



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DE UM DERIVADO DE PACLITAXEL
ASSOCIADO A UMA EMULSÃO LIPÍDICA RICA EM
COLESTEROL COM O PACLITAXEL COMERCIAL**

FRANCIVALDO DE OLIVEIRA LIMA VERSIANI

**MANAUS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

FRANCIVALDO DE OLIVEIRA LIMA VERSIANI

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DE UM DERIVADO DE PACLITAXEL
ASSOCIADO A UMA EMULSÃO LIPÍDICA RICA EM
COLESTEROL COM O PACLITAXEL COMERCIAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Eficácia e Segurança de Bioprodutos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marne Carvalho de Vasconcellos

**MANAUS
2011**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Versiani, Francivaldo de Oliveira Lima

- 1.1 Estudo comparativo do efeito citotóxico e genotóxico de um derivado de paclitaxel associado a uma emulsão lipídica rica em colesterol com o paclitaxel comercial / Francivaldo de Oliveira Lima Versiani. - Manaus: UFAM, 2011.

94 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

1. Quimioterapia 2. Nanotecnologia 3. Farmacologia clínica 4. Câncer - Tratamento I. Vasconcellos, Marne Carvalho de (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 615.03:616-006.6(043.3)

“ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE UM DERIVADO DE PACLITAXEL ASSOCIADO A UMA EMULSÃO LIPÍDICA RICA EM COLESTEROL COM O PACLITAXEL COMERCIAL”

FRANCIVALDO DE OLIVEIRA LIMA VERSIANI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Eficácia e Segurança de Bioprodutos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Professor Émerson Silva Lima, Doutor

Coordenador do PPGCF

Apresentada perante à banca examinadora composta pelos professores:

Doutora Marne Carvalho de Vasconcellos (UFAM) – Presidente e Orientadora

Doutor Igor Rafael dos Santos Magalhães (UFAM) – Membro interno

Doutora Ana Paula de Araújo Boleti – Membro externo

Manaus, 30 de agosto de 2011.

*Dedico este trabalho à minha amada,
Fernanda, pelo apoio e amor incondicionais.
Você completa a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, em quem busco força, equilíbrio e paz.

Aos colegas da 1ª turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: **Latife Barakat, Hana Choji, Vitor Renato, Lilian Bastos e Nívea Melo**. A amizade e apoio de vocês foi essencial para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: **Imarita Socorro de Menezes, José Maria, Luciana, Giane e Daniel Carneiro** pelo apoio.

À acadêmica **Ana Carolina Lima Ralph**, pela amizade e companheirismo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo permanente. Vocês sempre contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Aos meus “filhotes”, **Breno e Bryan**, que sempre compreenderam a minha ausência durante o mestrado.

À minha orientadora e amiga Prof. **Marne Vasconcellos**, pelo incentivo e apoio constantes. Agradeço imensamente a tolerância, compreensão e disponibilidade.

Ao Prof. **Émerson Lima**, pela tolerância e compreensão em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho.

E a todos, que estiveram direta e indiretamente envolvidos na concretização deste projeto.

“Todos os deveres humanos se encerram nestes dois pontos: resignação à vontade do Criador e caridade para com os nossos semelhantes.”

Alexander Pope

RESUMO

O Paclitaxel é um agente quimioterápico muito utilizado no tratamento do câncer de mama e ovário, inclusive em estágios avançados. Devido sua hidrofobicidade, o Paclitaxel foi incorporado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) e teve um grupamento de ácido oléico associado à molécula primária, originando o oleato de Paclitaxel. Este trabalho teve a finalidade de avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do oleato de Paclitaxel incorporado à nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE), comparando os resultados com o Paclitaxel comercial (Taxilan). Foram encontrados os seguintes resultados para o teste de hemólise em camundongos: LDE+OPTX: 59,04 μ M (26,95-129,4); OPTX, TAX, OA, PTX : >100 μ M; LDE: 58,26 μ M (42,59-79,69). No teste de hemólise em eritrócitos humanos nenhuma substância causou hemólise, exceto o OA (94,2%). A citotoxicidade em ACP02 mostrou as CI_{50} : LDE+OPTX: 17,65 μ M (15,91-19,58); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 51,75 μ M (48,43-55,30). A citotoxicidade em MCF-7 mostrou as CI_{50} : LDE+OPTX: 12,41 μ M (9,38-16,41); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 25,53 μ M (21,23-30,70). A citotoxicidade em MDA-MB-231 mostrou as CI_{50} : LDE+OPTX: 21,82 μ M (19,20-24,80); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 26,29 μ M (24,17-28,59). A citotoxicidade em linfócitos humanos mostrou os seguintes resultados para CI_{50} em 24h: LDE+OPTX, LDE, OPTX, OA: >100 μ M; TAX: 40,39 (28,23-57,78). Para 48h: OPTX, OA: >100 μ M; TAX: 24,61 (15,61-38,79); LDE: 47,20 μ M (37,00-60,23); LDE+OPTX: 40,78 μ M (31,41-52,93); TAX: 24,61 μ M. Para 72h: OPTX, OA: >100 μ M; LDE: 39,06 μ M; LDE+OPTX: 33,99 μ M. O teste do Cometa mostrou que a nanoemulsão é genotóxica tanto em linfócitos quanto em células tumorais gástricas e de mama. No teste do Micronúcleo em 24 e 48 horas não houve aumento de frequência de micronúcleos em nenhuma substância. Portanto, verificou-se que a nanoemulsão rica em colesterol com oleato de Paclitaxel é citotóxica em células tumorais e em células normais, causando danos ao DNA de linfócitos e células de adenocarcinoma gástrico e de mama, somente nas maiores concentrações testadas (7,5 e 10 μ M).

Palavras-chave: Nanoemulsão, LDE, Oleato de Paclitaxel, câncer gástrico, câncer de mama, linfócitos humanos.

ABSTRACT

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of breast and ovarian cancer, even in advanced stages. Because of its side effects, paclitaxel has been incorporated into nanoparticle to in other to abolish its toxicity. In this way, this study aimed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of paclitaxel oleate (OPTX) incorporated into cholesterol-rich lipid nanoemulsion (LDE), when compared with commercial paclitaxel (Taxilan[®]). The lytic effects were performed in mice and human erythrocytes are described as followed: LDE+OPTX: 59,04 % (26,95-129,4); OPTX, TAX, PTX, OA: >100 %; LDE: 58,26 μ M (42,59-79,69). As for human erythrocytes none of the compounds caused hemolysis, except OA (94,2%). Cytotoxicity studies on gastric cancer cell line (ACP02) showed an IC₅₀ after 72h of: LDE+OPTX: 17,65 μ M (15,91-19,58); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 51,75 μ M (48,43-55,30). As for breast cancer cell line (MCF-7) the IC₅₀ after 72 h were: LDE+OPTX: 12,41 μ M (9,38-16,41); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 25,53 μ M (21,23-30,70). As for breast cancer cell line (MDA-MB-231) the IC₅₀ after 72h were: LDE+OPTX: 21,82 μ M (19,20-24,80); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 26,29 μ M (24,17-28,59). The cytotoxicity after 24h in human lymphocytes showed an IC₅₀ of: LDE+OPTX, LDE, OPTX, OA, PTX: >100 μ M; TAX: 40,39 μ M (28,23-57,78). To 48h: OPTX, OA, OPTX: >100 μ M; TAX: 24,61 μ M (15,61-38,79); LDE: 47,20 μ M (37,00-60,23); LDE+OPTX: 40,78 μ M (31,41-52,93); TAX: 24,61. After 72 treatment, IC₅₀ were: OPTX, OA, PTX >100 μ M; LDE: 39,06 μ M; LDE+OPTX: 33,99 μ M. The Comet assay showed that the nanoemulsion is genotoxic for both lymphocytes and tumor cells. Micronuclei assay after 24 and 48 hours, did not show increase on the frequency of micronuclei for all tested compound. Therefore, it was found that the cholesterol-rich nanoemulsion with paclitaxel oleate is cytotoxic to tumor cells and normal cells, causing DNA damage in lymphocytes and tumor cells only at 7.5 and 10 μ M. Other studies are needed to further elucidate the results.

Keywords: Nanoemulsion, LDE, paclitaxel oleate, gastric cancer, breast cancer, human lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fórmula estrutural do Paclitaxel.....	17
Figura 2-	Núcleo taxano.....	17
Figura 3-	Estrutura química de um dos principais componentes do Cremophor EL: triricinoleato de polioxietilenoglicerol.....	21
Figura 4-	Estrutura molecular do oleato de paclitaxel. A seta indica a estrutura do grupamento lipofílico adicionado à molécula.....	37
Figura 5-	Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano.....	48
Figura 6-	Divisão dos grupos de camundongos utilizados no teste do Micronúcleo.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo-B 100	Apolipoproteína B100
Apo-E	Apolipoproteína E
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G ₂ /M	Fase de transição entre G ₂ e M (mitose)
g	Força de centrifugação
i.v	Intravenoso
IC	Intervalo de confiança
ID	Índice de dano
KBr	Brometo de potássio
K _{O/A}	Constante de lipossolubilidade óleo/água
LDE	Partícula lipídica artificial rica em colesterol
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligramma
mg/kg	Miligramma por quilograma
µg/mL	Microgramma por mililitro
mg/mL	Miligramma por mililitro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Na ₂ EDTA	Etilenodiaminotetracético dissódico
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NCE	Eritrócito normocromático
nm	Namômetro
O/A	Óleo/Água
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCE	Eritrócito policromático
RPMI	Meio de cultura
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volt
v/v	Volume/volume
p/p	Peso/peso
°C	Graus Celsius
Mg m ⁻²	Miligramas por metro quadrado
CYP450	Citocromo P450
%	Porcentagem
ml/m ²	Mililitro por metro quadrado

