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

AVALIAÇÃO SERIADA DO PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DA ESPÉCIE *Sapajus apella* TRATADOS COM LDE-OLEATO DE PACLITAXEL COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER

NAYARA CRISTINA LIMA DE OLIVEIRA

BELÉM – PARÁ
2017

NAYARA CRISTINA LIMA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO SERIADA DO PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DA ESPÉCIE *Sapajus apella* TRATADOS COM LDE-OLEATO DE PACLITAXEL COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Belém, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.
Sob orientação do Prof. Dr.Rommel Burbano.

BELÉM – PARÁ

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Oliveira, Nayara Cristina Lima de

Avaliação seriada do perfil hematológico e bioquímico de primatas não humanos da espécie *Sapajus apella* tratados com LDE – oleato de paclitaxel como instrumento para a terapêutica do câncer / Nayara Cristina Lima de Oliveira; Orientador, Rommel Burbano. - 2017.

83 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Câncer – tratamento - pesquisa. 2. Câncer - quimioterapia. 3. Paclitaxel - pesquisa. 4. Nanopartículas – testes de toxicidade. 5. Primatas. I. Machado, Fernando A., orientador. II. Titulo.

CDD – 22 ed. 616.994

NAYARA CRISTINA LIMA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO SERIADA DO PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DA ESPÉCIE *Sapajus apella* TRATADOS COM LDE-OLEATO DE PACLITAXEL COMO INSTRUMENTO PARA A TERAPÊUTICA DO CÂNCER

Dissertação aprovada em 23 de Fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Barbara do Nascimento Borges

Prof. Dr. Danielle Cristinne Azevedo Feio

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 Lípides, 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)

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Márcia Andréia Duarte Gomes (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Aos professores Danielle Feio, Barbara Borges e Rommel Burbano, pela dedicação, incentivo e por dividir comigo algo tão valioso, o conhecimento.

A todos os funcionários do Centro Nacional De Primatas (CENP), veterinários, biólogos, biomédicos, técnicos e tratadores, pois sem eles esse trabalho não seria possível.

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, que contribuíram para conclusão desse projeto.

Minha família, porque de alguma forma todos fizeram parte da minha vida acadêmica, sempre me ajudando e me incentivando a continuar e a correr atrás dos meus sonhos. Em especial aos meus primos e minhas irmãs.

Aos meus afilhados (Daniel e Sophia) por ter tornado meus dias menos cansativos e mais felizes.

Meus pais, meu infinito agradecimento. Por sempre me apoiar, incentivar e ajudar durante toda minha vida, vocês foram essências nessa trajetória, por nunca medir esforços para me dar a melhor educação possível.

Minha tia Andréia *(in memoriam)* que sempre sonhou com o meu sucesso junto comigo, uma das pessoas mais incríveis que já conheci em toda minha vida, um ser humano iluminado que me incentivou em continuar essa pesquisa, pois ela mais do que ninguém sabia as dores e as dificuldades que um paciente com câncer sofria durante o tratamento, infelizmente ela não pode ver meu trabalho finalizado.

Aos meus companheiros de pós-graduação, pelos momentos divididos juntos, pelo companheirismo e amizade durante esses dois anos de mestrado. Desejo que essa amizade dure para o resto da vida.

Ao meu namorado Mauricio Ferreira Gomes por estar ao meu lado me dando apoio, incentivo e por ter me ajudado durante a realização dessa dissertação. Agradeço a Deus por ter encontrado esse homem incrível, ser humano exemplar e que acima de tudo ainda é um pesquisador dedicado e com um futuro promissor. “ Você me faz lembrar como tenho sorte” Te amo.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento

Só tenho a agradecer a todos que de forma direta ou indireta sempre contribuíram para que pudesse terminar minha graduação com louvor.

“Todos os nossos sonhos podem tornar-se realidade se tivermos a coragem de perseguí-los”.

Walt Disney

RESUMO

Estudo de um sistema de veiculação de quimioterápicos, denominado LDE, com composição lipídica semelhantes com as lipoproteínas de baixa densidade naturais do corpo. As LDE apresentam vantagens sobre as formas químicas comerciais, pois são capazes de se concentrar nos tecidos neoplásicos após injeção na corrente circulatória, podendo assim direcionar-se aos tumores. As LDE podem ser utilizadas como "portadoras" do quimioterápico paclitaxel (PTX) para possível redução da toxicidade e aumento da sua ação terapêutica. A utilização de primatas não humanos como modelos experimentais *in vivo* 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. O projeto objetivou avaliar a toxicidade crônica das nanopartículas associadas com o quimioterápico Paclitaxel (LDE-PTX) em indivíduos da espécie *Sapajus apella*, a partir da determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, e suas possíveis alterações. Durante a pesquisa foram utilizados 15 animais, divididos em grupos: Controle negativo (CN); Experimental (EXP1 e EXP2) onde os animais receberam a LDE-PTX por via intravenosa em duas doses diferentes de 175 mg⁄m^2 e 250 mg⁄m^2 respectivamente; e o Controle positivo (CP1 e CP2) onde os animais receberam por via intravenosa o fármaco na forma comercial nas mesmas doses utilizadas no grupo experimental, respectivamente. Os primatas foram acompanhados durante 6 ciclos de quimioterapia, com intervalo de 3 semanas. A análise hematológica e bioquímica foi realizada a cada ciclo através dos valores do eritrograma, leucograma, plaquetogrma, fosfatase alcalina, proteína total, albumina e globulina, bilirrubina total e frações, glicemia, amilase e lipase sérica. A análise dos eletrólitos sódio e potássio, foi realizada no soro dos animais nos dias das coletas de materiais. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão e submetidos à análise de variância ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com significância para $p<0,05$, através do BioEstat®5.3. Os resultados obtidos demonstraram vantagens da utilização de LDE-PTX, já que os teste hematológicos demonstram que houve uma menor toxicidade em todos os ciclos quimioterápicos e a não alteração da maioria dos parâmetros bioquímicos, demonstram que a toxicidade do fármaco testado associado a LDE apresentam menor efeito tóxico do que sua versão comercial. Conclui-se com as análises dos resultados que a toxicidade hematológica e bioquímica foi menor no tratamento com o PTX associado à LDE do que o tratamento do PTX na sua forma comercial.

Palavras-chave: Paclitaxel; *Sapajus apella*; Nanoemulsões; Perfil hematológico; Perfil bioquímico; Peso; Toxicidade.

ABSTRACT

Study of a chemotherapy delivery system, called LDE, with lipid composition similar to the natural low density lipoproteins of the body, denominated by the acronym LDL. LDEs have advantages over commercial chemical forms, since it is able to concentrate in the neoplastic tissues after injection into the circulatory chain, thus being able to target the tumors. LDE can be used as a "carrier" of paclitaxel (PTX) for possible reduction of toxicity and increase of its therapeutic action. The use of non-human primates as in vivo experimental models are of great importance in human health applications due to their anatomical, biochemical and phylogenetic similarities with human primates, generating results that can be interpreted more closely and safely to The phenomena in humans. The aim of the project was to evaluate the chronic toxicity of nanoparticles associated with to chemotherapy Paclitaxel (LDE-PTX) in individuals of the *Sapajus apella* species, based on the determination of hematological and biochemical parameters and their possible alterations. During the research 15 animals were used, divided into groups: Negative control (CN); Experimental (EXP1 and EXP2) where the animals received LDE-PTX intravenously two different doses of 175 mg / m^2 and 250 mg / m^2 respectively; and positive control (CP1 and CP2) where the animals intravenously received the drug in commercial form at the same doses used in the experimental group, respectively. Primates were accompanied for 6 cycles of chemotherapy, with interval of 3 weeks. Hematological and biochemical analysis was performed at each cycle through erythrogram and leukogram, alkaline phosphatase, total protein, albumin and globulin, total bilirubin and fractions, glycemia, amylase and serum lipase. E of the sodium and potassium eletrolytes were carried out in the serum of the animals during the collection days. Data were expressed as mean ± standard deviation and submitted to analysis of variance ANOVA, with Bonferroni post-test with significance for $p < 0.05$, through BioEstat®5.3. The obtained results demonstrated advantages of the use of LDE-PTX, since the hematological tests demonstrate that there was a lower toxicity in all the chemotherapeutic cycles and the non-alteration of the majority of the biochemical parameters, demonstrate that the toxicity of the tested drug associated to LDE present smaller Effect toxic than its commercial version. It was concluded from the analysis of the results that hematological and biochemical toxicity was lower in treatment with PTX associated with LDE than treatment of PTX in its commercial form.

Keywords: Paclitaxel; *Sapajus apella*; Nanoemulsions; Hematologic profile; Biochemical profile; Weight; Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Formação do tumor – Células neoplásicas.....18
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidente estimados para 2016/2017 por sexo, exceto pele não melanoma*.....19
Figura 3. A. Estrutura da lipoproteína de densidade baixa (LDL) B. Estrutura da nanoemulsão lipídica (LDE) 22
Figura 4. Representação da aderência de apolipoproteínas E.....13
Figura 5. Estrutura tridimensional e bioquímica do Paclitaxel 25
Figura 6. Mecanismo de ação do Paclitaxel 25
Figura 7. Macaco-prego (*Sapajus spp.*). Notar a presença de um tufo de pêlos na região frontal da cabeça, cuja coloração e extensão podem variar entre as espécies e entre indivíduos.....27
Figura 8. (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 do
CENP.....34
Figura 9. Linha temporal dos ciclos quimioterápicos.....35
Figura 10. Fluxograma do delineamento experimental.....36
Figura 11. Coleta de sangue por venopunção da veia femoral.....36
Gráfico 1: Analise seriada do peso.....39
Gráfico 2: Analise seriada do parâmetro hematológico hemoglobina.....41
Gráfico 3: Analise seriada do parâmetro hematológico hematócrito.....42
Gráfico 4: Analise seriada do parâmetro hematológico HCM.....42
Gráfico 5: Analise seriada do parâmetro hematológico RDW.....43
Gráfico 6: Analise seriada do parâmetro hematológico Leucócitos.....44
Gráfico 7: Analise seriada do parâmetro hematológico neutrófilo.....45
Gráfico 8: Analise seriada do parâmetro hematológico Linfócitos.....45
Gráfico 9: Analise seriada do parâmetro hematológico Monócito.....46
Gráfico 10: Analise seriada do parâmetro hematológico basófilo.....47
Gráfico 11: Analise seriada do parâmetro hematológico Plaquetas.....48
Gráfico 12: Analise seriada do parâmetro hematológico VPM.....48
Gráfico 13: Analise seriada do parâmetro hematológico VCM.....49
Gráfico 14: Analise seriada do parâmetro hematológico Eosinófilo.....50

Gráfico 15: Analise seriada do parâmetro hematológico Hemácia.....50
Gráfico 16: Analise seriada do parâmetro hematológico CHCM.....51
Gráfico 17: Analise seriada do parâmetro bioquímico Uréia.....53
Gráfico 18: Analise seriada do parâmetro bioquímico Amilase.....53
Gráfico 19: Analise seriada do parâmetro bioquímico Glicose.....54
Gráfico 20: Analise seriada do parâmetro bioquímico Lipase.....55
Gráfico 21: Analise seriada do parâmetro bioquímico HDL-C.....56
Gráfico 22: Analise seriada do parâmetro bioquímico Triglicerideos.....57
Gráfico 23: Analise seriada do parâmetro bioquímico VLDL.....57
Gráfico 24: Analise seriada do parâmetro bioquímico Colesterol.....58
Gráfico 25: Analise seriada do parâmetro bioquímico LDL.....58
Gráfico 26: Analise seriada do parâmetro bioquímico AST\TGO.....60
Gráfico 27: Analise seriada do parâmetro bioquímico ALT\TGP.....60
Gráfico 28: Analise seriada do parâmetro bioquímico GGT.....61
Gráfico 29: Analise seriada do parâmetro bioquímico Fosfatase alcalina.....61
Gráfico 30: Analise seriada do parâmetro bioquímico Globulina.....62
Gráfico 31: Analise seriada do parâmetro bioquímico Albumina.....63
Gráfico 32: Analise seriada do parâmetro bioquímico Ácido úrico.....63
Gráfico 33: Analise seriada do parâmetro bioquímico Proteína Total.....64
Gráfico 34: Analise seriada do parâmetro bioquímico LDH.....64
Gráfico 35: Analise seriada do parâmetro bioquímico Cálcio.....65
Gráfico 36: Analise seriada do parâmetro bioquímico Bilirrubina Total.....65
Gráfico 37: Analise seriada do parâmetro bioquímico Sódio.....65
Gráfico 38: Analise seriada do parâmetro bioquímico Potássio.....66
Gráfico 39: Analise seriada do parâmetro bioquímico Creatinina.....66

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Efeitos Colaterais mais recorrentes com o tratamento quimioterápico.....20
Tabela 1. Valores normais dos padrões hematológicos de *Sapajus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.....29
Tabela 2. Valores normais dos padrões bioquímicas de *Sapajus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.....30
Tabela 3. Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimental.....39
Tabela 4. Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do eritrograma.....40
Tabela 5. Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do leucograma.....44.
Tabela 6. Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do plaquetograma.....47
Tabela 7: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos sem alterações estatisticamente significativas 49
Tabela 8: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão renal. 52
Tabela 9: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão pancreática. 54
Tabela 10: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos do perfil lipídico. 56
Tabela 11: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão hepática. 59
Tabela 12: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos padrões bioquímicos que não houveram alterações estatisticamente significantes 62

LISTA DE SIGLAS

CENP Centro Nacional De Primatas

CHCM Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CN Controle Negativo_ Grupo que não recebeu nenhuma medicação

CP1 Controle Positivo 1_ Grupo que recebeu a dose de 175mg/m² do quimioterápico na sua forma comercial

CP2 Controle Positivo 2_Grupo que recebeu a dose de 250mg/m² do quimioterápico na sua forma comercial.

DCC - diciclohexilcarbodiimida

DMAP - 4-dimetilaminopiridina

DNA Ácido desoxirribonucléico

EXP1 Experimental 1_ Grupo que recebeu a dose de 175mg/m².do quimioterápico associado a nanoemulsão.

EXP 2 Experimental 2 _grupo que recebeu a dose de 250mg/m² do quimioterápico associado a nanoemulsão.

HCM Hemoglobina Corpuscular Média

INCA Instituto nacional do câncer

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LDE-PTX Nanoparticula de Colesterol associada ao paclitaxel

LDE Nanoparticula de Colesterol

MPV Volume Plaquetário Médio

PTX Paclitaxel

RDW Largura e distribuição de células vermelhas

VCM Volume Corpuscular Médio

SUS Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 CÂNCER 17
2.2 LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL) 21
2.3 NANOPARTÍCULA DE COLESTEROL OU LDE 22
2.4 - PACLITAXEL 24
2.5 PRIMATAS NÃO HUMANOS- *Sapajus apella* 26
2.5.1 Padrões de normalidade hematológica de *Sapajus apella* criado em cativeiro 28
2.5.2 Padrões de normalidade bioquímica de *Sapajus apella* criado em cativeiro 29
3. JUSTIFICATIVA 31
4. OBJETIVOS 32
4.1 OBJETIVO GERAL 32
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 32
5. METODOLOGIA 33
5.1 PREPARAÇÕES E DERIVATIZAÇÃO DAS NANOEMULSÃO 33
5.2 ANIMAIS E TRATAMENTOS 34
5.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE 36
5.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA 37
5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 37
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 37
6. RESULTADOS 38
6.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS 38
6.2 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO. 40
6.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO 51
7. DISCUSSÃO 67
8. CONCLUSÃO 74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA 82
ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA 83

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência relativamente nova, cujas aplicações possuem uma ampla utilização que se ramifica em diferentes áreas, dentre elas destaca-se sua aplicabilidade nas áreas da saúde, em especial na oncologia, pelo fato de nanopartículas criadas com o auxílio dessa nova ciência, atualmente serem empregadas auxiliando no tratamento do câncer. Essas nanopartículas possuem propriedades únicas, que conferem significativas vantagens sobre os métodos clássicos de tratamento (LEARY *et al*., 2005).

As nanoparticulas ao serem injetadas na corrente sanguínea de pacientes com câncer concentraram-se nos tecidos neoplásicos, o que foi observado em pacientes com leucemias agudas, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, mieloma múltiplo, carcinoma de ovário, colo de útero e carcinoma mamário. Assim, foi demonstrado que é possível utilizar esse ramo da nanotecnologia no direcionamento de quimioterápicos aos tecidos neoplásicos através da sua associação às nanopartículas de LDE. Em diferentes estudos, foram desenvolvidas preparações dos quimioterápicos de ação anti-câncer como a carmustina (HUNGRIA *et al*., 2004), o etoposídeo (VALDUGA *et al*., 2003; AZEVEDO *et al*., 2005; LO PRETE *et al*., 2006; PINHEIRO *et al*., 2006) e paclitaxel associados às nanoemulsões (DIAS *et al*., 2007; PIRES *et al*., 2009).

O Paclitaxel é o fármaco precursor dos táxons, uma classe de agentes estabilizantes de microtúbulos (CONTRERAS, 2010), foi obtido no começo dos anos 60 a partir do extrato de casca do teixo do Pacifico, chamado *Taxusbrevifolia*. 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 ao componente β-tubulina do dímero α-β-tubulina, proteínas essas que promovem e compõem a polimerização dos microtúbulos, impedindo assim, a sua despolimerização, através da estabilização da dinâmica microtubular (ALBERT *et al*., 2004; SUN *et al*., 2009; LATASTE *et al*., 1984; GUERITTE-VOEGELEIN *et al*., 1991; RAO et al., 1994). O paclitaxel possui atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, colo uterino, células não pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi (CONTRERAS, 2010), sendo utilizado em vários países, dentre eles o Brasil, como tratamento de primeira linha em câncer refratário de ovário e segunda linha em câncer de mama (MÉNDEZ, 2010).

A LDE pode ser utilizada como instrumento para diminuir, os graves efeitos tóxicos desse fármaco, como: A inibição da resposta imunológica, alterações gastrointestinais, toxicidade (cardíaca, hepática e renal) e hemorragias entre outras, além de aumentar sua

atividade farmacológica. Portanto, a maioria dos efeitos tóxicos causados pela quimioterapia podem ser estudados através da avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, pois permite analisar o estado de saúde do organismo, diagnosticar doenças, realizar prognósticos e acompanhar a evolução do tratamento e possibilita a avaliação da resposta terapêutica (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) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue (FAILACE, 2009).

Em estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepatocelular, biliar, pancreática e renal, que incluem uma combinação de diversos testes bioquimicos tais como: Fosfatase alcalina, Proteína Total, Albumina e Globulina, Bilirrubina Total e frações, glicemia, amilase e lipase sérica. Os eletrólitos do sangue, em especial sódio, potássio, também são alterados frequentemente de forma recíproca nos processos patológicos, por isso eles são considerados conjuntamente (BURTIS *et al*., 2008). Outro aspecto clínico muito evidente no tratamento quimioterápico é a alteração de peso, que está diretamente relacionada com a toxicidade gastrointestinal causadas por indução medicamentosa. Portanto, é evidente a importância da avaliação desses parâmetros para detectar possível toxicidade de qualquer composto analisado.

O projeto foi realizado *in vivo* em primatas da espécie *Sapajus apella*, conhecido popularmente como macaco prego. Os espécimes utilizados no experimento são todos provenientes do Centro Nacional dos Primatas (CENP). Os primatas não humanos são os melhores modelos para o desenvolvimento de pesquisas biomédicas uma vez que permite uma maior aproximação devido ao seu parentesco evolutivo com o ser humano, tornando-os modelos eficazes para estudos comparativos, particularmente pertinentes para as enfermidades humanas (TAKAYAMA *et al*., 2008).

Essa pesquisa se mostra pertinente, pois testes clínicos, realizados em pacientes com câncer avançado e com resistência a múltiplas drogas, demonstraram que tanto a carmustina quanto o etoposídeo e o paclitaxel passaram a apresentar toxicidade mínima quando associados às nanoemulsões, como a LDE, mesmo quando administrados em doses altas. Além disso, a incorporação em nanopartículas protege o fármaco contra degradação química na corrente circulatória (PINHEIRO *et al*., 2006; HUNGRIA *et al*., 2004; MARANHÃO *et al*., 2002; AZEVEDO *et al*, 2005; DIAS *et al*., 2007; PIRES *et al*., 2009), fatos que apresentam possíveis vantagens na utilização das nanoparticulas.

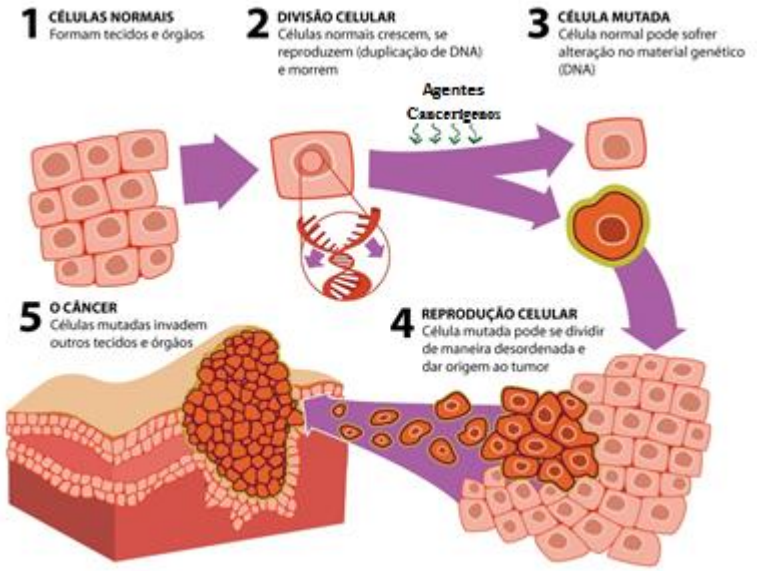
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, processo denominado metástase. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, acúmulo de células cancerosas ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (FERLAY *et al.*, 2013).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2016). Basicamente o câncer surge quando uma célula normal sofre alterações no DNA. É o que chamamos mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes, denominados protooncogenes, que a princípio tem sua atividade extremamente regulada. Quando ocorre algum tipo de desregularização, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas (PARK & LEE, 2002). O processo de transformação da célula normal em célula tumoral pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Formação do tumor – Células neoplásicas



Fonte: http://www.ache.com.br/Corp/oncologia-canceraz.aspx

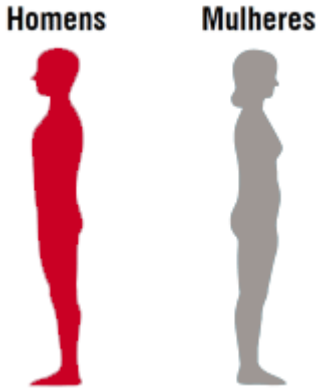
O número de casos de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Em países desenvolvidos, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina são os de próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres. Em 2030, a carga global será de 27 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (BOYLE *et al*., 2008).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016/2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude desta patologia 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 (61 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanomas estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero,

pulmão, estômago, corpo do útero e glândula tireoide (INCA 2016). A estimativa e os tipos de câncer mais incidentes para o biênio estão demonstrados na Figura 2.

