

José Pereira de Souza

**EFEITOS DO PACLITAXEL ASSOCIADO A UMA NANOEMULSÃO
SEMELHANTE A LDL EM LINHAGENS CELULARES DE
ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro – UNISA,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde
Orientadora: Prof. Dra. Carmen Guilherme Christiano de
Matos Vinagre**

São Paulo

2016

Souza, José Pereira de

Efeitos do paclitaxel associado a uma nanoemulsão semelhante a LDL em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático/ José Pereira de Souza. - São Paulo, 2016.

44 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Santo Amaro, 2016.

Orientador: Prof. Dra. Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre.

1. Nanopartículas 2. Paclitaxel 3. Lipoproteínas LDL 4. Adenocarcinoma 5. Pâncreas. I. Vinagre, Carmen Guilherme Christiano de Matos, orient. II. Título

Agradecimentos

À Profa. Dra. Carmen, por sua calma e sabedoria que foram cruciais no desenvolvimento desse projeto, tornando viável e factível. Obrigado por sua dedicação e oportunidade de construção de novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Neil, por todo apoio e compreensão das limitações apresentadas por mim durante toda trajetória. Muito obrigado por disponibilizar seu tempo e dedicação na análise estatística do projeto.

À Profa. Dra. Iara, por todo seu acolhimento, carinho e cuidado que ofereceu, transmitindo segurança nos momentos de insegurança.

Ao Prof. Dr. Ricardo Giorgi, por seu conhecimento técnico que foi importante e norteador para chegarmos até aqui. Obrigado por ter aberto seu laboratório para esse projeto e pela confiança.

À Profa. Dra. Patrícia Colombo, por sua clareza e colocações pertinentes que fazem a diferença no aprendizado. De forma calma e segura, sempre demonstrou compreensão das dificuldades apresentadas e portanto, agradeço pela oportunidade.

À Profa. Dra. Ana Paula, por aceitar fazer parte da banca de qualificação desse projeto, pela ética que apresentou em nossas aulas.

Ao Prof. Dr. Eloi F. Rosa, pela sabedoria e por sua visão, construindo oportunidades nas negociações entre as instituições e proporcionando novos projetos e parcerias.

À Caroline Grillette Negri, muito obrigado pelo compartilhamento do aprendizado, pela paciência e coleguismo que sempre se portou. Você foi essencial para o sucesso dos experimentos.

À Dra. Jocelene, que sempre acreditou que eu pudesse chegar até aqui. Por seu empenho nas negociações e principalmente, pela confiança depositada.

À Andréa pelo seu carinho, apoio, dedicação e força nos momentos que mais precisei. Com você, me sinto seguro. Obrigado.

RESUMO

Souza JP. **Efeitos do paclitaxel associado a uma nanoemulsão semelhante a LDL em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-UNISA].

O adenocarcinoma pancreático é um dos tipos de câncer humano mais letais e continua sendo a quarta causa de morte por câncer e a segunda entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos. Sua natureza altamente agressiva e os sintomas pouco específicos levam ao diagnóstico tardio e à resistência à quimioterapia e radioterapia disponíveis. Partindo da constatação de que algumas linhagens de células neoplásicas expressam um maior número de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), vários estudos mostraram que nanopartículas lipídicas artificiais que se ligam aos receptores de LDL podem ser utilizadas como transportadores de quimioterápicos em vários tipos de neoplasias. Com isso, o tratamento poderia ser mais direcionado poupando o tecido normal. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antitumoral da associação paclitaxel-nanoemulsão em linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático humano. **Métodos:** Os grupos avaliados foram os seguintes: - Grupo 1 - linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais; Grupo 2 - linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais incubadas com a associação paclitaxel-nanoemulsão. Foram utilizados ensaios de proliferação celular, tais como concentração inibitória (IC50) e capacidade inibitória da proliferação celular, teste de viabilidade e proliferação celular e determinação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). **Resultados:** Foram realizados quatro ensaios. No primeiro ensaio, percebeu-se uma diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da associação paclitaxel-nanoemulsão, chegando a 22,77% quando as células foram submetidas a 1,1mg. Da mesma forma, no segundo, terceiro e quarto ensaios, houve diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração do Paclitaxel na Nanoemulsão lipídica, chegando a 36,15%, 20,40% e 16,97% quando as células foram submetidas a 1,1mg. A análise global demonstrou que houve uma diferença estatisticamente significativa entre $\Delta 1$ e $\Delta 7$ ($p=0,0419$) ou seja, houve diferença da viabilidade celular na concentração de Paclitaxel 0,1mg e 1,1mg. A análise de variância de Friedman demonstrou um número de mortes na concentração 1,1mg significativamente maior que na concentração 0,1mg ($\chi^2= 15,4554$; $p=0,0170$) **Conclusões:** O efeito antitumoral da associação paclitaxel-nanoemulsão em linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático humano foi proporcional à concentração. A análise da proliferação celular destas linhagens submetidas à associação paclitaxel-nanoemulsão, mostrou diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da associação paclitaxel-nanoemulsão, sendo a menor taxa, no valor de 16,97% quando as células foram submetidas a 1,1mg.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Paclitaxel. Lipoproteínas LDL. Adenocarcinoma. Pâncreas.

SUMMARY

Souza JP. **Effect of paclitaxel associated with a nanoemulsion similar to LDL in pancreatic adenocarcinoma cell lines.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-UNISA].

The pancreatic adenocarcinoma is one of the most lethal human cancers, remaining the fourth leading cause of cancer death and the second leading cause of death within malignant gastrointestinal diseases in the United States. Its highly aggressive nature and nonspecific symptoms lead to late diagnosis and resistance to chemotherapy and radiotherapy. Since some neoplastic cell lines express a greater number of low density lipoprotein (LDL) receptors, several studies have shown that artificial lipid nanoparticles that bind to LDL receptors can be used as chemotherapeutic carriers for various types of neoplasms. Thus, the treatment can be delivered more directly to the cancer cells and therefore sparing the normal tissue. Objective: The objective of this study is to evaluate the antitumor effect of paclitaxel-nanoemulsion combination in cell lines derived from human pancreatic adenocarcinoma. Methods: The study groups were Group 1 - cell lines derived from pancreatic ductal adenocarcinomas; Group 2 - cell lines derived from pancreatic ductal adenocarcinomas incubated with paclitaxel-nanoemulsion association. Cell proliferation assays were used such as inhibitory concentration (IC₅₀) and inhibitory capacity of cell proliferation, viability testing and determination of cell proliferation and cell viability by the MTT assay (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyl bromide tetrazoline). Results: Four experiments/assays were conducted during this period. In the first assay, a decrease in cell viability was noticed as we increase concentrations of Paclitaxel-nanoemulsion association, reaching 22.77% when cells were exposed to 1.1 mg. Likewise, the second, third and fourth assays showed a decrease in cell viability as we increase the concentration of the lipid nanoemulsion, reaching 36.15%, 20.40% and 16.97% when the cells were exposed to 1.1mg. The overall analysis showed that there was a statistically significant difference between $\Delta 1$ and $\Delta 7$ ($p= 0.0419$), i.e there was a difference in cell viability at a concentration of 0.1 mg and 1.1 mg. To support these findings, the Friedman analysis of variance showed that a number of deaths is significantly higher in concentration 1.1mg when compared to 0.1mg ($\chi^2= 15.4554$; $p= 0.0170$). Conclusion: The antitumor effect of paclitaxel-nanoemulsion combination in cell lines derived from human pancreatic adenocarcinoma was proportional to the concentration. The cell proliferation analysis of these cell lines exposed to paclitaxel-nanoemulsion combination showed a decrease in cell viability as we increase the concentration of the association paclitaxel-nanoemulsion, reaching the lowest rate of 16.97% when the cells were exposed to 1.1 mg.

Keywords: Nanoemulsion. Paclitaxel. LDL Lipoprotein. Adenocarcioma. Pancreas.

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1	Poços em triplicata com as diferentes concentrações. São Paulo, 2016.	24
Gráfico 1	Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 1). São Paulo, 2016.	26
Gráfico 2	Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 2). São Paulo, 2016.	27
Gráfico 3	Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 3). São Paulo, 2016.	28
Gráfico 4	Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 4). São Paulo, 2016.	29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 1). São Paulo, 2016. 26
- Tabela 2** Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 2). São Paulo, 2016. 27
- Tabela 3** Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 3). São Paulo, 2016. 28
- Tabela 4** Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 4). São Paulo, 2016. 29
- Tabela 5** Viabilidade celular quando tratadas com a associação de Paclitaxel+Nanoemulsão nos experimentos. São Paulo, 2016. 30
- Tabela 6** Distribuição das células mortas quando tratadas a associação de Paclitaxel+Nanoemulsão nos experimentos. São Paulo, 2016. 31

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ATCC	American Type Culture Collection
CDKs	Quinases ciclina dependentes
DL50	Dose Letal Mediana
DMT	Dose Máxima Tolerada
ETP	Etoposido
IC50	Concentração inibitória 50%
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
NCI	National Cancer Institute
PTX	Paclitaxel
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TFR	Taxa Fracional de Remoção

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Adenocarcinoma pancreático ductal.....	1
1.2	Paclitaxel	5
1.3	Nanoemulsão lipídica artificial semelhante a LDL, como carreador de quimioterápicos	6
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Material.....	18
3.2	Métodos.....	18
3.2.1	Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol	18
3.2.2	Associação do oleato de paclitaxel à nanoemulsão lipídica	19
3.2.3	Cultura celular.....	20
3.2.4	Grupos a serem avaliados	20
3.2.5	Concentração inibitória (IC50) e capacidade inibitória da proliferação celular	21
3.2.6	Teste de viabilidade e proliferação celular.....	21
3.2.7	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina	22
3.2.8	Cultura celular.....	22
3.3	Análise estatística.....	25
4	RESULTADOS	26
4.1	1º Ensaio	26

4.1.1	Paclitaxel+Nanoemulsão	26
4.2	2º Ensaio	27
4.2.1	Paclitaxel+Nanoemulsão	27
4.3	3º Ensaio	28
4.3.1	Paclitaxel+Nanoemulsão	28
4.4	4º Ensaio	29
4.4.1	Paclitaxel+Nanoemulsão	29
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o entendimento dos mecanismos genético-moleculares envolvidos na gênese e na progressão de tumores permitiu o delineamento de novas estratégias para o tratamento do câncer.

