapia, mas também evitar danos aos tecidos normais e prevenir a resistência a múltiplos fármacos (MDR)

O sistema de nanoemulsões LDE é resultado de pesquisas realizadas inteiramente no Brasil, abrangendo estudos de físico-química e farmacotécnica, farmacologia celular em modelos animais e ensaios clínicos, oferecendo assim várias vantagens terapêuticas. O LDE, ao reduzir acentuadamente a toxicidade da quimioterapia, propicia, caso necessário, o aumento da dose do fármaco, aumentando as possibilidades de associação de drogas na poliquimioterapia. Além disso, ele possibilita o tratamento quimioterápico mais prolongado, já que a toxicidade acumulada diminui. E ao concentrar o fármaco no seu sítio de ação, pode aumentar a efetividade do tratamento.

O paclitaxel (PTX) é uma droga terapêutica eficaz e amplamente utilizado para o tratamento do câncer, incluindo diferentes tipos, como: o câncer do ovário, melanoma e carcinoma hepatocelular (LIU et al., 2014). No entanto, cada vez mais cânceres apresentam uma resposta diminuída à monoquimioterapia do PTX, assim, é necessário combinar a terapia com PTX a outras substâncias, ou realizar a sua incorporação a produtos carreadoras, para alcançar assim uma combinação sinérgica e um melhor efeito terapêutico.

A incorporação em nanopartículas ainda protege o fármaco contra degradação química na corrente circulatória. Com essas vantagens, e manufaturado a partir de lípidos presentes no organismo, perfeitamente integrados no metabolismo corpóreo e sem imunogenicidade, o emprego do sistema LDE pode resultar em melhora da qualidade de vida dos pacientes com câncer e aumentar a sua sobrevivência. O processo de formulação dos quimioterápicos veiculados na LDE não encarece apreciavelmente o tratamento, pelo custo adicional dos lípidos ou pelo processo de incorporação às

nanopartículas. Assim, ao evitar gastos adicionais com medicamentos, como do sistema LDE pode também gerar grande economia para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Nos últimos três anos, foi desenvolvido um método baseado em homogeneização recirculante sob alta pressão que viabiliza a futura produção em escala industrial. Obtendo preparações de alto rendimento de incorporação do fármaco nas nanopartículas e com estabilidade para garantir a validade do produto por tempo suficiente para viabilizar a comercialização. Este novo método de manufatura da nanoemulsão LDE para adaptação futura em escala industrial exige um estudo detalhado para testar a eficiência farmacológica e a toxicidade bioquímica e *in situ* das diversas preparações LDE-quimioterápico que têm sido produzidas.

Desta forma, o presente estudo avaliou a toxicidade tecidual e celular em primatas não humanos da espécie *Cebus apella* tratados com uma nanoemulsão do quimioterápico paclitaxel (LDE-oleato de Paclitaxel) e sua respectiva versão comercial (Taxol®), comparando os efeitos nos animais provocados pelas diferentes formas deste quimioterápico. Os dados obtidos neste estudo representam um importante passo para a posterior avaliação das formas do paclitaxel em humanos, já que de acordo com o artigo 52 das normas do Conselho Nacional de Saúde (CNS), toda pesquisa em que o ser humano for submetido a estudo (ensaios clínicos), deve estar fundamentada na experimentação prévia realizada em animais, tornando-se indispensáveis os estudos pré-clínicos do fármaco em questão.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade crônica das nanopartículas associadas com o quimioterápico Paclitaxel (LDE-Oleato de paclitaxel) em primatas não humanos da espécie *Cebus apella*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a cinética, depuração plasmática e biodistribuição pela captação do  $^3\text{H}$ -Colesterol Éster da LDE em *Cebus apella*.

Verificar os efeitos da toxicidade crônica das nanopartículas associadas com o quimioterápico Paclitaxel através da análise das características clínicas dos animais.

Analisar a toxicidade crônica das nanopartículas associada com o quimioterápico Paclitaxel a partir da determinação de parâmetros hematológicos e de bioquímica sanguínea.

Investigar a toxicidade crônica das nanopartículas associadas com o quimioterápico Paclitaxel através da análise de anatomia e histológica patológica dos diversos órgãos do *Cebus apella*, por microscopia ótica.

### 3. METODOLOGIA

O presente trabalho faz parte do projeto “USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER”, aprovado e financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e coordenado pelos pesquisadores Dr. Raul Cavalcante Maranhão (USP-INCOR) e o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano (ICB-UFPA). O referido projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA CEPAE/BIO008-11 (anexo – 01), assim como, recebeu autorização para atividades com finalidade científica expedido pelo Sisbio/ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) com base na Instrução Normativa nº154/2007. Possuindo como número de autorização 31626-1 (anexo – 02).

#### 3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Os animais utilizados no experimento são da espécie *Cebus apella* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), sob as condições padrões, tendo sido previamente selecionados e separados para realização deste trabalho.

Os animais selecionados tiveram como critérios de inclusão: a idade, sendo todos adultos jovens e adultos (entre 5 a 12 anos); o peso, entre 3 e 4,5 kg e o sexo, todos do sexo masculino. Como critérios de exclusão adotados não foram incluídos animais que já haviam participado de outros estudos experimentais, animais com alterações clínicas como: doença de pele, alterações gástricas, alterações pulmonares ou qualquer outra alteração clínica significativa, bem com animais com alterações nos padrões de análise hematológico e bioquímico.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de alumínio com dimensões de 80x90x80cm, dentro de galpões telados, sujeitos ao fotoperíodo natural, com alimentação diária à base de frutas, verduras, legumes, tenébrions gigantes (*Zophobas*

*morio* na fase larval), ração peletizada (FOXY Júnior Supremo, 28% de proteína bruta; PROVIMI, Pinhais, PR, Brasil) e água *ad libitum* (figura 4). Para identificação e controle os animais possuíam um código de três letras tatuadas na face interna da coxa direita e um “microchip” implantado na porção dorsal na região interescapular, tornando possível a identificação do animal através de uma sequência de nove números.



**Figura 4** - (A) Recintos de alvenaria revestidos de azulejo e tela metálica, utilizados para alojar os animais, onde se evidencia as gaiolas individuais, (B) Visão externa do galpão experimental I do CENP.

Os experimentos foram realizados na Unidade de Experimentação do CENP, no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica da Universidade Federal do Pará e no Laboratório de metabolismo de lípidos (INCOR-USP). Um total de 18 *Cebus apella* foram avaliados.

Para a administração das drogas os animais foram divididos em 6 grupo, de acordo com a disposição abaixo:

- Grupo 1 – (CPB): três animais que receberam a LDE-PTX marcada com radioisótopo por via intravenosa.
- Grupo 2 – normal (CN): três animais sem tratamento que receberam solução salina por via intravenosa.
- Grupo 3 – tratados (EXP1): três animais que receberão a LDE-PTX por via intravenosa na dose de 175 mg/m<sup>2</sup>.
- Grupo 4 – tratados (EXP2): três animais que receberão a LDE-PTX por via intravenosa na dose de 250 mg/m<sup>2</sup>
- Grupo 5 – (CP1): três animais que receberão por via intravenosa o Paclitaxel comercial nas doses de 175 mg/m<sup>2</sup>.

- Grupo 6 – (CP2): três animais que receberão por via intravenosa Paclitaxel comercial nas doses de 250 mg/m<sup>2</sup>.

A tabela abaixo, ilustra a divisão dos seis diferentes grupos diferentes grupos, bem como, o tipo de tratamento e número de animais envolvidos.

**Tabela 3** - Divisão dos diferentes grupos de animais de acordo com o tratamento.

Grupos	LDE-PTX [ <sup>3</sup> H]	Solução Salina	LDE-PTX (175mg/m <sup>2</sup> )	LDE-PTX (250mg/m <sup>2</sup> )	Taxol (175mg/m <sup>2</sup> )	Taxol (250mg/m <sup>2</sup> )	Nº de Animais
CPB	X						3
CN		X					3
EXP1			X				3
EXP2				X			3
CP1					X		3
CP2						X	3

Os animais do grupo CPB, foram tratados com a partícula de LDE-PTX marcada com lípidos radioativos (colesterol éster-[<sup>3</sup>H]) e acompanhados durante 24 horas, para a realização dos experimentos de biodistribuição e cinética plasmática (itens 2.8 e 2.9).

Os animais dos grupos CN, CP1, CP2, EXP1 e EXP2, após receberem o tratamento inicial foram acompanhados durante 6 ciclos de administração do fármaco, com intervalo de 3 semanas (21 dias) cada, totalizando 18 semanas (126 dias). Durante o período de tratamento, os padrões físicos e clínicos dos animais foram registrados diariamente. Foi realizada também a mensuração do peso, análises bioquímicas e hematológicas de cada animal sempre nos dias de aplicação do fármaco a cada ciclo.

### 3.2 AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Os animais de todos os grupos de estudo foram pesados antes do início de qualquer um dos tratamentos, assim como durante todo o período experimental (especificamente nos dias de aplicação do fármaco e após quatorze dias e no 21º dia

após o último ciclo de tratamento), sendo este critério adotado como um dos parâmetros de avaliação do estado clínico geral. A mensuração do peso foi realizada em balança eletrônica de precisão modelo BP Baby - Filizola, com os animais previamente sedados.

### 3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

A avaliação clínica dos animais foi feita diariamente, no período de 8 às 11h da manhã de forma visual, complementada por registros fotográficos e vídeos, para verificar qualquer manifestação de sinais de toxicidade, tais como: alteração na locomoção, alteração na pele, pelôs, piloereção, sialorreia, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, movimentos estereotipados, tremores, diarreia, letargia e coma.

### 3.4 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Para realização de cada procedimento experimental (coleta de sangue periférico, aplicação do LDE-PTX e PTX comercial) os animais foram previamente sedados por injeção via intramuscular com 0,2 mg/kg de Zoletil® 50 (Cloridrato Tiletamina e Cloridrato Zolazepam).

Para o procedimento de eutanásia após o fim do período experimental os animais foram submetidos à injeção intravenosa de pentobarbital sódico (150mg/kg), seguindo todas as diretrizes estabelecidas em relação ao bem estar animal pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal).

### 3.5 COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para a realização dos exames hematológicos, bioquímicos e da cinética plasmática da LDE foram coletados 5 ml de sangue por venopunção da veia femoral

direita e/ou esquerda (figura 5), o material foi dividido em *vacutainers* contendo EDTA e Gel SST II *Advance*. O material coletado era posteriormente encaminhado para análise no Laboratório de Análises Clínicas do CENP. A análise hematológica e bioquímica dos animais pertencentes aos grupos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2, foram realizadas em todos os 6 ciclos de quimioterapia, ou seja, nos dias de aplicação do fármaco ou da solução salina, assim como, no intervalo dos ciclos, sempre no 14º dia após o procedimento e no 21º dia após o último ciclo de tratamento.



**Figura 5** - Procedimento de coleta sanguínea por venopunção da veia femoral esquerda.

### 3.6 PREPARAÇÕES E DERIVATIZAÇÃO DAS NANOEMULSÃO

As nanoemulsões LDE foram preparadas a partir de uma sequência de diluições de soluções mães dos lípides constituintes da LDE dissolvidos em clorofórmio: metanol 2:1, onde foi preparada uma mistura com a seguinte composição de fosfolípides: éster de colesterol: colesterol livre (66:33:1), que pode ser modificada conforme os resultados após incorporação com fármacos, visando sua utilização. O processo de emulsificação e

purificação das nanopartículas foi realizado segundo o método descrito anteriormente por Maranhão e colaboradores (1993). O tamanho médio das nanopartículas foi monitorado pela técnica de dispersão de feixe de LASER. A preparação então foi centrifugada a 3700 rpm, por 20 minutos e filtrada em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilização. A preparação foi armazenada em tubos estéreis, apirogênicos, a 4°C.

O paclitaxel foi modificado e associado à nanoemulsão através de cossonicação ou irradiação ultrassônica, como descrito por Rodrigues et al. (2005), o qual foi utilizado no grupo experimental 1 e 2. O procedimento foi realizado no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (INCOR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e encaminhado para o Laboratório de Citogenética Humana e Médica da UFPA em recipiente refrigerado com uma proteção para evitar o contato com o tubo contendo a nanoemulsão.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA PLASMÁTICA DA LDE

O estudo do comportamento cinético assim como a biodistribuição da LDE, foi realizada nos três animais pertencentes ao grupo CPB após um jejum de 12 horas. Os animais da espécie *Cebus apella* foram previamente sedados e posteriormente injetados cerca de 500  $\mu\text{l}$  de LDE - Oleato paclitaxel (LDE-PTX) marcado com colesterol livre- $^3\text{H}$  na veia femoral (esquerda). Durante 24 horas as amostras de sangue foram colhidas sempre com o animal em estado de sedação, em intervalos de tempo predeterminados, 5, 15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, da veia femoral (direita e/ou esquerda) desses animais. Após as coletas, o plasma foi separado por centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm e alíquotas de 1 ml foram pipetadas em tubos de cintilação, congeladas e armazenadas em recipiente de isopor com gelo seco e levadas para São Paulo, por via aérea, para a continuação da análise. Foram acrescentadas posteriormente aos tubos 5 ml da solução cintiladora (Ultima Gold XR, PerkinElmer). A análise da radioatividade emitida foi realizado no Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Instituto do Coração (INCOR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, medida no espectrómetro de cintilação líquido (Liquid Scintillation Analyzer, 1600TR Tri-Carb, Packard), sob a utilização do software Speed STAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers.