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidente estimados para 2016/2017 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização primária	Casos novos	%	Localização primária	Casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%



* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA, 2016.

O tratamento do câncer pode ser realizado mediante várias modalidades terapêuticas, tais como quimioterapia, radioterapia, cirurgia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizadas combinadas ou não (BARRETO *et al*., 2009). A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados, e consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinações, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. As medicações utilizadas nessa terapia agem interferindo no processo de divisão e crescimento celular, porém não são seletivas, agindo, também, em células sadias, como as do tecido hematopoiético, germinativo, do folículo piloso

e do aparelho gastrointestinal, devido apresentar rápida divisão celular (BARRETO; AMORIM, 2009). No entanto, como as células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, ao contrário das células tumorais, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, desde que seja respeitado um intervalo suficiente para que as células saudáveis possam se recuperar, por esse motivo o tratamento deve seguir rigorosamente os ciclos periódicos pré-definidos pelo médico (INCA, 2016) caso contrário a terapêutica pode causar inúmeros efeitos colaterais, dentre eles, destacam-se o do Quadro 1.

Quadro 1: Efeitos colaterais mais recorrentes no tratamento quimioterápico.

PRINCIPAIS EFEITOS COLATERAIS DA QUIMIOTERAPIA	
Órgãos/Sistemas	**Efeitos**
Sistema Nervoso	Cefaleia, sonolência, confusão mental, paralisia motora, dor nos membros inferiores, rigidez na nuca, convulsão e, em casos raros, produzir um estado de depressão e coma.
Sistema Cardiovascular	Associados à falência do miocárdio e hipotensão/ Trombose /Embolia pulmonar
Sistema Respiratório	Fibrose pulmonar podendo causar sintomas como tosse seca, dispneia
Sistema Sanguíneo	Sendo a medula óssea o órgão mais atingido/ Atinge células do sistema imunológico
Sistema Urinário	Afetando diretamente o endotélio urinário, podendo ocorrer sangramento urinário
Sistema Gastrointestinal	Perda ou ganho de peso
Sistema Tegumentar	Alopecia (Perda de pelos)

FONTE: Adaptação de Frias *et al*,2000; Massunaga *et al*.,2000; Massunaga et al,2000; Lourenço et al.,2000; POLICASTRO et al., 2000; Barreto & Amorim, 2009.

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, sem que os efeitos colaterais alterem o protocolo de quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005).

2.2 LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL)

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um constituinte normal do sangue e a principal transportadora de colesterol na circulação, carregando cerca de 2/3 do colesterol total (ALMEIDA *et al*., 2010). 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 com uma maior quantidade de captação de LDL pelos tumores; diminuição da LDL plasmática em pacientes com câncer e 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 similar a ela (FIRESTONE, 1993; FAVERO & BYDLOWSKI, 2008).

As partículas de LDL possuem um diâmetro médio de 25-50 nanômetros e são constituídas de aproximadamente 170 moléculas de triglicerídeos e 1600 moléculas de colesterol esterificado, com 700 moléculas de fosfolipídios na monocamada que a reveste, contendo apenas uma apolipoproteína, a apoB-100 e 600 moléculas de colesterol livre, sendo um terço no interior da vesícula e o restante no envoltório (HEVONOJA *et al*., 2000). A ApoB-100 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. A apo B-100 e Apo B-48, devido provavelmente ao seu grau de interação com os componentes lipídicos das lipoproteínas, não apresentam esta propriedade de translocação (HEVONOJA *et al*., 2000).

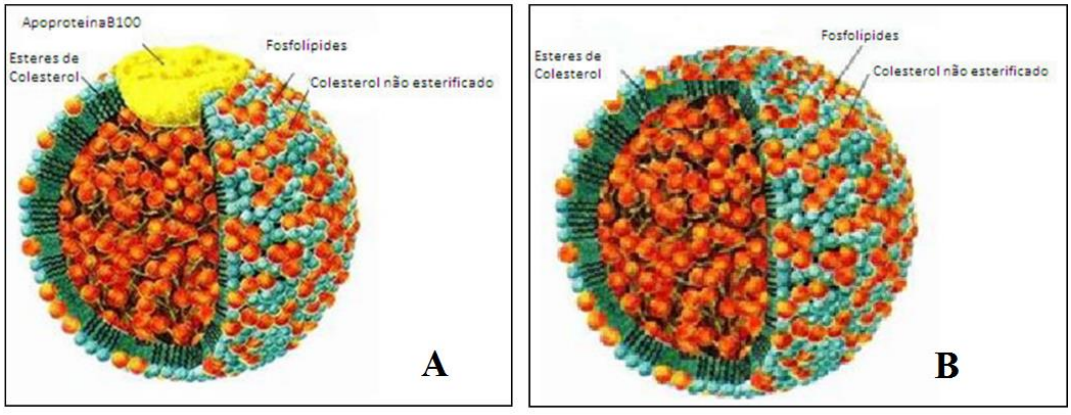
A LDL é originada da VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), que é produzida no fígado e convertida em ILD e posteriormente em LDL, através de processo metabólico ocorrido na circulação. Possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente dois dias. Sua densidade varia entre 1,019 e 1,063 g/ml, possuindo 3 subclasses bem definidas dentro desta variação de densidade (RHAINDS *et al*., 1999). A remoção da LDL do plasma é feita principalmente pelo fígado, mas também perifericamente, ocorre pela captação da LDL através da interação com os receptores de LDL (LDL-R). Estes receptores que se encontram na membrana das células, têm afinidade tanto por Apo B-100 como por Apo E, encontram se em regiões específicas da membrana de todos os tipos celulares do nosso organismo (GOLDSTEIN et al., 1983). Após a interação da lipoproteína com o receptor, ocorre sua internalização com a participação da clatrina, uma proteína de sustentação celular, formando vesículas endocíticas, cuja fusão forma os endossomos. A diminuição do pH local promove a liberação do receptor

de LDL, que acaba por voltar à superfície da membrana (GOLDSTEIN *et al*., 1980). A concentração de colesterol intracelular é o regulador da afinidade dos receptores B/E por LDL, assim como da sua expressão (RALL *et al*.,1983).

2.3 NANOPARTÍCULA DE COLESTEROL OU LDE

Na área da Nanotecnologia Biomédica, o grupo comandado pelo professor Raul Maranhão, descreveu o primeiro sistema de nanopartículas (não lipossomais) produzidas em laboratório, capazes de direcionar e concentrar fármacos no sitio de ação "drug targeting" para tratamento de doenças proliferativas como o câncer (MARANHÃO *et al*., 1992, 1994, 2008). Essas nanoparticulas criadas em laboratório foram denominadas de LDE, e são parecidas estruturalmente com as partículas da lipoproteína de baixa densidade LDL, que é um constituinte normal do sangue, além de ser a principal transportadora de colesterol para todos os tecidos. Tanto a LDL como a LDE podem ser observadas nas figuras 3 A e B, respectivamente.

Figura 3. A. Estrutura da lipoproteína de densidade baixa (LDL) / B. Estrutura da nanoemulsão lipídica (LDE)

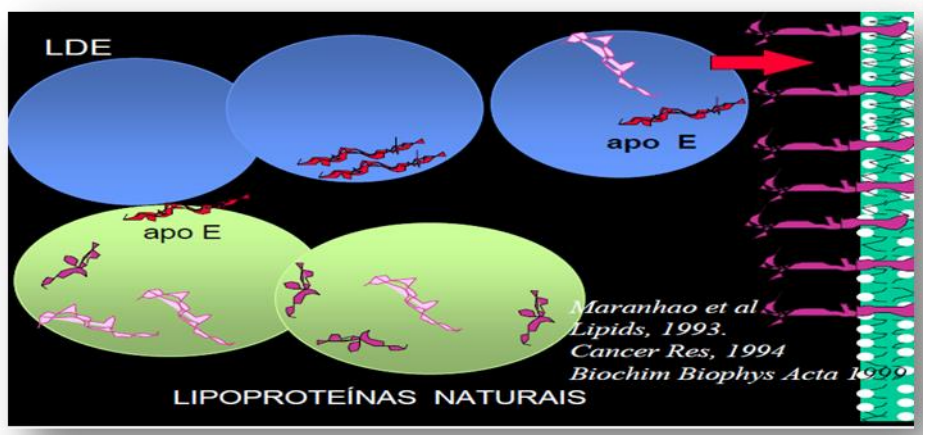


Fonte Raul Maranhão, 2011.

As LDE demonstraram que, quando injetadas na circulação, são captadas pelas células através de endocitose mediada pelos receptores da LDL (HIRATA *et al*., 1999). A LDE e produzida sem proteínas e não apresenta a apolipoproteína B 100; mas em contato com o plasma, em colisões com as diversas lipoproteínas, as apolipoproteínas (apo) como a apo CII, apo A1, apo E e outras aderem à superfície das articulas (figura 4). A apo E serve de ligante da LDE aos receptores da LDL. Por isso, a LDE é removida mais rapidamente da circulação do que a própria LDL natural: a apo E tem 20 a 30 vezes mais afinidade pelo receptor do que a apo

B100, única apolipoproteína da LDL natural e que é o ligante da LDL ao receptor (MARANHÃO *et al*., 1993).

Figura 4. Representação da aderência de apolipoproteínas E.



Fonte: Raul Maranhão (1999).

Um amplo espectro foi aberto com a descoberta de que a LDE, após injeção na corrente circulatória, concentra-se nos tecidos tumorais e pode ser usada no tratamento do câncer como veículo para direcionar quimioterápicos para as células neoplásicas (MARANHÃO *et al*., 2002). As células neoplásicas malignas têm como uma das suas principais características apresentarem uma super expressão dos receptores da LDL (HO *et al*., 1978; GAL *et al*., 1981; VITOLS *et al*., 1992). O aumento desses receptores é necessário para que as células aumentem a captação de colesterol e fosfolipídeos, presentes na LDL, para síntese de membranas constituídas por esses lipídeos, sendo requerida para a aceleração na taxa de mitose característica do processo proliferativo neoplásico (TEIXEIRA *et al.,* 2004; TEIXEIRA *et al*., 2008).

A semelhança das nanoemulsões com as lipoproteínas naturais do corpo possibilita o uso da LDE como veículo para o direcionamento de quimioterápicos associados ás partículas aos tecidos neoplásicos. O uso dessa associação atribui vantagens ao tratamento, tais como, os quimioterápicos serão atraídos com mais eficácia para as células malignas, já que essas células possuem um número aumentado de receptores. Com isso, pode-se aumentar a eficiência terapêutica desses agentes e diminuir os efeitos colaterais que constituem umas das limitações mais importantes da quimioterapia (NAOUM *et al*., 2004).

Nos experimentos visando o tratamento do câncer com a nanoemulsão como veículo, fizeram-se progressos significativos. Foi demonstrado não só em animais de experimentação, mas também em pacientes nos quais tanto a LDE quanto os fármacos a ela incorporados se

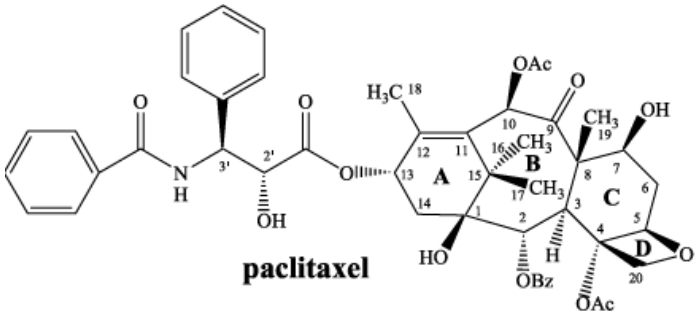
concentram nos tumores (GRAZIANI *et al*., 2002; VALDUGA *et al*., 2003; AZEVEDO *et al*.,2005; RODRIGUES *et al*., 2005). A incorporação e a estabilidade de fármacos no interior da LDE foram otimizadas com a modificação destes sem que houvesse perda do seu efeito farmacológico. Dessa forma foi possível com a modificação desses fármacos, prosseguir com a montagem de um arsenal terapêutico associado as nanoemulsões.

Preparações da LDE, associada a formas modificadas dos agentes quimioterápicos etoposideo (VALDUGA *et al*., 2003), paclitaxel (RODRIGUES *et al*., 2005) e, mais recentemente, daunorrubicina e metotrexato estão prontas e com eficiência testada *in vitro* e *in vivo*. Em todos os casos, comparando-se essas associações com nanoemulsões com as respectivas preparações comerciais, mostrou-se em cultura de células neoplásicas e modelos de tumores implantados em animais (tumor de Walker e melanoma B-16), ação terapêutica maior em doses mais baixas, melhor eficiência na regressão tumoral e maior sobrevida dos animais (TEIXEIRA *et al*., 2004; RODRIGUES *et al*., 2005; LO PRETE *et al*., 2006). Em ensaios clínicos com a carmustina, etoposideo e paclitaxel (MARANHÃO *et al*., 2002; PINHEIRO *et al*., 2006; PIRES *et al*., 2009) verificou-se que o uso desses fármacos associados a LDE, mesmo em doses mais altas do que as usualmente empregadas na clínica, apresentou toxicidade reduzida (MARANHAO *et al*., 2002).

2.4 - PACLITAXEL

Paclitaxel é o fármaco precursor de uma classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. Sua descoberta foi fruto de trabalho laborioso em que foram investigados pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) aproximadamente 12000 compostos naturais, os quais foram testados contra um painel de tumores experimentais e, no final, apenas aqueles que apresentaram alguma atividade foram selecionados (ROWINSKY *et al*., 1990). O paclitaxel foi extraído primariamente no começo dos anos 60 a partir do extrato de casca do teixo do Pacifico, chamado *Taxus brevifolia*. Sua forma pura somente foi obtida em 1969 e sua estrutura química (Figura 5), descrita pela primeira vez em 1971 (WANI *et al*., 1971).

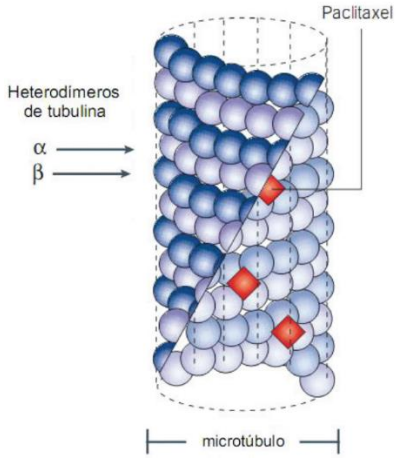
Figura 5. Estrutura tridimensional e bioquímica do Paclitaxel



Fonte: Pan *et al*., 2009.

O Paclitaxel não era um agente de reconhecida importância até o final dos anos 70, quando foi descoberto que possuía um mecanismo de ação único. (SCHIFF E HORWITZ, 1980). O Paclitaxel é um fármaco da classe dos taxanos (ROWINSKY et al., 1990). 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 ao componente β-tubulina do dímero α-β-tubulina (Figura 6), proteínas essas que promovem e compõem a polimerização dos microtúbulos, impedindo assim, a sua despolimerização, através da estabilização da dinâmica microtubular (ALBERT *et al*, 2004; SUN *et a*l, 2009).

Figura 6. Mecanismo de ação do Paclitaxel



Fonte: Adaptado de BRANDÃO *et al*., 2010.

Os microtúbulos são essenciais no processo de mitose, necessários durante a divisão celular, além de serem elementos importantes para a manutenção da forma celular, 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 consequentemente na quebra dos cromossomos, bloqueando o ciclo celular no final da fase G2 e na Mitose, impedindo a proliferação das células neoplásicas, resultando consequentemente na morte das mesmas (ALBERT *et al*, 2004; SUN *et al*, 2009; LATASTE *et al*. 1984; GUERITTE-VOEGELEIN *et al*., 1991; RAO *et al*., 1994).

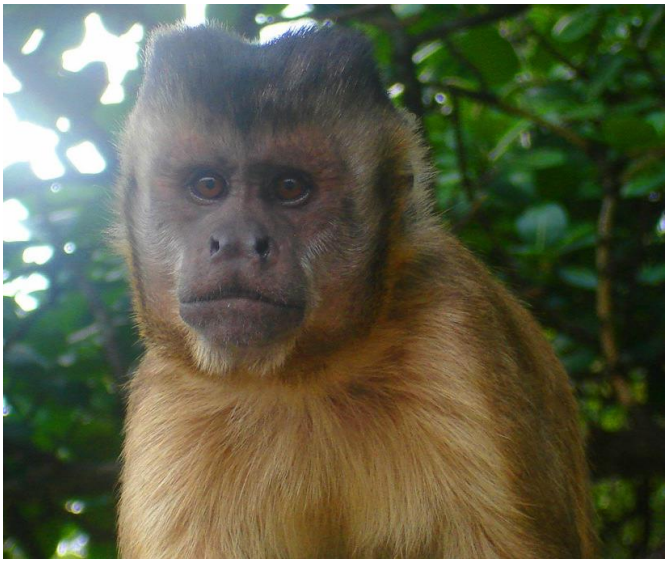
O paclitaxel tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, colo uterino, células não pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi (ROWINSKY *et al*., 1994). É utilizado em vários países, entre eles o Brasil, como tratamento de primeira linha em câncer refratário de ovário e segunda linha em câncer de mama (MÉNDEZ, 2010).

2.5 PRIMATAS NÃO HUMANOS- *Sapajus apella*

O primata não humano da espécie *Sapajus apella* é conhecido popularmente como macaco prego e pertence à subordem *Anthropoídea*, superfamília *Platyrrhini*, família C*ebidae* e gênero *Sapajus*. 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-prego são indivíduos de médio porte cujo peso varia de 2,5 a 5,0 kg, são robustos, apresentam um moderado grau de dimorfismo sexual no tamanho sendo os machos maiores que as fêmeas; possuem cauda semi-prênsil e curvada para baixo que muitas vezes é utilizada durante o forrageio para suspender o animal durante breves períodos de tempo (YOULATOS, 1999; FRAGASZY *et al.* 2004).

Figura 7. Macaco-prego (*Sapajus spp.*). Notar a presença de um tufo de pêlos na região frontal da cabeça, cuja coloração e extensão podem variar entre as espécies e entre indivíduos.



Fonte: Karina Portilho, 2009.

São animais com uma longevidade em torno dos 40 anos e bastante inteligentes, sendo os únicos macacos *platirrinos* capazes de utilizar ferramentas na natureza com o intuito de facilitar a exploração de recursos (FRAGASZY *et al*., 2004).

São indivíduos diurnos e arborícolas que mostram uma preferência pela parte central do dossel, embora possam forragear no chão (principalmente os machos com tamanho maior) e em níveis mais altos da copa (FRAGASZY *et al*., 2004; FLAIBAN, 2006). São animais onívoros, cuja dieta é composta principalmente por frutos e insetos, embora possam incluir sementes, flores, brotos e pequenos vertebrados (BICCA-MARQUES *et al*., 2006).

A utilização crescente dos primatas da espécie *Sapajus 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, bioquímica, imunológica e virologia (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 à carcinógenos 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).

2.5.1 Padrões de normalidade hematológica de *Sapajus apella* criado em cativeiro

A avaliação hematológica permite analisar o estado de saúde do organismo, diagnosticar doenças, realizar prognósticos e acompanhar a evolução do tratamento e possibilita a avaliação da resposta terapêutica (NEVES *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). Essas análises são demonstradas de forma numérica, mostrando os valores de referência de cada um dos parâmetros analisados de acordo com a idade, sexo e espécie do paciente, e alterações nos padrões de referências podem estar relacionadas com modificações hematológicas importantes no diagnóstico de doenças (VERRASTRO, 2005)

Os valores de referência para espécie *Sapajus apella* estão descritos na Tabela 1.

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

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

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

2.5.2 Padrões de normalidade bioquímica de *Sapajus apella* criado em cativeiro

A bioquímica sérica é uma ferramenta útil para avaliar o estado de saúde de mamíferos. Idade, sexo, estado de hidratação e condição nutricional são variáveis que influenciam nos resultados. Outras fontes de variação estão relacionadas aos fatores ambientais tais como: fotoperíodo, temperatura e manejo, bem como, métodos de coleta de amostras e técnicas laboratoriais (THRALL *et al*., 2007).

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 (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Gama-glutamiltransferase (GGT) entre outras (OZER *et al*.,2008), servindo assim como sinalizadores celulares de dano hepático. 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, Triglicerídeos, Cálcio e etc. (BURTIS *et al*., 2008).