O câncer de pâncreas ainda é um dos cânceres humanos mais letais, estando associado a uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 5% e, mesmo com grandes avanços tecnológicos, maior conhecimento da genética molecular e do melhor entendimento sobre a doença, esta neoplasia continua sendo a quarta causa de morte por câncer e a segunda entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos^(1,2,3).

1.1. Adenocarcinoma pancreático ductal

O adenocarcinoma pancreático ductal é a neoplasia pancreática mais comum, correspondendo a 95% dentre todos os tumores pancreáticos. Os demais tipos tumorais originam-se dos componentes celulares exócrinos ou endócrinos. Carcinomas de células acinares, tumores císticos serosos e mucinosos, tumores intraductais papilíferos produtores de mucina, tumores sólidos pseudo papilares e tumores de papila representam, assim como os adenocarcinomas pancreáticos ductais, tumores do pâncreas exócrino, contudo, distinguem-se deste pelo padrão molecular⁽¹⁾. As neoplasias endócrinas, por sua vez, são representadas pelos tumores originários e não-originários das células das ilhotas pancreáticas. Insulinomas, glucagonomas, somatostatatomas, VIPomas e PPomas são exemplos

de tumores endócrinos originários das células das ilhotas do pâncreas, enquanto gastrinomas, tumores produtores de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), síndrome de hipercalemia ectópica, tumores produtores de hormônio antidiurético e tumores carcinóides constituem tumores não-originários das ilhotas⁽⁴⁾.

A incidência de carcinoma do pâncreas tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas, sendo considerada a quarta principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos. Segundo o órgão Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), são estimados 53.070 novos casos e 41.780 mortes por câncer de pâncreas nos Estados Unidos em 2016. Apesar da alta taxa de mortalidade associada ao câncer de pâncreas, sua etiologia é ainda pouco compreendida⁽⁵⁾.

Alguns fatores de risco para o câncer de pâncreas foram identificados e uma importante associação foi encontrada em relação à idade, uma vez que as taxas de incidência aumentam progressivamente com o avançar desta, com mais de 80% dos casos de câncer pancreático ocorrendo em indivíduos com idade entre 60 e 80 anos⁽⁶⁾. Assim como a idade, tabagismo e pancreatite crônica constituem fatores de risco para o câncer pancreático. Outros fatores, tais como dieta rica em carnes e gorduras, baixos níveis de folato sérico, diabetes mellitus e obesidade também podem conferir risco aumentado. Além disso, aproximadamente 7% a 10% dos pacientes demonstram uma predisposição familiar para câncer de pâncreas⁽⁷⁾.

Os principais fatores que influenciam o prognóstico do câncer pancreático são a localização do tumor e a extensão da doença, ou seja, é descrito um melhor prognóstico se o tumor for localizado e puder ser completamente ressecado e; se não houve disseminação do tumor para os linfonodos ou outros órgãos (menos de 20% dos casos). Para os pacientes com doença localizada e lesões pequenas (<2 cm) sem metástases linfáticas e sem extensão além da cápsula do pâncreas, a

resseccão cirúrgica completa está associada a uma taxa de sobrevida em 5 anos de 18% a 24%⁽⁸⁾.

O tumor localiza-se mais frequentemente na cabeça do pâncreas (65%). Cerca de 15% localiza-se no corpo e/ou na cauda, e 20% envolve difusamente toda a glândula⁽¹⁾.

O progresso no entendimento da genética do câncer de pâncreas apresenta um número de implicações importantes, uma vez que, a tentativa de reduzir a elevada taxa de mortalidade da neoplasia pode conduzir tanto à descoberta de marcadores efetivos para a detecção precoce da doença quanto à identificação de alvos potenciais para a intervenção terapêutica.

Eventos moleculares já bem estabelecidos e correlacionados à patogênese das neoplasias pancreáticas ductais incluem a ativação do oncogene K-ras em mais de 80% dos casos, expressão aumentada do receptor do fator de crescimento epidermal (HER 2/neu) e a inativação dos genes supressores de tumor P53, p16, DPC4 e BRCA2. Genes adicionais têm sido frequentemente identificados e acrescentados à lista de alterações moleculares descritas no modelo de progressão do câncer pancreático⁽⁶⁾.

Atualmente, o único tratamento curativo do câncer de pâncreas é representado pela ressecção cirúrgica, contudo, é realizada em uma quantidade muito pequena dos casos (aproximadamente 10%), pois, no momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta a doença em estado avançado, seja localmente, seja em função das metástases à distância⁽⁹⁾.

Embora o aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas propicie a ressecção tumoral completa, a maioria dos pacientes submetidos ao procedimento apresenta recorrência, cuja taxa é reduzida com a terapia sistêmica adjuvante. Ainda, como os

tumores pancreáticos costumam ser resistentes ao tratamento com quimioterapia e radioterapia, os pacientes diagnosticados com este tumor geralmente são considerados candidatos para ensaios clínicos por causa da fraca resposta à quimioterapia, terapia de radiação, e cirurgia, tal como convencionalmente utilizados⁽⁸⁾.

Assim como para outras neoplasias, as drogas quimioterápicas podem ser utilizadas em qualquer fase do tratamento, ou seja: como terapia neoadjuvante, administrada antes da cirurgia (por vezes juntamente com radiação) para tentar reduzir o tumor; como tratamento adjuvante, usado após a cirurgia (também por vezes juntamente com radiação) para tentar eliminar as células neoplásicas residuais, na tentativa de diminuir a chance de recidiva; e, em casos de doença avançada, quando o tumor não pode ser removido completamente com a cirurgia⁽⁸⁾.

Diversos quimioterápicos podem ser usados para tratar o câncer de pâncreas, incluindo⁽⁸⁾:

- Gemcitabina (Gemzar®)
- 5-fluorouracil (5-FU)
- Irinotecano (Camptosar®)
- Oxaliplatina (Eloxatin)
- Paclitaxel ligado à albumina (Abraxane®)
- Capecitabina (Xeloda®)
- Cisplatina
- Paclitaxel (Taxol®)
- Docetaxel (Taxotere)
- Irinotecanlipossomal (Onivyde®)

1.2. Paclitaxel

O paclitaxel é um fármaco extraído a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifoliae*. Sua atividade antitumoral foi detectada pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos da América (EUA) em 1962. Em meados dos anos 80 foi desenvolvido um método de produção semi-sintética⁽¹⁰⁾.

O paclitaxel (PTX) tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de mama, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma de células não pequenas de pulmão, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi associado com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)⁽¹¹⁾.

O mecanismo de ação do paclitaxel está relacionado à inibição da mitose através da polimerização da tubulina que gera microtúbulos disfuncionais e dessa forma, o ciclo celular é bloqueado na fase G2M, impedindo a divisão celular^(11,12,13). O mecanismo preciso pelo qual a estabilização dos microtúbulos leva a apoptose das células não está totalmente esclarecido⁽¹⁴⁾, porém, sabe-se que alterações nos microtúbulos podem induzir a expressão do gene supressor de tumores p53 e de reguladores do ciclo celular como o p21/Waf-1, um inibidor de cinase dependente de ciclinas (CDKs). A apoptose induzida pelo paclitaxel pode ocorrer por dois mecanismos distintos, via independente de p53 e via dependente de p53 com acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular^(15,16).

O paclitaxel também está disponível em uma formulação de associação à nanopartículas, estabilizado com a ligação à albumina. Dados sugerem que esta associação possa ter melhor desempenho quando comparado à outras formas de paclitaxel além de ter menos efeitos secundários.

Em estudo clínico, realizado com pacientes diagnosticados por adenocarcinoma de pâncreas avançado, a utilização do paclitaxel associado a uma nanopartículaalbumínica (*nab*-Paclitaxel) demonstrou evidências de atividade antitumoral, como terapia de segunda linha⁽¹²⁾.

Os principais efeitos adversos do paclitaxel são a neurotoxicidade e a neutropenia¹⁷. Outros efeitos adversos estão relacionados à toxicidade promovida pelo veículo da formulação. Por ser praticamente insolúvel em água, a formulação comercial do paclitaxel (Taxol®) é solubilizada em partes iguais de etanol e do surfactante Cremophor EL®, um derivado poli-oxetilado de óleo de rícino⁽¹⁸⁾. Os efeitos adversos relacionados ao uso do Cremophor EL® incluem reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, vasodilatação, dispneia, letargia e hipotensão⁽¹⁹⁾.