### 3.8 ANÁLISE COMPARTIMENTAL DOS DADOS CINÉTICOS

A radioatividade presente nas amostras de plasma sanguíneo dos animais foi utilizada para traçar as curvas de decaimento plasmático e para o cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da nanoemulsão, por meio do *software* de análise compartimental ANACOMP® versão 4.1 (LIMA et al., 2009).

A curva de decaimento plasmático da LDE apresenta um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial, seguido de um decaimento mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com dois compartimentos, a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (K) para cada marcação da nanoemulsão.

Os compartimentos e os parâmetros cinéticos desse modelo são definidos do seguinte modo:

- Compartimento 1: representa a LDE introduzida no espaço intravascular, assim como foi injetada.
- Compartimento 2: representa a LDE após aquisição de apolipoproteínas, no plasma.

Taxas fracionais de transferência (K):

- $K_{1,0}$ : representa a remoção não específica da LDE.
- $K_{1,2}$ : representa a transformação da LDE pela aquisição de apolipoproteínas.
- $K_{2,0}$ : representa a remoção da LDE do compartimento plasmático para o espaço extravascular, por meio da captação principalmente hepática.

### 3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO TECIDUAL DO 3H-COLESTEROL ÉSTER DA LDE

Para o estudo da captação tecidual da LDE os três primatas não-humanos pertencentes ao grupo experimental CPB, foram sacrificados com injeção intravenosa, 24 horas após a injeção de LDE marcada com lípidos radioativos (colesterol éster-[ $^3\text{H}$ ]). Os seguintes órgãos e tecidos foram coletados: cérebro, pele, testículo, vesícula seminal, rins, glândula supra-renal, baço, medula óssea, coração, músculo reto-abdominal,

músculo psoas, músculo sartório, músculo diafragma, fígado, pulmão, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas, esôfago, bexiga, traquéia, bile, língua, gordura da região abdominal, glândula submandibular, pênis e linfonodos. As amostras destes órgãos foram selecionadas, limpas e acondicionadas em solução fisiológica gelada, em seguida, os tecidos foram pesados (1000 mg) e macerados até ficarem com aspecto pastoso. As amostras foram colocadas em tubos para extração acrescentando 10 ml de metanol (Merck), agitadas em *vortex*, sendo adicionados 20 mL de clorofórmio (Merck) e deixadas em repouso “*overnight*” para a extração do colesterol livre e esterificado segundo o método de Folch (1957).

Posteriormente filtrou-se as amostras em papel filtro por gravidade, adicionou-se 5 ml de clorofórmio e 7 ml de água destilada, mantendo-as em repouso, “*overnight*” a 4°C. Após o repouso, a fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e então descartada. Na próxima etapa adicionou-se 4 ml de solução de Folch (Clorofórmio/Metanol/H<sub>2</sub>O) na proporção de 3:48:47, mantendo em repouso, “*overnight*” a 4°C. Após o repouso a fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e descartada. As amostras obtidas após estes procedimentos foram posteriormente encaminhadas em isopor contendo gelo seco para o Laboratório de Metabolismo de Lípidos, onde foi dada continuidade ao procedimento experimental. Os infranadantes foram transferidos para tubos de cintilação e secados através da evaporação total dos solventes no equipamento Speed Vac® (Thermo Scientific). As amostras então foram homogeneizadas através da adição de 5 ml de solução cintiladora (Ultima Gold XR, Perkin Elmer). A análise da radioatividade medida no espectrômetro de cintilação líquido (Liquid Scintillation Analyzer, 1600TR Tri-Carb, Packard), sob a utilização Speed STAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO

O perfil bioquímico dos quinze primatas não-humanos pertencentes aos grupos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2, foi acompanhado durante todo o período experimental, através da análise de alanina aminotransferase (ALT), aspartato de aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), uréia, creatinina, ácido úrico, glicose, colesterol, HDL-C, triglicérides, lipase, fosfatase alcalina, proteína total, albumina, globulina, bilirrubina total e cálcio.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do CENP através do Sistema de química seca ARCHITECT 5000® (Abbot Diagnostics), seguindo a metodologia preconizada pelos fabricantes dos kits para cada parâmetro analisado.

### 3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO

Para avaliação da toxicidade do tratamento, o hemograma dos quinze primatas não-humanos pertencentes aos grupos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2, foi realizado antes e durante todo o período experimental. A análise hematológica ocorreu no Laboratório de Análises Clínicas do CENP utilizando-se o contador de células automático para uso veterinário Cell Dyn Ruby® (Abbott Diagnostics) para determinação dos seguintes parâmetros hematológicos: hemácias, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), diferencial leucocitário, plaquetas e volume plaquetário médio (MPV).

### 3.12 ANÁLISE DA ANATOMIA PATOLÓGICA E MORFOLÓGICA

Com o término do tratamento todos os animais pertencentes aos grupos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2, foram submetidos à eutanásia e procedeu-se a coleta dos seguintes órgãos e tecidos para a realização dos exames macroscópico e histopatológico: músculo sartório, músculo psoas, músculo reto abdominal, diafragma, coração, glândula submandibular, esôfago, língua, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso, traquéia, pulmão, fígado, vesícula biliar, bexiga, supra-renal, rim, vesícula seminal, testículos, pênis, baço, linfonodos, timo, cérebro e pele. Este procedimento foi realizado pelo Veterinário responsável pelo setor de patologia do CENP, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo CONCEA.

A análise macroscópica dos órgãos dos animais utilizados nesse experimento levou em consideração os parâmetros relacionados à consistência, coloração, presença

de hemorragias, e outras alterações como erosões, ou nódulos visíveis nos diversos órgãos.

Após a coleta os fragmentos dos órgãos e tecidos foram inicialmente fixados em formol tamponado a 10% - pH 7,2. A próxima etapa consistiu da preparação das amostras em processador automático de tecidos Leica TP 1020, onde primeiramente os fragmentos sofreram o processo de desidratação, ou retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool (Dinâmica®), através de várias etapas, com banhos sequenciais de baterias de álcool 70, 80, 90% e duas baterias de álcool 100% (absoluto), na segunda etapa, denominada de diafanização, o álcool presente nos tecidos foi substituído por xilol (Dinâmica®), em duas baterias sequenciais com duração de uma hora cada. Na impregnação, última etapa, o xilol foi substituído por parafina, em duas baterias de parafina a 60°C por trinta minutos cada.

Uma vez impregnados, os tecidos foram colocados em fôrmas à temperatura ambiente, contendo parafina fundida e deixando-a endurecer. Assim, as amostras envoltas em parafina sólida foram denominadas de blocos. Os cortes nos blocos foram feitos em micrótomo, com a espessura de 6 µm, sendo as tiras obtidas durante a microtomia transferidas para o banho-maria mantido a 40°C. Os cortes foram distendidos na superfície da água e depois colocados na superfície de uma lâmina mergulhada em banho-maria.

Realizou-se também a coloração com hematoxilina (Biotec®) e eosina (Synth®) (H/E), para permitir a diferenciação do citoplasma e do núcleo, fornecendo assim subsídios de análise morfológica para sugerir o mecanismo de ação do composto em estudo, com todo esse procedimento tendo sido realizado no Laboratório de Histopatologia do CENP.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como Média ± DP. A comparação entre os grupos foi realizada por teste t de Student e análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

A avaliação dos resultados dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e do peso, foram analisados através da média de valores obtidos durante todo o período experimental nos grupos de estudos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2.

Os animais pertencentes aos grupos CP1 e CP2, que receberam o paclitaxel na sua forma comercial (Taxol®), tiveram no 1º ciclo de quimioterapia grave reação tóxica a aplicação do fármaco, observada através de manifestações clínicas como letargia, convulsão, alterações na frequência cardíaca (realizado através de um eletrocardiograma) e hiperêmese. A constatação dessas alterações sugestivas de grave reação tóxica, levou ao veterinário responsável pelos cuidados dos primatas não-humanos pertencentes ao Centro Nacional de Primatas, a sugerir a suspensão da continuação dos ciclos de aplicação do fármaco em 4 animais, sendo 2 animais pertencentes ao grupo CP1 e 2 animais pertencentes ao grupo CP2. A sugestão foi acatada para que o experimento continuasse a seguir as diretrizes estabelecidas para o bem estar animal do CONCEA. Desta forma os grupos CP1 e CP2 seguiram com apenas um animal em cada grupo.

### 4.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Os animais que compuseram os grupos CN, CP2, EXP1 e EXP2 não tiveram diferença significativa comparando a média de peso presente na literatura (3,750 Kg) (FERREIRA, 2009). Apenas o animal do grupo CP1 apresentou decréscimo no valor do peso quando comparado ao valor considerado normal para a espécie. O animal do grupo CP1, que recebeu o fármaco na forma comercial na dose de 175mg/m<sup>2</sup> apresentou uma perda significativa do peso corporal, cerca de 28%, sendo esse valor significativamente menor ao ser comparado ao grupo CN.

Os valores de média de peso dos animais dos grupos controle e experimental ao final do experimento (126º dia) são apresentados na tabela abaixo:

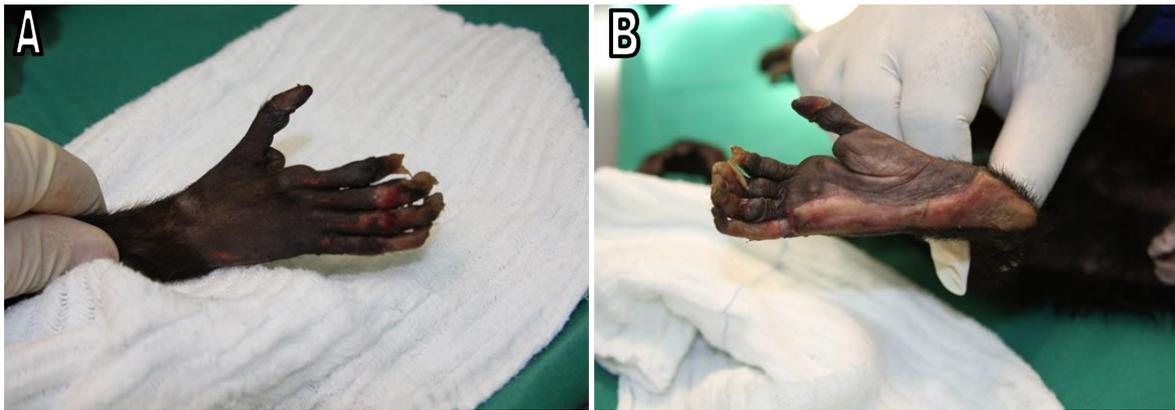
**Tabela 4** - Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimentais.

GRUPOS	PESO
	MÉDIA ± DP
CN	3,57 ± 0,45
EXP1 (175 mg/m <sup>2</sup> )	3,50 ± 0,31
EXP2 (250mg/m <sup>2</sup> )	3,43 ± 0,59
CP1 (175mg/m <sup>2</sup> )	2,59 ± 0,10 <sup>1</sup>
CP2 (250mg/m <sup>2</sup> )	3,17 ± 0,22

1- p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.

#### 4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Na avaliação clínica diária que ocorreu sempre no período de 8 às 11 horas da manhã, nos diferentes grupos estudados, foi observado que os animais pertencentes aos grupos CN, EXP1 e EXP2 não apresentaram nenhum sinal de toxicidade ou alteração comportamental. Já nos animais dos grupos CP1 e CP2 foram verificados sinais de toxicidade a partir do segundo ciclo de quimioterapia, tais como: alteração na pele percebidas através de lesões inflamatórias descamativas (figura 6), perda progressiva dos pêlos ao longo da quimioterapia (Figura 7), onde ao final do período experimental, chegou a cerca de 70% do pelo corporal. Assim como, a presença de diarreia e êmese, nos três dias seguidos a aplicação do fármaco na versão comercial.



**Figura 6** - Lesões inflamatórias descamativas observadas nas regiões da mão (A) e no pé (B), respectivamente, em animais do grupo controle positivo.