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Paclitaxel.....	16
2.2	O câncer e a nanotecnologia.....	25
2.2.1	Lipoproteína de baixa densidade (LDL) e câncer.....	32
2.2.2	Nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) e Paclitaxel.....	34
3.	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4.	METODOLOGIA.....	39
4.1	Tipo de estudo.....	39
4.2	Substâncias utilizadas nos testes.....	39
4.3	Delineamento experimental.....	40
4.4	Estudo da atividade hemolítica em eritrócitos humanos e de camundongos..	41
4.5	Estudo da citotoxicidade com Alamar blue nas linhagens neoplásicas.....	42
4.6	Estudo com células normais (<i>ex vivo</i>).....	45
4.6.1	Obtenção de linfócitos.....	45
4.6.2	Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	46
4.7	Teste do cometa com linfócitos e linhagem celular ACP02.....	47
4.7.1	Preparo das lâminas.....	49
4.7.2	Obtenção e tratamento dos linfócitos.....	49
4.7.3	Obtenção e tratamento da linhagem celular ACP02.....	49
4.7.4	Fixação dos linfócitos à lâmina e etapa de lise.....	50
4.7.5	Fixação da ACP02 à lâmina e etapa de lise.....	51
4.7.6	Etapa de eletroforese e coloração.....	51
4.7.7	Escore das lâminas.....	52
4.8	Teste do Micronúcleo.....	53
4.8.1	Preparo dos animais para o teste do micronúcleo.....	54
4.8.2	Procedimento experimental.....	54
4.9	Aspectos éticos.....	56

4.10	Análise estatística.....	56
5.	RESULTADOS.....	57
6.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	58
7.	REFERÊNCIAS.....	80
8.	ANEXOS.....	90

1. INTRODUÇÃO

O Paclitaxel, pertencente ao grupo dos taxanos, representa um importante agente antitumoral utilizado no tratamento do câncer, sobretudo no câncer de mama em estágios iniciais e avançados, inclusive metatásticos. Os taxanos são agentes que apresentam alta afinidade pelos microtúbulos, afetando, dessa forma, a mitose, motilidade e transporte intracelular nas células neoplásicas, levando à morte celular por apoptose. Os taxanos têm demonstrado potente atividade antineoplásica contra diversos tipos de câncer, inclusive o câncer de pulmão de células não pequenas e o câncer de ovário, isoladamente ou em combinação com outros agentes antitumorais. Porém, a molécula do Paclitaxel é muito lipofílica, obrigando a utilização de solventes lipofílicos para melhorar sua solubilidade nas formulações. Entretanto, estas formulações contendo lipídios podem estar associadas com significativa toxicidade dose-limitante (MIELE *et al*, 2009; PIRES *et al*, 2008).

Os sistemas de nanotransportadores (nanoemulsões, liposomas, micelas, dendrímeros, nanopartículas) têm proporcionado grandes avanços no diagnóstico e tratamento do câncer, permitindo superar os obstáculos decorrentes da toxicidade e farmacocinética dos agentes antitumorais por melhorarem a farmacocinética e aumentarem a biodistribuição do agente terapêutico no órgão-alvo (KOO *et al*, 2005).

O DNA pode ser utilizado como biomarcador de exposição a agentes tóxicos e como um índice de dose biologicamente efetiva. O dano ao DNA pode indicar probabilidade de aparecimento de câncer. A lesão ao DNA pode ter origem endógena, porém, os agentes exógenos são os mais potencialmente causadores de dano. Se o sistema de reparo do DNA não corrige a lesão, a alteração pode se acumular através

de divisões celulares podendo ocasionar morte celular e surgimento de tumores (YOUN *et al*, 2007; MARTINEZ *et al*, 2003).

A associação entre citotoxicidade e genotoxicidade está bem estabelecida, pois danos ao DNA são considerados como um importante mecanismo indutor de morte celular. Os agentes que alteram a seqüência de bases do DNA são “tóxicos” para o genoma, assim chamados de genotóxicos (SILVA *et al*, 2003).

Genotoxicidade é o processo pelo qual os agentes interagem com o DNA e outros alvos celulares que controlam a integridade do material genético. Estas interações envolvem indução de adutos de DNA, quebra de fitas simples ou duplas, mutações pontuais e estruturais e alterações cromossômicas numéricas (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000). Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (RIBEIRO *et al*, 2003). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

O projeto vislumbra o uso de novas tecnologias (nanoemulsões) aproveitando o potencial de fármacos conhecidos na clínica e que possuem uma aplicação farmacoterapêutica importante para o tratamento de doenças como, por exemplo, o câncer, mas que na maioria das vezes possuem um baixo índice terapêutico. Uma vez que estudos anteriores *in vitro* e *ex vivo* em células de melanoma B16F10 mostram

que a formulação de oleato de Paclitaxel associada à nanoemulsão apresenta o mesmo efeito terapêutico e menos efeitos tóxicos que a apresentação comercial de Paclitaxel.

Nesse sentido, o estudo proposto pretende comparar a citotoxicidade do oleato de Paclitaxel associado a uma nanoemulsão rica em colesterol (LDE) *versus* o Paclitaxel comercial (Taxilan) sobre células de adenocarcinoma gástrico (ACP02) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e em células normais, bem como estudar o potencial genotóxico e mutagênico de ambas as formulações de Paclitaxel.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Paclitaxel

O Paclitaxel é um taxano isolado da casca do tronco da árvore ocidental teixo (*Taxus brevifolia*). O Paclitaxel (figura 1) é um pseudoalcalóide diterpenóide, com fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e peso molecular de 853 Da e para sua atividade antitumoral é necessária a presença do núcleo taxano (figura 2). A forma pura do Paclitaxel foi obtida em 1969 e sua estrutura química foi demonstrada em 1971, após muitas dificuldades devido a sua baixa concentração e estrutura complexa. A importância do Paclitaxel não foi reconhecida até o final da década de 1970, devido sua difícil obtenção, baixa solubilidade e problemas de formulação. Em 1979, Susan Horwitz, descobriu que o Paclitaxel tinha um mecanismo de ação único e o interesse sobre ele aumentou após a demonstração de sua elevada atividade em um screening com câncer de pulmão (SINGLA *et al*, 2002).

Apesar da extração do Paclitaxel ter aumentado a produção para 0,04% p / p, quatro árvores têm de ser sacrificados para produzir 2 gramas da droga para a quimioterapia de um paciente, o que é bastante desfavorável do ponto de vista ambiental. A síntese total do Paclitaxel e seus análogos representam enormes desafios devido à sua complexidade estrutural. Embora os cientistas do mundo inteiro estejam buscando e várias tentativas de síntese total tenham sido realizadas e publicadas, um método prático para a sua síntese ainda precisa ser desenvolvido. Uma solução adequada, portanto, parece ser uma semi-síntese, que envolve a extração do Paclitaxel das árvores do gênero com maior abundância (SINGLA *et al*, 2002).

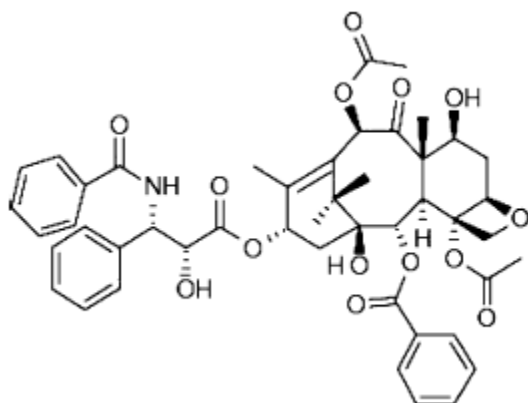


Figura 1 – Fórmula estrutural do Paclitaxel. FONTE: ZHOU *et al*, 2010

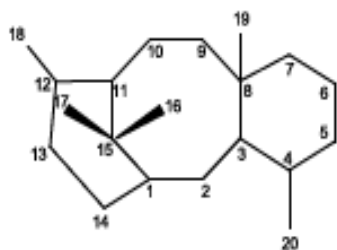


Figura 2 – Núcleo taxano. FONTE: SINGLA *et al*, 2002

O Paclitaxel é um dos fármacos de maior relevância para a quimioterapia do câncer (SCHIFF; HORWITZ, 1979). Possui atividade antitumoral particularmente contra o carcinoma epitelial primário de ovário, câncer de mama, colón, cabeça, câncer de célula não-pequena de pulmão e sarcoma de Kaposi co-relacionado à AIDS (DIGUE *et al*, 1999; DE ROSSI *et al*, 2009; NORNOO *et al*, 2007, SINGLA *et al*, 2002).

O Paclitaxel é um pó cristalino branco ou quase branco. Ele é altamente lipofílico, insolúvel em água e seu ponto de fusão é de 216-217 °C. A disposição do

fármaco no plasma parece ser bifásico. O declínio inicial rápido representa a distribuição para o compartimento central e a eliminação da droga e a fase tardia é devido em parte ao efluxo dela do compartimento periférico. A dose adotada geralmente é de 200-250 mg m⁻² e é administrada em infusão de 3 horas e 24 horas. A farmacocinética do Paclitaxel apresenta grande variabilidade. A meia-vida encontrada varia de 1,3 a 8,6 horas (média de 5 horas). A droga apresenta extenso metabolismo hepático via CYP450 e menos de 10% da droga inalterada é eliminada na urina. A maior parte da droga é excretada através das fezes. Mais de 90% da droga liga-se rápida e extensivamente às proteínas plasmáticas (SINGLA *et al*, 2002).

Os taxanos são drogas anticâncer que se ligam à subunidade β da tubulina. A tubulina é uma proteína que se polimeriza em microtúbulos que são responsáveis pela mitose, motilidade, manutenção do formato celular e tráfego intracelular de macromoléculas e organelas (XIAO *et al*, 2006).

A ligação do Paclitaxel à β -tubulina provoca a aceleração da polimerização da mesma e estabilização dos microtúbulos resultantes (OJIMA *et al*, 2009). O polímero resultante é estável e resistente à despolimerização que pode ser ativada por íons Ca²⁺, baixa temperatura e diluição (XIAO *et al*, 2006). Consequentemente, essa estabilização induz a parada do ciclo celular na fase G₂/M causando duas mudanças morfológicas nos microtúbulos: a formação de feixes paralelos durante a intérfase e a formação anormal do fuso (não associado com o centríolo) durante a mitose. O resultado é a parada do ciclo celular na fase G₂/M, levando à ativação da cascata de sinalização da apoptose. Todas essas alterações no ciclo celular justificam o interesse da investigação do potencial genotóxico e citotóxico desse fármaco para células humanas normais, tais como os linfócitos (DIGUE *et al*, 1999).