1.3. Nanoemulsão lipídica artificial semelhante a LDL, como carreador de quimioterápicos

A observação de que células neoplásicas apresentam superexpressão de receptores de Lipoproteína de baixa densidade (LDL)^(20,21) levou à hipótese de que uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol, com metabolismo semelhante ao da LDL natural^(22,23,24) poderia ser utilizada como transportadora de quimioterápicos, concentrando-os nos tecidos neoplásicos por meio de endocitose mediada pelos receptores de LDL⁽²²⁾.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o maior transportador de colesterol circulante no plasma humano. A LDL é internalizada nas células por meio da ligação de sua proteína - a apolipoproteína B-100 (apo B100) - a receptores celulares específicos⁽²¹⁾.

Nanopartículas lipídicas artificiais com conteúdo lipídico semelhante ao da LDL natural e que se ligam aos receptores dessa lipoproteína^(22,23,24,25) podem ser produzidas em laboratório.

A nanoemulsão lipídica artificial não possui proteínas em sua constituição, porém, no compartimento plasmático entra em contato com as lipoproteínas naturais e adquire apolipoproteínas, como a apolipoproteína E (apoE), que modula o metabolismo da nanoemulsão lipídica. A ligação da nanoemulsão aos receptores celulares se dá pela ligação da apo E⁽²³⁾.

A associação da nanoemulsão à drogas tem sido alvo de estudos. Benefícios e limitações da associação da Nanoemulsão às drogas tem sido cada vez mais estudados e demonstrados seus resultados. Apesar de benéficos, muito ainda há para ser pesquisado em relação a seus efeitos colaterais.

Estudos realizados demonstraram a ligação da Nanoemulsão às lipoproteínas naturais, principalmente a ApoE que é reconhecida pelos LDL-R, sendo captada pela célula. Porém, havia um limite de conhecimento em relação ao mecanismo de ligação que ocorre no organismo⁽²³⁾. Hoje já se conhecem cerca de 30 diferentes ligantes, como lipoproteínas, proteínas de matriz, proteínas intracelulares, fatores de crescimento e protease como a MMP9^(26,27).

Maranhão et al²⁸ realizaram um estudo em coelhos para verificar se a nanoemulsão se concentraria na artéria do coelho lesionada e se o derivado de paclitaxel, o oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão, poderia reduzir as lesões

ateroscleróticas. A nanoemulsão-paclitaxel reduziu as áreas de lesão de animais alimentados com colesterol em 60% e inibiu a migração de macrófagos e proliferação de células do músculo liso e invasão da íntima. A nanoemulsão-paclitaxel produziu pronunciada regressão de aterosclerose sem toxicidade e mostrou notável potencial na terapêutica cardiovascular.

Outro alvo dos estudos de associação da nanoemulsão é a área da Oncologia.

A associação de agentes quimioterápicos a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol concentrou estes fármacos nos tecidos neoplásicos, aumentando a eficácia dos mesmos^(29,30,31,32,33,34,35,36,37).

A hipótese da nanoemulsão ser utilizada como transportadora de quimioterápicos foi testada em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) onde se verificou que a nanoemulsão lipídica foi removida com maior velocidade nestes pacientes do que nos pacientes do grupo controle⁽³⁸⁾.

Outros estudos confirmaram a captação e concentração da nanoemulsão lipídica no carcinoma de ovário⁽³⁹⁾ e no carcinoma de mama^(35,40).

A nanoemulsão lipídica foi testada como transportadora dos quimioterápicos carmustina^(29,30), paclitaxel^(33,36,41,42), etoposide^(31,32,44) e daunorrubicina^(37,43).

Valduga et al⁽⁴⁴⁾ descreveram um estudo em que uma microemulsão rica em colesterol (nanoemulsão) se liga a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e é levada seletivamente pelas células malignas que superexpressam esses receptores, demonstrando seu uso como veículo para agentes antineoplásicos. Em seu estudo avaliaram a associação de etoposido (ETP) com a nanoemulsão. Foi observado que o etoposido se associou fracamente à uma microemulsão. A associação de oleato de etoposido com a nanoemulsão foi de quase 100% tendo sido testado quanto à

estabilidade física e química, bem como para a absorção celular, a toxicidade em ratos e a atividade citotóxica contra uma linha de células neoplásicas (NCI-H292). A absorção e a atividade citotóxica de oleato de etoposido com a nanoemulsão pelas células NCI-H292 foram mediadas por receptores de LDL. A atividade anti-proliferativa do oleato de etoposido com a nanoemulsão contra as células neoplásicas foi menor do que a do oleato de etoposido (Concentração inibitória 50% ou IC50) (concentração da droga necessária para inibir 50% do crescimento celular) = 0,48 e 0,19 mm, respectivamente). Esta diferença, no entanto, foi atribuída à atividade do veículo utilizado comercialmente e não a droga em si, porque, quando o veículo foi adicionado às culturas com oleato de etoposido com a nanoemulsão, o IC50 diminuiu. Por outro lado, a tolerabilidade do oleato de etoposido com a nanoemulsão dos ratos foi importante, de tal modo que a sua dose letal (DL50) foi cerca de cinco vezes a da formulação comercial (DL50 = 315 e 58 mg kg⁻¹, respectivamente). Concluíram que a associação do oleato de etoposido com a nanoemulsão é estável e a atividade citostática da droga é preservada enquanto que a sua toxicidade em animais é pequena. Ao diminuir os efeitos secundários e dirigir o etoposido para tecidos neoplásicos, a nanoemulsão pode ser considerada como um avanço no uso de quimioterapia, especificamente com esta droga.

Lo Prete⁽³²⁾ também testaram a associação de um derivado de etoposido à nanoemulsão em termos da toxicidade e ação antitumoral desta nova preparação in vivo. Ratos portadores de melanoma e controles receberam a nanoemulsão-oleato de etoposido ou etoposido comercial, com ou sem marcação radioativa. A dose máxima tolerada (DMT), a distribuição do tecido, curvas de decaimento do plasma, os parâmetros farmacocinéticos e a atividade anti-tumoral foram investigadas. A associação à nanoemulsão reduziu drasticamente a toxicidade do fármaco, uma vez

que a DMT foi aproximadamente cinco vezes maior do que com o etoposido comercial. A nanoemulsão-oleato de etoposido teve concentração quatro vezes maior no tumor em comparação com os tecidos normais adjacentes. Além disso, foi removido rapidamente a partir do plasma em ratos portadores de tumor quando comparados aos controles, e manteve-se na corrente sanguínea mais tempo do que o etoposido comercial. A taxa de inibição do crescimento do tumor e a sobrevivência foram maiores nos animais tratados com a nanoemulsão-oleato de etoposido em comparação com o etoposido comercial. A incorporação da nanoemulsão-oleato de etoposido resultou em toxicidade marcadamente reduzida e atividade anti-tumoral superior.

Maranhão et al⁽²⁹⁾ conduziram ainda um estudo clínico exploratório para determinar o perfil de toxicidade da associação carmustina-nanoemulsão em níveis de dose escalonada em 42 pacientes com câncer avançado refratários à quimioterapia convencional. Identificaram que a carmustina formou uma associação estável com a nanoemulsão e que a ação farmacológica da carmustina nas células cancerosas não foi diminuída com a associação em comparação com o fármaco livre e que, foi de fato mediada pelo receptor de LDL. Os pacientes tratados com a associação mostraram efeitos colaterais mínimos, mesmo com doses muito elevadas corroborando que a associação com a nanoemulsão preserva a citotoxicidade da carmustina diminuindo seus efeitos colaterais.

Hungria et al⁽⁴⁶⁾ descreveram que a nanoemulsão pode ser absorvida por células de mieloma múltiplo e avaliaram a resposta de pacientes com mieloma múltiplo ao tratamento com a nanoemulsão associada à carmustina. Partiram do princípio de que micro-emulsões ricas em colesterol se ligam aos receptores de LDL, apresentando a capacidade de se concentrar em células de leucemia mielóide

aguda e, em carcinomas do ovário e da mama. Desta forma, a nanoemulsão poderia ser usada como um veículo para fármacos dirigidos contra células neoplásicas. Avaliaram o perfil lipídico de 131 pacientes voluntários com mieloma múltiplo recentemente diagnosticados, classificados como estágio clínico IIIA e controles saudáveis. A cinética plasmática da nanoemulsão foi avaliada em 14 deles. A absorção celular da nanoemulsão e a citotoxicidade da carmustina associada com a emulsão foi avaliada numa linha celular do mieloma múltiplo e o estudo farmacocinético da nanoemulsão-carmustina foi realizado em três pacientes. Além disso, avaliaram a nanoemulsão-carmustina em sete doentes com mieloma múltiplo não tratados. Os achados deste estudo de Hungria et al⁽⁴⁶⁾ mostraram que o colesterol LDL foi menor nos 131 doentes com mieloma múltiplo comparados aos controles saudáveis e a taxa fracional de remoção (TFR), em unidades por minuto) nos 14 doentes com mieloma múltiplo foi o dobro que em 14 indivíduos controle saudáveis. Além disso, a entrada da nanoemulsão em várias células de mieloma mostrou ser mediada por receptores de LDL. Seus resultados indicam que houve melhoria dos sintomas em todos os pacientes e as concentrações do colesterol aumentaram após o tratamento, sugerindo que o tratamento resultou em pelo menos destruição parcial de células neoplásicas com sobre-regulação do receptor. Demonstraram que quando a carmustina está associada com a nanoemulsão, a toxicidade do fármaco é significativamente reduzida em pacientes com câncer avançado.