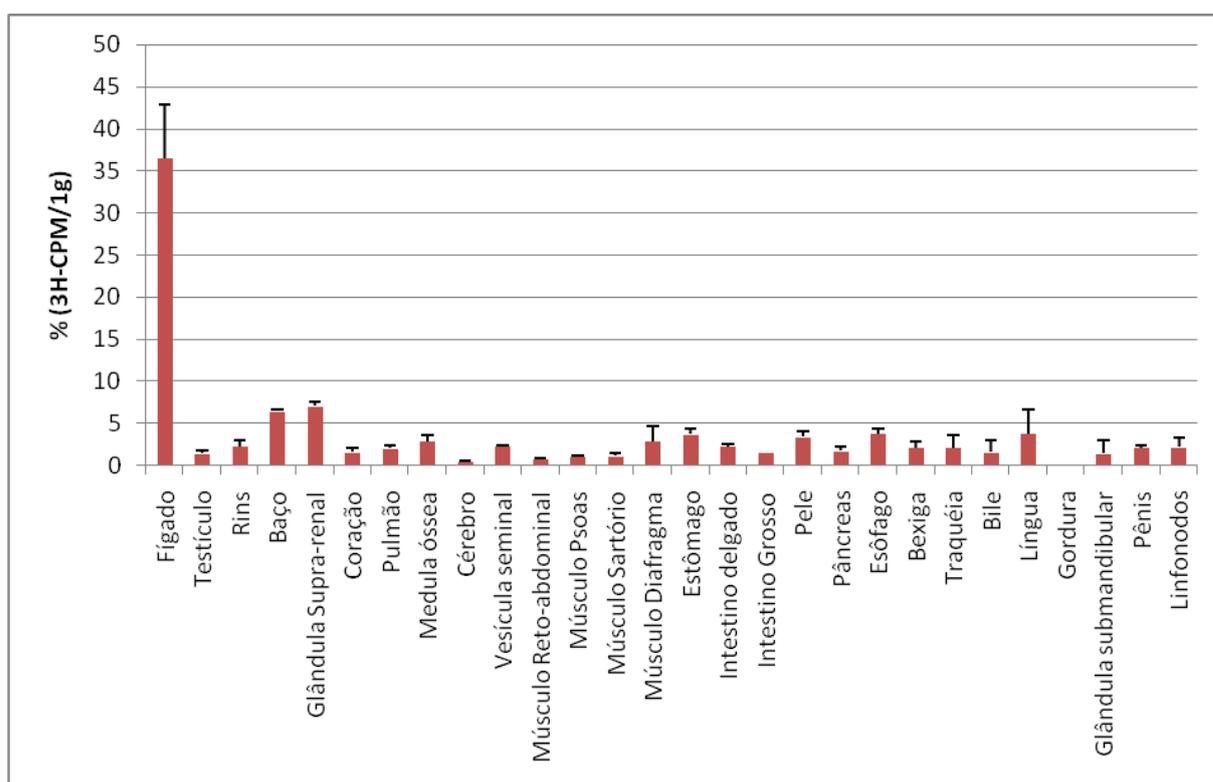
Na figura abaixo podemos observar comparativamente as diferenças quantitativas de pêlo em dois animais, sendo um do grupo EXP2, o qual recebeu o paclitaxel associado à nanoemulsão e um outro animal pertencente ao grupo CP2, no qual foi administrado o paclitaxel na versão comercial, com uma perda significativa do pêlo corporal.



**Figura 7** - Característica do pêlo de dois diferentes animais ao final do período experimental. (A) e (B) – Animal pertencente ao grupo EXP2. (C) e (D) – Animal pertencente ao grupo CP2.

### 4.3 ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA NANOEMULSÃO LDE EM *Cebus apella*

Três animais da espécie *Cebus apella* adultos, do sexo masculino, saudáveis, com média de peso de 3,410kg (desvio padrão de 0,028), foram utilizados para a análise da biodistribuição tecidual da LDE (Grupo CPB), através da retirada pós-eutanásia de diferentes órgãos, pesagem e extração lipídica para quantificação dos diferentes lipídios marcados radioativamente ( $[^3\text{H}]$ -colesterol éster) incorporados à nanopartícula. Os resultados estão expressos em porcentagem de radioatividade injetada por grama de tecido, apresentados na Figura 8.

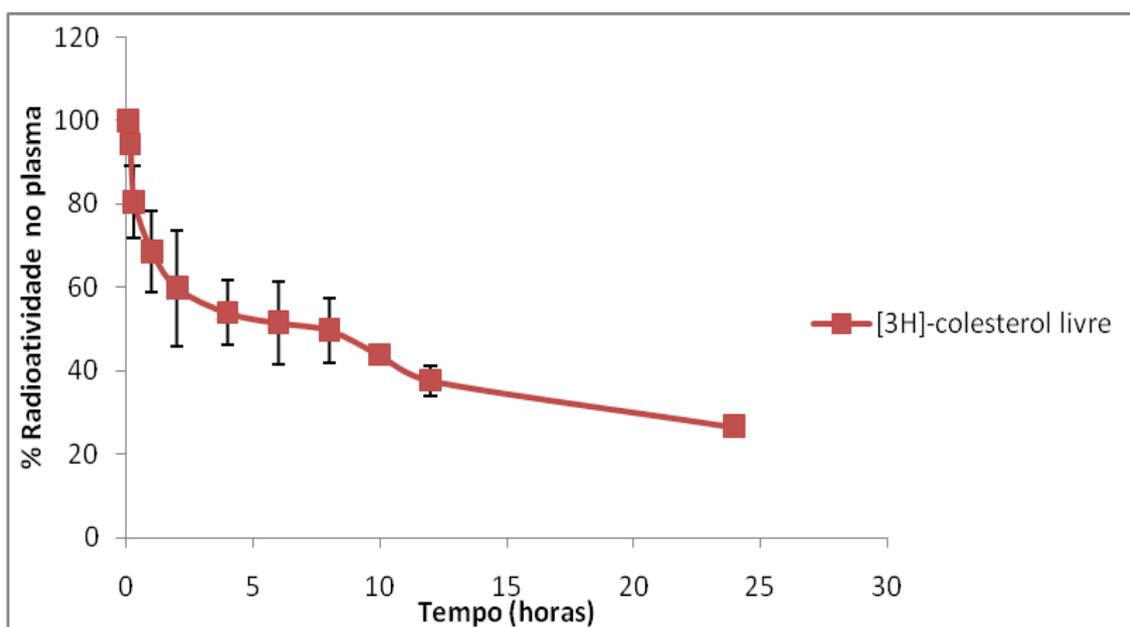


**Figura 8** – Biodistribuição tecidual da LDE em *Cebus apella*, através da captação tecidual de  $[^3\text{H}]$ -colesterol éster injetado pela via endovenosa após 24 horas.

No geral a maioria dos órgãos apresentou níveis de captação abaixo de 5%, com exceção do fígado (captação de 36,41%), baço (captação de 6,42%) e da glândula supra-renal (captação de 7,04%).

#### 4.4 ANÁLISE DA CINÉTICA DA NANOEMULSÃO LDE MARCADA COM [<sup>3</sup>H]-COLESTEROL ÉSTER EM *Cebus apella*

Os resultados observados na cinética plasmática não mostraram diferença estática significativa entre os animais nos valores expressos (média ± DP), demonstrando curva de perfil bioexponencial com um rápido decaimento inicial seguido de decaimento mais lento, a qual pode ser observada na Figura 9. Em relação aos valores obtidos de TFR ( $0,0564 \pm 0,0052$ ), e das taxas fracionais de transferência  $K_{1,0}$  ( $0,429 \pm 0,2275$ );  $K_{1,2}$  ( $1,0833 \pm 0,33892$ ) e o  $K_{2,0}$  ( $0,0346 \pm 0,01188$ ), também não houve diferença estática em relação aos animais analisados.



**Figura 9** – Curva de decaimento cinético do [<sup>3</sup>H]-colesterol livre plasmáticos de LDE em *Cebus apella*.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO

Os animais do grupo CN tiveram seus parâmetros hematológicos considerados normais, não apresentando diferença estatisticamente significativa, considerando sempre  $p < 0,05$ , ao serem comparados aos valores de normalidade para macacos da espécie *Cebus apella* mantidos em cativeiro (NAVES et al., 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ et al., 2008).

Com base na análise estatística dos padrões hematológicos foi possível chegar a uma avaliação do estado de saúde dos animais submetidos ao experimento, onde pode se observar que houve alteração significativa dos componentes do eritrograma e do leucograma, como linfócitos, monócitos e neutrófilos.

Na análise específica do eritrograma podemos observar as seguintes alterações: Os valores da hemoglobina no grupo CP1 (12,45) tiveram média significativamente menor quando comparada com o grupo EXP1 (14,46) e EXP2 (14,18); os valores de média do hematócrito do grupo CP1 (38,96) foram significativamente menores quando comparado ao EXP1 (43,80); já os valores obtidos do HCM dos grupos CP1 (24,13) e CP2 (23,75) foram significativamente menores ao serem comparados com a média dos valores do grupo EXP2 (24,98). Em relação à comparação de médias do parâmetro RDW entre os grupos, observou-se que os valores encontrados nos grupos CP1 (13,38) e CP2 (13,0) apresentaram-se significativamente maiores em comparação aos grupos CN (11,2) e EXP1 (11,34) e EXP2 (11,50).

Ao avaliarmos os dados observados no leucograma podemos ressaltar as seguintes alterações:

Na análise da média de leucócitos, os valores obtidos nos grupos EXP1 (5,26) e EXP2 (4,99) foram significativamente menores quando comparados ao grupo CN (7,91); na análise da média de porcentagem do neutrófilo os grupos EXP1 (36,69) e EXP2 (40,24) apresentaram médias significativamente menores quando comparadas ao grupo CN (57,62). O grupo CP1 (57,39) também apresentou média significativamente maior quando comparado com o grupo EXP1 e EXP2. Na comparação entre as médias da porcentagem de linfócitos os grupos EXP1 (56) e EXP2 (54,84) tiveram valores significativamente maiores quando comparados com os grupos CN (30,07) e CP1 (36,32) e CP2(40,36).

Ao serem comparados os valores das médias das porcentagens dos monócitos entre os grupos, verificou-se que o CP1 (8,40) e CP2 (11,52) apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com os grupos CN (6,66) e EXP1 (5,12) e EXP2 (23,43). Os valores de porcentagem de basófilo no grupo EXP1 (1,85) apresentaram diferença significativamente maior quando comparamos o grupo CN (0,63).

A observação quantitativa do plaquetograma apresentou os seguintes valores: média das plaquetas do grupo CP2 (275,5) considerada significativamente maior ao ser comparada ao grupo e EXP1 (218,72) e EXP2 (200,93) e os valores de VPM do grupo CP1 (14,56) teve valores significativamente maiores em relação ao grupo CP2 (11,70) e o grupos EXP1 (12,32) e EXP2 (12,36).

Além da análise dos valores de médias dos parâmetros hematológicos citados anteriormente foram analisados, sem apresentar diferença significativa entre os grupos, os seguintes parâmetros: hemácias, MCV, MCHC e eosinófilo. Os valores obtidos na análise dos padrões hematológicos são descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos.

<b>PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS</b>	<b>CN</b>	<b>EXP1 (175 mg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>EXP2 (250mg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>CP1 (175mg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>CP2 (250mg/m<sup>2</sup>)</b>
	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>
Hematócrito (%)	42,72 ± 1,69	43,80 ± 2,05	42,80 ± 3,11	38,96 ± 2,26 <sup>1</sup>	41,21 ± 0,49
Hemácias (mm <sup>3</sup> ) X10 <sup>6</sup>	5,89 ± 0,38	5,75 ± 0,24	5,66 ± 0,35	5,19 ± 0,23 <sup>1</sup>	5,57 ± 0
Hemoglobina (G/DI)	14,2 ± 0	14,46 ± 0,28	14,18 ± 1,06	12,45 ± 0,21 <sup>2</sup>	13,28 ± 0,35
VCM (u <sup>3</sup> )	73,22 ± 2,12	76,14 ± 0,21	75,91 ± 0,63	75,48 ± 0,84	73,9 ± 0,70
HCM (uug)	24,4 ± 1,69	25,12 ± 0,49	24,98 ± 0,28	24,13 ± 1,62 <sup>2</sup>	23,75 ± 0,70 <sup>2</sup>
CHCM (%)	32,27 ± 1,34	33,05 ± 0,77	33,22 ± 0,07	31,97 ± 2,47	32,18 ± 1,27
RDW	11,2± 0,21	11,34 ± 0,91	11,50 ± 1,12	13,38 ± 1,06 <sup>3</sup>	13 ± 1,62 <sup>3</sup>
Leucócitos	7,91 ± 4,22	5,26 ± 1,26 <sup>4</sup>	4,99 ± 1,73 <sup>4</sup>	5,12 ± 3,14	5,45 ± 1,56 <sup>2</sup>
Basófilo (%)	0,63± 0,13	1,85 ± 2,01 <sup>4</sup>	1,17 ± 1,96	1,28 ± 0,70	1,55 ± 2,26
Eosinófilo (%)	0,01±0	0,11±0,13	0,17±0,16	0,02±0,02	0,10±0,05
Neutrófilo (%)	57,62 ± 0,84	36,69 ± 8,34 <sup>4</sup>	40,24 ± 9,54 <sup>4</sup>	57,39 ± 17,39 <sup>2</sup>	45,66 ± 20,01
Linfócitos (%)	30,07 ± 0,07	56 ± 7,28 <sup>5</sup>	54,84 ± 4,45 <sup>5</sup>	36,32 ± 14,56	40,36 ± 13,08
Monócito(%)	6,66±0,96	5,12±1,08	3,43±3,31	8,40±2,12 <sup>3</sup>	11,52±4,78 <sup>3</sup>
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /m/mm <sup>3</sup> )	238,75 ± 91,21	218,72 ± 61,51 <sup>1</sup>	200,93 ± 21,21	224,83 ± 7,77 <sup>1</sup>	275,5 ± 26,16 <sup>2</sup>
VPM(fl)	13,4 ± 0,28	12,32 ± 0,56	12,36 ± 0,77	14,56 ± 0,77 <sup>7</sup>	11,70 ± 0,91

1 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (1).

2 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (1 e 2).

3 - p<0.05 em relação ao controle negativo e grupo experimental(1 e 2).

4- p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.

5- p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e controle positivo (1 e 2)

6 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (2)

7 - p<0.05 em relação aos grupos controle positivo 2 e experimental (1 e 2)

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO

Na análise dos valores das médias do perfil bioquímico foram verificados que os seguintes parâmetros: creatinina, ácido úrico, cálcio, bilirrubina total, proteína total, albumina e globulina não apresentaram diferença significativa. Já os marcadores bioquímicos que apresentaram diferença estatística significativa, as alterações observadas são descritas a seguir:

Os valores de uréia encontrados no grupo EXP1 (32,61) apresentou-se significativamente maior quando comparado ao grupo EXP2 (19,94) e CP1 (21,25), sendo que o grupo CP2 (28,33) apresentou valor significativamente maior quando comparado com o grupo EXP2.