Na prática clínica, o Paclitaxel apresenta uma vasta aplicação no tratamento de cânceres humanos avançados, refratários e metastáticos como o de ovário (McGUIRE *et al*, 1996) e mama (HOLMES *et al*, 1991). Bons resultados foram obtidos com o uso desse quimioterápico como adjuvante na terapia ou com uso concomitante na radioterapia (DIGUE *et al*, 1999). Em estudo com mulheres portadoras de câncer ovariano, McGuire e colaboradores (1996) testaram o Paclitaxel associado à Cisplatina em comparação com o tratamento usando Cisplatina combinada à Ciclofosfamida. No grupo tratado com Paclitaxel e Cisplatina, houve aumento da sobrevida e diminuição da progressão da doença que levou à incorporação desse tratamento na primeira linha do câncer ovariano no estágio III e IV.

Em estudo realizado por Bonomi e colaboradores (2000), pacientes com câncer avançado de célula não-pequena de pulmão foram testados com baixa e alta dose de Paclitaxel combinado com Cisplatina em comparação ao tratamento com Etoposídeo conjugado com Cisplatina. Como resultado, os autores perceberam que Paclitaxel combinado com Cisplatina promove aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida. O Paclitaxel também apresentou-se eficaz no tratamento recidivante de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço em estudo realizado por Fayette *et al* (2010).

O Paclitaxel é pouco solúvel em água e em outros veículos comuns usados para administração parenteral de drogas. Após investigações de uma grande variedade de excipientes para propiciar a administração da droga, a formulação usando 50% de Cremophor EL e 50% de etanol desidratado USP, tornou-se a opção mais viável. O Paclitaxel devido sua limitada hidrossolubilidade (10,8 µg/mL) e alta lipofilicidade ($k_{o/A} = 311$) é administrado por via intravenosa na forma de Taxol®. O Taxol® é uma formulação de 5 mL composta de Paclitaxel (6 mg/mL) diluído em solução de

Cremophor EL (óleo de castor polioxetilado) e etanol na proporção 1:1 v/v (NORNOO *et al*, 2008).

O Cremophor EL também é usado como veículo para a solubilização de diversas outras drogas hidrofóbicas, incluindo anestésicos (ex., propofol), fotosensibilizantes, vitaminas, agentes imunossupressores (ex., ciclosporina A e tacrolimus), sedativos (ex., diazepam) e drogas anticâncer (ex., aplidine, clafenur, didemnin B, halomon e teniposídeo) (ZUYLEN *et al*, 2001).

O Cremophor EL é um líquido viscoso, de branco a quase branco, com peso molecular aproximado de 3000 Da (figura 3) e densidade específica (25°C/25°C) de 1,05-1,06, e é produzido pela reação do óleo de castor com óxido de etileno em uma proporção de 1:35. O óleo de castor é incolor ou amarelo pálido, obtido das sementes de *Ricinus communis* (Fam. Euphorbiaceae), com uma viscosidade extremamente elevada, constituído principalmente por glicerídeos de ácido ricinoléico, isoricinoléico, esteárico e diidroesteárico. O surfactante não-iônico produzido do óleo de castor é usualmente de composição altamente variada, com o componente principal (cerca de 87%) identificado como triglicerídeos oxietilados de ácido ricinoléico (ZUYLEN *et al*, 2001).

O principal efeito adverso do Cremophor EL é uma reação de hipersensibilidade aguda, que se caracteriza por dispnéia, rubor, erupção cutânea, dor no peito, taquicardia, hipotensão, angio-edema e urticária generalizada. O mecanismo desta hipersensibilidade ao Cremophor EL ainda não foi totalmente esclarecido (GELDERBLOMM *et al*, 2001; ZUYLEN *et al*, 2001). Um evento presente na reação de hipersensibilidade é a liberação de histamina e a profilaxia para neutralizar o mecanismo histaminérgico reduz a incidência da reação de hipersensibilidade. As reações de hipersensibilidade são mais predominantes com a administração em bolus

(SINGLA *et al*, 2002). Comumente, esta reação ocorre nos primeiros dois períodos de tratamento com Paclitaxel e pode ser prevenido pela redução da taxa de infusão. Nesta hipótese, o racional para o esquema de pré-tratamento do Paclitaxel é baseado no uso de antagonistas do receptor H₂ de histamina e altas doses de corticosteróides. Entretanto, apesar desta extensa pré-medicação, a frequência geral de reações menores é estimada tão alta quanto 44%, com reações maiores necessitando de descontinuidade da terapia com Paclitaxel, ainda ocorrendo em aproximadamente 1,5 a 3% dos pacientes (ZUYLEN *et al*, 2001).

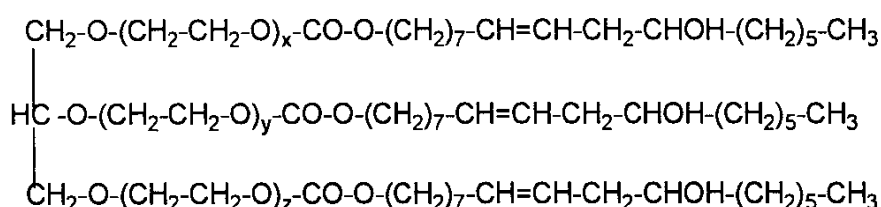


Figura 3 – Estrutura química de um dos principais componentes do Cremophor EL: triricinoleato de polioxietilenoglicerol. FONTE: ZUYLEN *et al*, 2001

Recentemente, foi postulado que a ativação do complemento é um mecanismo importante que contribui para a reação de hipersensibilidade do Cremophor EL devido à ocorrência natural de ligação de anticorpos anti-colesterol com a superfície rica em hidroxilas das micelas de Cremophor EL. Baseado em uma série de experimentos *in vitro*, foi mostrado que a ativação do complemento induzida pelo Cremophor EL em soros humanos foi claramente dependente da concentração, com níveis mínimos, da ordem de 2 µg/ml, uma concentração rapidamente alcançada no plasma através de doses padrões de Paclitaxel (ZUYLEN *et al*, 2001).

Um dos constituintes do Cremophor EL, o ácido oléico, é especialmente suspeito por sua capacidade de liberação da histamina, também presente no Tween

80, e portanto, pode ser a causa de reações de hipersensibilidade na terapia com docetaxel (ZUYLEN *et al*, 2001).

O Cremophor EL é responsável por promover efeitos adversos tais como alteração do comportamento da farmacocinética da droga, além de agir como cofator no desenvolvimento de neuropatia periférica. Alguns dos efeitos diretos do Taxol® podem ser observados pela alteração da viabilidade dos eritrócitos de acordo com as mudanças conformacionais que resulta em estomatocitose, o que parece estar associado ao dano na membrana celular, induzindo a formação de lesões pré-hemolíticas (DE ROSSI *et al*, 2009).

Em contraste às reações de hipersensibilidade, a neurotoxicidade é uma reação bem menos conhecida do Cremophor EL. Estudos eletrofisiológicos em pacientes com neurotoxicidade após tratamento com Paclitaxel têm mostrado evidências de degeneração axonal e desmielinização, resultando em neuropatia periférica (GELDERBLOMM *et al*, 2001; ZUYLEN *et al*, 2001). Um estudo realizado com Paclitaxel [³H] em ratos não revelou níveis detectáveis de Paclitaxel no sistema nervoso periférico, mas o Paclitaxel, neste estudo, foi solubilizado em dimetilsulfóxido ao invés de Cremophor EL. Este achado pode sugerir que a neurotoxicidade do Paclitaxel é causada, provavelmente, pelo Cremophor EL. Trabalhos recentes, indicaram que a propriedade neurotóxica foi induzida por ácidos graxos insaturados e evidências preliminares sugerem que as modificações ocorreram devido ao aparecimento de produtos de peroxidação. Este fato sugere que os derivados etoxilados do óleo de castor, isto é, o constituinte primário do Cremophor EL, provavelmente, é o responsável pela maior parte do dano neuronal observado (ZUYLEN *et al*, 2001).

O Paclitaxel apresenta outros efeitos adversos, além dos já citados anteriormente: supressão medular manifestada por neutropenia, leucopenia, trombocitopenia e anemia, resistência a drogas (OJIMA *et al*, 2009), mialgias e eventos cardíacos (BONOMI *et al*, 2000), febre e reações graves de hipersensibilidade (McGUIRE *et al*, 1996) e nefrotoxicidade (SINGLA *et al*, 2002). Embora ele esteja sendo utilizado para a administração de outras drogas como a Ciclosporina A e Teniposídeo, a quantidade de Cremophor EL necessária para a formulação de Paclitaxel é significativamente maior que a administrada por qualquer outra droga do mercado que usa o Cremophor EL como veículo (SINGLA *et al*, 2002). A quantidade de Cremophor EL coadministrada com aquelas drogas fica em torno de $5,5 \text{ ml/m}^2$, entretanto, o Paclitaxel é uma exceção da quantidade da formulação preparada de Cremophor EL pois é muito maior por dose, 12 ml/m^2 (ZUYLEN *et al*, 2001).

O Cremophor EL também exerce influência sobre a função endotelial dos músculos, causando vasodilatação, dificuldade de respiração, letargia e hipotensão. Estudos têm mostrado que o Cremophor EL causa reações de hipersensibilidade fatais em quase todas as etapas no caminho de seu desenvolvimento, tanto em testes pré-clínicos quanto clínicos (SINGLA *et al*, 2002).

Levando em consideração os problemas relacionados à hidrofobicidade do Taxol® e a produção de efeitos colaterais pela formulação, o objetivo de produzir uma forma farmacêutica com propriedades superiores, com melhor atividade contra os tumores e que evite a resistência a drogas, novas formulações para administração intravenosa ou oral do Taxol® têm sido pesquisadas utilizando-se estratégias como o aumento da hidrossolubilidade usando solventes e/ou modificação estrutural usando

pró-drogas ou análogos, emulsificação em escala micro e nano, complexação com ciclodextrinas, lipossomos, microesferas e nanopartículas (NORNOO *et al*, 2008).