Em relação ao Paclitaxel, os estudos também corroboram o uso da associação entre droga e nanoemulsão.

Além disso, em pacientes com tumores de ovário, endométrio, cérvix uterina e mama, ocorreu maior captação da associação nanoemulsão-oleatos nos tecidos

neoplásicos^(36,42) e redução dos efeitos adversos comparando-se com o uso do paclitaxel comercial⁽³⁶⁾.

Em 2002, Rodrigues et al⁽⁴¹⁾ descreveram que uma emulsão rica em colesterol (nanoemulsão) pode ser tomada pelas células malignas que super expressam a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, assim, poderiam ser utilizadas como transportador para drogas dirigidas contra as células neoplásicas. Avaliaram a associação da nanoemulsão ao agente antineoplásico paclitaxel e analisaram a eficiência de incorporação da nova formulação, sua estabilidade química e física, a incorporação celular e a atividade citostática contra uma linha de células neoplásicas além da toxicidade aguda em ratos. Uma eficiência de incorporação do paclitaxel de cerca de 75% foi obtida quando o paclitaxel foi misturado com a nanoemulsão numa razão de 6:1 molar de lípido-droga. A associação do paclitaxel com a nanoemulsão aumentou 54% do diâmetro médio das partículas da emulsão, mas não danificou a estrutura química do paclitaxel, tal como analisada por HPLC. Os resultados de ultracentrifugação do gradiente de Sephadex G25 e a filtração em gel indicaram que a ligação da droga à emulsão foi estável. Foi demonstrado que a absorção celular e a atividade citotóxica da nanoemulsão-paclitaxel por uma linha de células neoplásicas (células NCI-H292) foi de fato mediada pelos receptores de LDL. A atividade antiproliferativa da nanoemulsão-paclitaxel contra as células NCI-H292 foi menor do que a de uma preparação comercial do paclitaxel (50% da concentração inibidora, IC₅₀ = 2,60 e 0,45 microM, respectivamente). Esta diferença, no entanto, foi atribuída à atividade anti-proliferativa in vitro do veículo comercial Cremophor EL do paclitaxel pois, quando o Cremophor EL foi adicionado às culturas com nanoemulsão-paclitaxel, o valor de IC₅₀ foi reduzido para 0,45 microM, atingindo a preparação do paclitaxel comercial.

A tolerabilidade de nanoemulsão-paclitaxel em ratos foi importante, de tal modo que a sua dose letal (DL50) foi dez vezes maior do que a da formulação comercial (DL50 = 324 e 31,8 mg kg⁻¹, respectivamente). Portanto, concluíram que a associação da nanoemulsão lipídica com o paclitaxel preservou a atividade citotóxica do fármaco e mostrou que sua Dose Máxima Tolerada (DMT) em camundongos foi maior do que a DMT da formulação comercial do quimioterápico. Ao diminuir os efeitos secundários e dirigir o paclitaxel para tecidos neoplásicos, a nanoemulsão pode ser útil como adjuvante na quimioterapia com esta droga.

Rodrigues et al⁽³³⁾ compararam a farmacocinética, a toxicidade para os animais e ação terapêutica de um derivado lipofílico de paclitaxel associado à nanoemulsão com os do paclitaxel comercial. Os resultados mostram que o oleato de paclitaxel e nanoemulsão foi estável. A atividade citostática da droga no complexo foi diminuída em comparação com o paclitaxel comercial devido à citotoxicidade do veículo Cremophor EL utilizado na formulação comercial. As experiências em células neoplásicas em cultura mostraram que o oleato de paclitaxel e nanoemulsão são internalizados em conjunto pela via do receptor de nanoemulsão. A nanoemulsão-oleato de paclitaxel age nas fases G(2) e fase M do ciclo celular, de modo semelhante ao paclitaxel comercial. A tolerabilidade aos ratos foi importante, de tal modo que a dose letal (LD (50)) era nove vezes superior à da formulação comercial (LD (50) = 326 microM e 37 microM, respectivamente). A nanoemulsão concentrou o oleato de paclitaxel no tumor aproximadamente quatro vezes em relação aos tecidos adjacentes normais. Em doses equimolares, a associação de oleato de paclitaxel com nanoemulsão mostrou resultados notáveis nas alterações dos parâmetros farmacocinéticos da droga quando comparado com paclitaxel comercial ($t(1/2) = 218$ min e 184 min, a AUC = 1,334 mcg h/ml e 707 mcg

h/ml e CL = 0,125 ml/min e 0,236 ml/min, respectivamente). A eficácia terapêutica do complexo foi pronunciadamente maior do que a do paclitaxel comercial, como indicado pela redução no crescimento do tumor, em aumentar as taxas de sobrevivência e a porcentagem de cura dos ratos tratados. Concluíram que a nanoemulsão-oleato de paclitaxel é um complexo estável e com um melhor índice terapêutico em uso clínico pois a toxicidade é consideravelmente reduzida e a atividade é aumentada.

Dias et al⁽⁴²⁾, partindo do princípio de que a nanoemulsão rica em colesterol se concentra em tecidos de câncer após a injeção na corrente sanguínea, testaram a farmacocinética da nanoemulsão-oleato de paclitaxel e a capacidade da nanoemulsão para concentrar a droga no tumor em pacientes com câncer ginecológico. Identificaram que a quantidade de paclitaxel e nanoemulsão radioativa no tumor foi de 3,5 vezes maior do que nos tecidos normais. Concluíram que o oleato de paclitaxel associado à nanoemulsão é um componente estável na corrente sanguínea e tem uma maior meia vida no plasma do que o paclitaxel + Cremophor. Desta forma, a associação à nanoemulsão mostrou-se uma estratégia interessante para o uso de paclitaxel para o tratamento de cânceres ginecológicos.

Pires et al⁽³⁶⁾ testaram em seu estudo clínico envolvendo quatro pacientes com câncer de mama, por oito ciclos de tratamento, a captação tumoral, farmacocinética e toxicidade do paclitaxel associado à nanoemulsões. A absorção da associação nanoemulsão e oleato-paclitaxel pelo tecido maligno da mama foi três vezes maior do que o tecido normal da mama e toxicidade foi mínima nos dois níveis de dose: a mielotoxicidade, documentada pela contagem de plaquetas, leucócitos e células vermelhas bem como reações de hipersensibilidade, toxicidade renal e hepática não ocorreram. Uma vez que o oleato de paclitaxel foi associado à

nanoemulsão, o perfil farmacocinético do transportador prevaleceu, resultando numa meia vida mais longa do fármaco em comparação com a da formulação de paclitaxel em Cremophor EL. Seus resultados sugerem que a preparação de paclitaxel-nanoemulsão pode ser vantajosa para o uso no tratamento de câncer da mama porque os parâmetros farmacocinéticos são melhorados, o fármaco é concentrado no tecido neoplásico e a toxicidade do paclitaxel é reduzida.

Kretzer; Maria; Maranhão⁽⁴⁷⁾ também descreveram o uso de nanoemulsões lipídicas utilizadas como transportadores de paclitaxel (PTX) e etoposido (ETP) para diminuir a toxicidade e aumentar a ação terapêutica desses fármacos. Investigaram a quimioterapia combinada com PTX e ETP associada à nanoemulsão. O crescimento do tumor, presença de metástase, a distribuição do ciclo celular, contagens de células de sangue e dados histológicos foram analisados. A inibição do crescimento do tumor foi igualmente forte em todos os grupos de tratamento. No entanto, houve uma maior redução no número de animais portadores de metástases no grupo de nanoemulsão-PTX + ETP (30%) em comparação com o grupo PTX + ETP (82%, $p < 0,05$). A redução da densidade celular, vasos sanguíneos e aumento das fibras de colágeno em tecidos tumorais foram observadas no grupo de ETP-PTX + nanoemulsão, mas não no grupo PTX + ETP, e em ambos os grupos foram observados reduzida anemia e trombocitose relacionadas com melanoma. A análise de citometria de fluxo sugeriu que nanoemulsão-PTX + ETP exibiu uma maior seletividade para as células neoplásicas quando comparado ao PTX-ETP. A toxicidade manifestada por perda de peso e mielossupressão foi marcadamente mais branda na nanoemulsão-PTX + ETP do que no grupo PTX + ETP. Desta forma, seus resultados podem fornecer uma forte justificativa para quimioterapia combinada

a drogas alvo, utilizando nanoemulsões lipídicas como veículos em futuros estudos clínicos.

Justificativa

O adenocarcinoma pancreático é um dos tipos de câncer humano mais letais e continua sendo a quarta causa de morte por câncer e a segunda entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos.

A maioria dos pacientes com adenocarcinoma pancreático tem doença incurável quando o diagnóstico é estabelecido.

O aprimoramento da quimioterapia convencional por meio de estratégias que reduzam os efeitos adversos dos agentes antineoplásicos é uma medida importante para a eficácia do tratamento do adenocarcinoma pancreático.