Quanto à análise do controle glicêmico (glicose) e a composição plasmática dos lipídeos (colesterol total, HDL-C e triglicerídeos), observou-se que:

Em relação aos valores da glicose, o CP2 (106,58) apresentou médias significativamente maiores quando comparado aos grupos EXP1 (63,22), EXP2 (74,88) e CP1 (86,41), já o grupo EXP2 (74,88) apresentou valores significativamente maiores ao serem comparados ao grupo EXP1 (63,22).

A concentração plasmática de colesterol, no grupo EXP2 (203,08) foi maior, em relação ao CN (113,00), assim como os grupos EXP1 (91,30) e EXP2 (92,25) também apresentou níveis de HDL-C significativamente maiores em relação ao CN (59,66). O triglicerídeo teve seus valores alterados no CP2 (104,83), sendo significativamente maior quando comparado aos grupos EXP1 (58,69) e EXP2 (67,27).

Quanto à análise do AST e ALT os valores de média destes parâmetros respectivamente apresentados pelos grupos CP1 (11,41/6,75) foram significativamente menores ao serem comparados com os valores dos grupos CN (20,32/14,33), EXP1 (18,66/11,16) e EXP2 (18,00/ 12,56). A avaliação do ALT revelou que o grupo CP2 (6,08) também apresentou valores menores quando comparados aos grupos CN, EXP1 (11,16) e EXP2 (12,56).

Os valores de média do parâmetro GGT apresentaram-se de forma significativamente menores nos grupos CP1 (32,08) ao serem comparados com os demais grupos. O grupo CP2 (67,83) também demonstrou valores discordantes maiores quando comparado ao grupo EXP2 (51,47) e CN (38,67).

Em relação à lipase, os CP1 (14,50) e CP2 (13,17) apresentaram valores menores de forma significativa, quando comparados ao grupo CN (22,67) e EXP2 (19,28). Já a fosfatase alcalina no grupo EXP2 (141,64) exibiu valores de média menores em relação ao grupo EXP1 (277,74), CP1 (243,75) e CP2 (241,67).

Os valores obtidos na análise dos padrões bioquímicos são descritos na Tabela 6.

**Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos.**

<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</b>	<b>CN</b>	<b>EXP1 175 mg/m<sup>2</sup></b>	<b>EXP2 250mg/m<sup>2</sup></b>	<b>CP1 (175mg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>CP2 (250mg/m<sup>2</sup>)</b>
	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>	<b>MÉDIA ± DP</b>
<b>Ureia (mg/dl)</b>	26,66 ± 16,23	32,61 ± 9,89 <sup>3</sup>	19,94 ± 2,50 <sup>4</sup>	21,25 ± 5,25	28,33 ± 11,31
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,97 ± 0,01	0,87 ± 0,08	0,83 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,89 ± 0,07
<b>Ácido úrico</b>	2,46 ± 0,49	1,90 ± 0,14	1,90 ± 0,56	1,95 ± 0,42	1,70 ± 0,35
<b>Glicose</b>	66,66 ± 17,67	63,22 ± 19,79	74,88 ± 35,35 <sup>2</sup>	86,41 ± 45,25 <sup>2</sup>	106,58 ± 83,43 <sup>1</sup>
<b>Colesterol</b>	113,00 ± 28,99	181,25 ± 23,33	203,08 ± 18,38 <sup>5</sup>	166,91 ± 76,36	152,75 ± 1,41
<b>HDL-C</b>	59,66 ± 5,65	91,30 ± 1,41 <sup>5</sup>	92,25 ± 21,92 <sup>5</sup>	65,66 ± 19,79	75,08 ± 0,70
<b>Triglicerídeos</b>	58,66 ± 40,30	58,69 ± 7,77	67,27 ± 1,41	77,00 ± 34,64	104,83 ± 40,30 <sup>6</sup>
<b>AST/TGO (U/L)</b>	20,32 ± 9,71	18,66 ± 8,65	18,00 ± 8,58	11,41 ± 3,20 <sup>7</sup>	14,17 ± 3,95
<b>ALT/TGP (U/L)</b>	14,33 ± 8,02	11,16 ± 8,13	12,56 ± 7,71	6,75 ± 1,76 <sup>7</sup>	6,08 ± 0,29 <sup>7</sup>
<b>GGT (U/L)</b>	38,67 ± 20,55	56,50 ± 26,17	51,47 ± 28,54	32,08 ± 8,67 <sup>8</sup>	67,83 ± 10,59 <sup>2</sup>
<b>Lipase</b>	22,67 ± 11,15	17,69 ± 3,12	19,28 ± 5,09	14,50 ± 4,40 <sup>9</sup>	13,17 ± 3,86 <sup>7</sup>
<b>Fosfatase alcalina</b>	199,33 ± 121,33	277,74 ± 96,85	141,64 ± 53,54 <sup>10</sup>	243,75 ± 98,75	241,67 ± 60,91
<b>Proteína total</b>	6,06 ± 0,07	7,18 ± 0,14	7,04 ± 0,14	6,78 ± 2,54	6,75 ± 0,07
<b>Albumina</b>	5,70 ± 1,97	4,77 ± 1,40	4,59 ± 0,14	3,95 ± 1,48	5,10 ± 1,12
<b>Globulina</b>	1,70 ± 0,70	2,49 ± 0,98	2,46 ± 1,06	1,85 ± 0,49	1,60 ± 0,90
<b>Bilirrubina Total</b>	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0
<b>Cálcio</b>	9,97 ± 0,19	8,99 ± 0,36	9,27 ± 0	9,18 ± 0,13	9,24 ± 0,33

1 – p < 0,05 em relação ao grupo EXP1, EXP2 e CP1; 2 – p < 0,05 em relação ao grupo EXP1; 3 – p < 0,05 em relação ao grupo EXP2 e CP1; 4 – p < 0,05 em relação ao grupo CP2; 5 – p < 0,05 em relação ao grupo CN; 6 – p < 0,05 em relação ao grupo EXP1 e EXP2; 7 – p < 0,05 em relação ao grupo CN, EXP1 e EXP2; 8 – p < 0,05 em relação a todos os outros grupos; 9 – p < 0,05 em relação ao grupo CN e EXP2; 10 – p < 0,05 em relação ao grupo EXP1, CP1 e CP2.

#### 4.7 ANÁLISE DA ANATOMIA PATOLÓGICA E MORFOLOGICA

Na avaliação macroscópica dos órgãos não foram verificadas alterações significativas nos órgãos dos grupos EXP1 e EXP2. Já no grupo CP2, tratado com a maior dose do fármaco comercial, o animal apresentou as seguintes alterações macroscópicas: linfonodos e hemisférios cerebrais estavam com aspecto congesto.

Em relação aos achados histopatológicos, em todos os grupos foi observada manutenção da arquitetura dos tecidos e integridade das estruturas microscópicas de cada um, como por exemplo, glomerulos renais, folículos linfoides, glândulas salivares seromucosas, células principais e parietais, substância cinzenta e branca, epitélio respiratório, fibras musculares esqueléticas e cardíacas, epiderme e derme. Não foram visualizadas alterações sugestivas de dano celular e tecidual irreversíveis na maioria dos órgãos analisados.

O grupo EXP1 que recebeu a menor dose da LDE-PTX (175 mg/m<sup>2</sup>), comportou-se de forma semelhante ao grupo CN, porém alterações vasculares representadas por ectasia e hemorragia foram visualizadas nos seguintes órgãos e tecidos: músculo sartório, psoas, diafragma e reto abdominal (2 animais), coração (3 animais), esôfago, pâncreas e estômago. Na língua foi observada melanose basal. Foi encontrada hiperplasia linfóide em dois animais deste grupo, enquanto que no intestino grosso foi observada a presença de hiperplasia, porém todos os animais de todos os grupos estudados apresentaram esta alteração. No baço, a presença de congestão de polpa vermelha foi verificada além da ectasia. Já no rim, um dos animais mostrou importante hemorragia glomerular e tubular além da presença de cilindro-hialino.

Ao se analisar o grupo EXP2 que recebeu a maior dose da LDE-PTX (250 mg/m<sup>2</sup>), foram observadas, igualmente, alterações vasculares representadas por ectasia e hemorragia em todos os tecidos musculares esqueléticos e no coração, língua, esôfago, estômago, traqueia, vesícula biliar, pâncreas e pênis (2 animais), porém estas alterações apresentaram-se em maior frequência e com maior intensidade quando comparado ao grupo EXP1 que recebeu a menor dose de LDE-PTX. Além dessas alterações foram verificados focos inflamatórios na mucosa e submucosa do estômago, no pulmão e no rim (2 animais), assim como hiperplasia linfóide no intestino delgado (3 animais). No fígado, um dos animais apresentou possíveis sinais de hepatotoxicidade, observada através da esteatose micro e macrovesicular com área de fibrose, além de hemorragia

sinusoidal, tumefação celular e necrose focal de hepatócitos. Da mesma maneira, na língua foi observada melanose basal e, no baço, presença de congestão de polpa vermelha e ectasia. Já no rim, um dos animais mostrou hemorragia glomerular e tubular intensa, congestão vascular, cilindro-hialino além de necrose nefrotóxica focal.

Com relação ao grupo CP1 e CP2, as alterações histopatológicas nos órgãos destes animais mostraram-se semelhantes nas duas doses estudadas, as quais se aproximaram dos resultados vistos no grupo EXP2 que recebeu a LDE-PTX (250 mg/m<sup>2</sup>). Ectasia e hemorragia em tecidos musculares, coração, esôfago, estômago, pulmão e cérebro. Destacam-se a hemorragia sinusoidal e esteatose microvesicular no fígado, e no rim, hemorragia glomerular e tubular, além de cilindro-hialino e presença de células inflamatórias mononucleares-intersticial. Foram visualizadas também congestão de polpa vermelha e ectasia no baço, e focos hemorrágicos na pele.

Os resultados da análise histopatológica dos tecidos e órgãos estudados encontram-se descritos nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos do sistema digestório, sistema respiratório e linfático.

Grupos	CN			CP1	CP2	EXP1			EXP2		
	A1	A2	A3	A1	A1	A1	A2	A3	A1	A2	A3
<b>Glândula Submandibular</b>											
Ectasia	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemorragia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Focos inflamatórios	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esôfago</b>											
Ectasia/Hemorragia	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Focos inflamatórios	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Língua</b>											
Melanose basal	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Ectasia/Hemorragia	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Células inflamatórias	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>Pâncreas</b>											
Ectasia/Hemorragia	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Estômago</b>											
Ectasia/Hemorragia	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Células Inflamatórias	-	-	-	++	-	+	-	-	+	+	+
<b>Intestino delgado</b>											
Hiperplasia linfoide	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
<b>Intestino grosso</b>											
Hiperplasia linfoide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Traquéia</b>											
Ectasia/Hemorragia	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>Pulmão</b>											
Ectasia	+	+	+	++	+	-	+	+	+	-	-
Hemorragia	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Espessamento de paredes alveolares	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Afilamento de paredes alveolares	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Células inflamatórias	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+	+
<b>Baço</b>											
Hiperplasia de polpa branca	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Megacariócitos	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Congestão de polpa vermelha	+	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+++	+++
Hemorragia	-	-	-	+	+	-	-	+	-	++	-
Ectasia	-	-	-	+	+	+++	+++	+	-	+	+++
<b>Linfonodos</b>											
Hiperplasia linfoide	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Ectasia	-	-	+	++	+	+	-	+	-	+	+
Hemorragia	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-	+
Fibrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

\*As alterações histopatológicas foram tiveram como critérios de graduação a seguinte escala: ausente (-), leve (+), Moderada (++) e intensa (+++). Os animais pertencentes a cada grupo de estudo foram denominados como "A", seguido de um algoritmo arábico.

**Tabela 8** - Análise histopatológica dos órgãos e tecidos do sistema hepato-biliar, sistema excretor, reprodutor, tegumentar e nervoso.

Grupos	CN			CP1	CP2	EXP1			EXP2		
	A1	A2	A3	A1	A1	A1	A2	A3	A1	A2	A3
<b>Vesícula biliar</b>											
Ectasia/Hemorragia	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<b>Fígado</b>											
Desorganização de cordões de hepatócitos	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Congestão veia centro-lobular	+	+	-	+	-	-	-	++	-	-	-
Hiperplasia células de Kupffer	+	+	+	+	++	-	-	++	-	-	-
Degeneração hidrópica	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	-	-
Necrose focal de hepatócito	-	+	-	-	-	+++	-	+	+	-	-
Hemorragia sinusoidal	+	+	-	+	++	+	+	++	+	+	+++
Focos inflamatórios	+	+	+	+	++	+	-	-	-	+	-
Tumefação de hepatócitos	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	+++
Esteatose microvesicular	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+++
Esteatose macrovesicular	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
Fibrose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<b>Bexiga</b>											
Ectasia/Hemorragia	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Supra-renal</b>											
Ectasia/Hemorragia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Vesícula seminal</b>											
Ectasia/Hemorragia	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Rim</b>											
Tumefação do epitélio tubular	-	+	+	+	+	-	+	++	-	-	-
Hemorragia tubular e Intersticial	+	+	-	++	+++	+	+	+++	+	++	++
Congestão vascular	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Cilindro-hialino	-	-	-	+	+	+	-	+++	++	+	+
Hemorragia glomerular	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	++
Células inflamatórias mononucleares	-	-	-	-	++	+	+	-	-	+	+
Necrose nefrotóxica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
<b>Testículo</b>											
Desorganização da arquitetura dos túbulos seminais	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Estereocílios	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Degeneração hidrópica	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Hemorragia/Ectasia	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Degeneração vacuolar de células do epidídimo	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Pênis</b>											
Ectasia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>Pele</b>											
Melanose focal	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Hemorragia	++	+	-	++	++	-	-	-	-	-	-
<b>Cérebro</b>											
Hemorragia	-	+	+	+	-	+	++	-	++	++	++
Ectasia	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

As alterações histopatológicas tiveram como critérios de graduação a seguinte escala: ausente (-), leve (+), Moderada (++) e intensa (+++). Os animais pertencentes a cada grupo de estudo foram denominados como “A”, seguido de um algoritmo arábico.