O objetivo fundamental do desenvolvimento de uma nova formulação de Paclitaxel é eliminar o veículo Cremophor EL pela reformulação da droga em um veículo melhor tolerado. A reformulação fornece também a possibilidade de melhorar a eficácia da terapia anticâncer baseada no Paclitaxel. Um grande esforço está sendo dirigido para o desenvolvimento de formulações aquosas baseadas em Paclitaxel, incluindo os derivados semi-sintéticos solúveis do Paclitaxel que não exigem a solubilização pelo Cremophor EL e que diminuem a depuração sistêmica da droga (SINGLA *et al*, 2002).

Quanto à procura de otimização da droga, Ojima *et al* (2009) estudaram a estrutura molecular do Paclitaxel pela análise da relação estrutura-atividade (SAR) e encontraram que modificações na posição do carbono 10 em certos grupos acil assim como a substituição do grupo fenil por um aquenil ou alquil na posição do carbono 3 faz a droga se tornar mais potente e não apresenta resistência em linhas de células de câncer de mama humano. Também foi verificado que a introdução de um substituinte (por exemplo MeO, N₃, Cl, F, etc.) na posição meta do carbono 2 com grupo benzoil teve melhor atividade e menor resistência.

Diversas formulações de Paclitaxel para vêm sendo desenvolvidas na tentativa de superar os inconvenientes da formulação de Taxol®. Estas estratégias incluem o aumento da solubilidade aquosa do Paclitaxel por cossolvência, emulsificação, microemulsificação, nanoemulsificação, complexação da droga com ciclodextrinas, uso de transportadores lipossomais, microsferas, nanopartículas, modificações estruturais para formas análogas e pró-droga (NORNOO *et al*, 2008).

As microemulsões destacam-se como um sistema apropriado para administração do Paclitaxel intravenosamente. Elas se formam espontaneamente e são compostas de um surfactante e/ou mistura de surfactantes, cosurfactante, um óleo e água com a fase dispersa de menos de 110 nm de diâmetro. A produção de uma microemulsão do Paclitaxel envolve vantagens tais como: ser um sistema apropriado para o transporte intravenoso do mesmo e o processo de formação da microemulsão é espontâneo; o tamanho da partícula é inferior a 110 nm; há fácil solubilização de componentes lipofílicos e pode haver esterilização por microfiltração sem prejuízo da formulação (NORNOO *et al*, 2008).

2.2 O câncer e a nanotecnologia

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. 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 (INCA, 2011).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que

diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases) (INCA, 2011).

A prevalência dos tipos de cânceres mais comuns tornou-se nitidamente mais elevada em todos os países que se industrializaram nas últimas décadas. Cânceres como de pulmão, mama, próstata e cólon têm se tornado mais frequentes em países onde existem fatores de risco como o fumo, hábitos alimentares pouco saudáveis e exposição a produtos químicos e agentes físicos carcinogênicos no trabalho ou no meio ambiente. Estudos epidemiológicos apontam o fumo como o principal carcinógeno. O cigarro causa câncer de pulmão, de vias aéreas superiores, esôfago, bexiga e de pâncreas. Provavelmente, também está associado ao câncer de estômago, fígado e rim, na leucemia mieloide e no câncer de cólon (WARD, 2002).

Hábitos alimentares modernos, particularmente, a elevada ingestão de gordura saturada e a baixa ingestão de fibras têm sido fortemente relacionados com o câncer de cólon. A obesidade aumenta o risco de câncer do endométrio e, por razões ainda não totalmente esclarecidas, do câncer de cólon, rim e vesícula. O consumo de álcool predispõe ao câncer dos tratos digestivo e respiratório e a cirrose alcoólica pode levar ao câncer de fígado. Várias formas de irradiação também têm sido implicadas na gênese de diversos tipos de câncer. Existem indubitáveis evidências de que a radiação ionizante produz câncer da tireóide e de que a radiação ultravioleta predispõe ao câncer de pele e se relaciona de forma clara com o melanoma maligno. Além dos agentes físicos e químicos, agentes biológicos têm sido reconhecidos como importantes desencadeadores do processo de tumorigênese. O papilomavírus tem sido identificado em 18 a 95% dos carcinomas de colo uterino e, embora a infecção viral sozinha não seja suficiente para iniciar o processo de transformação maligna do

epitélio cervical, numerosas evidências indicam que a presença do vírus predispõe a alterações genéticas adicionais. Outros vírus também possuem estreita relação com os tumores, como os vírus da hepatite B e C com o câncer hepático, o Epstein-Barr com o linfoma de Burkitt, o HTLV-1 com a leucemia de células T (WARD, 2002).

O câncer é uma doença de origem complexa cuja iniciação e progressão envolvem passos em que o DNA acumula uma série de lesões. Essas alterações sequenciais frequentemente ocorrem em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Dentre as evidências experimentais que corroboram esta teoria está o fato de que a célula cancerosa é capaz de transmitir as suas características fenotípicas às células “filhas” (BALMIAN *et al*, 2003; WARD, 2002). O processo de oncogênese resultante destas alterações culmina com o crescimento de sucessivas populações ou clones celulares, nos quais as mutações se acumularam em um processo denominado expansão clonal (SILVA, 2004).

Chama-se carcinogênese o processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna, sendo que os agentes indutores desse processo são denominados carcinógenos. Usualmente é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. Esse desenvolvimento ocorre muito lentamente devido à natureza complexa da carcinogênese, a qual pode ser dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Frequentemente, após a alteração inicial, aparecem novas populações celulares que representam a evolução de células normais para pré-neoplásicas, pré-malignas e malignas (LOUREIRO *et al*, 2002).

O câncer desenvolve-se através de um processo carcinogênico em várias etapas e para progredir usa diversos mecanismos complexos de sobrevivência, tais como a independência na sinalização do crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado,

angiogênese sustentada, invasão e metástase do tumor. Até agora, os tratamentos contra o câncer são realizados com base no estágio clínico e patológico, que é determinado usando ferramentas diagnósticas morfológicas, como exames radiológicos e histopatológicos convencionais. Entretanto, mesmo pacientes que sofrem de cânceres do mesmo tipo celular e estágio clínico, respondem às mesmas modalidades convencionais de tratamento diferentemente e com variações na taxa de sobrevivência. Isto implica que os eventos associados ao câncer são únicos em cada paciente (WANG *et al*, 2008).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vascularização pré-existente, sendo um evento essencial para o desenvolvimento normal e a homeostase dos tecidos. Em condições fisiológicas atua na embriogênese, no desenvolvimento tecidual, na ovulação, na formação do corpo lúteo e no processo de cicatrização. A angiogênese patológica, por sua vez, ocorre em uma variedade de transtornos, sejam eles caracterizados por neovascularização, como observado na retinopatia proliferativa, regeneração macular relacionada com a idade, artrite reumatóide, psoríase, diabetes mellitus, crescimento tumoral e disseminação metastática. A angiogênese contribui para o processo metastático facilitando o desprendimento de células neoplásicas no interior dos vasos sanguíneos neoformados. Em contraste com o processo ordenado, regulado e autolimitado da vascularização normal, a angiogênese patológica é um processo onde a proliferação vascular ocorre de modo descontrolado e contínuo (CAPP *et al*, 2009).

Para conter o alastramento do câncer, três recursos terapêuticos fundamentais podem ser empregados: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo que geralmente recorre-se a mais de um tipo de tratamento. A massa tumoral, originada de um único clone celular, é constituída de um conjunto celular largamente heterogêneo. Desse

modo, essas subpopulações diferem entre si sob vários atributos fenotípicos, tais como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento, como o câncer de mama e de colo do útero, possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia, bem como a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque imunológico (KUMMAR *et al*, 2004).

No âmbito da quimioterapia — cujo objetivo ideal é destruir as células neoplásicas preservando as células normais — apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado. Isso se deve, principalmente, a falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas e redução da sobrevida. Como os agentes quimioterápicos, em sua maioria, possuem um mecanismo de ação inespecífico, lesando tanto células neoplásicas quanto células normais, a ocorrência de efeitos colaterais torna-se comum e, ainda que o organismo se recupere após o tratamento, faz-se necessário que os benefícios da quimioterapia sejam confrontados com a toxicidade decorrente na procura de um índice terapêutico favorável (SALMONM, 1998). Portanto, diante do fato de a quimioterapia ser uma terapêutica agressiva e debilitante, táticas que visam o desenvolvimento de moléculas com maior eficácia terapêutica e menor incidência de efeitos adversos vêm sendo estudadas.

Avanços significativos foram alcançados na terapia contra o câncer durante a última década com o conhecimento obtido da biologia molecular e angiogênese. A proliferação celular do câncer, apoptose, angiogênese, invasão e metástase são regulados por uma rede interconectada de vias de sinalização celular envolvendo ligantes extracelulares, receptores transmembrana, proteínas quinase sinalizadoras e fatores de transcrição. Todo esse complexo processo intracelular tem sido alvo para o

desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, diferentemente dos agentes antineoplásicos mais tradicionais que interferem diretamente na mitose, síntese de DNA e sistemas de reparo (MA; ADJEI, 2009).

O campo da nanotecnologia está em fase de desenvolvimento acelerado em muitas áreas. Tem havido grande interesse na aplicação da nanotecnologia na medicina, com possibilidade de soluções para várias dificuldades existentes no campo da oncologia. Esses recentes avanços da engenharia e tecnologia levaram ao desenvolvimento de muitas novas plataformas em nanoescala, incluindo os pontos quânticos (imagem molecular), nanoshells, nanopartículas de ouro, nanopartículas paramagnéticas, nanotubos de carbono, e também permitiu melhorar as nanoestruturas tradicionais, como aquelas baseadas em lipídios, dendrímeros e lipossomas (CHITHRANI *et al*, 2009).

A aplicação da nanotecnologia à medicina visa superar os problemas, relacionados a diversas doenças. Particularmente, a aplicação da nanotecnologia para o câncer pretende trazer avanços significativos no diagnóstico, tratamento e monitoramento do câncer. Hoje, há um forte foco na aplicação da nanotecnologia para o câncer. O campo recebeu um forte apoio especialmente nos Estados Unidos da América (EUA), onde diversos centros de nanotecnologia para o câncer foram lançados e estão operando desde 2004 (WANG; THANOU, 2010).