A análise da uréia e da de creatinina como biomarcadores de lesão celular associado a drogas terapêuticas continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal (SODRÉ *et al*., 2007), demonstrando a importância dessa análise em estudos sobre toxicidade de fármacos. Entretanto, existem poucas informações sobre bioquímica sérica em diferentes primatas, particularmente nos do Novo Mundo (RIVIELLO e WIRZ, 2001).

Os valores considerados dentro dos padrões de normalidade para *Sapajus apella* de alguns marcadores bioquímicos como: AST, ALT, GGT, ureia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, colesterol e albumina estão na Tabela 2.

Tabela 2: Valores normais dos padrões bioquímicos de *Sapajus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos

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

Fonte: Adaptado de Riviello e Wirz (2011)

3. JUSTIFICATIVA

O sistema de nanoemulsões LDE é resultado de pesquisas realizadas inteiramente no País, abrangendo estudos de físico-química, farmacotécnica e farmacologia celular em modelos animais e ensaios clínicos, oferecendo assim várias vantagens. O LDE ao reduzir acentuadamente a toxicidade da quimioterapia, propicia, caso necessário, o aumento da dose do fármaco, dilatando as possibilidades de associação de drogas na poliquimioterapia. Além disso, possibilita o tratamento quimioterápico mais prolongado, já que a toxicidade acumulada diminui. Ao concentrar o fármaco no seu sítio de ação, pode aumentar a efetividade do tratamento. Além disso, a incorporação em nanopartículas protege o fármaco contra degradação química na corrente circulatória. Com essas vantagens, e manufaturado a partir de lípideos 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 sobrevida.

Nos últimos 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 *in situ* das diversas preparações LDE-quimioterápico que têm sido produzidas. O processo de formulação dos quimioterápicos veiculados na LDE não encarece apreciavelmente o tratamento, pelo custo adicional dos lípideos ou do processo de incorporação às nanopartículas. Assim, ao evitar gastos adicionais com medicamentos, como antieméticos potentes e outros, para tratamento dos efeitos colaterais e internações, o uso do sistema LDE pode também gerar grande economia para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar a toxicidade crônica das nanopartículas associada com o fármaco Paclitaxel em indivíduos da espécie *Sapajus apella*, a partir da determinação de parâmetros hematológicos, bioquímicos, peso e suas possíveis alterações.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar de forma seriada a toxicidade crônica das nanopartículas associadas com o quimioterápico Paclitaxel em indivíduos da espécie *Sapajus apella*, a partir da determinação dos padrões hematológicos e bioquímicos, com suas possíveis alterações.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliação seriada da possível toxicidade crônica da nanoemulsões LDE-Paclitaxel em *Sapajus apella*, com determinação dos parâmetros hematológicos durante todo o período experimental.

Avaliação seriada da possível toxicidade crônica da nanoemulsões LDE-Paclitaxel em *Sapajus apella*, com determinação dos parâmetros bioquímicos feitos durante todo o período experimental

Comparar os padrões do hematológicos da nanoemulsões LDE-Paclitaxel com a forma comercial do quimioterápico em estudo e com o controle negativo.

Comparar os padrões bioquímicos da nanoemulsões LDE-Paclitaxel com a forma comercial do quimioterápico em estudo e com o controle negativo.

Acompanhar o peso dos animais durante todo o período experimental.

5. 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 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. Possui como número de autorização 31625-1 (anexo – 02).

5.1 PREPARAÇÕES E DERIVATIZAÇÃO DAS NANOEMULSÃO

As Nanoemulsões LDE são preparadas a partir de uma bateria de soluções mães dos lípides constituintes da LDE dissolvidos em clorofórmio: metanol 2:1, onde será preparada uma mistura com a seguinte composição: fosfolípides ésteres 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 será realizado no método descrito anteriormente por Maranhão e cols (1993). O tamanho médio das nanopartículas será monitorado pela técnica de dispersão de feixe de laser. A preparação então irá ser centrifugada a 3700 rpm, por 20 minutos, e filtrada em membrana 0,22 μm para esterilização. A preparação será armazenada em tubos estéreis, apirogênicos, a 4°C.

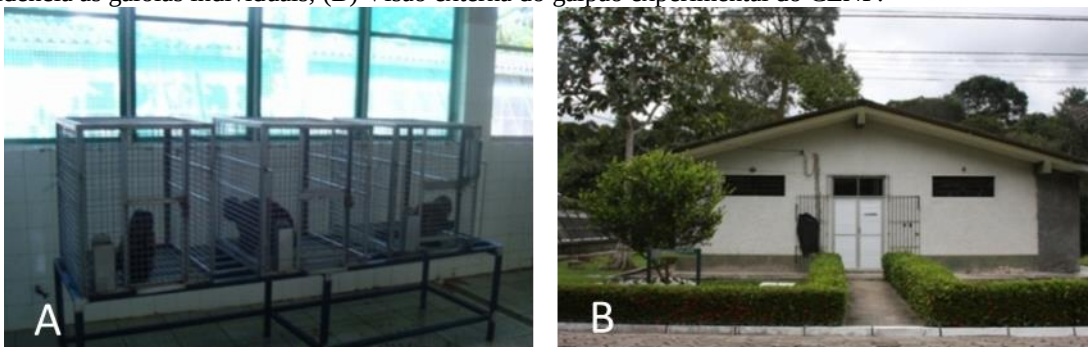
A derivatização dos fármacos para incorporação na LDE no Oleato de Paclitaxel será di-esterificado com brometo de dodecila em presença de carbonato de césio como catalisador, seguindo procedimento descrito na literatura por Rosowsky e cols, 1984. Basicamente a reação de esterificação se dá utilizando-se diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como intermediário e catalisador.

5.2 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Os animais utilizados no experimento são da espécie *Sapajus apella* e foram mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), localizado na cidade de Ananindeua no estado do Pará. Os animais estavam sob as condições padrões do CENP e foram previamente selecionados e separados para realização deste trabalho. Foram definidos como critérios de inclusão os seguintes aspectos: Todos os animais inclusos no projeto eram machos, com pesos equivalente que variavam de 3,00 a 3,750 Kg, sendo que nenhum dos animais previamente selecionados poderiam ter participado de nenhum projeto anterior dentro do CENP, além de contar com um bom estado de saúde que foi analisado e comprovado pelos exames clínicos, tais como exames laboratoriais, como a análise do hemograma e bioquímica (função hepática e renal), além de vermifugação para ser atestado que os mesmos eram saudáveis. Após essa análise inicial realizada pelos veterinários do CENP os animais foram escolhidos e transferidos para o galpão experimental.

Os animais selecionados foram mantidos em gaiolas individuais de alumínio com dimensões de 80x90x80cm (Figura 05), dentro de galpões telados, sujeitos ao foto período natural, luz solar durante o dia e sem luz durante a noite, com alimentação diária à base de frutas, verduras, legumes, tenébrios larvas do besouro *Tenébrio molitor* (*Zophobasmorio*), ração peletizada (*FOXY Junior Supreme*, 28% proteína bruta; PROVIMI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e água.

Figura 08. (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 do CENP.



Fonte: Arquivo pessoal, 2015.

Os experimentos foram realizados na Unidade de Experimentação do CENP e no Laboratório de Citogenética Humana da UFPA.

Um total de 15 espécimes de *Sapajus apella* foram incluídos no projeto e avaliados durante todo o período experimental. Cada grupo era composto por três animais, descritos de acordo com a disposição abaixo:

- Grupo 1 - Controle (CN): animais sem tratamento. Esse grupo recebeu solução salina por via intravenosa.

- Grupo 2 - tratados (EXP1): animais que receberam a LDE quimioterápico por via intravenosa na dose de 175 mg/m^2.

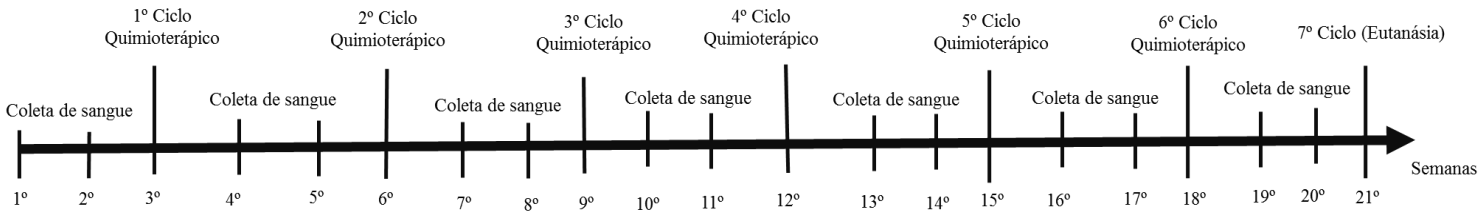
- Grupo 3 - tratados (EXP2): animais que receberam a LDE quimioterápico por via intravenosa na dose de 250 mg/m^2.

- Grupo 4 – Tratados comercial (CP1): animais que receberam por via intravenosa o fármaco na forma comercial na dose de 175 mg/m^2.

- Grupo 5 – Tratados comercial (CP2): animais que receberam por via intravenosa o fármaco na forma comercial na dose de 250 mg/m^2.

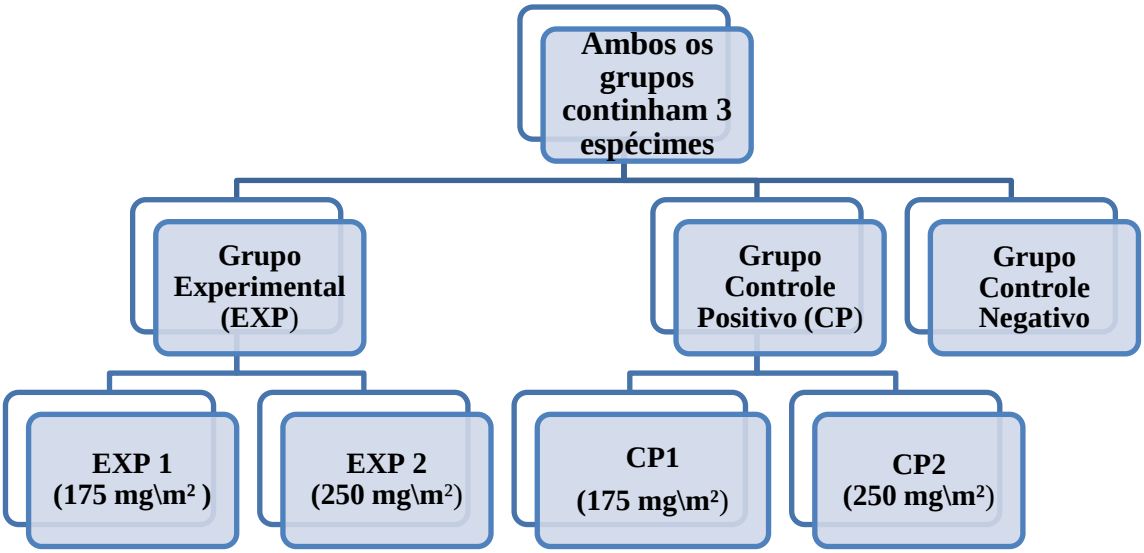
Os animais foram acompanhados durante seis ciclos, com intervalo de três semanas (Figura 9). Durante o período de tratamento, foram registrados diariamente os sintomas físicos e clínicos, assim como foi mensurado seu peso, e feito análises hematológicas e bioquímicas em cada ciclo.

Figura 9: Linha temporal representando os ciclos quimioterápicos



Antes de cada procedimento experimental (coleta de sangue periférico, aplicação do LDE-PTX e PTX comercial) os animais eram previamente sedados por injeção via intramuscular com 0,2 mg/kg de *Zoletil*® 50 (Cloridrato Tiletamina e Cloridrato Zolazepam). O delineamento experimental está descrito no fluxograma abaixo.

Figura 10: Fluxograma representando o delineamento experimental



5.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para coleta de sangue periférico os animais foram previamente sedados por injeção via intramuscular de 0,2 m/kg de Zoletil® 50 (Cloridrato Tiletamina e Cloridrato Zolazepam), sendo coletados 5 ml de sangue por venopunção da veia femoral direita e/ou esquerda. O material foi dividido e armazenado em vacutainers contendo o anticoagulante EDTA e gel SST.

Figura 11. Coleta de sangue por venopunção da veia femoral

Fonte: Arquivo pessoal,2016.

5.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

A análise hematológica foi feita utilizando o contador de células automático para uso veterinário *Cell Dyn Ruby* 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).

5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises dos testes bioquímicos de fosfatase alcalina, proteína total, albumina e globulina, bilirrubina total e frações, glicemia, amilase e lipase sérica, e dos eletrólitos sódio e potássio, foram realizadas no soro dos animais nos dias das coletas de materiais.

Os procedimentos foram realizados através do Sistema de química seca ARCHITECT 5000® (Abbot Diagnostics), seguindo a metodologia preconizada pelos fabricantes dos kits para cada parâmetro analisado.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como Média e Desvio Padrão. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$, através do programa BioEstat® 5.3 (AYRES *et al*., 2011).

6. RESULTADOS

Primeiramente determinou-se as diferentes doses a serem utilizadas que foram de 175 mg/m^2 que é a dose utilizada/recomendada no tratamento de câncer com o Paclitaxel na versão comercial e 250 mg/m^2 que é a dose acima do que se é utilizada/recomendada na terapêutica, contudo foi uma das doses testadas em experimentos anteriores tanto *in vitro* quanto *in vivo* que demonstraram eficácia no tratamento. Em seguida, foi estabelecido a separação dos grupos que iriam receber as doses experimentais e comercial do PTX, e foi realizada a manutenção dos animais pertencentes ao grupo controle negativo e foi feita a administração do fármaco nos demais animais do grupo tratado comercial e experimental. Vale ressaltar que os grupos controle positivo 1 e 2, que receberam o PTX comercial, iniciou o experimento com 3 animais em cada dose (175 e 250 mg/m^2), entretanto já no 1° ciclo da quimioterapia, vários animais apresentaram efeitos adversos consideráveis e o veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais, sugeriu a suspensão da veiculação do fármaco em alguns animais, para evitar ao máximo o sofrimento dos mesmos. Assim, somente dois animais continuaram os ciclos de quimioterapia e os grupos ficaram compostos apenas por um animal em cada dose (175 e 250 mg/m^2).

Os dados de hemograma, bioquímica e peso dos animais inicialmente foram analisados com todos os dados coletados durante todo o período experimental, onde os mesmos foram expressos através da média e desvio padrão. Posteriormente foi feita uma análise seriada, ou seja, os dados utilizados foram aqueles coletados após cada ciclo quimioterápico, buscando analisar da melhor forma os efeitos da quimioterapia nos animais. Dessa forma será possível fazer a comparação dos resultados no fim do período experimental com os de cada ciclo quimioterápico.

6.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Os animais que compuseram os grupos controle negativo e experimental (1 e 2) não tiveram diferença significativa comparando a média de peso presente na literatura (3,750 Kg) (FERREIRA, 2009). Já os animais do grupo controle positivo (1) tiveram valores de peso significativamente menores ao serem comparados aos grupos controle negativo e experimental (1 e 2) e os animais do grupo controle positivo 2 também mantiveram seu peso abaixo do normal, principalmente quando comparamos aos grupos EXP (1 e 2) e CN. Vale ressaltar que os animais tiveram seu peso mensurado durante todo o período experimental e os valores foram

tabelados e suas medias foram expressas ao fim do experimento e analisadas em cada ciclo quimioterápico. Os valores da média de peso dos animais são apresentados na Tabela 3.

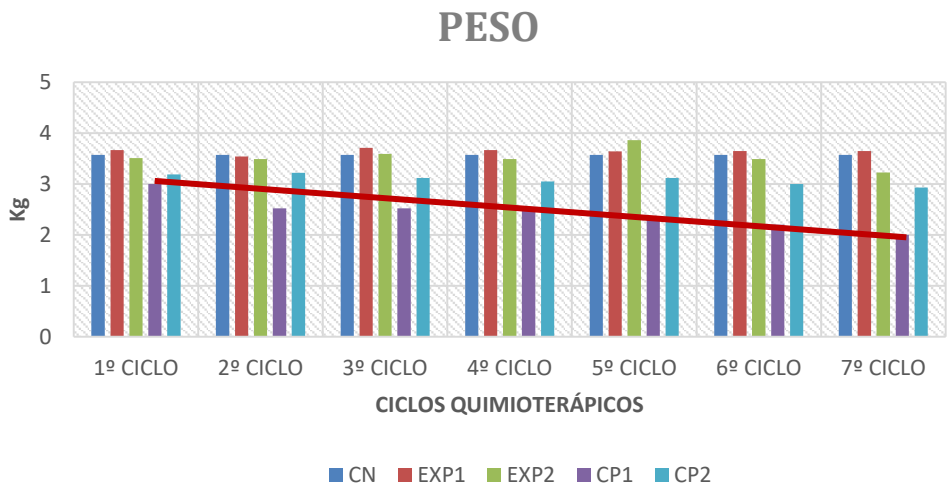
Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimental

GRUPOS	PESO MÉDIA ± DP
CONTROLE NEGATIVO	3,57 ± 0,45
EXP. 1 (175 mg/m²)	3,63±0,42
EXP. 2 (250mg/m²)	3,48±0,12
CP1(175mg/m²)	2,58±0,10[1]
CP2 (250mg/m²)	3,14±0,31

1_<0.05 em relação ao grupo controle negativo e experimental (1 e 2).

Na análise seriada é possível observar que os animais que compuseram os grupos controle negativo, experimental (EXP 1 e EXP 2) mantiveram seu peso equivalente em todo o período experimental. Já no grupo controle positivo 1 (CP1) houve uma acentuada diminuição do peso dos animais desde o primeiro ciclo quimioterápico, e os animais do grupo controle positivo 2 (CP2) também apresentaram peso reduzido durante todo o período experimental (gráfico 1).

Gráfico 1: Analise seriada do peso



6.2 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO.

Os animais do grupo controle negativo tiveram seus parâmetros hematológicos considerados normais, não apresentando diferença estatisticamente significativa ao serem comparados aos valores de normalidade para macacos da espécie *Sapajus apella* mantidos em cativeiro (NAVES *et al*., 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al*., 2008).

Para análise dos parâmetros hematológicos, foi realizada a comparação entre as médias dos grupos Controle negativo, controle positivo e experimental utilizando análise de variância (teste ANOVA - paramétrico). Com base na análise estatística foi possível chegar à conclusão 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 Leucócitos, Linfócito, Monócito e Neutrófilo e no plaquetograma.

Na análise específica do eritrograma pode-se observar que houveram as seguintes alterações: Os valores da hemoglobina no grupo CP1 (12,45) apresentaram média significativamente menor quando comparada com o grupo experimental 1 (14,46) e 2 (14,18); Os valores de média do hematócrito do grupo controle positivo 1 (38,96) foram significativamente menores quando comparado ao experimental 1(43,80); Já os valores obtidos do HCM dos grupos controle positivo 1 (25,13) e 2(26,75) foram significativamente maiores ao serem comparados com a média dos valores do grupo experimental 1 (25,12) e 2 (24,98). Em relação à comparação de médias do parâmetro RDW entre os grupos, analisou-se que os grupos controle positivo 1 (13,38) e 2 (13) apresentou um valor significativamente maior em comparação ao grupo controle negativo e experimental 1 (11,34) e 2 (11,50). Tabela 4

Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do eritrograma

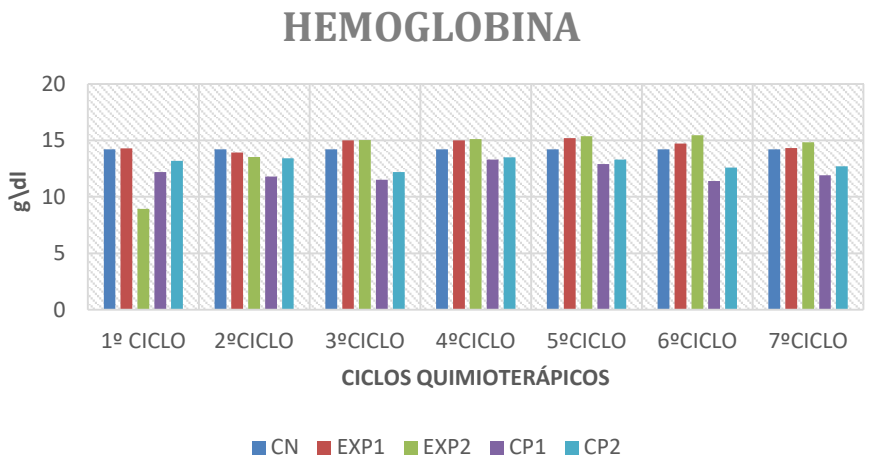
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	**CONTROLE NEGATIVO**	**EXP. 1 175 mg/m²**	**EXP. 2 250mg/m²**	**CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)**	**CONTROLE POSITIVO2 (250mg/m²)**
	MÉDIA ± DP	**MÉDIA± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**
Hematócrito (%)	42,72 ± 1,69	43,80 ± 2,05	42,80 ± 3,11	38,96 ± 2,26[1]	41,21 ± 0,49
Hemoglobina (G/DI)	14,2 ± 0	14,46 ± 0,28	14,18 ± 1,06	12,45 ± 0,21[2]	13,28 ± 0,35
HCM (uug)	24,4 ± 1,69	25,12 ± 0,49	24,98 ± 0,28	25,13 ± 1,62[2]	26,75 ± 0,70[2]
RDW	11,2± 0,21	11,34 ± 0,91	11,50 ± 1,12	13,38 ± 1,06[3]	13 ± 1,62[3]

1 - $p<0.05$ em relação o 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).

Na análise seriada foi possível identificar as alterações causadas pelo fármaco, tanto na versão comercial quanto na experimental, de uma maneira mais detalhada.