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo principal na quimioterapia do câncer é destruir seletivamente as células tumorais sem atingir prejudicialmente os tecidos e órgãos normais. Portanto, a utilização de veículos capazes de transportar drogas para as células alvo vêm sendo objeto de inúmeras pesquisas. Na última década, vários autores sugerem a possibilidade do uso de LDL como carreador de fármacos antitumorais, com base no aumento da expressão de receptores de LDL em diversos tipos de câncer. Embora sua utilização tenha sido um sucesso em ensaios experimentais, as dificuldades no isolamento de LDL do plasma, e do manuseio da preparação, além do fato desta partícula apresentar baixa meia-vida, a tornam inconveniente para a utilização no tratamento de rotina (MARANHÃO et al., 1994). A investigação do uso da LDE como um direcionador de agentes antineoplásicos as células tumorais foram então propostas, após a confirmação que a mesma se concentrava em tecidos neoplásicos (MARANHÃO et al., 1994). A utilização desta partícula em estudos pré-clínicos busca, atualmente, pesquisar a toxicidade associada à LDE. Desta forma o presente estudo buscou avaliar, de forma ampla, a toxicidade da LDE em primatas não humanos, de forma a esclarecer os possíveis benefícios desta partícula, associada ao paclitaxel, em comparação com a forma comercial deste fármaco, sendo este um passo importante para sua futura comercialização.

### 5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Na análise do estado corpóreo dos animais, através do acompanhamento do peso dos mesmos, observamos que somente os animais dos grupos CP1 e CP2, tratados com o PTX-Comercial, apresentaram diminuição de peso durante a realização do tratamento. Quando comparados com os animais do grupo CN, bem como, com os valores relatados na literatura para a média de peso normal de macacos da espécie *Cebus apella* (FERREIRA, 2009).

A perda de peso destes animais pode estar, em grande parte, associada ao provável processo da quimioterapia, no qual a desnutrição, perda ponderal, náusea,

vômito e alopecia são manifestações clínicas muito comuns, decorrente dos efeitos colaterais do paclitaxel (EXTRA et al., 1993; SLICHENMYER & VON HOF, 1993; WANG et al., 2011). Os animais deste grupo, que receberam o fármaco na sua forma comercial, apresentaram além da alteração do peso, perda progressiva dos pêlos ao longo dos ciclos de quimioterapia, assim como, a presença de diarreia e êmese.

A terapia nutricional é de extrema importância para manter o organismo do paciente preparado para a agressividade do tratamento e para a reestruturação do organismo pós-quimioterapia, por isso, a redução de efeitos colaterais gastrointestinais e de alteração no peso, podem contribuir, de forma satisfatória, para a evolução desses pacientes, promovendo uma maior aceitação dos alimentos propostos (CUPARI, 2009). Nos grupos experimentais 1 e 2, não foram observadas alterações gastrointestinais significativas, sendo que os animais deste grupo mantiveram sua rotina alimentar e consequentemente não houve alteração no peso dos mesmos.

Sinais de toxicidade cutânea foram observados, nos grupos CP1 e CP2, que receberam a forma comercial (PTX) a partir do segundo ciclo de quimioterapia, percebidas através de lesões inflamatórias descamativas. Essa sintomatologia é descrita em estudos recentes, que afirmam que sinais de toxicidade cutânea são observados em cerca de 65% dos casos de pacientes submetidos a quimioterapia antineoplásica, essas alterações incluem alopecia, reações de hipersensibilidade e alterações ungueais (SCHWARTZ et al., 2005). Entretanto, faltam dados detalhados sobre essas reações, devido maioria dos casos serem tratada por oncologista, descrevendo o quadro sucintamente como “reação cutânea” (DONATI & CASTRO, 2011). Além disso, a maioria dos estudos analisam a toxicidade da poliquimioterapia, tornando difícil a confirmação de qual fármaco está causado as reações cutâneas. Nos grupos EXP1 e EXP2, tratados com a LDE-PTX, estas alterações cutâneas não foram observadas em nenhum dos animais, ficando clara a ausência de toxicidade neste tecido.

## 5.2 BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL E CINÉTICA PLASMÁTICA DA NANOEMULSÃO LDE

O estudo farmacocinético analisou o perfil de depuração plasmática e biodistribuição do LDE-PTX em *Cebus apella*, e demonstrou decaimento característico

dos radiotraçadores de maneira semelhante quando comparada aos estudos com LDL e LDE em outros organismos (RODRIGUES et al., 2005). A inclinação da curva mostrou que nos primeiros 60 minutos há um decaimento rápido, sugerindo a sua distribuição entre os tecidos, diminuindo a quantidade de nanoemulsão circulante.

Quando a LDE é injetada na corrente sanguínea, ele adquire Apo E a partir das lipoproteínas nativas e se liga aos receptores de LDL que reconhecem tanto Apo B e Apo E (MARANHÃO et al., 1993; MARANHÃO et al., 1994). Pelo fato da Apo E ter uma maior afinidade para o receptor de LDL do que apo B, o LDE é removido mais rapidamente do compartimento do plasma de LDL nativa. Este efeito é vantajoso porque reduz o tempo necessário de observação (MARANHÃO et al., 1993; MARANHÃO et al., 1997; HIRATA et al., 1999), além disso os dados observados já foram validados em vários experimentos em animais com a LDE (MARANHÃO et al., 1993; MARANHÃO et al., 1997) e em estudos clínicos, em que o comportamento cinético da nanoemulsão foi semelhante à esperada para a LDL nativa (SANTOS et al., 2003; COUTO et al., 2007; ADES et al., 2001; HUNGRIA et al., 2004; DANTAS et al., 2010; BERTATO et al., 2012).

A cinética plasmática observada também está de acordo com o descrito em estudos anteriores, que demonstraram que a associação do paclitaxel com a LDE mudou a farmacocinética do fármaco, em comparação com a formulação à base de cremophor EL (forma comercial). A proporção de Cremophor EL utilizado para solubilizar o paclitaxel induz alterações farmacocinéticas, diminuindo seu tempo de meia-vida (TEM TIJE et al., 2003; DIAS, 2007), enquanto a preparação do oleato de paclitaxel associado a LDE tem maior tempo de meia vida plasmático ( $T_{1/2}$ ) e área sob a curva (AUC). Isto sugere que a mesma dose de paclitaxel associado à nanoemulsão é mantida em maiores concentrações por um período mais longo de tempo. Como a ação terapêutica do paclitaxel é altamente tempo dependente e sua capacidade de causar morte celular é de acordo com a duração da exposição (GOBLE & BEAR, 2003), um maior tempo de circulação na corrente sanguínea atribuído ao LDE-oleato de paclitaxel pode oferecer uma vantagem adicional a esta preparação. Por conseguinte, a farmacocinética alcançada pela associação com a LDE pode ampliar seu espectro de ação farmacológica (WOO et al., 1996; DIAS et al., 2007)

A compreensão clara da biodistribuição e farmacocinética é imperativa ao se desenvolver um sistema de “*drug delivery*” baseado em nanopartículas. Tal conhecimento é valioso para otimizar a avaliação do sistema de entrega no que diz

respeito à eficácia terapêutica e principalmente a toxicidade sistêmica. A biodistribuição do LDE-PTX, segundo parâmetros farmacocinéticos analisados, mostrou um acúmulo da radioatividade em órgãos que expressam maior quantidade de receptores de LDL, em especial o fígado, principal órgão relacionado ao metabolismo lipídico, confirmando sua captação via receptores de LDL (FAVERO et al., 2010). Outro dado importante está relacionado ao grande número de órgãos analisados, o que até o momento não havia sido realizado, demonstrando dados que ainda não tinham sido observados, como a baixa concentração da LDE em medula óssea e cérebro. Estes achados levam a inferir que a menor concentração da LDE-oleato de paclitaxel na medula óssea, quando comparada à formulação comercial, pode levar à diminuição da mielotoxicidade, que é um dos principais efeitos colaterais do paclitaxel (PING MA & MUMPER, 2013).

### 5.3 PADRÕES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

A literatura demonstra que células do sangue circulante de mamíferos, inclusive de primatas, constituem um ótimo sistema para testar uma substância quanto à sua capacidade em produzir danos no organismo. Estas células sanguíneas constituem ótimas amostras para variados sistemas de tratamento, pois pertencem a um tecido que está em contato direto e constante com quase todos os outros que compõem o organismo, e que além de amplamente disponíveis e facilmente coletadas, possibilitam a realização de vários testes e pós-testes com respostas que geralmente são de fácil e rápida análise (BASES et al., 1979; MORALES-RAMÍREZ et al., 2004; HOFFBRAND et al., 2013). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, células do sistema sanguíneo serviriam como um sistema sentinela para avaliação de possíveis riscos (RABELLO-GAY et al., 1991).

O conhecimento dos padrões hematológicos e bioquímicos é essencial para determinar os limites entre saúde e doença e para a compreensão das alterações produzidas pela patogenicidade de diversos agentes e/ou substâncias. Estas análises de hematologia e bioquímica auxiliam no diagnóstico e prescrição de novas terapias clínicas contribuindo para o diagnóstico diferencial em seres humanos e em animais

utilizados como modelos de laboratório, bem como na fisiologia comparativa e etiológicas em estudos (RIVIELLO & WIRZ, 2001; NAVES et al., 2006).

Os resultados obtidos nas análises dos padrões hematológicos e bioquímicos no grupo CN não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao serem comparados com os valores relatados na literatura como padrões de normalidade para estes parâmetros em *Cebus apella* (RIVIELLO & WIRZ, 2001; NAVES et al., 2006), com exceção para os valores de plaquetas, que estavam diminuídos em relação aos valores descritos como normais na literatura, mas dentro dos padrões de normalidade adotados pelo CENP.

Na análise do eritograma os grupos EXP1 e EXP2 tratados com LDE-PTX não apresentaram diferença significativa ao serem comparados ao CN. Já o grupo CP1, demonstrou uma diminuição significativa dos valores de hematócrito e hemoglobina, com o RDW aumentado nos grupos CP1 e CP2. Esses dados caracterizam uma possível anemia adquirida por indução medicamentosa e uma discreta anisocitose relacionada com o declínio da saúde do animal pela ação do fármaco na sua forma comercial (HAN et al., 2014; NAKAMURA et al., 2014; HOFFBRAND et al., 2013). Estes dados estão de acordo com a literatura, pois os principais efeitos adversos observados no tratamento com paclitaxel em humanos são: hipersensibilidade, neurotoxicidade, redução das defesas e anemia induzida por danos diretos aos eritrócitos (SIAU et al., 2006; PANIS et al., 2012), demonstrando assim uma possível vantagem do tratamento com a LDE-PTX em relação a versão atual presente no mercado.

Na série leucocitária, os neutrófilos sofreram um decréscimo, nos EXP1 e EXP2 comparado ao grupo CN, podendo estar relacionado com a diminuição da imunidade do animal associado à vinculação do fármaco. O índice de neutrófilos é utilizado como um dos parâmetros para a continuação ou suspensão dos ciclos de quimioterapia antineoplásica, de forma que se a contagem de neutrófilos basais estiver em valores absolutos menores que 1.000 células/mm<sup>3</sup>, o tratamento é suspenso ou adiado (BRANDÃO et al., 2010; HAMAGUCHI et al., 2005). Nos resultados encontrados nos grupos que utilizaram a LDE-PTX apesar de ser observada diminuição percentual dos neutrófilos, os valores absolutos estavam acima do mínimo aceitável (aproximadamente 1960 células/mm<sup>3</sup>). Outro resultado importante relacionado ao número relativo e absoluto de neutrófilos foi encontrado nos grupos CP1 e CP2, onde houve uma diminuição significativa do número destas células, chegando, no 5º ciclo de quimioterapia, aos valores de 579 e 750 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente. Estes valores

estavam abaixo do mínimo aceitável para a continuação do tratamento; porém, ao final do 6º ciclo de quimioterapia com a forma comercial (PTX), observou-se um aumento no número dos neutrófilos destes animais, que continuaram, porém, abaixo dos índices de normalidade (RIVIELLO & WIRZ, 2001; NAVES et al., 2006).

A neutropenia está dentro dos principais tipos de reações adversas hematológicas induzidas pelo quimioterápico paclitaxel, além da diminuição do número total de leucócitos e plaquetas (SOMA et al., 2009; HUANG et al., 2011).