Tem sido demonstrado que o direcionamento específico da quimioterapia às células tumorais, promovido pela associação de quimioterápicos a uma nanoemulsão lipídica que se liga a receptores de LDL, reduziu drasticamente os efeitos adversos observados com o uso da formulação comercial de agentes antineoplásicos como o paclitaxel^(34,36).

A avaliação dos efeitos da associação paclitaxel-nanoemulsão em células de adenocarcinoma pancreático é de grande relevância, visto que as taxas de incidência do adenocarcinoma pancreático ductal são praticamente idênticas às taxas de mortalidade devido à natureza altamente agressiva do tumor, bem como os sintomas pouco específicos que levam ao diagnóstico tardio e a resistência à quimioterapia e radioterapia disponíveis⁽⁴⁸⁾. A associação pode minimizar os efeitos adversos do paclitaxel e otimizar a eficácia do tratamento.

O aumento da concentração da associação Nanoemulsão+Paclitaxel, pode levar a diminuição da proliferação e viabilidade celular.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito antitumoral da associação paclitaxel-nanoemulsão em linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático humano.
- Analisar a proliferação celular destas linhagens de adenocarcinoma pancreático submetidas à associação paclitaxel-nanoemulsão

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os lípides trioleína, oleato de colesterol e colesterol utilizados na produção das emulsões, foram adquiridos da Nu-Check Prep. (Elysian, EUA). A fosfatidilcolina foi obtida da LipidProducts (Surrey, Inglaterra). O paclitaxel foi obtido da Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, EUA). Os equipamentos utilizados foram: disruptor de células ultrasônico Branson Ultrasonic Corporation (Danbury, EUA), ultracentrífuga com rotor Beckman SW41 (BeckmanCoulter Inc., Brea, EUA), agitador vórtex Thermomlyn® 37600 mixer, centrífuga de tubos Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol

A nanoemulsão lipídica foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg et al⁽²⁵⁾, modificada por Maranhão et al⁽²³⁾. Em um frasco foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre, dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). A mistura de lípides foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37°C) e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas, a 4°C, para a remoção total dos resíduos de solventes. A seguir, foram adicionados 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, e a suspensão de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante três horas, sob atmosfera de nitrogênio e com temperatura variando entre 51 e 55°C. A emulsão foi submetida à irradiação ultrassônica com uma potência de 125 watts, em modo

contínuo de operação por um disruptor de células Branson, modelo B 450, equipado com ponta de titânio com 1 cm de diâmetro.

Após a irradiação ultrassônica, a nanoemulsão lipídica foi purificada por ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante da solução (1,0 mL), contendo partículas que flutuam em densidade 1,006 g/mL, foi retirado e descartado. O volume restante foi submetido à nova ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante duas horas, a 4°C, após adição de brometo de potássio sólido, para ajustar a densidade em 1,210 g/mL. Do sobrenadante foram removidos 2,0 mL, os quais continham a fração das partículas de tamanho e composição desejados. A nanoemulsão lipídica foi dialisada utilizando-se 4,0 mL de tampão estéril TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, e saco de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA), por 16 horas, a 4°C, para a total remoção dos sais de brometo de potássio utilizados na etapa final de purificação. A nanoemulsão lipídica foi submetida à esterilização por filtração em filtros com poros de 0,2 μ de diâmetro (Millipore, São Paulo, SP). Todo o procedimento de preparo da nanoemulsão lipídica foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical para evitar a contaminação por microorganismos.

3.2.2. Associação do oleato de paclitaxel à nanoemulsão lipídica

O oleato de paclitaxel, modificado conforme descrito anteriormente⁽³³⁾, foi associado à nanoemulsão lipídica numa razão 10:1 em massa de lípides e fármaco. O paclitaxel foi dissolvido em etanol, sob agitação, até completa solubilização para posterior adição da nanoemulsão lipídica à solução de oleato de paclitaxel. A incorporação foi realizada por irradiação ultrassônica por 40 minutos com

temperatura variando entre 50 e 55°C. As preparações foram realizadas no mesmo dia dos respectivos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µ.

3.2.3. Cultura celular

As linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais foram obtidas na *American Type Culture Collection (ATCC)*, um centro de recursos biológicos que autentica linhagens celulares e gerencia a logística de preservação a longo prazo, bem como a distribuição de culturas para a comunidade científica.

As linhagens celulares MIA PaCa-2 (ATCC® Number: CRL-1420™) foi cultivada em garrafas de cultura de 25cm² contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibióticos contendo 10000 unidades de penicilina e 10000µg de estreptomicina por mililitro (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Uma vez em cultura, as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca de meio de cultura foi efetuada a cada 24 horas até que as células pudessem atingir confluência para a expansão.

3.2.4. Grupos a serem avaliados

- Grupo 1 - linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais.
- Grupo 2 - linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos ductais incubadas com a associação paclitaxel-nanoemulsão

3.2.5. Concentração inibitória (IC50) e capacidade inibitória da proliferação celular

A concentração inibitória 50% (IC50) foi determinada como a concentração requerida da nanoemulsão associada à droga para inibir o crescimento em 50%. Essa concentração (ug/mL) foi avaliada pela regressão linear e equação da reta. Utilizamos para esse cálculo, a viabilidade proporcional (%) pela comparação do grupo tratado com o controle sem tratamento, nos ensaios de exclusão pelo azul de trypan. A viabilidade do controle assumida para este cálculo foi de 100%. A capacidade inibitória da proliferação celular, representada em porcentagem, foi calculada a partir do número de células do controle e comparada com os experimentos obtidos nos ensaios de exclusão pelo azul de trypan. A capacidade inibitória do controle assumida para este cálculo foi de 0%.

3.2.6. Teste de viabilidade e proliferação celular

A viabilidade foi determinada pelo teste de exclusão do corante azul de trypan. Células viáveis são impermeáveis a este corante, uma vez que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana. Cada poço de uma placa para cultivo celular de 24 orifícios recebeu 2 ml de meio apropriado e 1 ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1×10^5 células/ml previamente tratadas com a nanoemulsão contendo paclitaxel. As células foram incubadas em ambiente controlado por períodos de 24 horas, 48 e 72 horas, sendo coradas posteriormente com azul de trypan 0,4% por 5 minutos. Após remoção do corante por aspiração e lavagem por duas vezes com solução tampão fosfato (pH 7,4), as células foram destacadas e contadas em câmara de Neubauer em microscópio invertido.

3.2.7. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

A viabilidade foi avaliada através da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que converte o sal de tetrazólio (MTT) para um composto colorido (formazan), cuja concentração pode ser determinada por espectrometria. O meio de cultura das células tratadas como descrito anteriormente foi removido e acrescentado 1mL em cada poço da solução de MTT (0,3 mg/mL) em meio de cultura sem soro protegido da luz. As células foram incubadas em estufa 37°C por quatro horas para formação dos cristais de formazan. A solução foi cuidadosamente removida dos poços e adicionado 0,5 mL de etanol 70% para promover a lise celular. Após solubilização foi feita leitura da absorbância a 570nm no leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência relativa ao grupo controle.

3.2.8. Cultura Celular

Para a cultura celular, foi preparado o meio DMEN com os nutrientes necessários e já contendo antibiótico com 10% do soro fetal bovino. Primeiramente, as células de linhagem MIA PaCa-2 foram descongeladas para o estudo, em Banho Maria à 37°C. O meio foi adicionado nas células em placa e colocado na estufa. Conforme o crescimento das células e sua expansão na placa, foi realizada a tripsinização das células aderentes ao fundo, que foram passadas para uma placa maior. Este procedimento foi realizado até as células atingirem quantidade suficiente para realizar o experimento.

Foi realizada contagem de células em Câmara de Neubauer (100 microlitros de células e contando quatro quadrantes). As células com meio foram colocadas nos poços e permaneceram na estufa, para aderir ao fundo dos poços.

Foi realizado o preparado da nanoemulsão e da nanoemulsão com a droga padronizado pelo Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da USP.

Foram realizados os cálculos para inserir os tratamentos nas células com as seguintes concentrações:

- 0,1mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 0,4mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 0,5mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 0,7mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 0,8mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 0,9mg de nanoemulsão + paclitaxel
- 1,1mg de nanoemulsão + paclitaxel

Foram adicionadas aos poços, as quantidades em triplicata, conforme ilustrado na Figura 1.



Figura 1. Poços em triplicata com as diferentes concentrações de Paclitaxel. São Paulo, 2016.

As placas foram colocadas na estufa por 48 horas para o tratamento das células.

Foi realizado o ensaio MTT, com 7,2g do sal + 24 MI de meio sem soro (cálculo para cada placa de 24 poços). O meio das células foi retirado dos poços e adicionado 1 MI do MTT em cada um. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada na estufa por 4 horas. Foi retirado o meio de todos os poços e adicionado 500µl de Etanol 70% e homogeneizados para a ressuspensão das células. Foram colocadas em poços novos e menores (200µl cada poço) e lidos no espectrofotômetro à 570nm.

A média foi calculada no programa Excel, sendo:

- Média = amostra .100/controlado

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, foi aplicada a análise de variância de Friedman⁽⁴⁹⁾, com os seguintes objetivos:

1. Comparar as diferenças percentuais (Δ) calculadas a partir do número de células contadas antes e após a adição da droga, para cada uma das sete concentrações.
2. Comparar as sete concentrações em relação ao número de células mortas.

Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de significância.

4. RESULTADOS

A seguir estão descritos os quatro ensaios realizados.

4.1. 1º ensaio

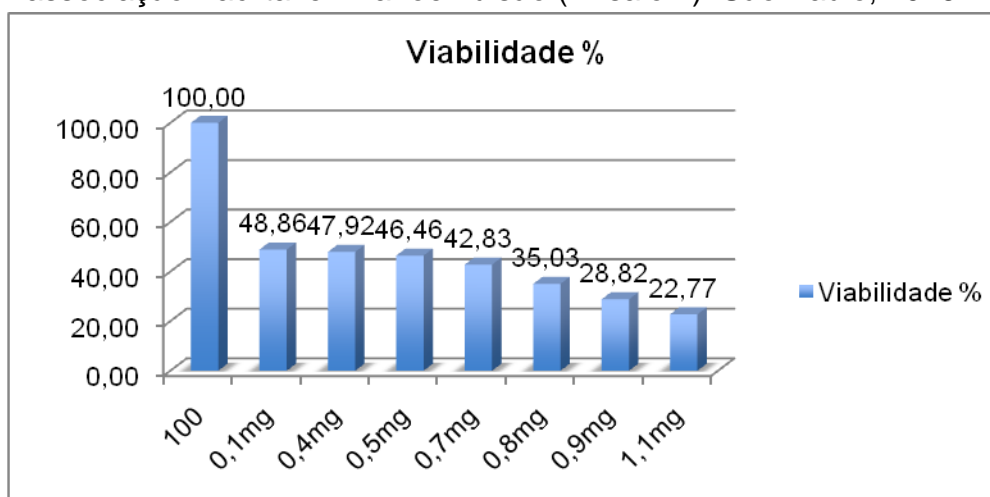
4.1.1. Paclitaxel+Nanoemulsão

Neste primeiro ensaio, percebeu-se uma diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da associação Paclitaxel+Nanoemulsão, chegando a 22,77% quando as células foram submetidas a 1,1mg (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+ Nanoemulsão (Ensaio 1). São Paulo, 2016.

Concentração de paclitaxel	Viabilidade celular
Controle	100,00
0,1mg	48,86
0,4mg	47,92
0,5mg	46,46
0,7mg	42,83
0,8mg	35,03
0,9mg	28,82
1,1mg	22,77

Gráfico 1. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 1). São Paulo, 2016.



4.2. 2º ensaio

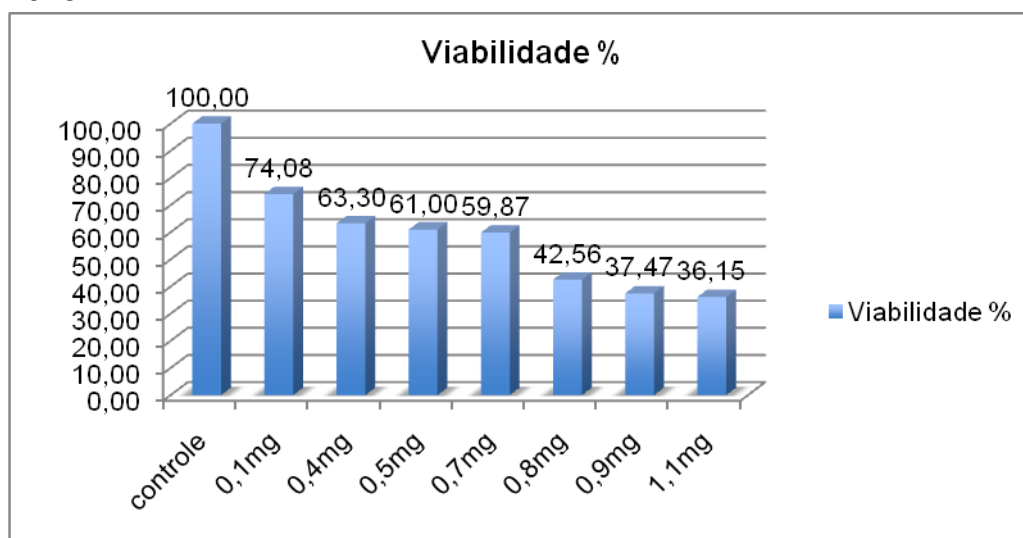
4.2.1. Paclitaxel+Nanoemulsão

Ainda durante o segundo ensaio, quando submetemos as células às diferentes concentrações da associação Paclitaxel+Nanoemulsão, também houve diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da Nanoemulsão lipídica, sendo 36,15% quando as células foram submetidas a 1,1mg (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 2). São Paulo, 2016.

Concentração de paclitaxel	Viabilidade celular
Controle	100,00
0,1mg	74,08
0,4mg	63,30
0,5mg	61,00
0,7mg	59,87
0,8mg	42,56
0,9mg	37,47
1,1mg	36,15

Gráfico 2. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 2). São Paulo, 2016.



4.3. 3º ensaio

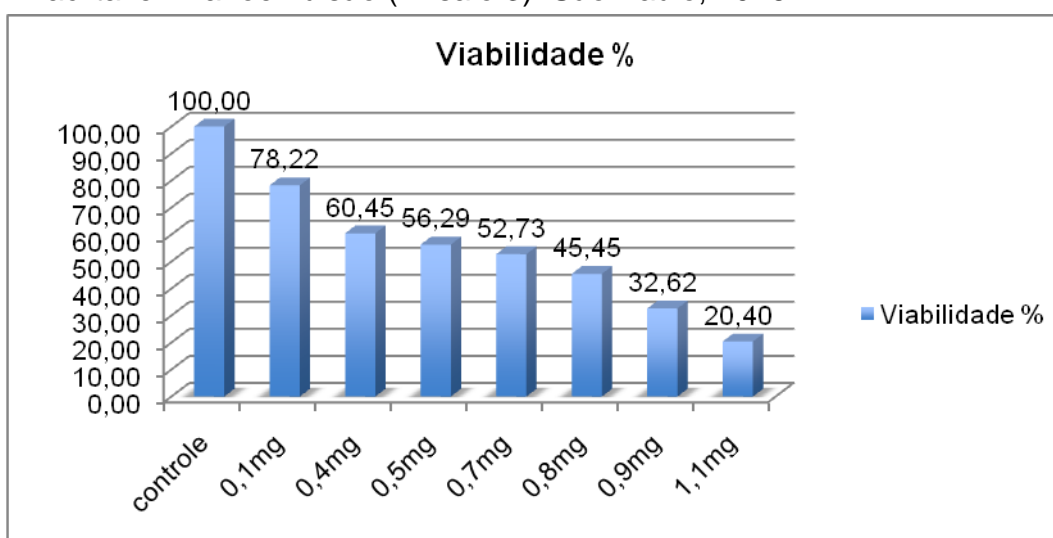
4.3.1. Paclitaxel+Nanoemulsão

Percebemos uma diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da associação Paclitaxel+Nanoemulsão, chegando a 20,40% quando as células foram submetidas a 1,1mg (Tabela 3 e Gráfico 3)

Tabela 3. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 3). São Paulo, 2016.

Concentração de paclitaxel	Viabilidade celular
Controle	100,00
0,1mg	78,22
0,4mg	60,45
0,5mg	56,29
0,7mg	52,73
0,8mg	45,45
0,9mg	32,62
1,1mg	20,40

Gráfico 3. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 3). São Paulo, 2016.



4.4. 4º ensaio

4.4.1. Paclitaxel+Nanoemulsão

Para as células submetidas às diferentes concentrações da associação Paclitaxel+Nanoemulsão, também houve diminuição da viabilidade celular conforme aumento da concentração da Nanoemulsão lipídica, sendo 16,97% quando as células foram submetidas a 1,1mg (Tabela 4 e Gráfico 4)

Tabela 4. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão. São Paulo, 2016.

Concentração de paclitaxel	Viabilidade celular
Controle	100,00
0,1mg	17,70
0,4mg	15,77
0,5mg	17,82
0,7mg	17,94
0,8mg	15,93
0,9mg	23,03
1,1mg	16,97

Gráfico 4. Porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com a associação Paclitaxel+Nanoemulsão (Ensaio 4). São Paulo, 2016.