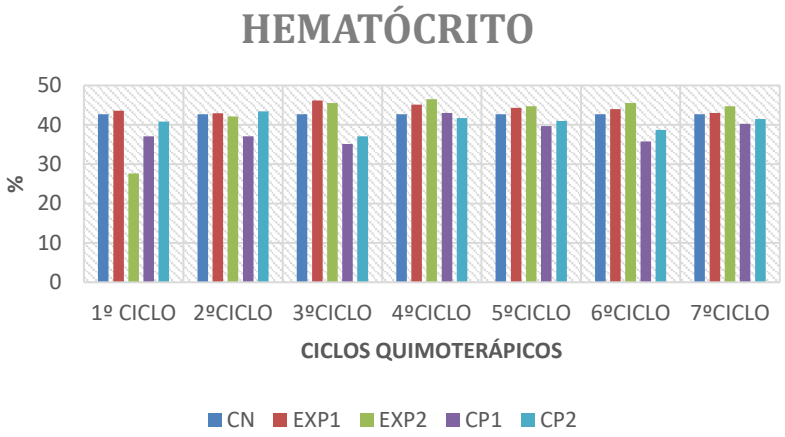
Em relação a hemoglobina foi observada com a análise feita com as medias no final do experimento a diminuição significativa dos grupos CP1 em relação ao grupo experimental 1 e 2, resultado que também é observado quando se analisa os dados de forma seriada, demostrando que o grupo CP1 teve uma diminuição a partir do segundo ciclo quimioterápico. Outro ponto relevante observado na análise seriada foi a diminuição acentuada do parâmetro analisado no grupo EXP 2 após o primeiro ciclo quimioterápico, entretanto observa-se que no 2º ciclo o mesmo já se encontra estabilizado e permanece equivalente ao grupo CN até o final do período experimental. (Gráfico 2)

Gráfico 2: Analise seriada do parâmetro hemoglobina



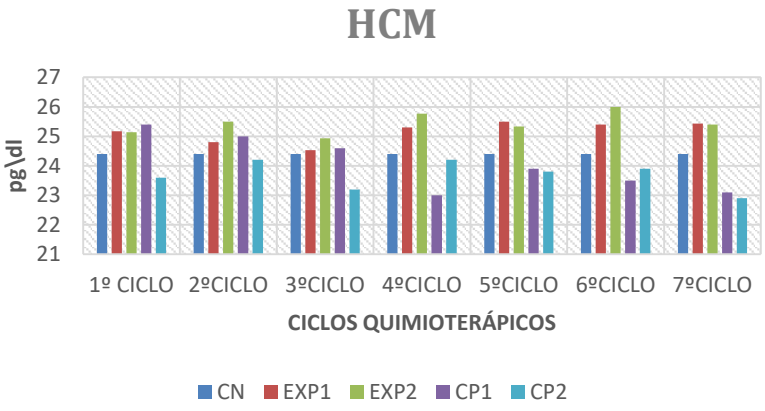
Na análise do parâmetro hematócrito observa-se que o grupo controle positivo 1 teve uma diferença significativamente menor quando comparado ao experimental 1, dado constatado após a análise no final do experimento, essa diminuição se torna evidente desde o primeiro ciclo, no 4º período quimioterápico observa-se um leve aumento da concentração de hematócrito, entretanto no 5º e 6º ciclo quimioterápico os valores voltam a diminuir e no 7º ciclo (eutanásia) os valores tem um aumento, porém ainda encontram-se abaixo dos valores normais (Gráfico 3).

Gráfico 3: Analise seriada do parâmetro hematócrito



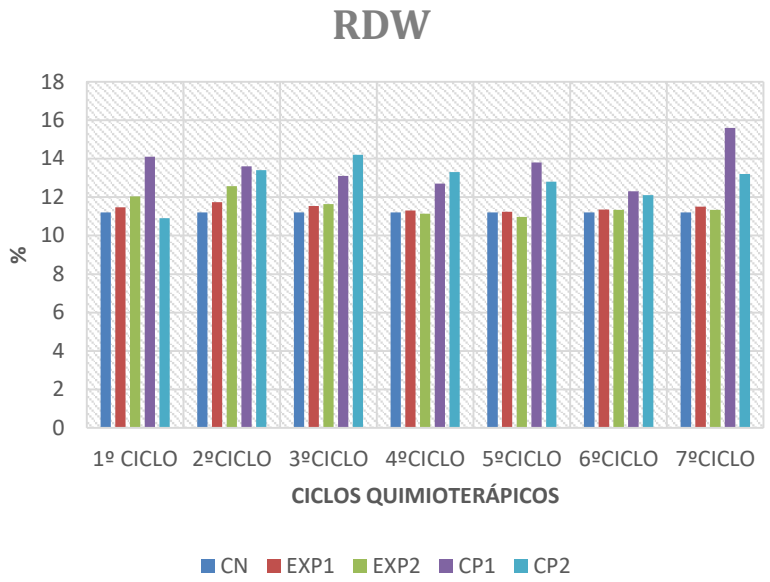
Já em relação ao valor obtido do HCM, observou-se que o grupo controle positivo 1 e 2 foram significativamente maiores ao serem comparados com a média dos valores do grupo experimental, resultado que não e observado após a análise seriada, que demonstra que houve diminuição dos valores de HCM, principalmente no grupo CP2, desde o primeiro ciclo quimioterápico, no 4º ciclo houve uma diminuição relevante no grupo CP1. Tanto o grupo controle positivo 1 quanto o 2 se mantiveram com valores muito abaixo até o dia do sacrifício dos animais (Gráfico 4).

Gráfico 4: Analise seriada do parâmetro HCM



Na comparação de médias do parâmetro RDW entre os grupos, analisou-se que o grupo controle positivo 1 e 2 apresentaram um valor significativamente maior em comparação aos grupos controle negativo e experimental 1 e 2. Houve aumento nos grupos controle positivo 1 e 2 desde os primeiros ciclos quimioterápicos, com exceção no 6º ciclo, onde houve uma discreta diminuição dos valores, porém esses ainda se encontravam acima dos valores normais para a espécie (Gráfico 5).

Gráfico 5: Analise seriada do parâmetro RDW



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

Na análise da média de leucócitos, os valores obtidos no grupo experimental 1 (5,26) e 2 (4,99) foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle negativo (7,91);

Na análise da média de porcentagem do neutrófilo o grupo experimental 1 (36,69) e 2 (40,24) apresentaram média significativamente menor quando comparado ao grupo controle negativo (57,62). O grupo controle positivo 1 (57,39) também apresentou média significativamente maior quando comparado com o grupo experimental 1 e 2. Na comparação entre as médias da porcentagem de linfócitos o grupo experimental 1 (56) e 2 (54,84) teve valores significativamente maiores quando comparado com os grupos controle negativo (30,07) e controle positivo 1 (36,32) e 2 (40,36).

Ao serem comparados os valores das médias das porcentagens dos monócitos entre os grupos, verificou-se que o controle positivo 1 (8,40) e 2 (11,52) apresentou valores significativamente maiores quando comparado com os grupos controle negativo (6,66) e experimental 1 (5,12) e 2 (3,43). Os valores de porcentagem de basófilo apresentaram diferença significativamente maior quando comparamos o grupo experimental 1 (1,85) com o experimental 2 (1,17) (Tabela 5).

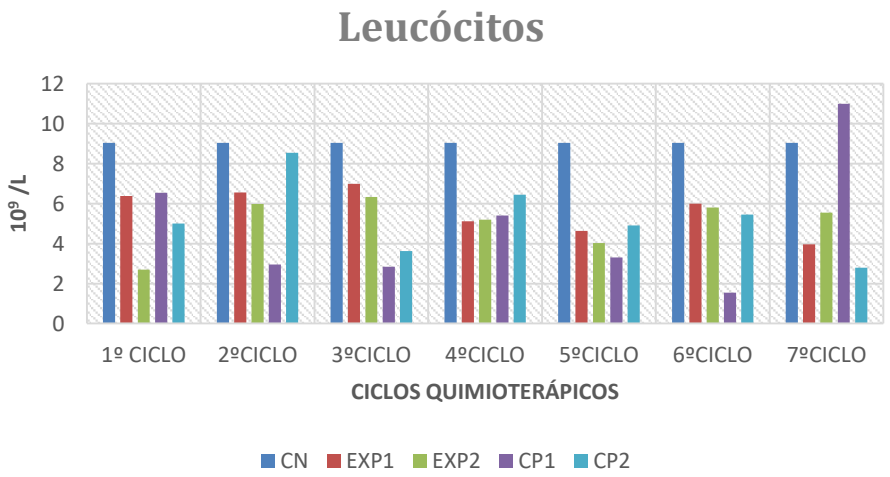
Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do leucograma

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	CONTROLE NEGATIVO	EXP. 1 175 mg/m²	EXP. 2 250mg/m²	CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)	CONTROLE POSITIVO2 (250mg/m²)
	MÉDIA± DP	MÉDIA±DP	MÉDIA± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
Leucócitos	7,91 ± 4,22	5,26 ± 1,26[3]	4,99 ± 1,73[3]	5,12 ± 3,14	5,45 ± 1,56[1]
Basófilo (%)	0,63± 0,13	1,85 ± 2,01[5]	1,17 ± 1,96	1,28 ± 0,70	1,55 ± 2,26
Neutrófilo (%)	57,62 ± 0,84	36,69 ± 8,34[3]	40,24 ± 9,54[3]	57,39 ± 17,39[2]	45,66 ± 20,01
Linfócitos (%)	30,07 ± 0,07	56 ± 7,28[4]	54,84 ± 4,45[4]	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[2]	11,52±4,78[2]

1 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (1 e 2).
2 - p<0.05 em relação ao controle negativo e grupo experimental (1 e 2).
3- p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.
4- p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e controle positivo (1 e 2)
5 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (2)

Na análise da média de leucócitos, os valores obtidos no grupo experimental 1 e 2 foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle negativo, resultado observado na análise seriada, entretanto pode ser observado que o grupo controle positivo 1, possui suas medias menores, principalmente no 2º,3º,5º e 6º ciclo quimioterápico, e tem um aumento considerável dos valores de sua média no último ciclo, resultados apresentados no gráfico a seguir, esses dados podem ter influenciado de maneira importante no resultado estatístico, sem que este representasse os resultados de forma fiel.

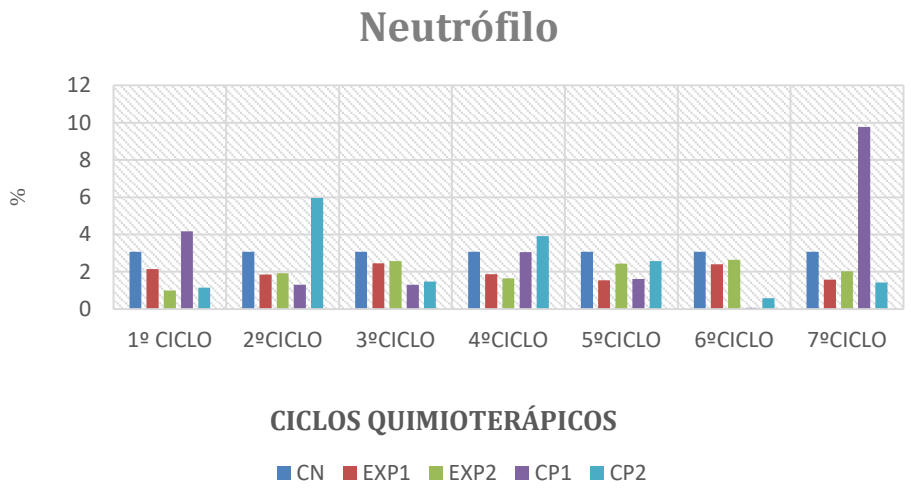
Gráfico 6: Analise seriada do parâmetro Leucócitos



Na análise da média de porcentagem do neutrófilo o grupo experimental 1 e 2 apresentou média significativamente menor quando comparado ao grupo controle negativo. O grupo controle positivo 1 também apresentou média significativamente maior quando comparado com

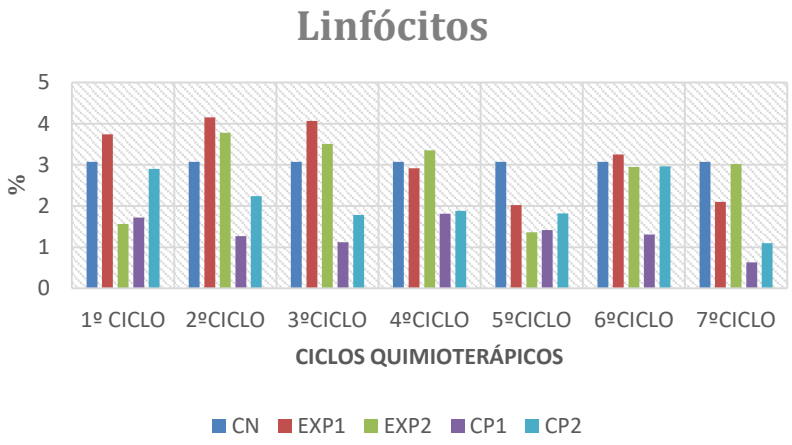
o grupo experimental 1 e 2. E possível observar que houve diminuição de nos grupos CP 1 e 2 em vários ciclos de quimioterapia (Gráfico 7).

Gráfico 7: Analise seriada do parâmetro Neutrófilo



Na análise seriada dos linfócitos o grupo experimental 1 e 2 tiveram os valores significativamente maiores quando comparado com os grupos controle negativo e controle positivo 1 e 2. Resultados que se apresentaram aumentados desde o primeiro ciclo, com diminuição considerável a partir do 4º ciclo que se mantiveram com os valores próximos dos normais até o último ciclo de coleta. Outro ponto relevante é o número muito abaixo do normal dos linfócitos para espécie nos grupos controle positivo 1 e 2.

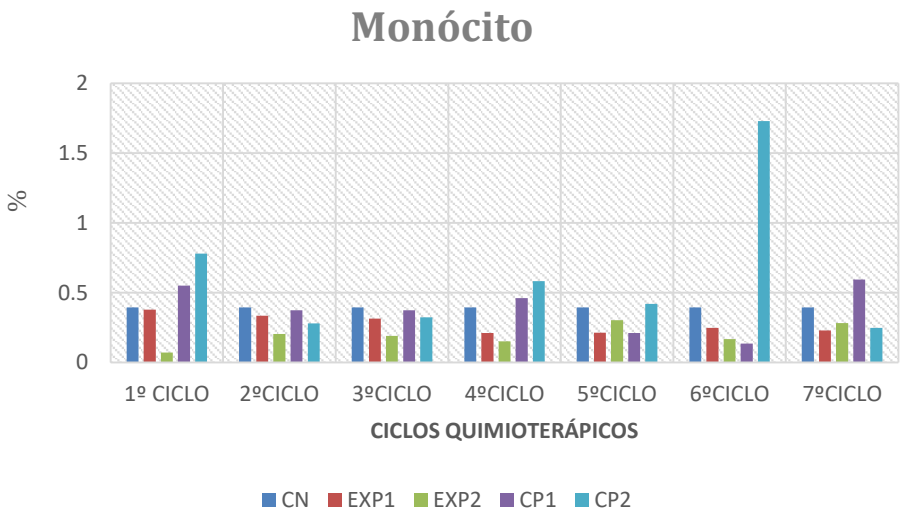
Gráfico 8: Analise seriada do parâmetro Linfócitos



Ao serem comparados os valores das médias das porcentagens dos monócitos entre os grupos, verificou-se que o controle positivo 1 e 2 apresentou valores significativamente maiores quando comparado com os grupos controle negativo e experimental 1 e 2. Resultado observado

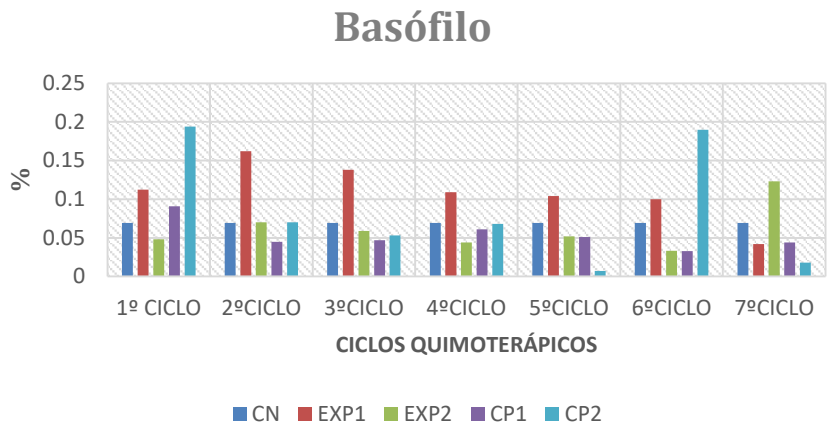
desde o primeiro ciclo, no 6º houve um aumento significativo, principalmente no grupo CP 2 que posteriormente teve uma diminuição considerável após o último ciclo de quimioterapia (Gráfico 9).

Gráfico 9: Analise seriada do parâmetro Monócito



Quando analisamos os resultados ao fim do período experimental dos basófilos observa-se que os valores de basófilo apresentaram diferença significativamente maior quando comparamos o grupo experimental 1 ao grupo experimental 2. Entretanto quando se analisa os dados de forma seriada observa-se que houveram grandes alterações com aumentos significativos do grupo controle positivo 2 com destaque para o 1º e 6º ciclos quimioterápicos, além das alterações dos grupos experimentais 1 e 2 que já tinham sido constatados na análise feita no fim do experimento (Gráfico 10).

Gráfico 10: Analise seriada do parâmetro Basófilo



A observação quantitativa do plaquetograma apresentou os seguintes valores: média das plaquetas do grupo controle positivo 2 (275,5) consideradas significativamente maiores ao serem comparados ao grupo experimental 1 (218,72) e 2 (200,93) e os valores de VPM do grupo controle positivo 1 (14,56) tem valores significativamente maiores em relação ao controle positivo 2 (11,70) e o grupo experimental 1 (12,32) e 2 (12,36) (Tabela 6).

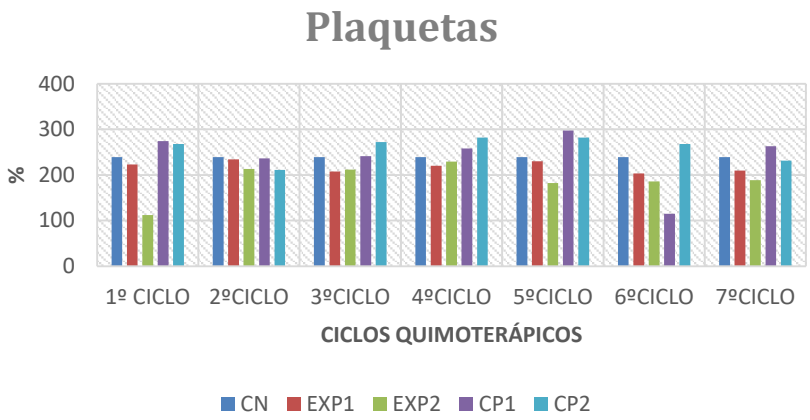
Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise do plaquetograma

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	**CONTROLE NEGATIVO**	**EXP. 1 175 mg/m²**	**EXP. 2 250mg/m²**	**CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)**	**CONTROLE POSITIVO2 (250mg/m²)**
	MÉDIA± DP	**MÉDIA±DP**	**MÉDIA± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**
Plaquetas (x10³/m/mm³)	238,75 ± 91,21	218,72 ±61,51	200,93 ± 1,21	224,83 ± 7,77[1]	275,5 ± 26,16[2]
VPM (fl)	13,4 ± 0,28	12,32 ± 0,56	12,36 ± 0,77	14,56 ± 0,77[3]	11,70 ± 0,91

1 - p<0.05 em relação o grupo experimental (1).
2 - p<0.05 em relação ao grupo experimental (1 e 2).
3 - p<0.05 em relação aos grupos controle positivo 2 e experimental (1 e 2)

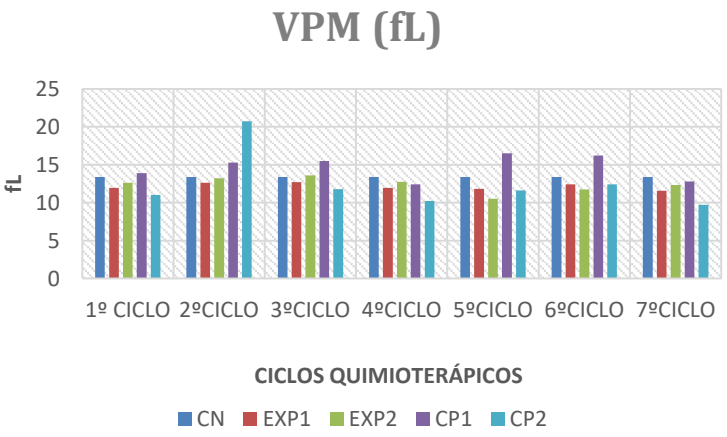
Na observação seriada das plaquetas apresentou os seguintes resultados: média das plaquetas do grupo controle positivo 1 e 2 consideradas significativamente maiores ao serem comparados ao grupo experimental 1 e 2 e controle negativo, resultado observado desde o primeiro ciclo quimioterápico (Gráfico 11).

Gráfico 11: Analise seriada do parâmetro Plaquetas.



Em relação aos valores de VPM observou-se que o grupo controle positivo 1 obteve valores significativamente maiores em relação ao controle positivo 2 e o grupo experimental 1 e 2. Resultado observado a partir do segundo ciclo quimioterápico que foi se estabilizando até a data da última coleta (Gráfico 12).

Gráfico 12: Analise seriada do parâmetro VPM.



Além da análise dos valores de médias dos parâmetros hematológicos citados anteriormente foram analisados, sem apresentar diferença significativa, os seguintes parâmetros: Hemácias, MCV, MCHC e eosinófilo.