O desenvolvimento da nanotecnologia associada à medicina tem propiciado grandes avanços no diagnóstico e tratamento do câncer permitindo superar os obstáculos decorrentes da toxicidade e farmacocinética dos agentes antitumorais. Os sistemas de nanotransportadores apresentam algumas vantagens, tais como: volume de distribuição reduzido (DRUMMOND *et al*, 1999), melhoram a farmacocinética e aumentam a biodistribuição do agente terapêutico no órgão-alvo, resultando em

eficácia aumentada (AU *et al*, 2001; FETTERLY *et al*, 2003; HOARAU *et al*, 2004; MOGHIMI *et al*, 2003). A toxicidade do fármaco é diminuída como consequência do acúmulo preferencial no órgão-alvo e com baixa concentração em tecidos normais. Além disso, muitos nanotransportadores têm a capacidade de aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos em meio aquoso para torná-los mais adequados para a administração parenteral (KOO *et al*, 2005; KRISTL *et al*, 2003). Nanotransportadores constituídos de materiais biocompatíveis têm sido investigados como alternativas seguras para veículos existentes, como o Cremophor EL, devido às reações de hipersensibilidade aguda e neurotoxicidade (GELDERBLOM *et al*, 2001; TEN TIJE *et al*, 2003; ZUYLEN *et al*, 2001).

Muitos estudos na área de nanotecnologia concentraram-se no estudo da citotoxicidade. No entanto, tais efeitos ocorrem freqüentemente em concentrações bastante elevadas e os efeitos mais sutis surgem em concentrações mais baixas, sem necessariamente causar morte celular, também precisam ser considerados. Um dos efeitos mais importantes é o dano ao DNA, uma vez que um aumento instabilidade genética está associada ao desenvolvimento do câncer (KARLSSON, 2010).

As pesquisas com nanoemulsões como transportadores de drogas para o tratamento de doenças como o câncer têm aumentado incrivelmente. Diferentes modificações sistemáticas em suas composições visando melhorar as propriedades farmacológicas têm sido realizadas com o objetivo de veiculação de drogas com maior eficácia terapêutica. Estudos anteriores mostraram que as nanoemulsões ricas em colesterol assemelham-se à estrutura da LDL. Portanto, estas nanoemulsões poderiam funcionar como transportadoras de drogas aos tumores (ALMEIDA *et al*, 2010).

2.2.1 Lipoproteína de baixa densidade (LDL) e câncer

A LDL é a principal lipoproteína transportadora de colesterol do plasma humano, representando cerca de 70% do colesterol plasmático total. Cada partícula de LDL contém cerca de 1500 moléculas de ésteres de colesterol, envolvidos por uma cápsula polar de fosfolipídios, colesterol livre e apolipoproteína B. As partículas de LDL entram nas células, predominantemente, através de endocitose mediada por receptor, sendo a etapa inicial, a ligação da LDL ao receptor de superfície celular específico. A LDL ligada ao receptor é internalizada e degradada nos lisossomos, liberando colesterol livre para ser usado na síntese de novas membranas e produção de hormônios esteróides (PINHEIRO *et al*, 2006; VITOLS *et al*, 1990).

A expressão aumentada de receptores para a LDL ocorre em diversos tipos de câncer. Essa expressão aumentada de receptores é explicada pelo fato de as células neoplásicas, por apresentarem rápida proliferação, exigirem demanda maior de colesterol e de fosfolipídeos para a síntese de novas membranas celulares. Portanto, pacientes com câncer apresentam alterações no metabolismo dos lipídeos com diminuição das lipoproteínas plasmáticas (hipocolesterolemia) ao mesmo tempo que há aumento da captação de lipídeos pelo aumento da expressão de receptores de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) na membrana de células tumorais (GENTA, 2006; GRAZIANI *et al*, 2002).

Ho *et al* (1978) mostraram que na leucemia mielóide aguda humana, as células malignas captam a LDL cerca de 3 a 100 vezes mais que as células normais. Vitols e colaboradores (1984a) também demonstraram captação aumentada de LDL na leucemia mielóide aguda humana, cerca de 4 a 25 vezes mais que as células brancas normais. Também observou-se aumento de LDL na leucemia monocítica humana,

mielomonocítica e leucemia mielóide crônica em crise blástica, quando comparado com as células mononucleares normais, granulócitos e células nucleadas da medula óssea (VITOLS *et al*, 1984b). Alexopoulos *et al* (1992) também encontraram valores aumentados de LDL após quimioterapia em linfomas. Resultados semelhantes foram encontrados em outras pesquisas com tumores sólidos humanos, como o câncer cervical epidermóide EC-50 e adenocarcinoma endometrial AC-258 (GAL *et al*, 1981), carcinoma gástrico e adenoma das parótidas (RUDLING *et al*, 1990a). Muitos tumores cerebrais captam 2 a 3 vezes mais LDL que as células normais, especialmente meduloblastoma, oligodendroglioma e meningioma maligno (RUDLING *et al*, 1990b).

Alguns tumores, entretanto, não internalizam grandes quantidades de LDL, como a leucemia mielóide crônica (VITOLS *et al*, 1984b), leucemia linfocítica crônica (JULIUSSON *et al*, 1988), diversos adenocarcinomas de cólon (FABRICANT; BROITMAN, 1990), câncer cervical EC-168 (GAL *et al*, 1982) e carcinoma epitelíóide A-431 (ANDERSON *et al*, 1981).

A possibilidade de usar o LDL como agente direcionador de fármacos é baseada em propriedades inerentes à partícula de LDL e seu receptor. A LDL poderia ser capaz de transportar fármacos lipofílicos para terem efeito citotóxico. Além disso, o fármaco incorporado na LDL teria maior concentração nas células neoplásicas pelo aumento da expressão de receptores pelas mesmas, protegendo as células normais. No entanto, a obtenção desse complexo LDL-fármaco necessitaria de altas concentrações de LDL humana no soro, ocasionando risco de infecção e, a incorporação do fármaco à partícula poderia causar a perda da apo-B100 que resultaria na perda de afinidade da proteína com seu receptor (GENTA, 2006).

Há 4 critérios que devem ser considerados para o uso bem sucedido da LDL como transportador de fármacos: 1) os compostos devem ser capazes de ligar-se à LDL; 2) A ligação fármaco-LDL deve ser tóxica para as células; 3) deve ser seletiva, isto é, entrar na célula somente via receptor de LDL; 4) a quantidade de fármaco ligada à LDL deve ser suficiente para matar todas ou quase todas as células neoplásicas (FIRESTONE *et al*, 1984).

O desenvolvimento de uma partícula lipídica artificial (LDE) resolveu os problemas e, apesar de a partícula criada não ter proteína, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais, adquire a apo-E, que é reconhecida pelo receptor de LDL, promovendo a captação pela célula. Foi comprovado também que o receptor de LDL tem mais afinidade pela apo-E da LDE que pela apo-B100 da LDL natural (GENTA, 2006).

2.2.2 Nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) e Paclitaxel

Maranhão *et al* (1994) demonstraram que partículas de nanoemulsão ricas em colesterol são reconhecidas pelas células através dos receptores de LDL. A nanoemulsão é composta por um núcleo de ésteres de colesterol e montantes de triglicerídeos rodeados por uma monocamada de fosfatidilcolina com colesterol livre. A nanoemulsão lipídica é produzida sem proteínas, mas, em contato com o plasma, adquire a apo-E e outras apolipoproteínas (MARANHÃO *et al*, 1992; 1993; MENDES *et al*, 2009; PIRES *et al*, 2008). A apo-E confere à nanoemulsão a capacidade de ser reconhecida pelos receptores de LDL. Foi demonstrado, em pacientes com carcinoma de mama e ovário, que o concentrado de nanoemulsão, chegou, respectivamente, a cinco vezes (GRAZIANI *et al*, 2002) e oito (ADES *et al*,

2001) vezes mais no tumor que no tecido normal. A nanoemulsão pode, portanto, funcionar como veículo para direcionar agentes quimioterápicos a cânceres com elevada expressão de receptores para LDL como na leucemia mieloide aguda, mieloma múltiplo, câncer de mama e ovário, diminuindo, conseqüentemente, a toxicidade sistêmica e potencializando a ação antitumoral dessas drogas (MENDES *et al*, 2009; PINHEIRO *et al*, 2006; PIRES *et al*, 2008).

Foi comprovado que a LDE pode se concentrar em células leucêmicas e tumores sólidos como o de mama e ovariano, pois neles os receptores de LDL são superexpressos. Como os componentes da LDE não são imunogênicos e a estrutura da LDE é análoga à da LDL, a LDE pode servir como um transportador de drogas quimioterápicas, tais como o Paclitaxel (RODRIGUES *et al*, 2005; GRAZIANI *et al*, 2002). Portanto, sabendo-se que a formulação do Taxol® causa severas reações de hipersensibilidade dentre outras reações adversas, a formulação de uma nanoemulsão rica em colesterol (LDE) com o Paclitaxel daria origem a uma terapia com maior especificidade e com menores efeitos adversos.

Uma estratégia habitual para tornar quimioterápicos mais estáveis quando associados a LDL ou a emulsões lipídicas artificiais é acoplar grupamentos lipofílicos à molécula original. Neste contexto, Lundberg *et al* (2003) demonstraram, recentemente, que um derivado lipofílico do Paclitaxel, o oleato de Paclitaxel, incorporado em uma emulsão lipídica melhorou os parâmetros farmacocinéticos do Paclitaxel comercial (Taxol®).

Em experimentos com animais, o oleato de Paclitaxel associado a uma nanoemulsão rica em colesterol (LDE) concentrado em tecidos neoplásicos mostraram toxicidade reduzida e aumento da atividade antitumoral em comparação com a atividade antitumoral do Taxol® (RODRIGUES *et al*, 2005). Um estudo

clínico piloto, realizado em pacientes com câncer de mama para avaliar a absorção tumoral, farmacocinética e toxicidade do Paclitaxel associado à nanoemulsão (LDE), demonstrou que a preparação pode ser vantajosa para utilização no tratamento do câncer da mama, porque os parâmetros farmacocinéticos foram melhorados, a droga estava concentrada no tecido neoplásico e a toxicidade do Paclitaxel foi reduzida (PIRES *et al*, 2008).