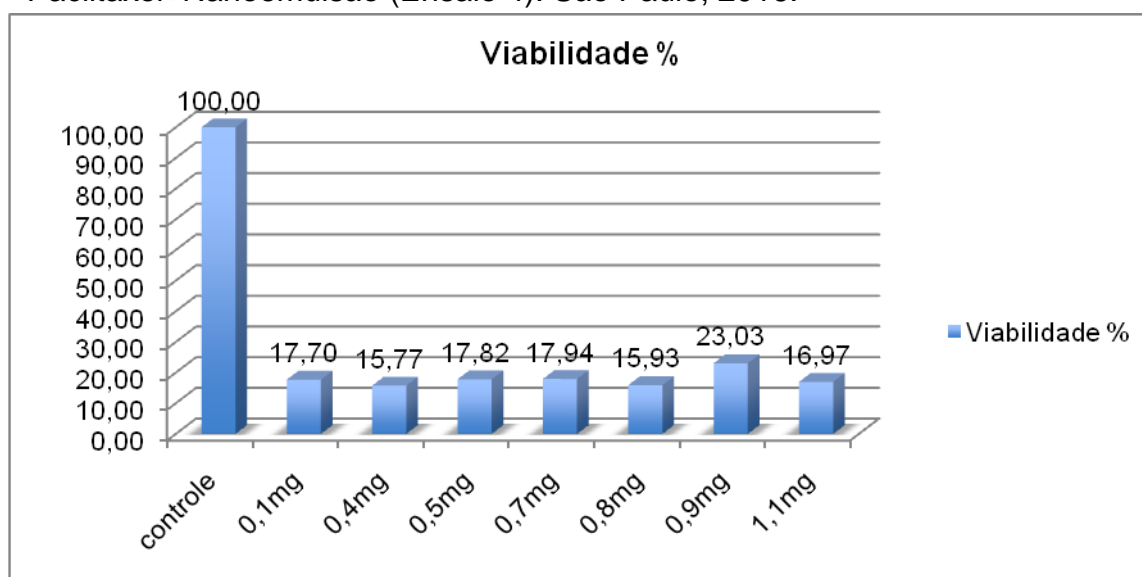


Tabela 5. Viabilidade celular quando tratadas com a associação de Paclitaxel+Nanoemulsão nos experimentos. São Paulo, 2016.

Grupo II - Células com associação Paclitaxel + Nanoemulsão																					
Experimento	C1 (0,1 mg)			C2 (0,4 mg)			C3 (0,5 mg)			C4 (0,7 mg)			C5 (0,8 mg)			C6 (0,9 mg)			C7 (1,1 mg)		
	Antes	Depoi	$\Delta 1$	Antes	Depoi	$\Delta 2$	Antes	Depois	$\Delta 3$	Antes	Depoi	$\Delta 4$	Antes	Depoi	$\Delta 5$	Antes	Depoi	$\Delta 6$	Antes	Depoi	$\Delta 7$
	s			s			s			s			s			s					
1	403666	19723	48,86	40366	19343	47,92	40366	187543	46,4	40366	17289	42,83	40366	14140	35,03	40366	11633	28,82	40366	91915	22,77
		1		6	7		6		6	6	0		6	4		6	7		6		
2	427000	31632	74,08	42700	27029	63,30	42700	260470	61,0	42700	25564	59,87	42700	18173	42,56	42700	15999	37,47	42700	15436	36,15
		2		0	1		0		0	0	5		0	1		0	7		0	1	
3	142666	11159	78,22	14266	86242	60,45	14266	80307	56,2	14266	75228	52,73	14266	64842	45,450	14266	46538	32,62	14266	29104	20,40
		3		6			6		9	6			6			6			6		
4	93333	16520	17,70	93333	14719	15,77	93333	16632	17,8	93333	16744	17,94	93333	14868	15,93	93333	21495	23,03	93333	15839	16,97
									2												
Mediana			61,47			54,18			51,3			47,38			38,80			30,72			21,56
									8												
Média			54,86			46,86			45,3			43,34			34,74			30,49			24,07
									9												

Análise de Variância de Friedman
 $\chi^2 = 13,07$ ($p = 0,0419$)
 Concentração 1,1mg > 0,1mg

Na Tabela 6, apresentamos a análise de variância de Friedman. Encontramos um número de mortes na concentração 1,1mg significativamente maior que na concentração 0,1mg ($\chi^2= 15,4554$; $p=0,0170$)

Tabela 6. Distribuição das células mortas quando tratadas com a associação de Paclitaxel+Nanoemulsão nos experimentos. São Paulo, 2016.

Concentração de paclitaxel	0,1mg	0,4mg	0,5mg	0,7mg	0,8mg	0,9mg	1,1mg
Experimento 1	206435	210229	216123	230776	262262	287329	311751
Experimento 2	110678	156709	166530	171355	245269	26700,	272639
Experimento 3	31073	56424	62359	67438	77824	96128	113562
Experimento 4	76813	76813	76701	76589	78465	71838	77494
Mediana	93745,5	116761,0	121615,5	123972,0	161867,0	181565,5	193100,5
Média	106249,75	125043,75	130428,25	136539,5	165955,0	180574,5	193861,5

Análise de Variância de Friedman
 $\chi^2= 15,4554$ ($p=0,0170$)
 Concentração 1,1mg > 0,1mg

5. DISCUSSÃO

Mesmo com todo o avanço que se alcança diariamente na área da Oncologia, o adenocarcinoma pancreático continua a ser considerado um dos diagnósticos de câncer humano mais letais. Responder pela quarta causa de morte por câncer e a segunda entre as doenças malignas do trato gastrointestinal nos Estados Unidos infere nos profissionais a responsabilidade de investimento em alternativas que melhorem a efetividade do tratamento. Quando se tem um diagnóstico de adenocarcinoma pancreático, a maioria dos pacientes apresenta-se em fase incurável da doença. Uma das saídas para reduzir os efeitos adversos dos agentes antineoplásicos e interferir positivamente na eficácia do tratamento do adenocarcinoma pancreático inclui o aprimoramento da quimioterapia convencional por meio de associações que preservem a qualidade de vida do paciente e ao mesmo tempo controlem o crescimento tumoral.

Tem sido demonstrado que o direcionamento específico da quimioterapia às células tumorais, promovido pela associação de quimioterápicos a uma nanoemulsão lipídica que se liga a receptores de LDL, reduziu drasticamente os efeitos adversos observados com o uso da formulação comercial de agentes antineoplásicos como o paclitaxel^(33,36).

O desenvolvimento de métodos para tratamento do câncer envolve além dos fármacos já consagrados na literatura, a busca de associações que diminuam a toxicidade e melhorem a qualidade de vida dos pacientes. O melhor conhecimento do mecanismo do câncer de pâncreas tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que podem inibir ou bloquear os processos patológicos e proliferação celular. O interesse na terapia antiproliferativa levou a uma busca pela

inibição de fases específicas do ciclo celular, que pode ser alcançada através de agentes farmacológicos que bloqueiam a proliferação celular, como o paclitaxel.

No presente estudo, utilizamos o paclitaxel associado à nanoemulsão lipídica, no intuito de manter a estabilidade e a ação farmacológica da droga, bem como para aumentar sua tolerância. Observou-se que a percentagem de viabilidade celular diminuiu de acordo com o aumento da concentração utilizada da nanoemulsão associada ao paclitaxel.

Avaliar os efeitos da associação paclitaxel-nanoemulsão em células de adenocarcinoma pancreático é primordial para a busca de alternativas que minimizem os efeitos adversos do paclitaxel e otimizem a eficácia do tratamento, uma vez que as taxas de incidência do adenocarcinoma pancreático ductal são praticamente idênticas às taxas de mortalidade. Para um tumor com esta natureza altamente agressiva, bem como com baixa especificidade dos sintomas que dificultam o diagnóstico precoce, associações entre compostos e quimioterápicos podem diminuir a resistência à quimioterapia e radioterapia disponíveis⁽⁴⁸⁾.

A menor percentagem de viabilidade de células tratadas com a nanoemulsão foi obtida na concentração de 1,1mg, ou seja, em torno de 25%, em relação a viabilidade da célula controle, sem tratamento.

Recentemente, comprovou-se que a associação é estável e que a ação farmacológica do fármaco não foi modificada e a toxicidade animal foi 12 vezes menor do que a forma comercial, aumentando a tolerabilidade⁽³³⁾.

Além da redução de toxicidade, os dados de Rodrigues et al⁽³³⁾ também indicaram que a associação com nanoemulsão aumentou significativamente a atividade anti-tumoral do paclitaxel .

Estudos “in vivo” têm demonstrado a redução dos efeitos do paclitaxel quando foram associados a nanoemulsão lipídica com diminuição da toxicidade do quimioterápico ³⁴. A atenuação dos efeitos adversos do paclitaxel também foi descrita em estudos com outros sistemas de fármacos, tais como polímeros, proteínas e lipossomas Rodrigues et al³³. É conhecido na literatura, que o cremophor EL, veículo no qual o paclitaxel é solubilizado e administrado em sua forma comercial, apresenta toxicidade conhecida e sua substituição pela nanoemulsão lipídica é um fator importante na redução dos efeitos tóxicos do tratamento.

Nesse trabalho, os resultados de viabilidade celular utilizando-se a associação nanoemulsão+Paclitaxel, analisada isoladamente, foram satisfatórios para que o estudo continue “in vivo”. Entretanto, modelos de teste em células apresentam limitações em relação ao crescimento celular e proliferação. Portanto, sugerimos que mais estudos precisam ser realizados, em especial utilizando-se modelos animais, para poder melhor observar a ação farmacológica da associação nanoemulsão-paclitaxel, no adenocarcinoma pancreático.

O pioneirismo nesse processo de associação do paclitaxel a uma nanoemulsão para o tratamento de adenocarcinoma pancreático ductal, fortalece os interesses na continuidade dos estudos e sua relevância para pesquisa clínica.

6. CONCLUSÕES

O efeito antitumoral da associação nanoemulsão-paclitaxel em linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático humano foi proporcional a concentração.

A análise global mostrou que houve uma diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular entre $\Delta 1$ e $\Delta 7$ ($p=0,0419$). A viabilidade da concentração 1,1mg foi significativamente maior do que a observada em 0,1mg.