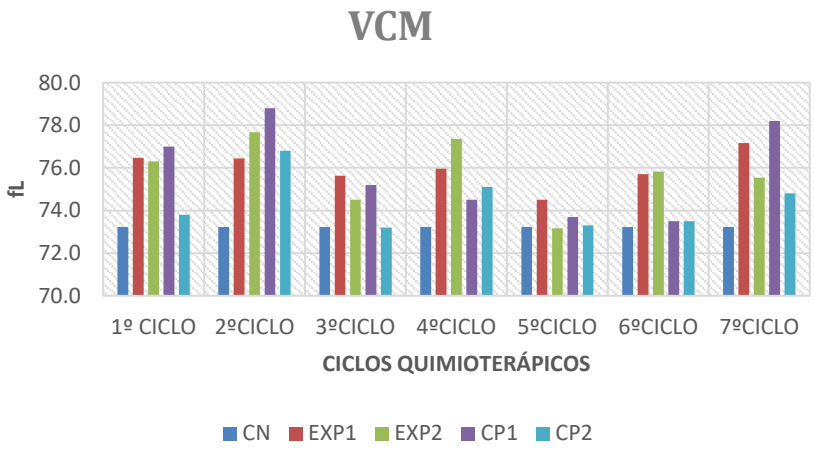
Tabela 7: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos sem alterações estatisticamente significativas

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	CONTROLE NEGATIVO	EXP. 1 175 mg/m²	EXP. 2 250mg/m²	CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)	CONTROLE POSITIVO2 (250mg/m²)
	MÉDIA± DP	**MÉDIA±DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**
Hemácias (mm^3) 10^6	5,89 ± 0,38	5,75 ± 0,24	5,66 ± 0,35	5,19 ± 0,23	5,57 ± 0
MCV	73,22 ± 2,12	76,14 ± 0,21	75,91 ±0,63	75,48 ± 0,84	73,9 ± 0,70
CHCM (%)	32,27 ± 1,34	33,05 ± 0,77	33,22 ± 0,07	31,97 ± 2,47	32,18 ± 1,27
Eosinófilo (%)	0,01±0	0,11±0,13	0,17±0,16	0,02±0,02	0,10±0,05

Entretanto quando se analisa-os de forma seriada e possível observar que tanto o VCM quando os eosinófilos possuem alterações importantes durante o experimento.

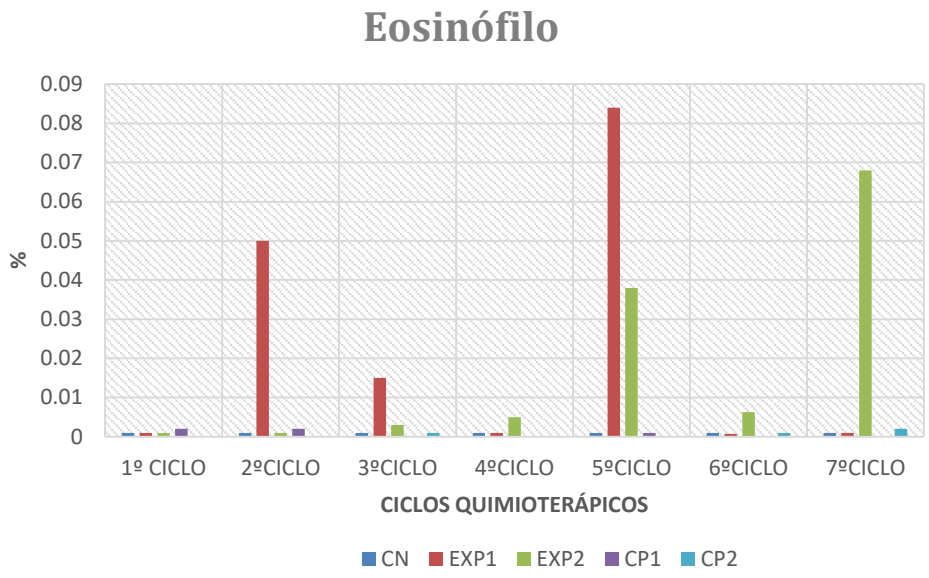
O VCM apresenta aumento das suas médias tanto no grupo experimental 1 e 2, quanto no controle positivo 1 e 2 em quase todos os ciclos quimioterápicos (Gráfico 13).

Gráfico 13: Analise seriada do parâmetro VCM



Já os eosinófilos apresentam aumento no grupo experimental 1 e 2, quando comparamos aos demais grupos, a partir do 5º ciclo o grupo EXP 1 volta aos seus valores normais, entretanto o grupo EXP2 que não tinha tido alterações significativas até o 4º, tem aumento significativo dos seus valores, porem esses não representam uma diferença $p < 0,05$ (Gráfico 14).

Gráfico 14: Analise seriada do parâmetro Eosinófilo



Já os resultados de hemácia e CHCM se mantiveram normais e sem grandes alterações durante todo o período experimental, resultado que podem ser observados nos gráficos a seguir.

Gráfico 15: Analise seriada do parâmetro Hemácia

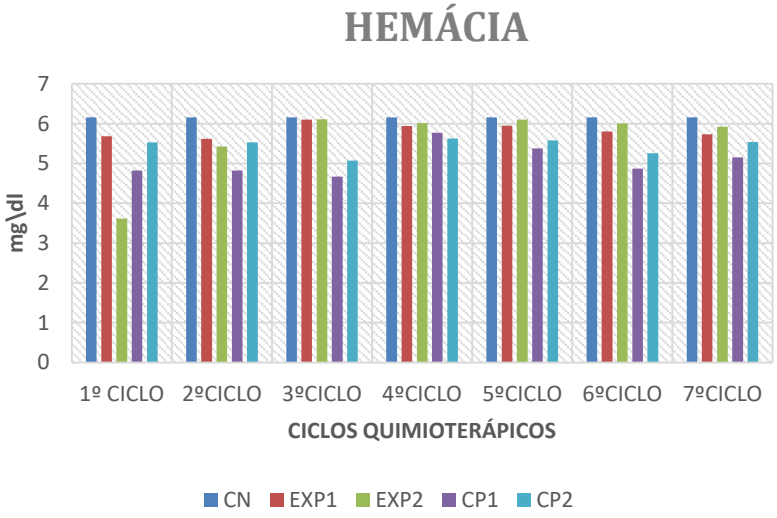
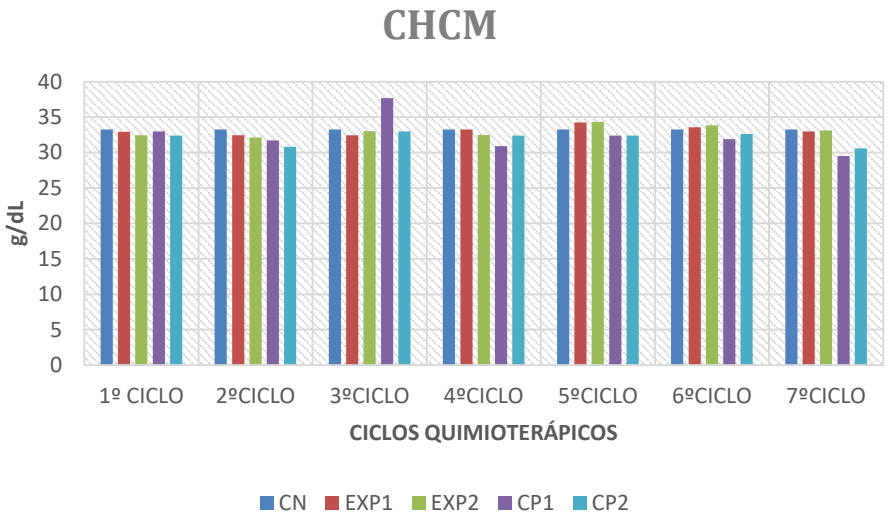


Gráfico 16: Analise seriada do parâmetro CHCM



6.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO

Para análise dos parâmetros bioquímicos, foi realizada a comparação entre as médias dos grupos: experimental 1 e 2 com o controle negativo e comercial (controle positivo 1 e 2) utilizando o teste estatístico de análise de variância (ANOVA - paramétrico).

Os animais do grupo controle negativo tiveram seus parâmetros bioquímicos considerados normais, não apresentando diferença estatisticamente significativa ao serem comparados aos valores de normalidade para macacos da espécie *Sapajus apella* mantidos em cativeiro (NAVES *et al*., 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al*., 2008). Com base na análise estatísticas dos padrões bioquímicos foi possível chegar a conclusão do estado de saúde dos animais submetidos ao experimento, onde pode se observar que ocorreram alterações significativas dos componentes glicemia ,amilase, uréia, colesterol, triglicerídeos, Lipase, VLDL ,LDL e HDL-C além das três enzimas marcadores de efeitos tóxicos sobre o fígado a transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e a gama-glutamil transferase (GGT).

Além da análise dos valores das médias do parâmetro bioquímico citados anteriormente foram analisados, sem apresentarem diferença significativa na comparação entre

os grupos, os seguintes parâmetros: creatinina, ácido úrico, cálcio, bilirrubina total, sódio, potássio, proteína total, albumina e globulina.

Na avaliação dos marcadores bioquímicos que apresentaram diferença estatística significativa podemos observar as seguintes alterações:

Nos parâmetros que analisam função renal observamos que os valores de uréia no grupo experimental 1 (32,61) apresentaram significativamente maiores quando comparado ao grupo experimental 2 (19,94) e controle positivo 1 (21,25), sendo que o grupo controle positivo 2 (28,33) apresentou valor significativamente maior quando comparado com o grupo experimental 2. Já nos valores de média da amilase, os valores obtidos nos grupos experimental 2 (108,92) e controle positivo 1 (68,3) e 2 (87,83) tiveram suas médias significativamente menor quando comparados ao grupo controle negativo (465,33). O grupo controle positivo 1(68,3) e 2(87,83) apresentou media significativamente menor quando comparado ao grupo experimental 1(348,92).

Tabela 8: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão renal

PARÂMETROS BIOQUIMICOS	**CONTROLE NEGATIVO**	**EXP. 1 175 mg/m²**	**EXP. 2 250mg/m²**	**CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)**	**CONTROLE POSITIVO 2 (250mg/m²)**
	MÉDIA ± DP	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**
Ureia (mg/dl)	26,66 ± 16,23	32,61 ± 9,89[1]	19,94 ± 2,50	21,25 ± 5,25	28,33 ± 11,31[2]
Amilase	465,33±66,46	348,92±96,87	108,59±7,07[3]	68,3± 4,94[3]	87,83± 28,28[3]

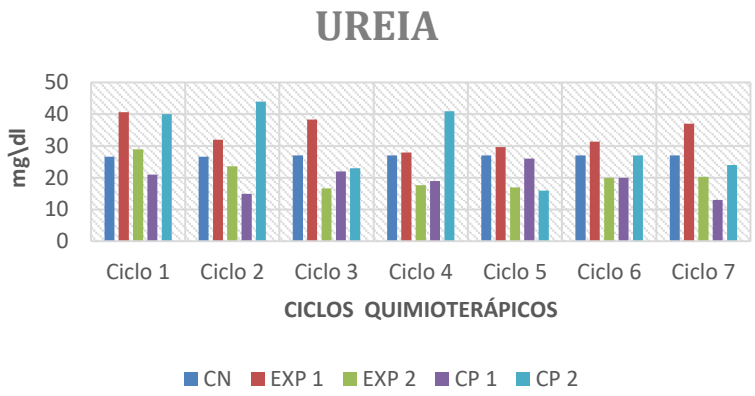
1 - p>0.05 em relação ao grupo experimental (2) e controle positivo (1).

2 - p>0.05 em relação ao grupo experimental (2).

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

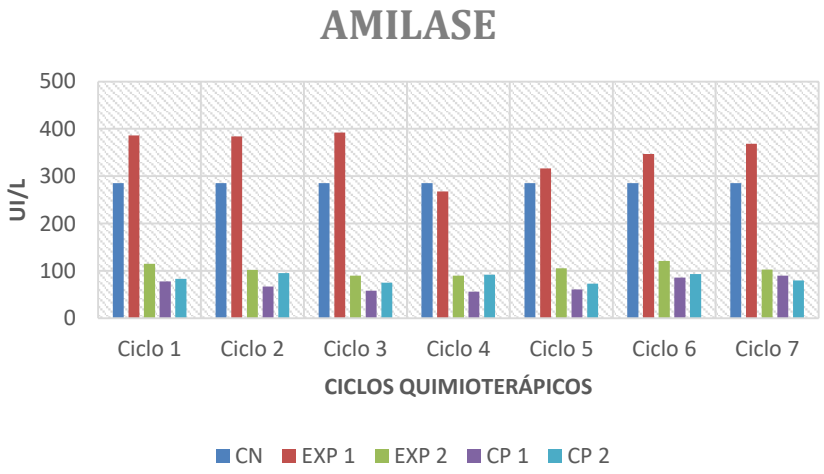
Na analise seriada da ureia observa-se que os grupos EXP 1 e CP2 tiveram suas medias significativamente maiores que os demais grupos (CN, EXP2 e CP2),entretanto o grupos CP2 se normalizou a partir do 4º ciclo. (Gráfico 17)

Gráfico 17: Analise seriada do parâmetro Ureia



Os resultados de forma seriada do parâmetro amilase comprovam que os animais que compuseram os grupos EXP2, CP1 e CP2 tiveram médias significativamente menores desde o primeiro ciclo quimioterápico, principalmente quando comparados aos grupos controle negativo e experimental 1. Em relação ao grupo experimental 1 observa-se que os valores se mantiveram próximos aos considerados normais para a espécie, valores representados pelo grupo controle negativo (Gráfico 18).

Gráfico 18: Analise seriada do parâmetro Amilase



Em relação aos marcadores de lesão pancreática observa-se que no parâmetro glicose houveram as seguintes alterações, o controle positivo 2 (106,58) apresentou médias significativamente maiores quando comparados aos grupos experimentais 1 (63,22) e 2 (74,8) e controle positivo 1 (86,41), já o controle positivo 2 (106,58) e experimental 2 (74,8)

apresentaram valor significativamente maior ao serem comparados ao grupo experimental 1 (63,22).

Em relação à lipase os controles positivos 1 (14,50) e 2 (13,17) se apresentaram valores menores de forma significativa, quando comparados ao grupo controle negativo (22,67) e experimental 2 (19,28) e em relação ao grupo controle negativo (22,67) e experimental 1 (17,69) e 2 (19,28), respectivamente.

Tabela 9: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão pancreática

PARÂMETROS BIOQUIMICOS	CONTROLE NEGATIVO	EXP. 1 175 mg/m²	EXP. 2 250mg/m²	CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)	CONTROLE POSITIVO 2 (250mg/m²)
	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
Glicose	66,66 ± 17,67	63,22 ± 19,79	74,88 ± 35,35[2]	86,41 ± 45,25[2]	106,58 ± 83,43[1]
Lipase	22,67 ± 11, 15	17,69 ± 3,12	19,28 ± 5,09	14,50 ± 4,40[4]	13,17 ± 3,86[3]

1 - p>0.05 em relação ao grupo experimental (1 e 2) e controle positivo (1).

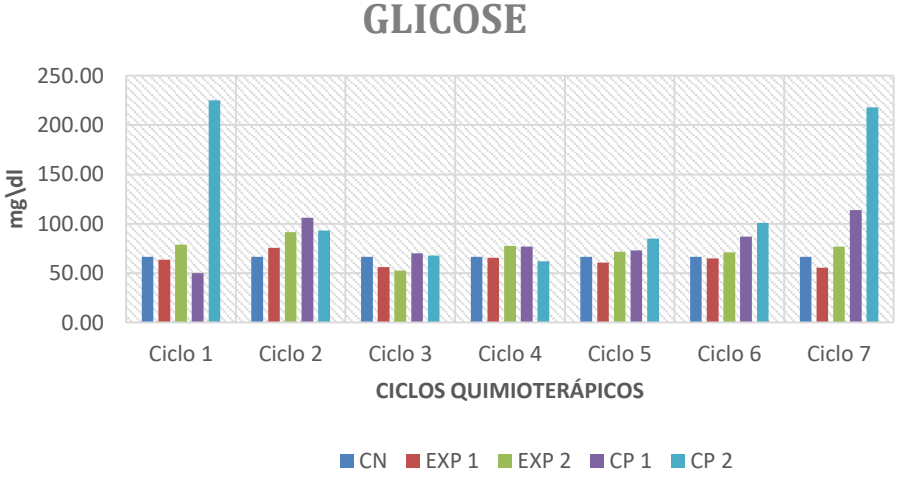
2 - p>0.05 em relação ao grupo experimental (1).

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

4 - p>0.05 em relação ao grupo controle negativo e experimental (2).

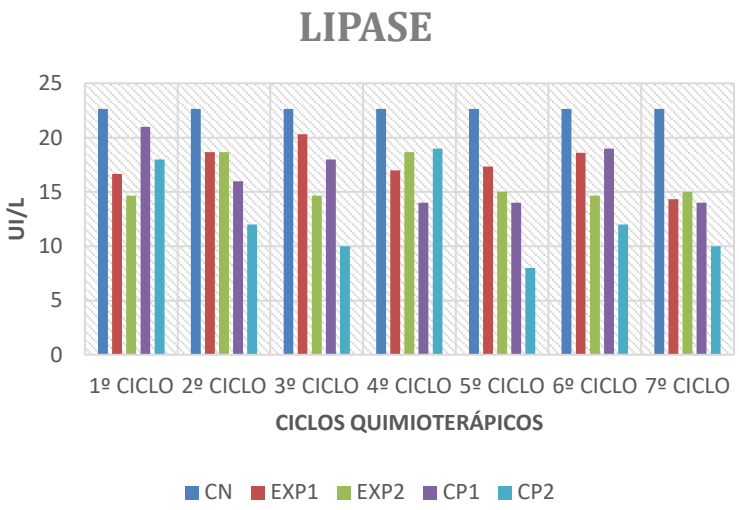
O aumento na glicose nos grupos Controle positivo 1 e 2 podem ser observados também na análise seriada, onde é possível observar que o grupo controle positivo 2 possui uma média muito maior que as demais, principalmente no 1º e no 7º ciclo. Já os dados do grupo controle positivo 1 demonstram que as alterações começaram a se apresentar a partir do segundo ciclo quimioterápico e tem leves aumentos no decorrer dos ciclos. (Gráfico 19)

Gráfico 19: Analise seriada do parâmetro Glicose



Em relação à lipase os controles positivos 1 e 2 se apresentaram menores de forma significativa, quando comparados ao grupo controle negativo e experimental 2 e em relação ao grupo controle negativo e experimental 1 e 2, respectivamente. Dados que podem ser observados partir do segundo ciclo quimioterápico (Gráfico 20).

Gráfico 20: Analise seriada do parâmetro Lipase



Quanto à análise da composição plasmática dos lipídeos (colesterol total, HDL-C, triglicerídeos e LDL), observou-se que:

A concentração plasmática de colesterol, HDL-C no grupo experimental 2 (92,25) foi maior, $p>0,05$, em relação ao controle negativo (59,66), assim como o grupo experimental 1 (91,30) também apresentou níveis de HDL-C significativamente maiores em relação ao controle negativo. O triglicerídeo teve seus valores alterados no controle positivo 2 (104,83), sendo significativamente maior comparado ao grupo experimental 1 (58,69) e 2 (67,27).

Os valores das médias do parâmetro VLDL foram maiores no grupo controle positivo 2 (20,9), principalmente quando comparamos aos grupos EXP 1 (11,5) e 2 (13,4).

Em relação ao colesterol, observou-se que o grupo EXP 2 (203,08) apresentou uma média significativamente maior quando comparado com os grupos CN (113) e CP 2 (152,72). Quando analisado o padrão LDL observa-se que os valores das médias do grupo EXP 2 (98,2) apresentaram concentrações maiores se comparado com os grupos CN (41,6) e CP2 (56,7).

Tabela 10: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos do perfil lipídico.

PARÂMETROS BIOQUIMICOS	CONTROLE NEGATIVO	EXP. 1 175 mg/m²	EXP. 2 250mg/m²	CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)	CONTROLE POSITIVO 2 (250mg/m²)
	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
Colesterol	113,00 ± 28,99	181,25 ± 23,33	203,08 ± 18,38[1]	166,91 ± 76,36	152,75 ± 1,41
HDL-C	59,66 ± 5,65	91,30 ± 1,41[2]	92,25 ± 21,92[2]	65,66 ± 19,79	75,08 ± 0,70
Triglicerídeos	58,66 ± 40,30	58,69 ± 7,77	67,27 ± 1,41	77,00 ± 34,64	104,83 ± 40,30[3]
VLDL	11,7±8	11,5±1,5	13,4±0,2	15,4±6,9	20,9±8[4]
LDL	41,6±15,2	79±28,1	98,2±3,8[1]	85,8±49,6	56,7±5,9

1 - p>0.05 em relação ao grupo controle negativo controle positivo 2.

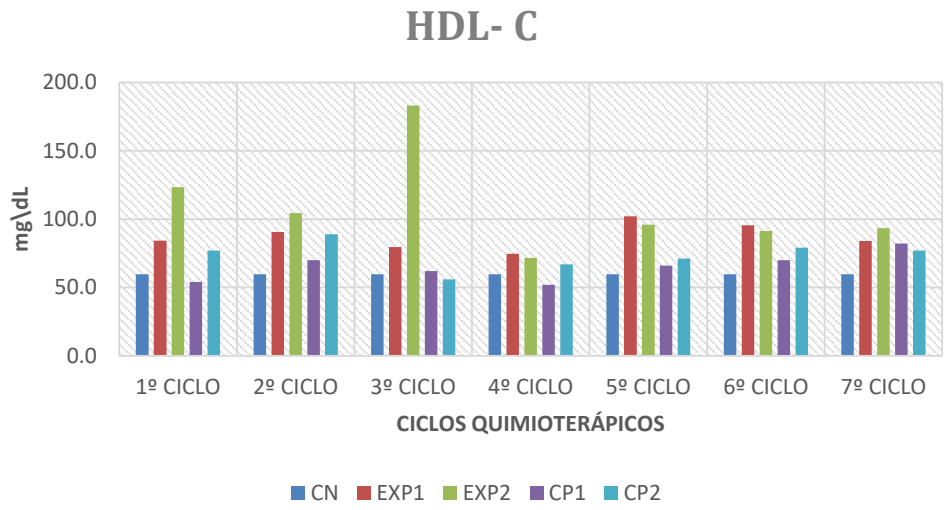
2- p>0.05 em relação ao grupo controle negativo.