O Glioblastoma multiforme é uma doença maligna altamente agressiva que representa cerca de 40% dos tumores cerebrais primários em adultos (NARAYANA *et al*, 2004). A quimioterapia tem contribuição limitada para a sobrevida dos pacientes e não tem fornecido muitos benefícios (MARKERT *et al*, 2005). Maletinska *et al* (2000) em estudo com sete linhagens de Glioblastoma multiforme verificaram que há elevada expressão de receptores de LDL nas células neoplásicas. Nikanjam *et al* (2007) verificaram que a LDE é um veículo promissor para agentes antitumorais lipofílicos que podem ser utilizados no tratamento do Glioblastoma multiforme.

Nesse sentido, o estudo aqui proposto pretende comparar a citotoxicidade da formulação de um derivado do Paclitaxel, o Oleato de Paclitaxel, associado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) *versus* o Paclitaxel comercial (Taxilan) sobre células neoplásicas gástricas e de mama e em células normais *in vitro*, bem como estudar o potencial genotóxico de ambas as formulações de Paclitaxel em modelos celulares *in vitro* e *ex vivo*. Vale ressaltar, pois, que a molécula veiculada na nanoemulsão resulta de uma derivatização lipídica do Paclitaxel, onde um grupamento oleato foi adicionado ao composto original de modo a torná-lo mais estável e susceptível à incorporação na respectiva formulação (figura 4).

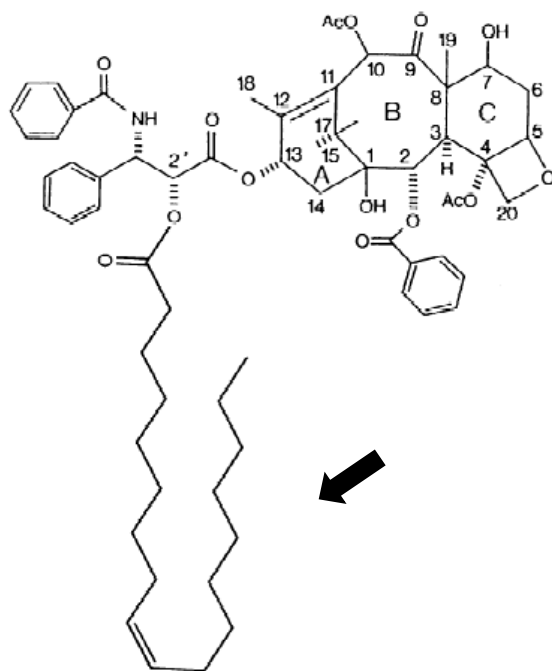


Figura 4 – Estrutura molecular do oleato de Paclitaxel. A seta indica a estrutura do grupamento lipofílico adicionado à molécula. FONTE: LUNDBERG *et al*, 2003

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar o efeito citotóxico e genotóxico do Oleato de Paclitaxel incorporado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) com uma formulação comercial de Paclitaxel.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o potencial hemolítico *ex vivo* da nanoemulsão de Paclitaxel em hemácias humanas e de camundongos *versus* o Paclitaxel comercial;
- Determinar o potencial citotóxico *in vitro* da nanoemulsão de Paclitaxel em células de adenocarcinoma gástrico e de mama e *ex vivo* em linfócitos humanos *versus* o Paclitaxel comercial;
- Determinar o potencial genotóxico *ex vivo* da nanoemulsão de Paclitaxel *versus* o Paclitaxel comercial;
- Determinar o potencial mutagênico *in vivo* da nanoemulsão de Paclitaxel *versus* o Paclitaxel comercial.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Tratou-se de um estudo experimental utilizando modelos *ex vivo* para avaliação do potencial hemolítico e citotoxicidade do oleato de Paclitaxel incorporado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) sobre hemácias humanas e de camundongos (*Mus musculus* Swiss), sobre uma população de linfócitos colhidos de sangue periférico de voluntários humanos saudáveis e *in vitro* sobre células de adenocarcinoma gástrico (ACP02) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Utilizou-se um modelo experimental *ex vivo* para avaliação da genotoxicidade do oleato de Paclitaxel incorporado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE) sobre uma população de linfócitos colhidos de sangue periférico de voluntários humanos saudáveis e *in vitro* sobre células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Utilizou-se também um modelo experimental *in vivo* para avaliação da mutagenicidade em camundongos (*Mus musculus*) adultos jovens da linhagem DBA.

4.2 Substâncias utilizadas nos testes

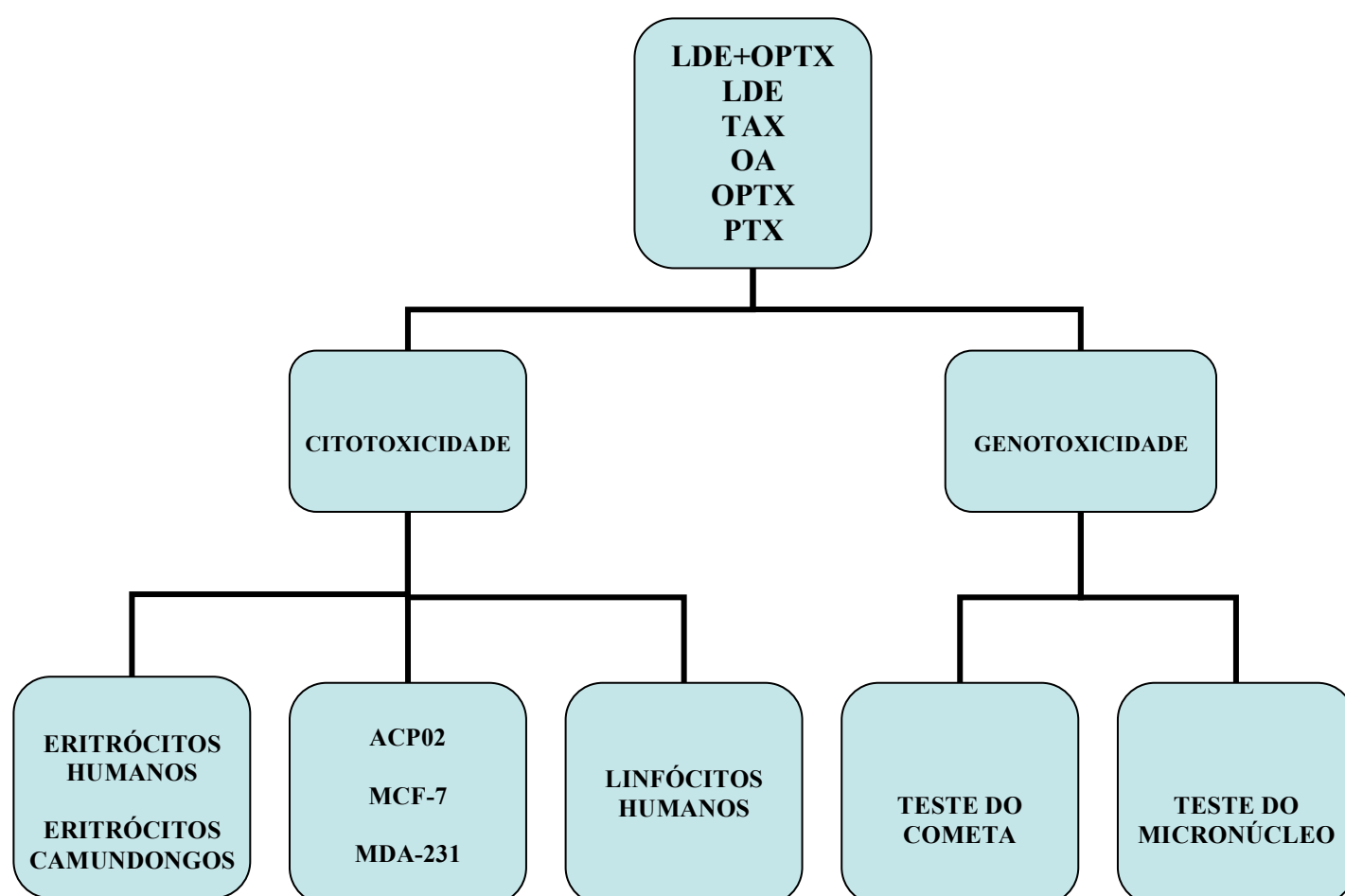
As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: oleato de Paclitaxel (OPTX), LDE (veículo), oleato de Paclitaxel incorporado à nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE+OPTX), Paclitaxel (PTX, utilizado na incorporação), Ácido Oléico (OA) e Paclitaxel comercial (TAX). Vale ressaltar que PTX, OA e OPTX

foram diluídos em dimetilsulfóxido e que a LDE+OPTX e LDE estavam prontas para uso.

Para o teste do Micronúcleo foram utilizados somente a nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE+OPTX) e o Paclitaxel comercial (TAX).

As substâncias utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo professor Doutor Raul Cavalcante Maranhão do Instituto do Coração – Incor de São Paulo. O oleato de Paclitaxel incorporado à nanoemulsão lipídica rica em colesterol foi preparado de acordo com Ginsburg *et al* (1982) e modificado por Maranhão *et al* (1993), conforme o anexo A.

4.3. Delineamento experimental



4.4 Estudo da atividade hemolítica em eritrócitos humanos e de camundongos

Esta metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Berlincki *et al* (1996) e permitiu avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

Para a obtenção da solução de eritrócitos de camundongo, foi coletado, aproximadamente, 500 µL de sangue de 3 camundongos *Mus musculus* Swiss por via intra-cardíaca. Transferiu-se o sangue para um tubo cônico completando o volume para 10 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução fisiológica por centrifugação a 956 g (3000 rpm por 5 minutos) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução fisiológica para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2% (1mL de eritrócitos em 50 mL de solução fisiológica).

Para obtenção da solução de eritrócitos humanos, coletou-se cerca de 3 mL de sangue venoso em tubo contendo heparina, retirou-se o plasma e, do concentrado de hemácias foi transferido 1 mL para uma proveta contendo 99 mL de solução fisiológica 0,9 %, obtendo-se então uma solução de eritrócitos a 1%.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades, em que em cada poço foi adicionado 150 µL da substância e 150 µL de suspensão de eritrócitos. As substâncias foram testadas nas concentrações de 100µM a 1,56 µM, em diluição seriada e em triplicata. Para controle positivo foi utilizado o Triton X-100 (que corresponde a 100% de hemólise) e para controle negativo utilizou-se o dimetilsulfóxido (diluyente das substâncias utilizadas).