Ao comparar as concentrações em relação ao número de células mortas, na análise de variância de Friedman, mostrou que a concentração de 1,1mg apresentou número significativamente maior que na concentração 0,1mg ($\chi^2= 15,46$; $p=0,0170$).

Nesse trabalho, os resultados de proliferação celular utilizando-se a associação Paclitaxel+Nanoemulsão, analisada isoladamente, foram satisfatórios para que o estudo continue "in vivo".

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEMA JH, GOUMA DJ, OBERTOP H. TUMORES EXÓCRINOS DO PÂNCREAS. IN: COELHO, JCU. *Aparelho digestivo: clínica e cirurgia*. 3ªedição. São Paulo: editoraAtheneu; 2005. p. 1867-1878.
2. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, THUN MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59: 225-49.
3. SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62(1):10-29.
4. DUARTE B. Tumores endócrinos do pâncreas. In: Coelho, JCU. *Aparelho digestivo: clínica e cirurgia*. 3ªedição. São Paulo: editoraAtheneu; 2005. p. 1879-1892.
5. SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS (SEER) Program SEER*Stat Database: SEER 9 Incidence & U.S. Mortality 1975-2012, All Races, Both Sexes. Disponível em <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>. Acessado em 15 de março de 2016. ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J.S.;PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplasticovarian tissues. *Gynecol. Oncol.*, v.81(1), p.84-87, 2001.
6. LILLEMOE KD, YEO CJ, CAMERON JL. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. 2000; 50(4):241-68.
7. MAISONNEUVE P, LOWENFELS AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis*. 2010; 28: 645-56.
8. AMERICAN CANCER SOCIETY. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016. Available online. Acessado em 15 de março de 2016.
9. WINTER JM, CAMERON JL, CAMPBELL KA, ARNOLD MA, CHANG DC, COLEMAN J, HODGIN MB, SAUTER PK, HRUBAN RH, RIALI TS, SCHULICK RD, CHOTI MA, LILLEMOE KD, YEO CJ. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *JGastrointest Surg*. 2006; 10: 1199-210.

- 10.HORWITZ, S.B. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 13(4), p.134-136, 1992.
- 11.ROWINSKY, E.K.; CAZENAVE, L.A.; DONEHOWER, R.C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.*, v.82(15), p.1247-1259, 1990.
- 12.HOSEIN PJ, MACINTYRE J, KAWAMURA C, MALDONADO JC, ERNANI V, LOAIZA-BONILLA A, NARAYANAN G, RIBEIRO A, PORTELANCE L, MERCHAN JR, LEVI JU, ROCHA-LIMA CM. Aretrospective study of neoadjuvant FOLFIRINOX in unresectableorborderline-resectable locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2012 May 29;12:199.
- 13.HORWITZ, S.B.; LOTHSTEIN, L.; MANFREDI, J.J.; MELLADO, W.; PARNES, J.; ROY, S.N.; SCHIFF, P.B.; SORBARA, L.; ZEHEB, R. Taxol: mechanisms of action and resistance. *Ann N Y Acad Sci.*, v.466, p.733-744, 1986.
- 14.DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 7th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. CD-ROM. DIMITROULAKOS, J.; THAI, S.; WASFY, G.H.; HEDLEY, D.W.; MINDEN, M.D.; PENN, L.Z. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma*, v.40, p.167-178, 2000.
- 15.TISHER, R.B.; LAMPPU, D.M.; PARK, S.; PRICE, B.D. Microtubule-active drugs Taxol, vinblastine, and nocodazole increase the level of transcriptionally active p53. *Cancer Res.*, v.55, p.6021, 1995.
- 16.WOODS, C.M.; ZHU, J.; MCQUENEY, P.A.; BOLLAG, D.; LAZARIDES, E. Taxolinduced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med.*, v.1, p.506, 1995.
- 17.MICHAUD, L.B.; VALERO, V.; HORTOBAGYI, G. Risks and benefits of taxanes in breast and ovarian cancer. *Drug Safety*, v. 23 (5), p.401-428, 2000.
- 18.VAN ZUYLEN, L.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs.*,v.19(2), p.125-141, 2001.
- 19.LIEBMANN, J.; COOK, J.A.; MITCHELL, J.B.; CREMOPHOR, E.L. Solvent for paclitaxel, and toxicity. *Lancet*, v.342(8884), p.1428, 1993.

20. HO, Y.K.; SMITH, G.L.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, v.52, p.1099-1114, 1978.
21. BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v.232, p.34-47, 1986.
22. MARANHÃO, R.C.; GARICOCHA, B.; SILVA, E.L.; LLACER, P.D.; PILEGGI, F.J.; CHAMONE, D.A. 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 the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res.*, v.25(10), p.1003-1007, 1992.
23. MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO-MARIANI, S.R.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*, v.28(8), p.691-696, 1993.
24. MARANHÃO, R.C.; ROLAND, I.A.; TOFFOLETTO, O.; RAMIRES, J.A.; GONÇALVES, R.P.; MESQUITA, C.H.; PILEGGI, F. Plasma kinetic behaviour in hiperlipidemic subjects of a lipid microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*, v.32(6), p.627-633, 1997.
25. GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D., Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, v.257, p.8216-8227, 1982.
26. LILLIS AP, MIKHAILENKO I, STRICKLAND DK. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1884-93.
27. MANTUANO E, INOUE G, LI X, TAKAHASHI K, GAULTIER A, GONIAS SL, CAMPANA WM. The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurosci.* 2008 Nov 5;28(45):11571-82.
28. MARANHÃO RC, TAVARES ER, PADOVEZE AF, VALDUGA CJ, RODRIGUES DG, PEREIRA MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008 Apr;197(2):959-66.

29. MARANHÃO, R.C.; GRAZIANI, S.R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R.F.; LATRILHA, M.C.; RODRIGUES, D.G.; COUTO, R.D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A.C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer ChemotherPharmacol.*, v.49(6), p.487-498, 2002.
30. 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 lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors. *J. Pharm Pharmacol.*, v.60(10), p.1287-95, 2008.
31. AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *GynecolOncol.*, v.97, p.178-182, 2005.
32. LO PRETE, A.C.; MARIA, A.D.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBAÑEZ, O.C.M.; MARANHÃO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. *J.Pharm.Pharmacol.*, v.58(6), p.801-808, 2006.
33. RODRIGUES DG, MARIA DA, FERNANDES DC, VALDUGA CJ, COUTO RD, IBAÑEZ OC, MARANHÃO RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2005 Jun;55(6):565-76. Epub 2005 Feb 22.
34. KRETZER, I.F. Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo associados à lipídica rica em colesterol – LDE. São Paulo, 2007. 121p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
35. MENDES, S.; GRAZIANI, S.R.; VITÓRIO, T.S.; PADOVEZE, A.F.; HEGG, R.; BYDLOWSKI, S.P.; MARANHÃO, R.C. Uptake by breast carcinoma of a lipid nanoemulsion after intralesional injection into the patients: a new strategy for neoadjuvant chemotherapy. *GynecolOncol.*, v.112(2), p.400-404, 2009.
36. 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. *Cancer ChemotherPharmacol.*, v.63(2), p.281-287, 2009.
- 37.CONTENTE, T.C. Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma nanoemulsão rica em colesterol: estudos de regressão tumoral e farmacocinética. São Paulo, 2011. 128p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.
- 38.MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; DORLHIAC-LLACER, P.; CADENA, S.M.; COELHO, I.J.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.; CHAMONE, D.A. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, v.54(17), p.4660-4666, 1994.
- 39.ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J.S.;PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplasticovarian tissues. *Gynecol. Oncol.*, v.81(1), p.84-87, 2001.
- 40.GRAZIANI, S.R.; IGREJA, F.A.F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L.I.; BARBOSA, R.; AMANCIO, F.R.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer. *GynecolOncol.*, v.85, p.493-497, 2002.
- 41.RODRIGUES, D.G.; COVOLAN, C.C.; CORADI, S.T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R.C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J. Pharm and Pharmacol.*, v.54, p.765, 2002.
- 42.DIAS ML, CARVALHO JP, RODRIGUES DG, GRAZIANI SR, MARANHÃO RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2007 Jan;59(1):105-11. Epub 2006 May 13.
- 43.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, p.1615-1622, 2003.
- 44.PINHEIRO, K.V.; HUNGRIA, V.T.M.; FICKER, E.S.; VALDUGA, C.J.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary

- study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer ChemotherPharmacol.*,v.57(5), p.624-630, 2006.
45. TEIXEIRA, R.S.; CURI, R.; MARANHÃO, R.C. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *J Pharm Pharmacol.*,v.56(7), p.909-914, 2004.
46. HUNGRIA VT, LATRILHA MC, RODRIGUES DG, BYDLOWSKI SP, CHIATTONE CS, MARANHÃO RC. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2004 Jan;53(1):51-60. Epub 2003 Oct 22.
47. KRETZER IF, MARIA DA, MARANHÃO RC. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. *Cell Oncol (Dordr).* 2012 Dec;35(6):451-60. doi: 10.1007/s13402-012-0104-6. Epub 2012 Oct 3.
48. GHANEH P, COSTELLO E, NEOPTOLEMOS JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut.* 2007; 56:1134-52.
49. SIEGEL, S; CASTELLAN JR, N.J. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Segundaedição. Artmed. Porto Alegre. 448p, 2006