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

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

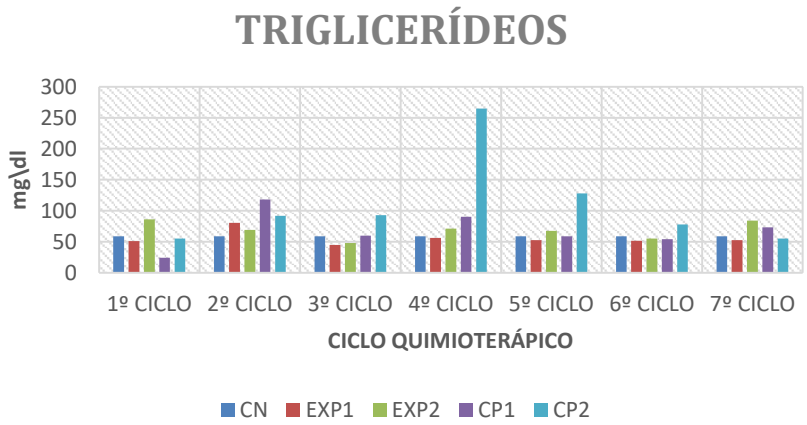
Em relação ao parâmetro HDL-C o grupo experimental 1 e 2 tem medias significativamente maiores, em relação ao controle negativo. Entretanto é possível observar que os valores do grupo EXP 1 e 2 tendem a ficar próximos aos valores normais para a espécie partir do 4º ciclo quimioterápico. (Gráfico 21)

Gráfico 21: Analise seriada do parâmetro HDL-C



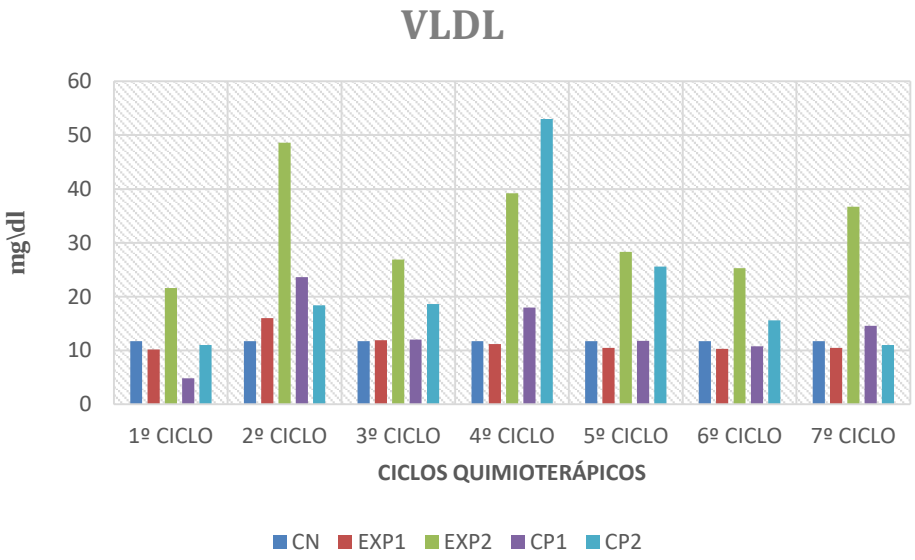
O triglicerídeo teve seus valores alterados no controle positivo 2, sendo significativamente maior comparado ao grupo experimental 1 e 2. Sendo que ocorre um pico no 4º ciclo, que permanece alto no 5º, porem se estabiliza até o último ciclo quimioterápico (Gráfico 22).

Gráfico 22: Analise seriada do parâmetro Triglicerídeos



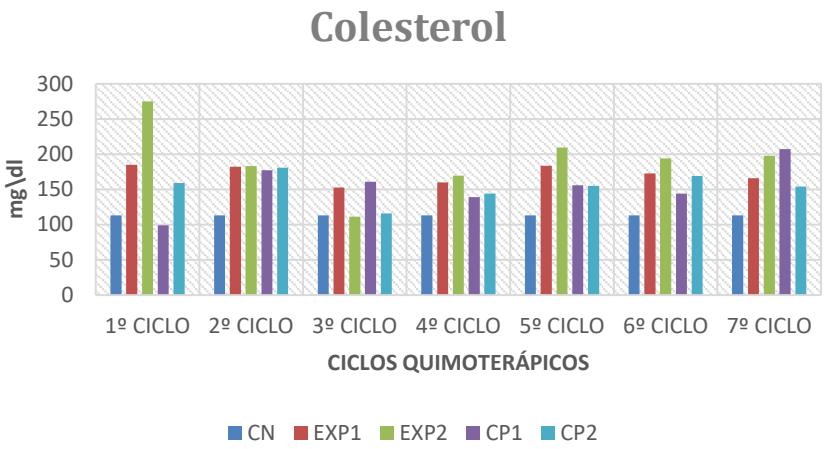
Os valores das médias do VLDL com todos os dados demonstram que os valores do grupo EXP 1 e 2 foram significativamente menores que os analisados no grupo CP 2. Entretanto quando analisamos de forma seriada observa-se que os valores do grupo EXP 2 se encontram maiores desde o primeiro ciclo quimioterápico, porém nota-se que que o grupo EXP 1 se manteve sempre próximo aos valores do grupo controle negativo (Gráfico 23)

Gráfico 23: Analise seriada do parâmetro VLDL



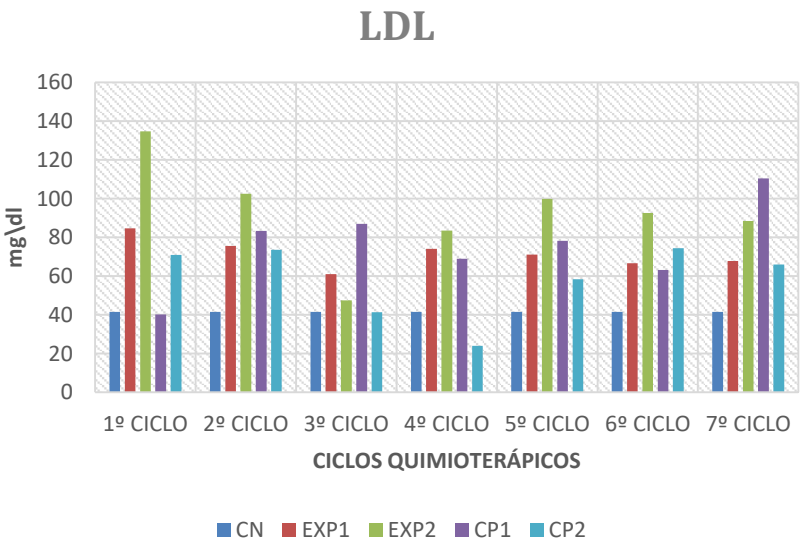
Em relação ao colesterol, observou-se que o grupo EXP 2 apresentou uma maior concentração de colesterol se comparado com os demais grupos. Observa-se também que ocorre um aumento dos valores dos grupos EXP 1, ambos os grupos tiveram alterações desde o primeiro ciclo (Gráfico 24)

Gráfico 24: Analise seriada do parâmetro Colesterol



Quando analisado o padrão LDL observa-se que os valores das médias do grupo EXP 2 apresentaram concentrações maiores se comparado com os grupos CN e CP2. Quando observamos de forma seriada é possível perceber que o aumento desse parâmetro ocorre desde o primeiro ciclo quimioterápico, além de ser possível analisar que os grupos EXP 1 também tem suas médias relativamente maiores que os demais grupos (Gráfico 25).

Gráfico 25: Analise seriada do parâmetro LDL



Quanto à análise dos marcadores de função hepática, tais como AST, ALT, GGT e fosfatase alcalina, observa-se que os valores de AST nos grupos controle positivo 1 (11,41)

foram significativamente menores ao serem comparados com os valores dos grupos controle negativo (14,33) e experimentais 1 (18,66) e 2 (11,41). A avaliação do ALT revelou que o grupo controle positivo 2 (6,08) também apresentou valores menores quando comparados aos grupos controle negativo (14,33) e experimentais 1 (11,16) e 2 (12,56).

Os valores de média do parâmetro GGT apresentaram-se de forma significativamente menores nos grupos controle positivo 1 (32,08) ao serem comparados com os demais grupos. O grupo controle positivo 2 (67,83) também demonstrou valores discordantes maiores quando comparado ao grupo experimental 2 (51,47). Já a fosfatase alcalina no grupo experimental 2 (141,64) exibiu valores de média menores em relação ao grupo experimental 1 (277,74) e controle positivo 1 (243,75) e 2 (241,61).

Tabela 11: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores bioquímicos de lesão hepática.

PARÂMETROS BIOQUIMICOS	**CONTROLE NEGATIVO**	**EXP. 1 175 mg/m²**	**EXP. 2 250mg/m²**	**CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)**	**CONTROLE POSITIVO 2 (250mg/m²)**
	MÉDIA ± DP	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**	**MÉDIA ± DP**
AST/TGO (U/L)	20,32 ± 9,71	18,66 ± 8,65	18,00 ± 8,58	11,41 ± 3,20[2]	14,17 ± 3,95
ALT/TGP (U/L)	14,33 ± 8,02	11,16 ± 8,13	12,56 ± 7,71	6,75 ± 1,76[2]	6,08 ± 0,29[2]
GGT (U/L)	38,67 ± 20,55	56,50 ± 26,17	51,47 ± 28,54	32,08 ± 8,67[3]	67,83 ± 10,59[1]
Fosfatase alcalina	199,33 ± 121,33	277,74 ± 96,85	141,64 ± 53,54[4]	243,75 ± 98,75	241,67 ± 60,91

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

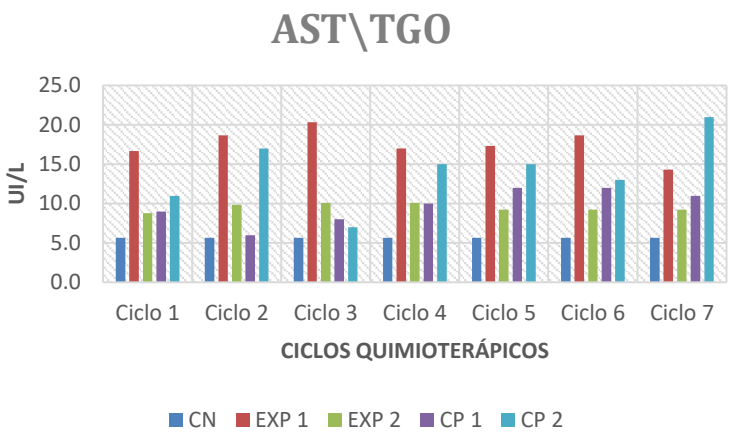
2- p>0.05 em relação ao grupo controle negativo e experimental (1 e 2).

3 - p>0.05 em relação a todos os outros grupos.

4- p>0.05 em relação ao grupo experimental (1) e controle positivo (1 e 2).

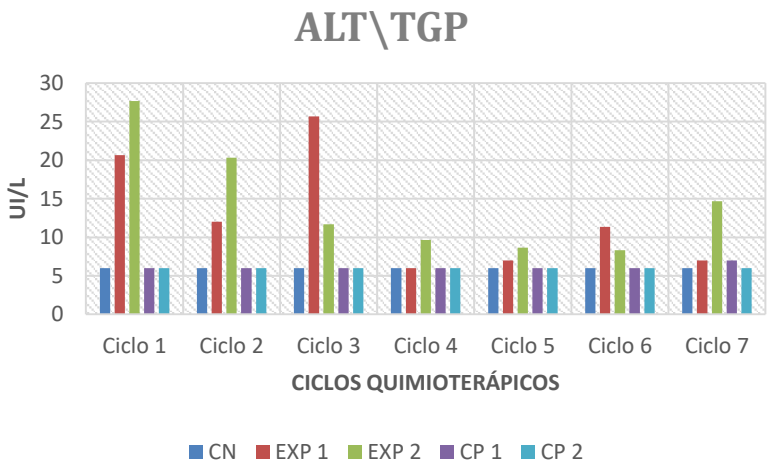
Quando analisamos os resultados de forma seriada de AST observa-se que houve grande variações neste parâmetro, demostrando que os valores dos grupos experimental 1 e controle positivo 2 estavam com valores elevados na semana seguinte a quimioterapia, entretanto esses valores se normalizaram com o decorrer do experimento (Gráfico 26).

Gráfico 26: Analise seriada do parâmetro AST/TGO



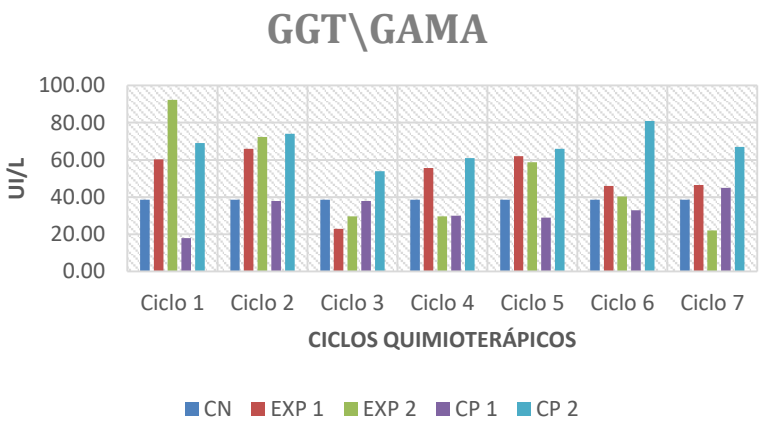
Na avaliação seriada de ALT verifica-se que nos grupos EXP 1 e 2 ocorre um aumento nos três primeiros ciclos de inoculação do fármaco, entretanto o experimental 1 se normaliza até o último ciclo quimioterápico. Já os grupos controle positivo 1 e 2 se mantiveram próximos aos valores considerados normais para a espécies desde o 1º tratamento quimioterápico e se mantem assim até o fim do período experimental (Gráfico 27).

Gráfico 27: Analise seriada do parâmetro ALT/TGP



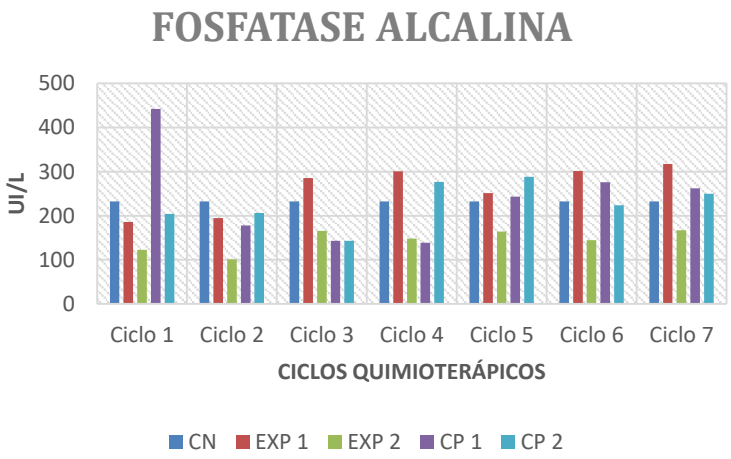
A análise seriada de GGT demonstra que houve grandes variações durante o período experimental, onde os resultados confirmam que houve uma diminuição dos valores do grupo CP 1 em relação aos demais (CP 1, EXP 1 e 2). Outro ponto relevante observado é que o grupo experimental 1 e 2 se normaliza até o final do último ciclo quimioterápico, já o grupo CP 2 se mantem com os valores altos até o último ciclo (Gráfico 28).

Gráfico 28: Analise seriada do parâmetro GGT



Já a fosfatase alcalina no grupo experimental 2 exibiu valores de média menores em relação ao grupo experimental 1 e controle positivo 1 e 2, alteração observada desde o primeiro ciclo (Gráfico 29)

Gráfico 29: Analise seriada do parâmetro Fosfatase Alcalina



Além da análise dos valores das médias dos parâmetros bioquímicos citados anteriormente foram analisados, sem apresentarem diferença significativa na comparação entre os grupos durante todo o período experimental, os seguintes parâmetros: creatinina, ácido úrico, cálcio, LDH, bilirrubina total, sódio, potássio, proteína total, albumina e globulina.

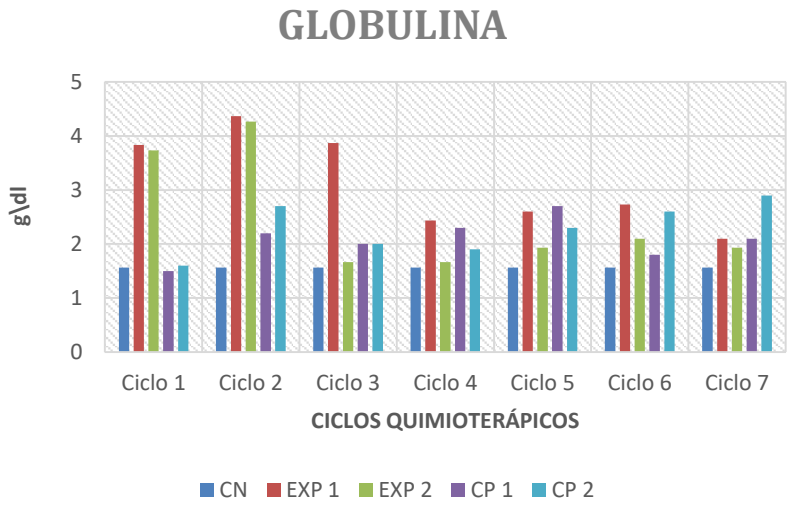
Tabela 12: Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos padrões bioquímicos que não houveram alterações estatisticamente significativas

PARÂMETROS BIOQUIMICOS	CONTROLE NEGATIVO	EXP. 1 175 mg/m²	EXP. 2 250mg/m²	CONTROLE POSITIVO 1 (175mg/m²)	CONTROLE POSITIVO 2 (250mg/m²)
	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
Creatinina (mg/dl)	0,97 ± 0,01	0,87 ± 0,08	0,83 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,89 ± 0,07
Ácido úrico	2,46 ± 0,49	1,90 ± 0,14	1,90 ± 0,56	1,95 ± 0,42	1,70 ± 0,35
Proteína total	6,06 ± 0,07	7,18 ± 0,14	7,04 ± 0,14	6,78 ± 2,54	6,75 ± 0,07
Albumina	5,70 ± 1,97	4,77 ± 1,40	4,59 ± 0,14	3,95 ± 1,48	5,10 ± 1,12
Globulina	1,70 ± 0,70	2,49 ± 0,98	2,46 ± 1,06	1,85 ± 0,49	1,60 ± 0,90
Bilirrubina Total	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,10 ± 0
Sódio	144,6±0	151,14±2,82	147,53±8,48	152,48±1,41	146,42±2,82
Potássio	3,8±1,13	4,1±1,34	4±0,07	4,1±0,49	3,78±0,35
Cálcio	9,97 ± 0,19	8,99 ± 0,36	9,27 ± 0	9,18 ± 0,13	9,24 ± 0,33
LDH	63,67±32	126,13±84,5	117,67±50	84,41±2	89,5±2

Entretanto quando analisamos de forma seriada verifica-se que alguns parâmetros obtiveram alterações consideráveis, tais como:

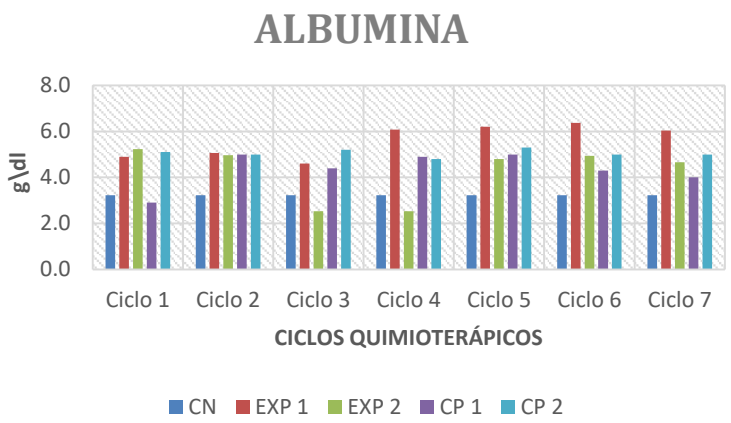
Os valores de globulina se apresentaram alterados nos grupos EXP 1 e 2, entretanto os mesmos se normalizaram até o último ciclo quimioterápico (Gráfico 30).

Gráfico 30: Analise seriada do parâmetro Globulina



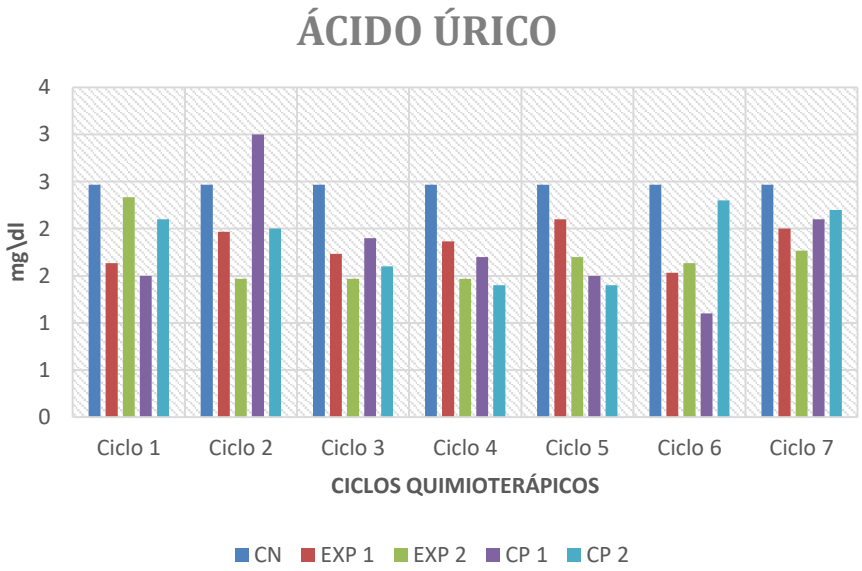
Já quando analisamos de forma seriada o parâmetro albumina, observa-se que houve um aumento significativo, principalmente no grupo EXP 1 (Gráfico 31).