Incubou-se a placa por uma hora a 37°C e, depois centrifugou-se a mesma a 239 g (1500 rpm) por 10 minutos. Após centrifugação, transferiu-se o sobrenadante

para outra microplaca de 96 poços para a leitura da absorbância em leitor de ELISA DTX 800 (Beckman Coulter) no comprimento de onda de 540 nm. A atividade das substâncias foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

4.5 Estudo da citotoxicidade com Alamar Blue nas linhagens neoplásicas

O alamar blue é um teste utilizado para indicar crescimento ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de células em cultura (AHMED *et al*, 1994).

O teste do Alamar blue envolve a adição de um indicador colorimétrico redox para o crescimento de células. A forma oxidada do Alamar blue é azul escuro e tem pequena fluorescência intrínseca. Quando metabolizado pela célula, torna-se reduzido e fica vermelho. Esta forma reduzida do Alamar blue é altamente fluorescente. A extensão desta conversão reflete a viabilidade celular que pode ser quantificada por densidade óptica ou fluorescência com grande sensibilidade. Existem diversas vantagens no ensaio do Alamar blue: 1) simples de usar: o indicador é adicionado diretamente nas células em cultura ao final do período de incubação, nenhum reagente adicional é necessário; 2) O Alamar blue não é tóxico para as células e para o usuário; 3) O teste do Alamar blue não exige nenhuma manipulação ou método de eliminação especial pois não são utilizados materiais radioativos nem tóxicos. Portanto, possui custo menor que os testes tradicionais de citotoxicidade; 4) Devido a sua natureza homogênea, o teste do Alamar blue pode ser adaptado em larga escala em ensaios *in vitro*; 5) outros estudos relataram que o Alamar blue é comparável em sensibilidade ao teste de incorporação da timidina e redução do tetrazolium para mensuração da

proliferação celular e citotoxicidade (PAGE *et al*, 1993; AHMED *et al*, 1994; DE FRIES; MITSUHASHI, 1995).

A linhagem celular de adenocarcinoma gástrico (ACP02) foi estabelecida a partir de um adenocarcinoma gástrico primário de um paciente do sexo masculino. O tumor foi removido da região da cárdia do estômago e foi classificado como do tipo difuso (LEAL *et al*, 2009). É uma linhagem celular que foi estabelecida recentemente, sendo gentilmente cedida pelo prof. Rommel Burbano da Universidade Federal do Pará.

As linhagens celulares ACP02, MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas plásticas pequenas para cultura, utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos Estreptomicina e Ampicilina. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram expandidas para uma nova garrafa com meio de cultura novo, em uma concentração de $0,5 - 1,0 \times 10^6$ células por mililitro. As células das linhagens utilizadas aderem à parede da garrafa, portanto, foi necessária uma etapa de tripsinização para a realização do teste de citotoxicidade.

Acompanhou-se a confluência celular da garrafa com ACP02 através da observação em microscópio até que atingisse 70-80% (confluência ideal) para que o teste de citotoxicidade fosse realizado. Posteriormente, retirou-se todo o meio de cultura da garrafa contendo as linhagens celulares, lavou-se duas vezes a superfície interna da garrafa com 1 ml de PBS, desprezando-se o PBS após cada lavagem. Adicionou-se 500 µL de Tripsina, aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 100 µL de Soro Fetal Bovino e 900 µL de meio de cultura RPMI para inativar a tripsina.

Retirou-se uma alíquota de 10 μL da suspensão celular e determinou-se a concentração celular em Câmara de Neubauer. Foram contadas todas as células localizadas nos 4 quadrantes externos (área destinada à contagem de leucócitos) e dividiu-se o resultado por quatro. O resultado obtido indica o número de células presente em 1 mL da suspensão preparada.

Foram colocados 100 μL das linhagens celulares: ACP02, MCF-7 e MDA-MB-231 em três placas de 96 cavidades nas concentrações de $2,5 \times 10^3$ para ACP02 e $0,125 \times 10^3$ para MCF-7 e MDA-MB-231. Após 24 h, 100 μL das substâncias nas concentrações: 100 μM a 1,56 μM , em diluição seriada, foram adicionadas aos poços em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h, 48 h e 72 h. A doxorrubicina e o dimetilsulfóxido foram utilizados como controle positivo e branco, respectivamente. Um volume de 10 μL da solução estoque de Alamar blue 0,4% foi adicionado a cada poço da placa, exceto no branco, 2 horas antes de completar os tempos estabelecidos. O resultado foi mensurado pela fluorescência em 465 nm e em 540 nm, usando um leitor de placas de ELISA DTX 800 (Beckman Coulter) disponível no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

As concentrações celulares e o tempo de leitura após adição do Alamar blue (2 horas) utilizados, foram determinados em ensaios preliminares. Estes ensaios tiveram a finalidade de descobrir a concentração e o tempo ideais para leitura das placas. As células foram plaqueadas nas concentrações de $1,0 \times 10^3$ até $1,0 \times 10^5$ em triplicata no volume de 200 μL . Após 1, 2, 3 e 4 horas de incubação a 37° C em estufa com 5% de CO_2 , foram adicionados 10 μL de Alamar blue 0,4% e realizada a leitura em fluorescência. O tempo de leitura escolhido refletiu o período em que houve maior emissão de fluorescência.

Foram confeccionados gráficos de fluorescência *versus* concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

4.6 Estudo com células normais (*ex vivo*)

4.6.1. Obtenção de linfócitos

Para o estudo com os linfócitos humanos, foi utilizado o sangue periférico de 4 doadores voluntários, sendo dois homens e duas mulheres, obedecendo aos seguintes critérios de inclusão: ter entre 18 e 35 anos e bom estado geral de saúde e exclusão: ser etilista ou tabagista e estar fazendo uso de algum medicamento (anexo 2).

Os linfócitos foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 10 mL de sangue coletado em tubo contendo EDTA. Foram colocados 3 mL do sangue em tubo falcon de 15 mL, acrescentando-se 5 mL de PBS, posteriormente. Após homogeneização, o conteúdo foi transferido, lentamente, para um segundo falcon contendo 2 mL de Ficoll (Histopaque 1077). Posteriormente, o tubo falcon foi centrifugado por 30 minutos a 239 g (1500 rpm), seguido de aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma (“nuvem de linfócitos”). A camada de linfócitos aspirada foi colocada em outro falcon de 15mL, completando-se o volume para 11 mL com PBS. O tubo foi centrifugado por 20 minutos a 106 g (1000 rpm). O sobrenadante foi removido e desprezado e o pellet ressuspenso em 4 mL de meio RPMI.

4.6.2 Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Após o isolamento de linfócitos, retirou-se uma alíquota de 10 μL da suspensão celular e determinou-se a concentração celular em Câmara de Neubauer. Foram contados todos os linfócitos localizados nos 4 quadrantes externos (área destinada à contagem de leucócitos) e dividiu-se o resultado por quatro. O resultado obtido indica o número de células presente em 1ml da suspensão preparada.

Foram colocados 100 μL da suspensão de linfócitos em três placas de 96 cavidades na concentração de $2,5 \times 10^4$. O volume de 100 μL das substâncias nas concentrações: 100 μM a 1,56 μM , em diluição seriada, foram adicionadas aos poços em triplicata. As placas foram incubadas por 24h, 48h e 72h. Foram utilizados a doxorrubicina e o dimetilsulfóxido como controle positivo e branco, respectivamente. Um volume de 10 μL da solução estoque de Alamar blue 0,4% foi adicionado a cada poço da placa, exceto no branco, 4 horas antes de completar os tempos estabelecidos. O resultado foi mensurado pela fluorescência em 465 nm e em 540 nm, usando um leitor de placas de ELISA DTX 800 (Beckman Coulter) disponível no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Foram confeccionados gráficos de fluorescência *versus* concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

4.7 Teste do cometa com linfócitos e linhagem celular ACP02

O teste do cometa ou teste de eletroforese de célula única em agarose (Single Cell Gel Electrophoresis) é amplamente utilizado para avaliar dano ao DNA, reparação em células eucarióticas e morte celular. Por ser um teste simples, de baixo custo, sensível, com um emprego de uma pequena população celular em suspensão, proliferação ou não, e correspondente a um teste citogenético, o teste do cometa possui grande popularidade (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005; COLLINS, 2004; HARTMANN *et al.*, 2001; JHA, 2008).

O teste de cometa tem sido utilizado com uma grande variedade de aplicações incluindo biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para investigar lesão ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares em resposta a diversos agentes que causam dano ao DNA. Além disso, muitos estudos têm demonstrado sucessivamente que esse teste pode ser aplicado para a análise de células obtidas de diferentes tecidos humanos, propiciando dados substanciais para sugerir que o teste poderia beneficiar muitas áreas de investigação clínica por fornecer informações valiosas sobre as características intrínsecas ao DNA de células individuais e sua resposta a vários fatores externos, como radiação, agentes químicos e fármacos. Este tipo de informação mostra-se particularmente relevante no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer (McKENNA *et al.*, 2008).

O dano ao DNA e o defeito no sistema de reparo do DNA são os eventos moleculares de base que levam ao início e progressão do câncer. Por esta razão, muitos estudos utilizam o teste do cometa para investigar dano e reparo do DNA em diversas células tumorais em resposta a uma variedade de agentes causadores de dano. Estes dados poderiam ser usados pelos oncologistas para informá-los qual o melhor

curso possível de intervenção; e assim, encontrar soluções para alguns dos problemas encontrados no tratamento do câncer (McKENNA *et al*, 2008).

O princípio do teste leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. As células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com o uso de detergentes em meio alcalino e as proteínas nucleares são removidas com o uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina aparece apenas o nucleóide íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com o seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim, as células com o DNA danificado formam, após a migração, o aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (BURLISSON *et al*, 2007; COLLINS, 2004; DUSINSKA; COLLINS, 2008; SHAPOSHNIKOV *et al*, 2008; TICE *et al*, 2000).