Já os basófilos tiveram um aumento no grupo EXP1 em relação ao controle negativo, o que pode caracterizar uma possível reação alérgica ao fármaco, já que um dos efeitos colaterais característicos do PTX são reações de anafilaxia (reações alérgicas) e reações graves de hipersensibilidade (PRIETO GARCÍA et al., 2010; RAISCH et al., 2011; JOERGER, 2012).

Os linfócitos do grupo EXP1 e EXP2 tiveram seus valores aumentados em comparação ao grupo CP1 e CP2 mostrando que o sistema imune do grupo experimental não foi afetado de forma considerável e permaneceu ativo sem grandes alterações mesmo com a vinculação do quimioterápico LDE-PTX, reforçando os dados que comprovam que a associação LDE-PTX é estável, sendo sua toxicidade menor do que a forma comercial, possibilitando maior tolerabilidade do tratamento (RODRIGUES et al., 2005). Em estudos clínicos, pacientes tratados com TAXOL® apresentaram reações adversas relacionadas à medula óssea, como alterações das células brancas do sangue, trombocitopenia, anemia, infecções e hemorragia. (NAKAMURA et al., 2014).

Em reação aos parâmetros bioquímicos, até o momento não foi demonstrada relação entre a dose de paclitaxel e alterações na função hepática, em pacientes sem alterações hepáticas de base, havendo apenas raros relatos de necrose hepática e encefalopatia hepática (TAXOL, 2014). Os resultados obtidos neste estudo após a análise dos parâmetros bioquímicos da função hepática (AST, ALT e GGT), demonstraram estar dentro dos padrões de normalidade para a espécie, tanto nos grupos CP1 e CP2 tratados com a forma PTX comercial quanto nos grupos EXP1 e EXP2 tratados com a LDE-PTX. Este resultado permite ainda inferir a baixa hepatotoxicidade da LDE-PTX, pois apesar desta partícula apresentar alta afinidade pelo fígado, como demonstrado nos resultados de biodistribuição da LDE-PTX, a mesma não demonstrou causar alterações nas enzimas hepáticas.

Ao analisarmos a função renal (uréia e creatinina), observamos uma única alteração, que foi nos valores da ureia, onde o grupo EXP1 apresentou discreto aumento de valor quando comparado ao grupo CN, e o grupo EXP2 demonstrou diminuição neste parâmetro quando também comparado ao grupo CN, sendo que estas alterações não chegaram a ser estatisticamente significativas. A uréia é um dos índices que avaliam a filtração glomerular, pois a maior parte da uréia é excretada na urina através da filtração nos glomérulos. Assim, a redução na filtração tem como consequência o aumento da concentração de uréia (FETTMAN et al., 2004). Apesar de haver diferença nos valores de uréia nos grupos EXP1 e EXP2, estes ainda estão dentro dos padrões considerados normais para primatas da espécie *Cebus apella*, indicando que não houve alteração na taxa de filtração renal nos animais tratados com a LDE-PTX (MAHON & SHORTEN, 1997; GABRIEL et al., 2011).

Em relação aos níveis séricos da glicose, verificamos que este apresentou-se aumentado nos grupos CP1 e CP2 que receberam a versão comercial do paclitaxel, o que corrobora com o descrito por HOLANDA et al., (2008) que relatou um aumento deste parâmetro em pacientes que realizavam poliquimioterapia contendo o paclitaxel. A quimioterapia em pacientes com diabetes requer precauções, pois é demonstrado que alguns fármacos podem interferir nos valores séricos de glicose dos pacientes, prejudicando o controle desta doença (KRATZ & ELSADEK, 2012; BERTATO et al, 2012; BONASSA, 2012 referencias). Desta forma, este estudo demonstrou uma possível vantagem da utilização da quimioterapia com a LDE-PTX, já que neste tratamento não houve alteração significativa nos níveis de glicose sérica dos animais.

Ao observamos os resultados obtidos na composição plasmática dos lipídeos, verificamos aumento nos valores do colesterol nos grupos EXP1 e EXP2, em relação ao grupo CN, o que pode ser explicado pela própria composição da preparação LDE-PTX, que contém ésteres de colesterol e colesterol não esterificado (ALMEIDA et al., 2010). É importante ressaltar que apesar dessas alterações serem significativas, os valores encontrados estão dentro do valor padrão de normalidade para a espécie utilizada como modelo experimental neste estudo (RIVIELLO & WIRZ, 2001). No grupo CP2 o valor de triglicerídeos estava significativamente maior em comparação ao grupo CN, porém apesar da observação deste aumento os valores estavam dentro dos parâmetros de normalidade adotados para os animais da espécie *Cebus apella* (RIVIELLO & WIRZ, 2001).

#### 5.4 PADRÕES ANATOMIA PATOLÓGICA

Na análise macroscópica dos órgãos dos animais utilizados nesse experimento não foram verificadas alterações macroscópicas significativas nos órgãos dos grupos CN, EXP1, EXP2, CP1 e CP2. Contudo, pequenas alterações macroscópicas não significativas identificadas são características das diferenças fisiológicas normais entre animais pertencentes da mesma espécie (CALOSI et al., 2013).

Quanto à análise histopatológica, o grupo EXP1 que recebeu a menor dose da LDE-PTX (175 mg/m<sup>2</sup>), comportou-se de forma semelhante ao grupo CN, ambos apresentando alterações em sua maioria consideradas de baixa intensidade, representadas por ectasia e hemorragia em órgãos e tecidos como: músculo sartório, coração, esôfago, pâncreas e estômago. As alterações encontradas são consideradas reversíveis e devem ter sido provavelmente provenientes do próprio processo de eutanásia e coleta do material. (YAMAUCHI et al, 2013)

As alterações hepáticas encontradas nesta pesquisa, como hemorragia sinusoidal, tumefação dos hepatócitos, focos inflamatórios, esteatose micro e macrovesicular, que se apresentaram em todos os grupos do estudo, são de natureza reversível e muitas delas podem estar associadas ao metabolismo hepático, portanto não decorrentes da ação tóxica do PTX. Já foi descrito que este fármaco não apresenta, em doses terapêuticas, toxicidade hepática, não comprometendo a síntese, armazenamento e distribuição de ferro (TAXOL, 2014). Apesar de ter sido encontrada uma alteração irreversível (necrose focal dos hepatócitos) em animais dos grupos EXP1 e EXP2, tratados com a LDE-PTX, o que nos leva a inferir que esta alteração possivelmente já estava presente nestes animais antes do início dos tratamentos, sendo que a mesma não deve ser devida à utilização da LDE-PTX. Cabe ressaltar que antes do início deste estudo todos os animais passaram por tratamento com o vermífugo Ivermectina (IVOMECA®), medicamento este comprovadamente hepatotóxico (VARÓ et al., 2010; GROVER et al., 2001).

Na análise histopatológica dos rins, foi observada intensa hemorragia glomerular e tubular, nos animais dos grupos CP1, CP2, EXP1 e EXP2, assim como a presença de cilindro-hialino em todos os grupos estudados; estes achados microscópicos, porém não permitem sugerir alteração irreversível na função renal (MACDOUGALL & COOPER, 2002). Também foi observada a presença de células inflamatórias mononucleares em

todos os grupos; esta alteração, porém está possivelmente relacionada com um possível processo infeccioso oportunista. Necrose nefrotóxica foi descrita em um animal do grupo EXP2, alteração esta que também provavelmente já estava presente nestes animais antes do início de qualquer tratamento deste estudo e não provocada pelo LDE-PTX.

No intestino delgado da maioria dos animais dos grupos EXP1 e EXP2 foi encontrada hiperplasia linfóide, também observada em um animal do grupo CN. Sendo está uma alteração reversível. No intestino grosso também houve a presença desta hiperplasia em todos os animais de todos os grupos estudados. Apesar deste último achado possivelmente estar relacionado com a sintomatologia clínica característica (diarréia) do tratamento com o Paclitaxel (SLAUGHTER et al., 2014), não podemos correlacionar estes achados com o tratamento com a forma comercial ou LDE-associada ao fármaco, pois esta alteração também foi encontrada no grupo CN; provavelmente estes achados são recorrentes e também já estavam presentes antes do início deste estudo.

No baço, as principais alterações encontradas foram presença de hiperplasia de polpa branca, congestão de polpa vermelha além de ectasia, na maioria dos animais de todos os grupos do estudo. Estas alterações reversíveis são características de processo infeccioso neste órgão (ROBBINS & COTRAN, 2006) e por esta razão, provavelmente não estão relacionadas ao tratamento com o LDE na forma comercial ou LDE-associada.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o tratamento com a LDE associada ao paclitaxel pode reduzir a toxicidade deste quimioterápico, quando comparado ao tratamento com a forma comercial deste fármaco. No grupo que recebeu a LDE-PTX, foram observadas manifestações clínicas menos severas ou ausentes, ausência de anemia e aumento de linfócitos, sugerindo aumento da atividade imune neste grupo, manutenção dos padrões bioquímicos considerados normais para a espécie e ausência de alterações histopatológicas irreversíveis significativas. Ainda que na análise individual dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos encontrados neste grupo tenham demonstrado algumas vezes resultados semelhantes aos encontrados no grupo CP1 e CP2, quando analisamos estes parâmetros em conjunto com as manifestações clínicas, podemos sugerir uma melhor resposta clínica do tratamento com a LDE associada ao paclitaxel, o que pode levar à menor necessidade de utilização de medicamentos associados à quimioterapia para tratar efeitos colaterais

típicos deste tratamento como diarreia, êmese e perda de peso, conseqüentemente levando à melhora da qualidade de vida do paciente, diminuindo possíveis internações possibilitando a extensão do tratamento por períodos mais prolongados e possibilitando o aumento da efetividade do tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

Verificamos uma ausência significativa nas manifestações clínicas no grupo tratado com a LDE-PTX, quando comparado ao grupo com a forma comercial do fármaco, que demonstrou manifestações como diarreia, êmese, perda de peso e pêlos e alterações cutâneas.

Na análise do eritrograma, verificamos diferenças significativas entre os grupos LDE-PTX e PTX-comercial, onde este último apresentou alterações acentuadas nesta análise, o que não ocorreu nos grupos tratados com o LDE-PTX comprovando que toxicidade hematológica foi menor no tratamento com a droga associada às nanoemulsões em todos os ciclos de tratamento.

Quanto à análise bioquímica, não houve alteração dos parâmetros bioquímicos da função hepática e renal, que demonstraram-se dentro das faixas de normalidade.

Outro achado importante foi à ausência de toxicidade significativa na análise histopatológica dos diversos órgãos e tecidos, principalmente nos animais que receberam a menor dose de LDE-PTX, já que foram encontradas na maioria dos animais apenas alterações reversíveis e não necessariamente relacionadas ao tratamento.

Os dados obtidos no presente estudo corroboram com o fato da toxicidade do fármaco testado associado à LDE se apresentar menor do que a versão comercial, sendo importante ressaltar que neste estudo foi avaliado o caráter toxicológico do tratamento crônico com a droga em questão, o que é condizente com o tratamento quimioterápico antineoplásico em humanos.

A análise comparativa da toxicidade dos tratamentos com o paclitaxel associado à LDE e o paclitaxel na sua forma comercial em primatas da espécie *Cebus apella*, é inovadora e relevante para o desenvolvimento científico e tecnológico da análise do tratamento antineoplásico. Acreditamos, por fim, que este estudo gerou novas informações biológicas, que possibilitarão uma melhor compreensão fisiopatológica de processos que acontecem durante o tratamento quimioterápico bem como o desenvolvimento de novos tratamentos antineoplásicos utilizando nanopartículas, buscando, desta forma melhora da qualidade de vida dos pacientes com câncer, com melhor eficácia terapêutica e aumento da sua sobrevida.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADES A, CARVALHO JP, GRAZIANI SR, AMANCIO RF, SOUEN JS, PINOTTI JA, MARANHÃO RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecol Oncol**. 82(1):84-7. 2001.

ALBERT, Bruce. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALLHOFF F, LIN P, MOORE D. **What is nanotechnology and why does it matter? From science to ethics**. 1° ed. United States: John Wiley and Sons. pp. 3–5. 2010.

ALMEIDA VL, LEITÃO A, REINA LCB, MONTANARI CA, DONNICI CL, LOPES MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, 28(1):118-119. 2005.

ALMEIDA CP, VITAL CG, CONTENTE TC, MARIA DA, MARANHÃO RC. Modification of composition of a nanoemulsion with different cholesteryl ester molecular species: Effects on stability, peroxidation, and cell uptake. **Int J Nanomedicine**, 20(5):679-686. 2010.

AYERS D & NASTI A. Utilisation of nanoparticle technology in cancer chemoresistance. **J. Drogas Deliv**. 2012(1): Article ID 265691. 2012.

AZEVEDO CH, CARVALHO JP, VALDUGA CJ, MARANHÃO RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol**, 97(1):178-82. 2005.

BANGHAM AD, STANDISH MM, WATKINS JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol**, 13:238–252. 1965.

BASES R, RUBINSTEIN A, KADISH A, MENDEZ F, WITTNER D, ELEQUIN F, LIEBESKIND D. Mutagen-induced disturbances in the DNA of human lymphocytes detected by antinucleoside antibodies. **Cancer Res**. 39(9):3524-30. 1979.

BERKOWITZ BA. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. In: KATZUNG BG. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9°ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.5, p.53-61. 2006.