Gráfico 31: Analise seriada do parâmetro Albumina



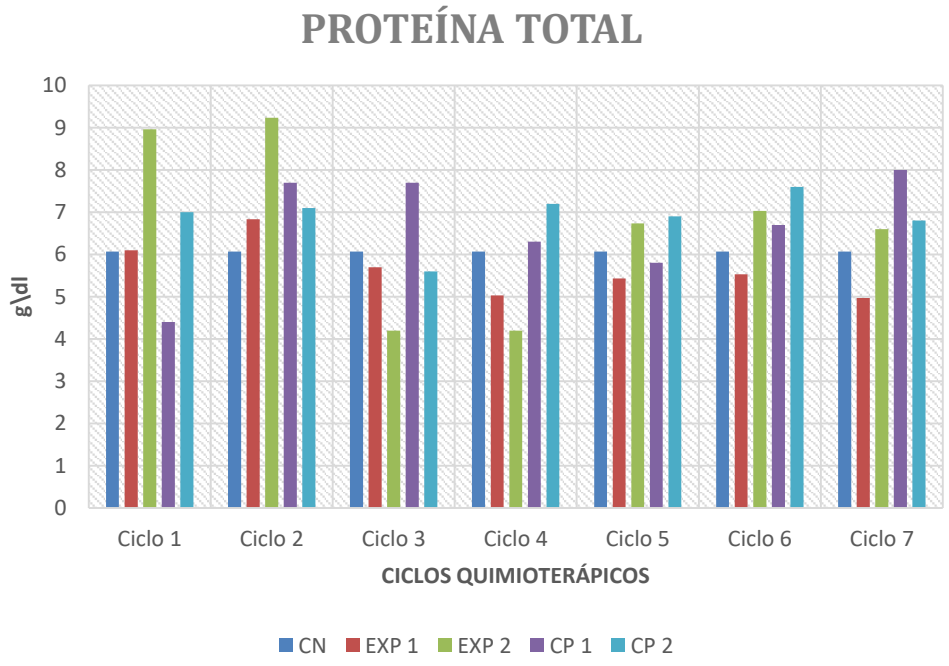
Em relação ao ácido úrico, observa-se que ocorre uma leve diminuição das médias dos grupos EXP (1 e 2) e CP 1 (Gráfico 32).

Gráfico 32: Analise seriada do parâmetro Ácido úrico



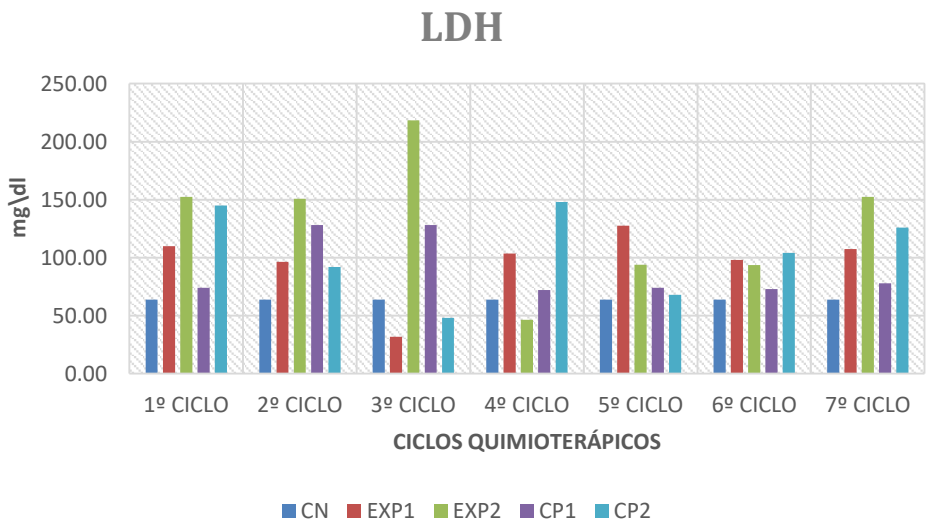
Quando analisamos a proteína total observa-se que houve um ligeiro aumento das médias dos grupos EXP 2 e CP 1 (Gráfico 33)

Gráfico 33: Analise seriada do parâmetro Proteína Total



Na análise feita com todos os dados não foi observado alterações no parâmetro LDH, contudo quando analisamos de forma seriada e possível observar que houve um aumento considerável, principalmente no grupo EXP 2 (Gráfico 34).

Gráfico 34: Analise seriada do parâmetro LDH



Os demais parâmetros como cálcio, bilirrubina total, sódio, potássio e creatinina se mantiveram com mínimas alterações durante a análise seriada.

Gráfico 35: Analise seriada do parâmetro Cálcio

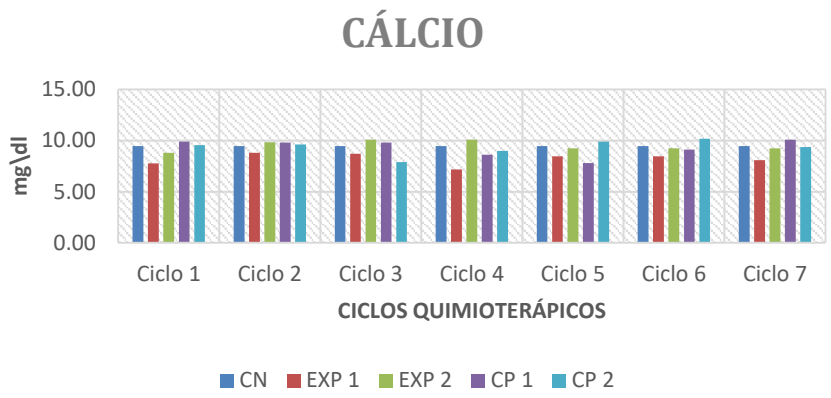


Gráfico 36: Analise seriada do parâmetro Bilirrubina Total

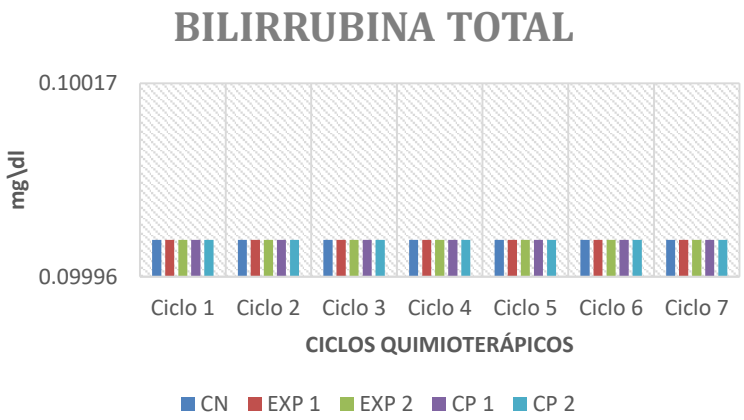


Gráfico 37: Analise seriada do parâmetro Sódio

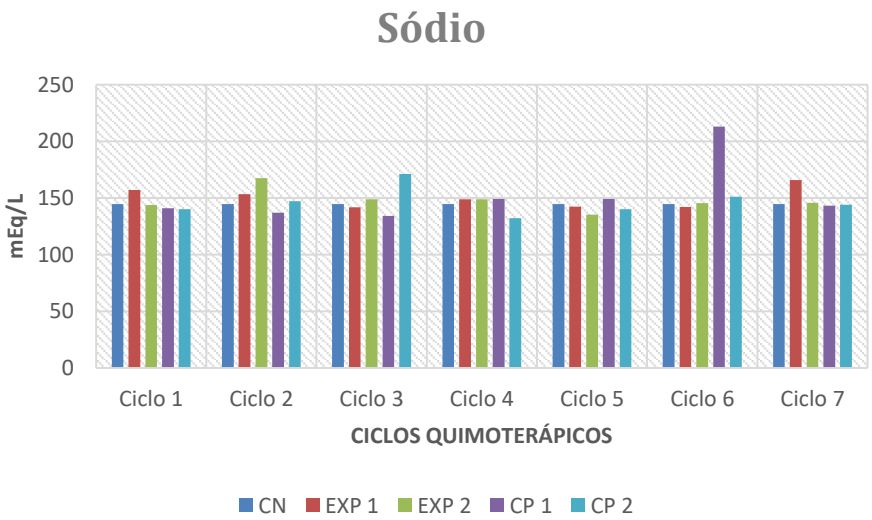


Gráfico 38: Analise seriada do parâmetro Potássio

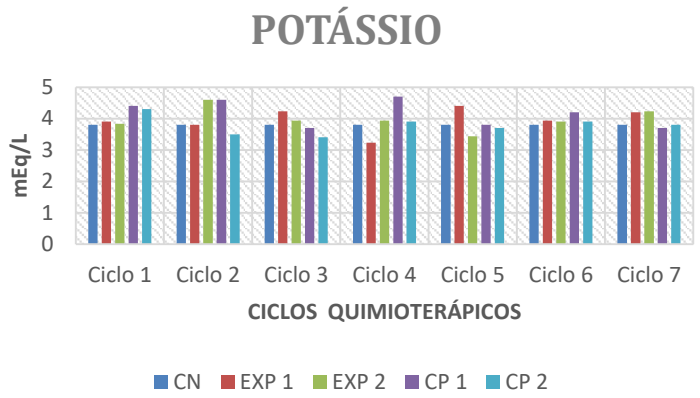
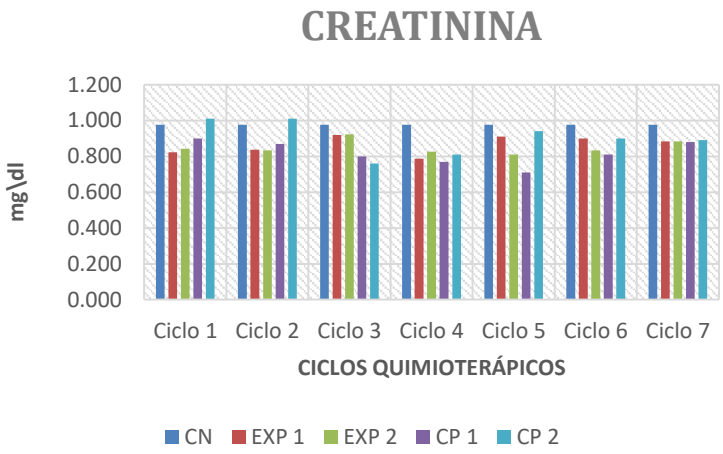


Gráfico 39: Analise seriada do parâmetro Creatinina



7. DISCUSSÃO

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*., 2007). 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. As analises hematológicas e bioquímicas 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 *et al.,* 2001; NAVES *et al*., 2006).

No presente estudo, a resposta celular de primatas não humanos tratados com a nanoemulsão LDE-Paclitaxel foi avaliada através da análise de células sanguíneas por métodos hematológicos, perfil metabólico sanguíneo e mensuração do peso.

Em relação à alteração do peso dos animais de acordo com VAN DEN BRANDT *et al*., (1999) alterações no comportamento alimentar, fato observado nos animais que compuseram os grupos controle positivo 1 e 2, associadas à presença de aversões alimentares em função dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico podem ter implicações nutricionais importantes, como redução na ingestão alimentar e perda de peso, o que pode indicar depleção clínica, fato que foi observado mais efetivamente no grupo controle positivo 1 (175 mg\m²), nos animais do grupo controle positivo 2, grupo que recebeu a maior dose (250 mg\m^2) do quimioterápico na forma comercial também foi possível analisar diminuição acentuada do peso, entretanto está não foi tão expressiva quando as que ocorreram nos animais do grupo CP 1, contudo é relevante ressaltar que os pacientes reagem de forma distinta ao tratamento, apresentando manifestações com graus diferentes de intensidade diante dos efeitos

colaterais, neste caso prevalece a individualidade do paciente perante a resposta do seu corpo a terapêutica (ALMEIDA *et al*.,2004). Os animais dos grupos experimental 1 e 2 que não tiveram alteração do seu peso durante o período experimental, demonstrando um possível benefício da associação da LDE com o paclitaxel.

Em relação ao estudo hematológico observou-se na análise do eritograma que os grupos tratados com LDE-PTX não apresentaram diferença significativa importantes e permanentes ao serem comparados ao controle negativo. Já o controle positivo 1, demonstrou uma diminuição significativa dos valores de hematócrito e hemoglobina, com o RDW, VCM e HCM aumentados nos dois grupos controles positivos. 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. Dados esses que estão de acordo com que se encontra na 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 (PANIS C *et al*., 2007), demonstrando assim uma possível vantagem da droga testada em relação a versão atual presente no mercado.

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de células e moléculas dispersas por todo o organismo e se caracteriza biologicamente pela capacidade de reconhecer especificamente determinadas estruturas moleculares ou antígenos e desencadear uma resposta efetora diante destes estímulos, provocando a sua destruição ou inativação. Portanto, representa um sistema eficaz de defesa contra microrganismos que penetrem no organismo ou contra a transformação maligna de células. Esta função de defesa é essencial contra o desenvolvimento de infecções e tumores. Esta capacidade de defesa do sistema imunológico se fundamenta na ativação das células efetoras – que incluem os linfócitos e as apresentadoras de antígenos ou acessórias (PRIETO *et al.,* 1997) O leucograma faz parte do hemograma e representa a avaliação da série leucocitária do sangue. Os parâmetros que constituem o leucograma são: (i) a contagem total de leucócitos ou leucometria total, expressa em milhares/ L de sangue e (ii) a contagem diferencial, expressa em percentual e em número absoluto (também em milhares/ L de sangue) de cada tipo de leucócito (FAILACE, 2009).

Na série leucocitária, os neutrófilos e basófilos sofreram um decréscimo, no grupo experimental 1 e 2 quando comparado ao controle negativo, podendo estar relacionado com a diminuição da imunidade do animal associado à vinculação do fármaco. Tendo em vista, que dentre as reações adversas, induzidas pelo quimioterápico paclitaxel podemos citar a

diminuição do número total de leucócitos, neutrófilo e plaquetas (SOMA *et al*; 2009; HUANG *et al*., 2010).

Apesar do possível benefício observado da LDE-PTX em relação à versão comercial no eritrograma, o mesmo não aconteceu em relação ao leocograma, já que as alterações nos parâmetros da seria leucocitária, que são as células especializadas na defesa do organismo, combatendo vírus, bactérias e outros agentes invasores que penetram no corpo dentre elas estão os neutrófilos e basófilos que também foram afetados pela droga testada.

O aumento do eosinófilo nos grupos Experimental 1 e 2, pode estar relacionada com reações á parasitas, já que a elevação significativa desse parâmetro na circulação é geralmente devido a doenças parasitárias (COUISSINIER,2006). A reação alérgica relacionada ao fármaco denominada de Reação a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS) é descartada nesse caso já que os animais desse grupo não apresentaram erupção cutâneomucosa extensa, característica clinica dessa patologia (ENSINA *et al*., 2009). Os animais foram previamente vermifugados antes do início do período experimental, contudo o protocolo de vermifugação utilizado no CENP recomenda que haja repiques das doses, já que a grande maioria desses medicamentos só atingem a fase adulta ou larval do parasita (VAN WYK, 2001), entretanto não houveram novas administrações dos antiparasitários, pois a associação farmacológica entre o quimioterápico e o vermífugo poderiam interferir no experimento. As alterações do eosinófilo podem ter ocorrido pela continuidade do ciclo dos parasitos remanescentes nos primatas que não foram atingidos pelo tratamento antiparasitário.

Os linfócitos do grupo experimental 1 e 2 tiveram seus valores maiores em comparação ao grupo controle positivo 1 e 2 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 e que a ação farmacológica da droga não foi modificada e sua toxicidade é menor do que a forma comercial, aumentando a tolerabilidade do organismo em relação ao fármaco (Rodrigues *et al*., 2005). Quando se observa a analise seriada desse parâmetro é possível notar que a partir do 4º ciclo quimioterápico os grupos EXP 1 e 2 ficam com valores bem próximos dos considerados normais para espécie, isso pode estar relacionado com os linfócitos de memória que necessitam de um período para reconhecer possíveis antígenos no corpo e agir com mais eficiência e rapidez em infecções posteriores (ABBAS *et al*., 2007), inicialmente as LDE's podem ter sido reconhecidas como possíveis ameaças e consequentemente ativado o sistema imunológico, porém como sua constituição se assemelha muito as lipoproteínas de LDL, posteriormente elas acabaram perdendo a características de

ameaça e passando a ser reconhecidas como constituintes naturais do corpo. Enquanto que os grupos controle positivo tiveram seus índices do seu sistema imunitário diminuído. 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. (TAXOL®). Uns dos três principais tipos de células defensoras do corpo são os neutrófilos, linfócitos e monócitos, sendo os neutrófilos os responsáveis por combaterem a infecção bacteriana. Os neutrófilos podem diminuir muito após a quimioterapia, causando a neutropenia. Os doentes, cujo total de neutrófilos for inferior a 1.000 células/mm3 não deverão, em nenhum caso, ser tratados com paclitaxel (TAXOL®).

O aumento dos valores de VPM e das plaquetas nós animais do grupo CP 1 e 2 pode estar relacionado a supressão da medula óssea por agentes quimioterápicos, tais como o paclitaxel na versão comercial administrada nesses grupos, é refletida em um VPM baixo ou normal tendendo para o limite inferior em face à profunda trombocitopenia (KARNAD; POSKITT, 1985). Assim que a produção de plaquetas é recuperada após a quimioterapia ou septicemia, o VPM aumenta antes mesmo de aumentos significativos na contagem de plaquetas (THOMPSON; JAKUBOWSKI, 1988). Dado que foi comprovado com a análise seriada que demonstra que os valores de VPM e plaquetas se encontram aumentados nas semanas seguintes a quimioterapia.

Em relação aos parâmetros bioquímicos até o momento não foi demonstrada a relação entre a dose do paclitaxel e as alterações da função hepática, em pacientes sem alterações hepática de base, onde há apenas raros relatos de necrose hepática e encefalopatia hepática (TAXOL®), entretanto no presente estudo foi observado o aumento na dosagem de glicose do grupo controle positivo 1 e 2 em relação ao grupo experimental 1 e 2 pode estar relacionado à pancreatite, um dos efeitos colaterais gastrointestinais deste quimioterápico (Póvoa, V. C. O., 2005). Lipase é um marcador pancreático, e seus níveis nos grupos EXP 1 e 2 se mantiveram bem próximos aos do grupo controle negativo, entretanto os níveis dos grupos CP 1 e 2 estão bem abaixo do normal, sendo que está alteração não possui nenhum relato na literatura, demonstrando a importância de estudos posteriores.

Como os principais órgãos de metabolização e de excreção de substâncias e medicamentos ingeridos são o fígado e os rins esses órgãos foram os que mais sofreram alterações durante o experimento. Em relação a amilase alguns autores defendem que os agentes quimioterápicos também levam à redução do fluxo salivar, da amilase e dos níveis de IgA. (Scully; Epstein, 1996) esse efeito colateral foi observado nos grupos experimental 2 e controle positivo 1 e 2 em comparação aos grupos experimental 1 e controle negativo, logo se pode notar

que os níveis baixos podem estar relacionados com o mau funcionamento da função renal, já que os rins também são bastante afetados, já que esse órgão e muito requisitado no processo de eliminação de substâncias tóxicas. Esses fatores estão relacionados, pois um teste em conjunto de creatina e amilase pode ajudar na avaliação da função renal. (Guyton AC, Hall JE .,2002)

A ureia também é um marcador de função renal o aumento deste, como foi observado nos grupos EXP 1 e CP2, pode estar relacionado com nefrotoxicidade causada pela utilização do quimioterápico paclitaxel na forma comercial e experimental, resultado que condiz com os relatos da literatura, que afirmam que a nefrotoxicidade é um dos principais efeitos colaterais apresentados quando se tem administrações crônicas de fármacos (Póvoa, 2005). Entretanto este parâmetro não é tão especifico quanto a creatinina, parâmetro bioquímico onde não houve alterações significativas. Já que os níveis de ureia podem ser alterados por outros fatores, tais como, proteínas alimentares de baixa qualidade, que podem aumentar a concentração de uréia plasmática, pois aminoácidos não essenciais são deaminados na ausência de aminoácidos essenciais, deficiência de carboidratos também aumentam a concentração de uréia, pois os estoques corporais de proteína são deaminados quando não há energia suficiente na dieta (KERR, 2003). A desidratação é causa mais comum de concentração aumentada de uréia, por exemplo, com vômito, diarréia e distúrbios poliúricos, alterações que foram observadas nos animais do grupo controle positivo 1 (BUSH,2004). A dieta não interfere na concentração de creatinina, por esse motivo resultados conjuntos de aumento de ureia e creatinina são mais confiáveis (KEER, 2003). O ácido úrico, também é um marcador de lesão renal, e nos animais dos grupos EXP (1 e 2) e CP 1 houve uma leve diminuição das médias, demostrando que não ocorreu dano renal importante e a manutenção dos baixos níveis desse parâmetro podem trazer benefícios, pois o ácido úrico é muito pouco solúvel e altas concentrações desse composto na circulação podem formar cristais e provocar obstruções (TALLO *et al*., 2013)

O termo hepatotoxicidade abrange todas as formas de reações hepáticas adversas, o diagnóstico de injuria hepática droga-induzia pode ser baseado na análise de alguns parâmetros bioquímicos como Fosfatase alcalina, GGT, AST e principalmente ALT (BONASSA *et al.,* 2012). Na análise seriada é possível observar que houve aumento dos parâmetros supracitados, nos grupos EXP (1 e 2) e CP (1 e 2), já que o fígado possui atividade metabólica conhecida por sua capacidade de detoxificar ou excretar na bile muitos medicamentos. A lesão hepática provocada por medicamentos resulta de toxicidade direta; da conversão hepática de um xenobiótico em uma toxina ativa; ou de mecanismos imunes, em geral por uma droga ou metabólito que atua como hapteno para converter uma proteína celular em um imunógeno (COTRAN *et al*.,2000). Contudo deve-se destacar que os animais do grupo EXP (1 e 2) se

mantiveram com valores muito próximos dos valores considerados normais para a espécie, demonstrando que houve lesão hepática mínima nesses animais, evidenciando a vantagem terapêutica da associação entre o fármaco e a nanopartícula.