BERTATO MP, OLIVEIRA CP, WAJCHENBERG BL, LERARIO AC, MARANHÃO RC. Plasma kinetics of an LDL-like nanoemulsion and lipid transfer to HDL in subjects with glucose intolerance. **Clinics**. 67(4):347-353. 2012.

BHOJANI MS, VAN DORT M, REHEMTULLA A. et al. Targeted imaging and therapy of brain cancer using theranostic nanoparticles. **Mol Pharm**. 6(7):1921-1929. 2010.

BONASSA, Edva Moreno. **Enfermagem Em Terapêutica Oncológica**. 4ª Ed. São Paulo: ATHENEU, 2012.

BRANDÃO HN, DAVID JP, COUTO RD, NASCIMENTO JAP, DAVID JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, 33(6):1359-1369. 2010.

BURTIS, Carl A, et al. **Fundamentos de Química Clínica**. 6º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CALOSI P, TURNER LM, HAWKINS M, BERTOLINI C, NIGHTINGALE G, TRUEBANO M, SPICER JI. Multiple physiological responses to multiple environmental challenges: an individual approach. **Integr Comp Biol**. 53(4):660-70. 2013.

CATTEL L, CERUTI M, DOSIO F. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. **J Chemother** (Florence, Italy) 16(4):94–99. 2004.

CORTES JE & PAZDUR R. Docetaxel. **J Clin Oncol**. 13(10):2643-55. 1995.

COUTO RD, DALLAN LA, LISBOA LA, MESQUITA CH, VINAGRE CG, MARANHÃO RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids**. 42(5):411-8. 2007.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto**. 2º ed. – 3º reimpr. Barueri: Manole, 2009.

DAILY EB, AQUILANTE CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. **Pharmacogenomics**. 10(9):1489-510. 2009.

DANTAS SM, FICKER ES, VINAGRE CG, IANNI BM, MARANHÃO RC, MADY C. Metabolism of a lipid nanoemulsion resembling low-density lipoprotein in patients with grade III obesity. **Clinics**. 65(1):23-7. 2010.

DIAS ML, CARVALHO JP, RODRIGUES DG, GRAZIANI SR, MARANHÃO RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Cancer Chemother Pharmacol**. 59(1):105-11. 2007.

DONATI A, CASTRO LGM. Efeitos colaterais cutâneos de quimioterapia com taxanos: O ponto de vista do dermatologista. **An Bras Dermatol**. 86(4):755-758. 2011.

ENDERS A, REISS P, PORTEGIES P, CLEZY K, HOP W, HOY J, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. **AIDS** (London, England) 11:1463–1471. 1997.

EXTRA JM, ROUSSEAU F, BRUNO R, CLAVEL M, LE BAIL N, MARTY M. Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976; NSC 628503) given as a short intravenous infusion. **Cancer Res**. 53(5):1037-42. 1993.

EYMIN B & GAZZERI S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. **Cell Adh Migr**, 4(1):114-123. 2010.

FAILACE, Renato. **Hemograma: manual de interpretação**. 5°. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 298p.

FARAJI AH & WIPF P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem**, 17(8):2950-2962, 2009.

FAVERO G & BYDŁOWSKI S. Receptores de LDL: alvo para drogas anti-neoplásicas. Publ. UEPG **Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa**. 14(1):53-58, 2008.

FAVERO GM, MARANHÃO RC, MARIA DA, LEVY D, BYDŁOWSKI SP. Synthetic nanoemulsion resembling a protein-free model of 7-ketocholesterol containing low density lipoprotein: *In vitro* and in vivo studies. **Biol Res**. 43(4):439-44. 2010.

FERLAY J, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0**, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

FERREIRA FG, POLLI MC, OSHIMA FRANCO Y, FRACETO LF. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Goiás, 6(1):14-24, 2009.

FERREIRA, Adriano Fernandes. **Perfis hematológicos e bioquímico de macaco prego (cebus spp., Erxleben, 1777) mantidos em cativeiro no estado da Paraíba**. Tese de Doutorado – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2009. 117f.

FETTMAN MJ & REBAR A. Laboratory evaluation of renal function. In: THRALL MA, BAKER DC, CAMPBELL RW, DENICOLA D, FETTMAN MJ, LASSEN ED, REBAR A, WEISER G. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.cap.21. p. 301-314.

FEYNMAN RP: There's plenty of room at the bottom, in Lewis J (ed). **Nanotechnology: Research and Perspectives**. Boston, MIT Press, 1992, pp 347-363.

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

FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**. 226(1):497-509. 1957.

FRIEDMAN A, HU B, KAO CY. Cell cycle control at the first restriction point and its effect on tissue growth. **J Math Biol**. 60(6):881-907. 2010.

FUKUMASU H, LATORRE AO, BRACCI N, GÓRNIAK SL, DAGLI MLZ. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**. 21(2):49-59. 2008.

GABRIEL IC, NISHIDA SK, KIRSZTAJN GM. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 33(2):261-267. 2011.

GAL D, MACDONALD PC, PORTER JC, SIMPSON ER. Cholesterolmetabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoproteinmetabolism. **Int J Cancer**. 28(3):315-9. 1981.

GOBLE S & BEAR HD. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. **Surg Clin North Am**. 83:943–971. 2003.

GONÇALVES RP, RODRIGUES DG, MARANHÃO RC. Uptake of highdensity lipoprotein (HDL) cholesteryl esters by human acute leukemia cells. **Leuk Res**, 29(8):955-959. 2005.

GRAHAME SMITH DG & ARONSON JK. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**. 3<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, 2004. 83p.

GROVER JK, VATS V, UPPAL G, YADAV S. Anthelmintics: a review. **Trop Gastroenterol**. 22(4):180-9. 2001.

GUERITTE-VOEGELEIN F, GUÉNARD D, LAVELLE F, LE GOFF MT, MANGATAL L, POTIER P. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. **J Med Chem**. 34(3):992-8. 1991.

GUIDO RVC, ANDRICOPULO AD, OLIVA G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud av**. 24(70). 2010.

HAJDU SI & VADMAL M. A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6. **Cancer**. 119(23):4058-82. 2013.

HAMAGUCHI T, MATSUMURA Y, SUZUKI M, SHIMIZU K, GODA R, NAKAMURA I, NAKATOMI I, YOKOYAMA M, KATAOKA K, KAKIZOE T. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. **Br J Cancer**. 92(7):1240-6. 2005.

HAN JJ, KIM YJ, KIM JW, CHANG H, LEE JO, LEE KW, JEONG CW, KIM JH, HONG SK, BANG SM, BYUN SS, LEE SE, LEE JS. Salvage treatment with low-dose weekly paclitaxel in elderly or poor performance status patients with metastatic urothelial carcinoma. **Tumori**. 100(4):439-45. 2014.

HEVONOJA T, PENTIKÄINEN MO, HYVÖNEN MT, KOVANEN PT, ALA-KORPELA M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim Biophys Acta**. 1488(3):189-210. 2000.

HIRATA RD, HIRATA MH, MESQUITA CH, CESAR TB, MARANHÃO RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsionmodel in rats. **Biochim Biophys Acta**. 1437(1):53-62. 1999.

HO YK, SMITH RG, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**. 52(6):1099–1114. 1978.

HOFFBRAND AV, MOSS PAH, PETTIT JE. **Fundamentos em hematologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLANDA CMCX, OLIVEIRA EHR, LOUISIANNY GB, ARRUDA VS, SPYRIDES MH, CONSTANTINO ACFS, MEDEIROS AC. Effect of paclitaxel (Taxol®) on the biodistribution of sodium pertechnetate (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) in female Wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51(spe):191-196. 2008.

HOUSMAN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N, SARKAR S. Drug resistance in cancer: an overview- Review. **Cancers (Basel)** 6(3):1769-92. 2014.

HUANG X, HUANG G, SONG H, CHEN L. Preconditioning chemotherapy with paclitaxel and cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine induced-killer cells in a murine lung carcinoma model. **Int J Cancer**. 129(3):648-58. 2011.

HUNAULT-BERGER M, LEGUAY T, THOMAS X, HUGUET F, BONMATI C, ESCOFFRE-BARBE M, et al. A randomized study of pegylated liposomal doxorubicin versus continuous-infusion doxorubicin in elderly patient with acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-SA1 study. **Haematologica** 96(2):245–252. 2011.

HUNGRIA VT, LATRILHA MC, RODRIGUES DG, BYDLOWSKI SP, CHIATTONE CS, MARANHÃO RC. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. **Cancer Chemother Pharmacol**. 53(1):51-60. 2004.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Rio de Janeiro: **INCA**, 2014. 124p.

JOERGER M. Prevention and handling of acute allergic and infusion reactions in oncology. **Ann Oncol. Suppl** 10(x):313-9. 2012.

KAPSE-MISTRY S, GOVENDER T, SRIVASTAVA R, YERGERI M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Front Pharmacol**. 5:159. 2014.

KATSUMATA N. Docetaxel: an alternative taxane in ovarian cancer. **Br J Cancer**. 89(3):S9-S15. 2003.

KRATZ F & ELSADEK B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. **J Control Release**. 161(2):429-45. 2012.

KRITCHEVSKY SB, WILCOSKY TC, MORRIS DL, TRUONG KN, TYROLER HÁ. Changes in plasma lipid and lipoprotein cholesterol and weight prior to the diagnosis of cancer. **Cancer Res**. 51(12):3198-203. 1991.

LATASTE H, SENILH V, WRIGHT M, GUÉNARD D, POTIER P. Relationships between the structures of taxol and baccatine III derivatives and their in vitro action on the disassembly of mammalian brain and Physarum amoebal microtubules. **Proc Natl Acad Sci USA**. 81(13):4090-4. 1984.

LEARY SP, LIU CY, UY C, et al. Toward the Emergence of Nanoneurosurgery: Part I –Progress in Nanoscience, Nanotechnology, and the Comprehension of Events in the Mesoscale Realm. **Neurosurgery**. 57:606-634.2005.

LEENDERS A, REISS P, PORTEGIES P, CLEZY K, HOP W, HOY J, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. **AIDS (London, England)**. 11(12): 1463–1471. 1997.

LIMA MF, PUJATTI PB, ARAUJO EB, MESQUITA CH. **Compartmental analysis to predict biodistribution in radiopharmaceutical design studies**. International Nuclear Atlantic Conference; Meeting on Nuclear Applications, 9th; Meeting on Reactor Physics and Thermal Hydraulics, 16th; Meeting on Nuclear Industry, Rio de Janeiro, 2009.

LIU GX, FANG GQ, XU W. Dual Targeting Biomimetic Liposomes for Paclitaxel/DNA Combination Cancer Treatment. **Int J Mol Sci**. 15(9):15287-303. 2014

LO AC, CHEN AY, HUNG VK, et al. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin expression in astrocytic end-feet. **J Cereb Blood Flow Metab**. 25(8):998-1011, 2005.

LO PRETE AC, MARIA DA, RODRIGUES DG, VALDUGA CJ, IBAÑEZ OC, MARANHÃO RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. **J Pharm Pharmacol**, 58(6):801-8. 2006.

LONGLEY DB, JOHNSTON PG. Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol**. 205:275-92. 2005

LOURENÇO-FILHO DD, MARANHÃO RC, MENDEZ-CONTRERAS CA, TAVARES ER, FREITAS FR, STOLF NA. An Artificial Nanoemulsion Carrying Paclitaxel Decreases the Transplant Heart Vascular Disease. A Study in a Rabbit Graft Model. **Journal of Thoracic and Cardiovascular**. Mar. 2011.

MA P & MUMPER RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. **J Nanomed Nanotechnol**. 4(2):1000164. 2013.

MACDOUGALL IC & COOPER AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrology, dialysis, transplantation**. 17(11):s39-s43. 2002.

MAHON P & SHORTEN G. Perioperative acute renal failure. **Curr Opin Anesthesiol**. 19(3):332-8. 2004.

- MALUMBRES M & BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, 9(3):153-166. 2009.
- MANN J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer**. 2(2):143-8. 2002.
- MARANHÃO RC, CESAR TB, PEDROSO-MARIANI SR. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. **Lipids**. 28:p.691-6. 1993.
- MARANHÃO RC, GARICOCHEA B, SILVA EL, LLACER PD, PILEGGI FJ, CHAMONE DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res**. 54(17):4660-4666. 1994.
- MARANHÃO RC, GARICOCHEA B, SILVA E, LLACER PD, PILEGGI FJ, CHAMONE DAF. 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**. 25(10):1033-1037. 1992.
- MARANHÃO RC, GRAZIANI SR, YAMAGUCHI N, MELO RF, LATRILHA MC, RODRIGUES DG, COUTO RD, SCHREIER S, BUZAID AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol**. 49(6):487-98. 2002.
- MARANHÃO RC, TAVARES ER, PADOVEZE AF, VALDUGA CJ, RODRIGUES DG, PEREIRA MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis**. 197(2):959-66. 2008.
- MARANHÃO RC, ROLAND IA, TOFFOLETTO O, RAMIRES JA, GONÇALVES RP, MESQUITA CH, ET AL. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**. 32(6):627-33. 1997.
- MARTY JJ, OPPENHEIM RC, SPEISER P. Nanoparticles a new colloidal drug delivery system. **Pharm Acta Helv**. 53(1):17-23, 1978.
- MCGUIRE WP, HOSKINS WJ, BRADY MF, KUCERA PR, PARTRIDGE EE, LOOK KY, CLARKE-PEARSON DL, DAVIDSON M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. **N Engl J Med**. 334(1):1-6. 1996.
- MELLO SB, TAVARES ER, BULGARELLI A, BONFÁ E, MARANHÃO RC. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. **Int J Nanomedicine**. 8:443-9. 2013.
- MORALES-RAMÍREZ P, VALLARINO-KELLY T, CRUZ-VALLEJO VL, LÓPEZ-ITURBE R, ALVARO-DELGADILLO H. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. **Mutagenesis**. 19(3):207-213. 2004.

NAKAMURA T, UEDA T, OISHI M, NAKANISHI H, FUJIHARA A, NAYA Y, HONGO F, KAMOI K, OKIHARA K, MIKI T. Salvage combined chemotherapy with paclitaxel, ifosfamide and nedaplatin for patients with advanced germ cell tumors. **Int J Urol.** 100(4):439-445. 2014.

NAVES EA, FERREIRA FA, MUNDIM AV, GUIMARÃES EC. Valores hematológicos de macaco prego (*Cebus apella* - Linnæus, 1758) em cativeiro. **Bioscience journal**, Uberlândia. 22(2):125-131, 2006.

NOWAK AK, WILCKEN NR, STOCKLER MR, HAMILTON A, GHERSI D. Systematic review of taxane-containing versus non-taxane-containing regimens for adjuvant and neoadjuvant treatment of early breast cancer. **Lancet Oncol.** 5(6):372-80. 2004.

O'BRIEN S, SCHILLER G, LISTER J, DAMON L, GOLDBERG S, AULITZKY W, et al. High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol.** 31(6):676-683. 2013.

OTRANTO M, SARRAZY V, BONTE FB, HINZ GABBIANI G, DESMOULIERE A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodelling. **Cell Adh Migr.** 6:1-49, 2012.

OZER J, RATNER M, SHAW M, BAILEY W, SCHOMAKER S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, 245(3):194-205. 2008.

PANIS C, LEMOS LG, VICTORINO VJ, HERRERA AC, CAMPOS FC, COLADO SIMÃO AN, PINGE-FILHO P, CECCHINI AL, CECCHINI R. Immunological effects of taxol and adriamycin in breast cancer patients. **Cancer Immunol Immunother.** 61(4):481-8. 2012.

PARK MT & LEE SJ. Cell cycle and cancer. **J BiochemMolBiol.** 36(1):60-65. 2003.

PATHAK P, HESS R, WEISS MA. Liposomal vincristine for relapsed or refractory Ph-negative acute lymphoblastic leukemia: a review of literature. **Ther Adv Hematol.** 5(1):18-24. 2014.

PING MA, MUMPER RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. **J Nanomed Nanotechnol.** 4(2):1000164. 2013.

PINHEIRO KV, HUNGRIA VT, FICKER ES, VALDUGA CJ, MESQUITA CH, MARANHÃO RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. **Cancer Chemother Pharmacol.** 57(5):624-30. 2006.

PIRES LA, HEGG R, VALDUGA CJ, GRAZIANI SR, RODRIGUES DG, MARANHÃO RC. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. **Cancer Chemother Pharmacol.** 63(2):281-7. 2009.

PRATT WB, RUDDON RW, ENSMINGER WD, MAYBAUM JY. **The Anticancer Drugs**. 2nd Edition. Oxford University Press, New York, USA. 1994

PRIETO GARCÍA A, PINEDA DE LA LOSA F. Immunoglobulin E-mediated severe anaphylaxis to paclitaxel. **J Investig Allergol Clin Immunol**. 20(2):170-1. 2010.

RABELLO-GAY MN, RODRIGUES MAR, MONTELEONE NETO R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos críticos de avaliação. **Soc Bras de Gen**. 75:97-103. 1991.

RAISCH DW, CAMPBELL W, GARG V, QURESHI ZP, BOOKSTAVEN PB, NORRIS LB, BENNETT CL. Description of anaphylactic reactions to paclitaxel and docetaxel reported to the FDA, with a focus on the role of premedication. **Expert Opin Drug Saf**. 10(4):521-8. 2011.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, FLOWER RJ, HENDERSON G. **Farmacologia**. 7<sup>ed</sup>. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 768p.

RAO S, KRAUSS NE, HEERDING JM, SWINDELL CS, RINGEL I, ORR GA, HORWITZ SB. 3<sup>l</sup>-(p-azidobenzamido) taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin. **J Biol Chem**. 269(5):3132-4. 1994.

RAO S, ORR GA, CHAUDHARY AG, KINGSTON DG, HORWITZ SB. Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl) taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin. **J Biol Chem**. 270(35):20235-8. 1995.

RIVIELLO MC & WIRZ. A Haematology and blood chemistry of Cebus paella in relation to sex and age. **J Med Primatol**. 30(6):308-12. 2001.

ROBBINS & COTRAN. **Fundamentos da patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006 - 829p.

RODRIGUES DG, COVOLAN CC, CORADI ST, BARBOZA R, MARANHÃO RC. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J Pharm Pharmacol**, 54(6):765-72. 2002.

RODRIGUES DG, MARIA DA, FERNANDES DC, VALDUGA CJ, COUTO RD, IBAÑEZ OC, MARANHÃO R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. **Cancer Chemother Pharmacol**. 55(6):565-76. 2005.

ROWINSKY EK, WRIGHT M, MONSARRAT B, DONEHOWER RC: Clinical pharmacology and metabolism of taxol (paclitaxel): update 1993. **Ann. Oncol**. 5(Suppl. 6),S7-S16. 1994.

RODRÍGUEZ-ANTONA C. Pharmacogenomics of paclitaxel. **Pharmacogenomics**. 11(5):621-3, p.10.32. 2010.

ROWINSKY EK, WRIGHT M, MONSARRAT B, DONEHOWER RC: Clinical pharmacology and metabolism of taxol (paclitaxel): update 1993. **Ann. Oncol**. 5(6):S7-S16. 1994.

SAKAMOTO JH, VAN DE VEN AL, GODIN B, et al. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacol Res.** 62(2):57-89, 2010.

SANTOS RD, HUEB W, OLIVEIRA AA, RAMIRES JA, MARANHÃO RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. **J Lipid Res.** 44(3):464-9. 2003.

SCHWARTZ J, DOMCHEK SM, HWANG WT, FOX K. Evaluation of anemia, neutropenia and skin toxicities in standard or dose-dense doxorubicin/cyclophosphamide (AC)-paclitaxel or docetaxel adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Ann Oncol.** 16(2):247-52. 2005.

SIAU C, XIAO W, BENNETT GJ. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. **Exp Neurol.** 201(2):507-14. 2006.

SLAUGHTER KN, MOORE KN, MANNEL RS. Anti-angiogenic therapy versus dose-dense paclitaxel therapy for frontline treatment of epithelial ovarian cancer: review of phase III randomized clinical trials. **Curr Oncol Rep.** 16(11):412. 2014.

SLICHENMYER WJ, VON HOF DD. Taxol: a new and effective anticancer drug. **Anticancer Drugs.** 2: 519-530, 1991.

SODRÉ FL, COSTA JCB, LIMA JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab.** 43(5):329-337. 2007.

SOMA D, KITAYAMA J, ISHIGAMI H, KAISAKI S, NAGAWA H. Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration. **J Surg Res.** 155(1):142-6. 2009.

SUN L, SIMMERLING C, OJIMA I. Recent advances in the study of the bioactive conformation of taxol. **Chem Med Chem.** 4(5):719-31. 2009.

TAKAYAMA S, THORGEIRSSON UP, ADAMSON RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proc Jpn Acad Ser B.** 84(6): 176-188, 2008.

TAVARES ER, FREITAS FR, DIAMENT J, MARANHÃO RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Int J Nanomedicine.** 6:2297-304. 2011.

TEIXEIRA RS, CURI R, MARANHÃO RC. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). **J Pharm Pharmacol.** 56(7):909-14. 2004.

TEIXEIRA RS, VALDUGA CJ, BENVENUTTI LA, SCHREIER S, MARANHÃO RC. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **J Pharm Pharmacol.** 60(10):1287-95. 2008.

TEN TIJE AJ, VERWEIJ J, LOOS WJ, SPARREBOOM A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implication for cancer chemotherapy. **Clin Pharmacokinet.** 42(7): 665-685. 2003.

VALDUGA CJ, FERNANDES DC, LO PRETE AC, AZEVEDO CH, RODRIGUES DG, MARANHÃO RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. **J Pharm Pharmacol.** 55(12):1615-22. 2003.

VAN KEMPEN L, RUITER D, VAN MUIJEN G, COUSSENS L. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **Eur J Cell Biol.** 82:539-548. 2003.

VARÓ I, RIGOS G, NAVARRO JC, DEL RAMO J, CALDUCH-GINER J, HERNÁNDEZ A, PERTUSA J, TORREBLANCA A. Effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: a proteomic approach. **Chemosphere.** 80(5):570-7. 2010.

VASCONCELOS, Shélida Braz. **Avaliação morfológica do baço, linfonodo e fígado de macacos-prego *Cebus apella* tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA.** Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Brasília. 2008. 88f.

VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** 36(3):131-149. 2003.

VIALARD JF, LACOMBE F, BELLOC F, PELLEGRIN JL, REIFFERS J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. **Cancer Radiother** 5(2):109-129. 2001.

VITOLS S, PETERSON C, LARSSON O, HOLM P, ABERG B. Elevated uptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue *in vivo*. **Cancer Res.** 52(22):6244-7. 1992.

WALSH T, FINBERG R, ARNDT C, HIEMENZ J, SCHWARTZ C, BODENSTEINER D, et al. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. **N Engl J Med.** 340:764–771. 1999.

WANG Y, WU KC, ZHAO BX, ZHAO X, WANG X, CHEN S, NIE SF, PAN WS, ZHANG X, ZHANG Q. A novel paclitaxel microemulsion containing a reduced amount of Cremophor EL: pharmacokinetics, biodistribution, and *in vivo* antitumor efficacy and safety. **J Biomed Biotechnol.** 2011:854872. 2011.

WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGON P, MCPHAIL AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc.** 93(9):2325-2327. 1971.

WEBER C & KUO P. The tumor microenvironment. **Surg. Oncol.** 21:172-177, 2012

WEINBERG, ED. (2007). **The biology of cancer.** New York, Garland Science Taylor and Francis Group. LLC.

WIRZ A, TRUPPA V, RIVIELLO MC. Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Am J Primatol.** 70(5):463-472. 2008.

WOO HL, SWENERTON KD, HOSKINS PJ. Taxol is active in platinum-resistant endometrial adenocarcinoma. **Am J Clin Oncol.** 19:290–291. 1996.

YAMAUCHI H, FEINS EN, VASILYEV NV, SHIMADA S, ZURAKOWSKI D, DEL NIDO PJ. Creation of nonischemic functional mitral regurgitation by annular dilatation and nonplanar modification in a chronic in vivo swine model. **Circulation.** 128(11):S263-70. 2013.

## ANEXO I

**PARECER BIO008-11**

**Projeto:** USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER

**Coordenador:** Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

**Área Temática:** Biologia/Oncologia Experimental

**Vigência:** 11/2010 a 11/2012

**Nº no CEPAE-UFPA:** BIO008-11

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 05 outubro de 2010

Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa  
Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará

## ANEXO II



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31826-1	Data da Emissão: 24/11/2011 18:33
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Danielle Cristine Azevedo Felo	CPF: 861.483.862-00
Título do Projeto: USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

## Cronograma de atividades

#	Descrição de atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Delimitação experimental	11/2011	11/2011
2	Seleção dos animais do grupo de estudo	12/2011	12/2011
3	Avaliação da Toxicidade crônica da Daunorubicina	12/2011	12/2014
4	Tratamento com Metotrexato (comercial e nanoemulsão)	12/2011	12/2014
5	Avaliação da Toxicidade crônica do Metotrexato	12/2011	12/2014
6	Tratamento com Daunorubicina (comercial e nanoemulsão)	12/2011	12/2014
7	Análise dos Resultados	06/2012	12/2014
8	Apresentação dos resultados em congressos	01/2012	12/2014
9	Submissão e Publicação de artigos	01/2013	01/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser renovada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exclui o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br/Servicos-on-line-Licença%20para%20importação%20ou%20exportação%20de%20flora%20e%20fauna-CITES%20e%20não-CITES">www.ibama.gov.br/Servicos-on-line-Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES</a> . Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio-menu-Exportação">www.icmbio.gov.br/sisbio-menu-Exportação</a> .
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar sempre de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação de legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso de infra-estrutura de unidade.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sommel Mario Rodriguez Turbino	Coordenador regional	267.056.542-04	3619264 SSP/PA-PA	Brasileira
2	PATRICIA DANIELLE LIMA DE LIMA	Orientadora	252.197.332-87	3208590 SSP/PA	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 77913762



Página 1/3

## ANEXO II



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 31826-1	Data da Emissão: 24/11/2011 18:33
-----------------	-----------------------------------

#### Dados do titular

Nome: Danielle Cristina Azevedo Felo	CPF: 881.483.882-00
Título do Projeto: USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE SE LIGAM A RECEPTORES CELULARES COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	ANANINDEUA	PA	Centro Nacional de Primatas	Fome de UC
2	BELEM	PA	Universidade Federal do Pará	Fome de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cebus spella

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
---	--------------------------------	-----------------------------------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Centro Nacional de Primatas	criadouro científico

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 77913762



Página 2/3