Em relação as alterações do perfil lipídico, observa-se que o grupo tratado com a nanoemulsão LDE associada ao Paclitaxel apresentou valores médios de Triglicerídeos e VLDL próximos do grupo controle negativo, enquanto que o grupo controle positivo 2, tiveram suas medias significativamente maiores quando comparamos aos demais grupos, dados que condizem com os achados na literatura que demostraram alterações no perfil lipídicos ocasionados durante o tratamento com quimioterápicos em mulheres pós-menopausa nos estágios iniciais de câncer de mama (BELL *et al*., 2012). A manutenção dos valores próximo dos normais do grupo EXP 1 e 2 mencionados pode estar relacionada ao direcionamento de forma específica das moléculas de nanoemulsão aos receptores celulares de LDL, pois as nanoemulsões possuem constituição lipídica e sua administração possivelmente poderia alterar a quantidade de células do perfil lipídico na circulação, contudo a utilização da LDE não alterou de forma significativa os parâmetros supracitados, demonstrando que houve um direcionamento eficiente das nanopartículas para as células . Além do que a não alteração desses parâmetros contribue para manutenção da saúde do paciente, já que de acordo com o estudo de Masquelier *et al*. (2006) a diminuição dos triglicerídeos reduz a possibilidade de desenvolver um quadro de hipertrigliceridemia, tal anormalidade é um fator de risco para doenças cardiovasculares, obesidade central, hipertensão, anormalidades do metabolismo da glicose e disfunção hepática (BERGLUND *et al*., 2012).

A conservação dos valores próximos dos normais das moléculas de VLDL durante o tratamento, principalmente do grupo EXP 1, merece destaque, uma vez que estas moléculas são os principais transportadores de triglicerídeos, logo a diminuição de VLDL está intimamente ligada a menor quantidade de triglicerídeos na circulação, sendo produzido no fígado, do qual após a metabolização, seus resíduos formaram partículas de IDL (Lipoproteínas de densidade intermediaria) que dão origem as partículas de LDL (Lipoproteínas de baixa densidade) (TENENBAUM *et al*., 2014). Deste modo, podemos inferir que a utilização da nanoemulsão LDE associada ao Paclitaxel, pode contribuir para a redução dos efeitos colaterais, pois apresentam um direcionamento mais especifico aos receptores celulares. Uma vez que células tumorais apresentam uma maior absorção de moléculas de LDL mediadas por receptores em comparação com as células normais, onde tais moléculas são utilizadas principalmente para o crescimento celular (VITOLS, 1984). Portanto as nanoemulsões seriam captadas com mais frequência pelas células tumorais e assim evitariam que células saudáveis fossem afetadas

efetivamente pelo fármaco utilizado, possibilitando assim a diminuição de diversos efeitos colaterais causados pela inespecificidade do tratamento.

Em relação à média das moléculas HDL-C do grupo EXP 1 E 2 apresentaram uma quantidade mais elevada do que no grupo CP1. Enquanto que, as concentrações de colesterol e LDL foram maiores no grupo EXP2 que nos grupos CN e CP 2. Esse dado pode ser devido a composição da nanopartículas de LDE que apresentam éster de colesterol e colesterol livre em sua constituição (MARANHÃO *et al*., 1993), deste modo tal característica pode ter contribuído para o aumento na concentração de colesterol durante o tratamento no grupo EXP 2. Este dado pode ser explicado pela dosagem maior administrada nesse grupo, vale ressaltar que as doses nesses animais foram maiores do que normalmente se utiliza no tratamento quimioterápico. Outra hipótese a ser considerada, em relação ao aumento do colesterol, pode estar relacionada à competitividade pelos receptores celulares entre a nanoemulsão de LDE e a molécula de LDL naturais, no qual acredita-se que as LDE's por possuírem apoproteínas do tipo ApoE, aquelas que possuem vinte vezes mais afinidade pelos receptores de membrana da LDL, tendem a se ligar com mais eficiência as membranas das células, impedindo que as lipoproteínas naturais se liguem aos seus receptores e dessa forma, consequentemente, acabam aumentando sua concentração na circulação, tal como foi constatado nos animais do grupo EXP 2, onde tal hipótese pode ser testada futuramente através de mais estudos sobre os receptores e competição celulares de LDL e LDE, como exemplo através de estudos com PCR em tempo real. Outra teoria seria que o aparelho de analise bioquímica estivesse lendo as nanopartículas como se fossem as lipoproteínas de LDL, dessa forma estava sendo contabilizado as nanoemulsões naturais e sintéticas, aumentando assim o número total desse parâmetro, principalmente nos animais que receberam a maior dose (250 mg\m^2) do quimioterápico associado as LDE's.

8. CONCLUSÃO

A alteração do peso dos animais que compuseram o grupo controle positivo 1 e 2 e a não diminuição do grupo experimental 1 e 2 comprovam os benefícios do fármaco LDE-PTX. Um dos principais achados foram às alterações acentuadas no eritograma nos grupos tratados PTX comercial, 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 do que o tratamento do PTX na sua forma comercial. Além disso, a não alteração acentuada dos parâmetros bioquímicos da função hepática, renal e perfil lipídico dos animais que receberam as doses experimentais do LDE-PTX, dentro das faixas de normalidade, corrobora com o fato da toxicidade do fármaco testado se apresentar menor do que a versão comercial, evidenciando os benefícios do fármaco LDE-PTX como potencial agente antineoplásico em futuros ensaios clínicos. O emprego do sistema LDE pode resultar em melhora da qualidade de vida dos pacientes com câncer e aumentar a sua sobrevida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. **Cellular and Molecular Immunology**, 6a ed, Editora Saunders 2007.

ALENCAR, N. X.: KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H. TAKAHIRA, R. K. Mielograma. **Parte I: indicações e colheita do material** ***Bone marrow evaluation. Part I: Indications and sample material collection. mielograma. Parte l' Indicaciones y colecta dei material***. Rcv. Educ. contin. CRMV·5P *I* Continuous Educatioll. Journal CRMV-SP, São Paulo volume 5, fascículo 2,p.157-163, 2002.

ALMEIDA, C. P.; VITAL, C. G.; CONTENTE, T. C.; MARIA, D. A.; MARANHÃO, R. C. **Modification of composition of a nanoemulsion with different cholesteryl ester molecular species: Effects on stability, peroxidation, and cell uptake.** Int J Nanomedicine, v. 20, n.5, p. 679-686. 2010.

ALMEIDA EPM, GUTIÉRREZ MGR, ADAMI NP. **Monitoring and evaluation of side effects of chemotherapy in patients with colon câncer.** Revsta Latino-americana de Enfermagem 2004 setembro-outubro; 12(5):760-6.

ARISAWA, L.A.E.; SILVA, M.O.C; CARDOSO, C.A.C; LEMOS, P.R.N. **Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à químio e à radioterapia.** Faculdade de Ciências da Saúde - Odontologia – UNIVAP.2000.

AZEVEDO, C. H.; CARVALHO, J. P.; VALDUGA, C. J.; MARANHÃO, R. C. **Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposideoleate in patients with ovarian carcinoma.** GynecolOncol, v. 97, n. 1, p. 178-82. 2005.

AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. BioEstat 5: **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. 5. ed**. Belém-PA: Publicações Avulsas do Mamirauá, 2007. 361 p.

BARRETO, T.S, AMORIM R.C .**The family in face of a relative's falling ill and having treatment for cancer la familia delante del enfermar y del tratamiento de um familiar con cancer.** p.462. Rev. enferm. UERJ, Rio de Janeiro, 2010.

BERGLUND L, BRUNZELL J. D, GOLDBERG AC, GOLDBERG IJ, SACKS F, MURAD MH, STALENHOEF AF, Endocrine Society: **Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline**. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 97:2969–2989. 2012.

BICCA-MARQUES, J.C. 1991**. Ecologia e comportamento de um grupo de bugios pretos Alouatta caraya (Primates: Cebidae) em Alegrete (RS, Brasil).** 1991. 200 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Departamento de Ecologia da Universidade de São Paulo.

BROWN, M. R., CATTELL, R. G.G., AND SUZUKI, N. (1981). **The Cedar DBMS: A preliminary report.** In *Proceedings of the ACM International Conference on Management of Data*, pages 205-211. ACM.

BONASSA EMA, GATO MIR. **Esquemas antineoplásicos: Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2012. p. 531-624.

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

BUSH, B.M. **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians.** London: Blackwell Scientific Publications, p. 200-209, 2004.

CONTRERAS, Carlos Alberto Méndez (2010). **Efeito da nanoemulsão lipídica associada a paclitaxel na prevenção da doença vascular do coração transplantado. Estudo experimental em coelhos.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -- São Paulo.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. NEOPLASIA. IN: COTRAN RS, KUMAR V,COLLINS T. ROBBINS **patologia estrutural e funcional**. 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. Cap. 8, p.233-95.

COUISSINIER-PARIS P. [**Activated eosinophils: techniques to characterize them**]. Presse Med. 2006;35(1 Pt 2):125-34. Review. French.

DIAS, M. L.; CARVALHO, J. P.; RODRIGUES, D. G.; GRAZIANI, S. R.; MARANHÃO, R. C. **Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers.** Cancer Chemother Pharmacol, n. 59, v. 1, p. 105-11. 2007.

DiGIACOMO, R.F.; McDONASH, B.F.; GIBBS, C.J. **The progression and evaluation of hematologic and serum biochemical values in the chimpanzee.** Journal of Medical Primatology, v.4, p.188-203, 1975.

ESTEVANATO L.L.C **Nanocapsulas magnéticas de selol para o tratamento do câncer de mama experimental:Avaliação*in vitro e in vivo***. 2012 Tese (Programa de Pós-Graduação em patologia molecular),Universidade de Brasília,Brasília,2012.

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

FAVERO G.M. **RECEPTORES DE LDL: ALVO PARA DROGAS ANTI-NEOPLÁSICAS.** Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v.14, n.1, p. 53-58, mar. 2008.

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 F.A. **PERFIS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE MACACOS-PREGO (*Cebus spp.*, Erxleben, 1777) MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DA PARAÍBA.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

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

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

FLAIBAN, K. K. M. C. **Valores hematológicos de macacos-prego (Cebus cay and Cebus nigritus) e bugios pretos (Alouatta caraya) de vida livre na Região Alto Rio Paraná, sul do Brasil.** 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FORMARIZ T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina**. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". ARARAQUARA – SP 2008.

FRAGASZY, D. M.; E. VISALBERGHI, L. M. FEDIGAN. 2004. **Complete Capuchin. The Biology of the Genus Cebus.** United King: The University of Cambridge Press, 339 p.
GAL, D.; MACDONALD, P .C.; PORTER, J. C.; SIMPSON, E. R. **Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoprotein metabolism.** Int J Cancer, v. 28, n. 3, p. 315-9. 1981.

GOLDSTEIN, D. B. **The effect of drugs on membrane fluidity**. "Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol". ISSN 0362- 1642. 24 (1984) 43-64.

GONÇALVES, R. P.; RODRIGUES, D. G.; MARANHÃO, R. C. **Uptake of high density lipoprotein (HDL) cholesteryl esters by human acute leukemia cells.** Leuk Res, v. 29, n. 8, p. 955-959. 2005.

GRAZIANI SR, IGREJA FAF, HEGG R, MENEGHETTI C, BRANDIZZI LI, BARBOZA R *et al.* **Uptake of a Cholesterol-Rich Emulsion by Breast Cancer.** Gynecol. Oncol. 2002; 85: 493-7.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Guanabara Koogan, 2002.

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.

HEARN, J. 1983. **Reprodution in the New World primates. New models in medical science.** Hingham: MTP press, 223 p.

HENRY, J. B. 2002. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais.** 19a Edição. Editora Manole. Rio de Janeiro.

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, R. D.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H.; CESAR, T. B.; MARANHÃO, R. C. **Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats.** BiochimBiophysActa, v. 1437, n. 1, p. 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.

HOWARD, C.F. **Non-human primates as models for the study of human diabetes mellitus.** Diabetes, v.31, p. 37-42, 1982.

HUNGRIA, V. T.; LATRILHA, M. C.; RODRIGUES, D. G.; BYDLOWSKI, S. P.; CHIATTONE, C. S.; MARANHÃO, R. C. **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.** CancerChemotherPharmacol, v. 53, n. 1, p.51-60. 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br. Acessado em: Janeiro, 2016.

KARNAD, A.; POSKITT, T. R. **The automated complete blood cell count. Use of the red blood cell volume distribution width and mean platelet volume in evaluating anemia and thrombocytopenia**. Archives of internal medicine, Chicago, v. 145, n. 7, p. 1270-1272, 1985.

KERR, MORAG G.; **EXAMES LABORATORIAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA - BIOQUÍMICA CLÍNICA E HEMATOLOGIA**; Editora Roca; São Paulo - SP 2003.

KRETZER I.F. **Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol –LDE**. 2007. 123 f.Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmácia na área de Análises Clínicas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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 U S A. 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 theMesoscale** Realm. **Neurosurgery** 57:606-634.2005.

LO PRETE, A. C.; MARIA, D. A.; RODRIGUES, D. G.; VALDUGA, C. J.; IBAÑEZ, O. C.; MARANHÃO, R. C. **Evaluation in melanoma-**

bearingmiceofanetoposidederivativeassociatedto a cholesterol-rich nano-emulsion. J Pharm Pharmacol, v. 58, n. 6, p. 801-8. 2006.

MARANHÃO R.C.; CESAR T.B.; PEDROSO-MARIANI S.R. **Metabolic behavior in rats of a nonproteinmicroemulsion resembling LDL.** Lipids, vol 28, p. 691-6, 1993.

MARANHÃO, R. C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E. L.; LLACER, P. D.; PILEGGI, F. J.; CHAMONE, D. A. **Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patiens with acute leukemia.** Cancer Res, v. 54, n. 17, p. 4660-4666. 1994.

MARANHÃO, R. C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.; LLACER, P. D.; PILEGGI, F. J.; CHAMONE, D. A. F. **Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for treatment of the disease.** Brazilian J Med Biol Res, v. 25, n.10, p. 1033-1037. 1992.

MARANHÃO, R. C.; GRAZIANI, S. R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R. F.; LATRILHA, M. C.; RODRIGUES, D. G.; COUTO, R. D.; SCHREIER. S.; BUZAID, AC. **Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients.** CancerChemotherPharmacol, v. 49, n. 6, p. 487-98. 2002.

NAVES; E. A.; FERREIRA F. A.; MUNDIM A. V.; GUIMARÃES, E. C. **Valores hematológicos de macaco prego (*Cebus apella* - Línnaeus, 1758) em cativeiro.** Biosciencejournal, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 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.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.BAILEY, W.; SCHOMAKER, S.**The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity.**Toxicology, v. 245, n. 3, p. 194-205. 2008.

PANIS, C. *et al***. Marcadores laboratoriais de toxicidade na quimioterapia do câncer com paclitaxel e doxorrubicina**. (Laboratório de Fisiopatologia de Radicais Livres) Universidade Estadual de Londrina,PR, 2007.

PARK, M. T. &LEE, S. J. Cell cycle and cancer. **J BiochemMolBiol**, v. 36, n. 1, p. 60-65. 2003.

PINHEIRO, K. V.; HUNGRIA, V. T; FICKER, E. S.; VALDUGA, C. J; MESQUITA, C. H.; MARANHÃO, R. C**. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE.** Cancer ChemotherPharmacol, v. 57, n. 5, p. 624-30. 2006.

PIRES, L. A.; HEGG, R.; VALDUGA, C. J.; GRAZIANI, S. R. RODRIGUES, D. G. MARANHÃO, R. C. **Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study.** CancerChemotherPharmacol, v. 63, n 2, p. 281-7. 2009.

RALL T, NIES A, TAYLOR R. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** 8ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1991: 309.

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.

REINERT F.R**GUIA FARMACOTERAPÊUTICO DE MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS: UMA FERRAMENTA PARA O USO RACIONAL**. 2007.

REIS, N. R., PERRACHI, A. L.; ANDRADE, F. R. 2008. **Primatas Brasileiros.** Londrina: Technical books, 260 p.

RIVIELLO, M. C. & WIRZ, A. **Haematology and blood chemistry of Cebus paella in relation to sex and age.** J Med Primatol, v.30, n. 6, pag. 308-12. 2001.

RODRIGUES D.G.; MARIA D.A.; FERNANDES D.C.; VALDUGA C.J.; COUTOR.D.; IBAÑEZ O.C.; MARANHÃO R.C. **Improvement of paclitaxel therapeuticindex by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion:in vitro and in vivo studies.** Cancer ChemotherPharmacol., vol 55, n 6, p. 565-76, 2005.

ROSOWSKY, A.; FORSCH, R. A.; YU, C. S.; LAZARUS, H.; BEARDSLEY, G. P. **Methotrexate analogues. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters.** J MedChem, n. 27, v. 5, p. 605-91984.

SANTOS, R. D.; HUEB, W.; OLIVEIRA, A. A.; RAMIRES, J. A.; MARANHÃO, R. C. **Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or with out coronary artery disease.** J Lipid Res, v. 44, n. 3, p. 464-9. 2003.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. **Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial.** J Bras Patol Med Lab, v. 43, n. 5, p. 329-337. 2007.

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.

TALLO FS, VENDRAME LS, LOPES RD. **Tumor lysis syndrome: a review for the clinician**. Rev Bras Clin Med. São Paulo, 2013 abr-jun;11(2):150-4

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P.; ADAMSON, R. H. **Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates.** Proc. Jpn. Acad., Ser. B, v. 84, n. 6, p. 176-188, 2008.

Taxol®,Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A),2012.

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

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** São Paulo: Roca, 2007, 582p.

THOMPSON, C. B.; DIAZ, D.; QUINN, P. G.; LAPINS, M.; KURTZ, S. R.; VALERI, C. R. **The role of anticoagulation in the measurement of platelet volumes. American journal of clinical pathology**, Philadelphia, v. 80, n. 3, p. 327-332, 1983a. 72 - THOMPSON, C. B.; JAKUBOWSKI, J. A.; QUINN, P. G.; DEYKIN, D.; VALERI, C. R. **Platelet size as a determinant of platelet function**. Journal of laboratory and clinical medicine, Saint Louis, v. 101, n. 2, p. 205-213, 1983b.

VALDUGA, C. J.; FERNANDES, D. C.; LO PRETE, A. C.; AZEVEDO, C. H.; RODRIGUES, D. G.; MARANHÃO, R. C. **Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide.** J Pharm Pharmacol, v. 55, n. 12, p. 1615-22. 2003.

VAN WYK, J.A. Refugia – **overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance**. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, v.68, p.55-67, 2001.

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.

VERONA, C. E. S.; PISSINATTI, A. 2007. **Primates - Primatas do Novo Mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio).** In: CUBAS, Z. S. et al. Tratado de Animais Selvagens. Medicina veterinária. São Paulo: Roca, Cap. 24, p. 358-377.

VERRASTRO, T. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia;fisiologia, Patologia e Clinica.** São Paulo: Atheneu, 2005.

VITOLS, S.; PETERSON, C.; LARSSON, O.; HOLM, P.; ABERG, B. **Elevateduptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue *in vivo*.** Cancer Res,v. 52, n. 22, p. 6244-7. 1992.

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.

WIRZ, A.; TRUPPA, V.; RIVIELLO, M. C. **Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*).** Am J Primatol, v. 70, n. 5, p. 463-472. 2008.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA

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 B – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA

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: 31625-4	Data da Emissão: 26/11/2015 13:57	Data para Revalidação*: 25/12/2016

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada 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.

Dados do titular

Nome: Danielle Cristinne Azevedo Felo	CPF: 861.463.862-00
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

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Delineamento experimental	11/2011	11/2011
2	Seleção dos animais do grupo de estudo	12/2011	12/2011
3	Tratamento com Paclitaxel (comercial e nanoemulsão)	12/2011	12/2014
4	Avaliação de Toxicidade crônica do Paclitaxel	12/2011	12/2016
5	Tratamento com metrotrexato (comercial e nanoemulsão)	12/2011	12/2016
6	Avaliação de Toxicidade crônica do Metotrexato	12/2011	12/2016
7	Análise dos Resultados	06/2012	12/2016
8	Apresentação dos resultados em congressos	07/2012	12/2016
9	Elaboração e Publicação de artigos	01/2013	01/2016

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 de 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 exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências 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 encontre-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 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 www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
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 esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da 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, 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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
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 da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Rommel Mario Rodriguez Burbano	Coordenador regional	257.059.542-04	3537284 SEGUP/PA-PA	Brasileira
2	PATRICIA DANIELLE LIMA DE LIMA	Orientadora	636.197.332-87	3208350 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 nº 03/2014. 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).

SISBIO

Código de autenticação: 96398944