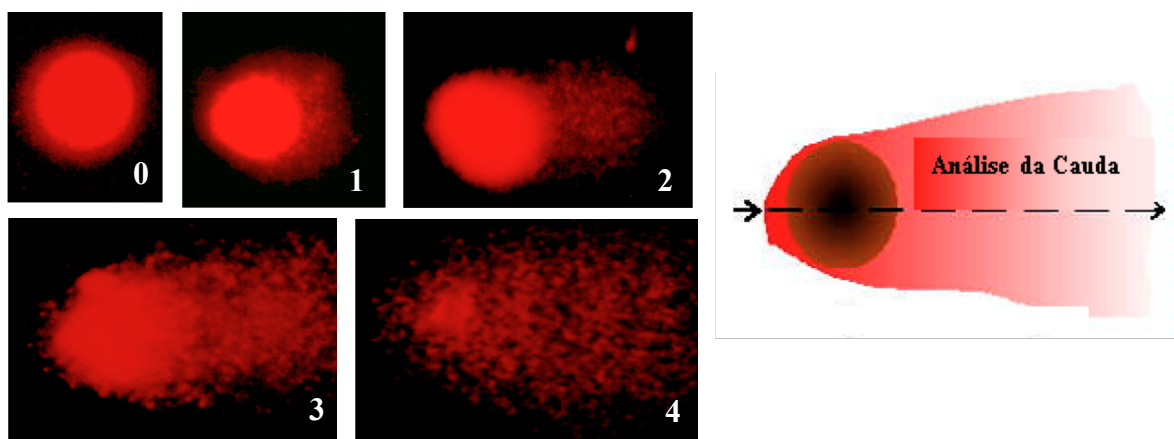


Figura 5 – Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano. FONTE: SINGH *et al*, 1988

4.7.1 Preparo das lâminas

As lâminas que receberam a primeira camada de agarose de ponto de fusão normal foram previamente lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente ou estufa a 37°C. Essas lâminas não podem estar oxidadas e precisam ter uma das extremidades lapidada.

Para fixar a primeira camada de agarose, as lâminas foram mergulhadas, uma a uma, no gel de agarose 1,5%, previamente preparado, a aproximadamente 60°C. Os excessos de agarose foram removidos e as lâminas permaneceram cobertas e à temperatura ambiente na posição horizontal até que estivessem completamente secas.

4.7.2 Obtenção e tratamento dos linfócitos

Inicialmente, os linfócitos foram isolados conforme o item 4.5.1. Para o Teste do Cometa foram utilizadas as seguintes concentrações das substâncias: 10 μM , 7,5 μM , 5,0 μM e 2,5 μM , conforme Digue *et al* (1999). Utilizou-se a Doxorubicina como controle positivo e o Dimetilsulfóxido como controle negativo.

Colocou-se um volume de 90 μL de linfócitos em microtubos suficientes para todas as concentrações e substâncias testadas. Adicionou-se posteriormente 10 μL das substâncias e incubou-se por 3 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 .

4.7.3 Obtenção e tratamento da linhagem celular ACP02

As células de adenocarcinoma gástrico foram obtidas conforme item 4.4. Para o Teste do Cometa com ACP02 utilizaram-se placas de 24 cavidades. A concentração

celular usada para plaqueamento foi de $1,0 \times 10^5$ /poço. Foram utilizadas as seguintes concentrações das substâncias: 10 μM , 7,5 μM , 5,0 μM e 2,5 μM . Utilizou-se a Doxorubicina como controle positivo e o Dimetilsulfóxido como controle negativo.

Foram plaqueados 450 μL de ACP02 em poços suficientes para todas as concentrações e substâncias testadas. Para cada concentração foram utilizados dois poços da placa. Aguardou-se 24 horas e realizou-se o tratamento através da adição de 50 μL de cada substância testada. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 .

4.7.4 Fixação dos linfócitos à lâmina e etapa de lise

Após 3 horas de incubação, homogeneizou-se a suspensão de linfócitos tratados. Retirou-se o volume de 40 μL de cada substância que foi homogeneizada com 180 μL de agarose de baixo ponto de fusão à 37 °C. Um volume de 110 μL dessa mistura foi colocada sobre a lâmina previamente coberta com agarose de ponto de fusão normal. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada substância testada. As lâminas foram cobertas com lamínulas 24x60 mm — evitando-se a formação de bolhas — e armazenadas em geladeira por 15 minutos. As lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas mergulhadas em uma cuba contendo solução de lise (solução de uso) previamente gelada por 2 horas. As lâminas ficaram descansando na solução de lise por pelo menos 1 hora em geladeira e depois foram lavadas com solução de neutralização e imersas nesta mesma solução por 5 minutos.

4.7.5 Fixação da ACP02 à lâmina e etapa de lise

Após 3 horas de incubação, transferiu-se o meio de cultura de cada poço para um microtubo respectivo. Lavou-se cada poço com 200 µL de PBS e transferiu-se para o respectivo microtubo. 200 µL de Tripsina foi adicionado e aguardou-se 5 minutos. Foram acrescentados 40 µL de Soro Fetal Bovino e 360 µL de meio de cultura RPMI. Transferiu-se, novamente, para o respectivo tubo. Os microtubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Retirou-se sobrenadante suficiente para que ficasse 100 µL. Ressuspendeu-se o pellet celular e aspirou-se o volume de 40 µL de cada microtubo que foi, posteriormente, homogeneizado com 180 µL de agarose de baixo ponto de fusão à 37 °C. Um volume de 110 µL dessa mistura foi colocada sobre a lâmina previamente coberta com agarose de ponto de fusão normal. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada poço. As lâminas foram cobertas com lamínulas 24x60 mm — evitando-se a formação de bolhas — e armazenadas em geladeira por 15 minutos. As lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas mergulhadas em uma cuba contendo solução de lise (solução de uso) previamente gelada por 2 horas. As lâminas ficaram descansando na solução de lise por pelo menos 1 hora em geladeira e depois foram lavadas com solução de neutralização e imersas nesta mesma solução por 5 minutos.

4.7.6 Etapa de eletroforese e coloração

A cuba foi preenchida previamente com a solução de eletroforese gelada (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH; pH>13). Em seguida, as lâminas foram removidas da solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) e colocadas na posição horizontal na

cuba, aguardando 20 minutos antes de iniciar a eletroforese, para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão do dano antes da eletroforese conforme Singh *et al* (1988) com modificações. A eletroforese foi conduzida à temperatura de 4°C por 20 minutos, usando 20V e corrente de 300 mA para linfócitos e para ACP02, a eletroforese foi conduzida à temperatura de 4°C por 15 minutos, usando 30V e corrente de 300 mA, de acordo com Preet *et al* (2010) com modificações. Todos esses passos foram conduzidos na ausência de luminosidade. Após a eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba, lavadas e imersas novamente na solução de neutralização durante 5 minutos para neutralizar a alcalinidade.

As lâminas foram fixadas em álcool etílico absoluto através de mergulhos sucessivos por alguns segundos e colocadas para secar à temperatura ambiente. As lâminas ficaram armazenadas em uma laminoteca até o momento da análise. As lâminas foram coradas com Brometo de etídio 20 µg/ml (solução de uso) e visualizadas em microscópio de fluorescência com luz ultravioleta com filtro vermelho.

4.7.7 Escore das lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores, previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Sendo classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, nas seguintes categorias: 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5-20%); 2 = médio nível de danos (20-40%); 3 = alto nível de danos (40-95%); 4 = dano total (>95%). O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Scores}$ (somatório dos escores). Foram contados 50 cometas por lâmina e

classificados de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA.

4.8 Teste do Micronúcleo

O teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais. É o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al*, 1987). Esse teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula de camundongos, mas pode ser feito em medula de ratos.

Micronúcleo é uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (FENECH, 2000). Micronúcleos são constituídos por cromossomos inteiros ou fragmentos que foram perdidos durante a divisão celular e, consequentemente, excluídos do núcleo principal das células-filhas (RIBEIRO *et al*, 2003). O micronúcleo é indubitavelmente um importante mecanismo de perda cromossômica (NORPPA; FALCK, 2003).

O teste do micronúcleo foi usado para detectar mutação induzida pela nanoemulsão de Paclitaxel ao cromossomo ou ao aparato mitótico de eritroblastos pela análise de eritrócitos retirados da medula óssea de camundongos. A metodologia baseia-se no OECD guideline for the testing of chemicals de 1997.

4.8.1 Preparo dos animais para o teste do micronúcleo

Foram utilizados camundongos saudáveis, adultos jovens (entre 6 e 8 semanas de idade), linhagem DBA, distribuídos ao acaso, tanto para os grupos controles como para os grupos tratados. Os animais, identificados individualmente, foram aclimatados às condições do biotério por pelo menos 5 dias antes do início do estudo. A variação de peso dos animais foi mínima, não excedendo a 20 % do peso médio de cada sexo. Em cada grupo controle e tratados com as substâncias (LDE+OPTX e TAX) nas concentrações 0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg, controle positivo e controle negativo, foram incluídos 4 animais de cada sexo, a temperatura da sala de manutenção dos animais foi de 22 °C ($\pm$ 3 °C) e um ciclo de luz 12 h claro/12 h escuro. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, do mesmo sexo e em estantes ventiladas. Para a alimentação, foi utilizada água filtrada e ração para camundongos oferecida sem restrição de quantidade. Grupos de animais controles negativo e positivo foram incluídos em cada estudo e foram testados ao mesmo tempo em que os grupos tratados. Os animais do grupo controle negativo foram tratados somente com o solvente/veículo. Foi utilizado um grupo controle para cada tempo de amostragem.

4.8.2 Procedimento Experimental

Os animais foram tratados com as substâncias por via i.v através do plexo orbital e sacrificados nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento para a retirada da medula óssea dos camundongos. Os animais foram tratados com as substâncias testes uma única vez, as amostras de medula óssea foram coletadas em dois momentos após a administração das substâncias testadas: 24 e 48h. Como controle positivo foi

utilizada a Ciclofosfamida 50 mg/kg e como controle negativo foi utilizada solução fisiológica (NaCl 0,9%) (Figura 6). Após o sacrifício do animal, uma amostra do material de medula óssea foi coletada dos dois fêmures, em uma pequena quantidade (3 mL) de soro bovino fetal. As preparações celulares foram coradas adequadamente com Leishman e analisadas para a presença de micronúcleos. Foram confeccionadas duas lâminas de cada animal.

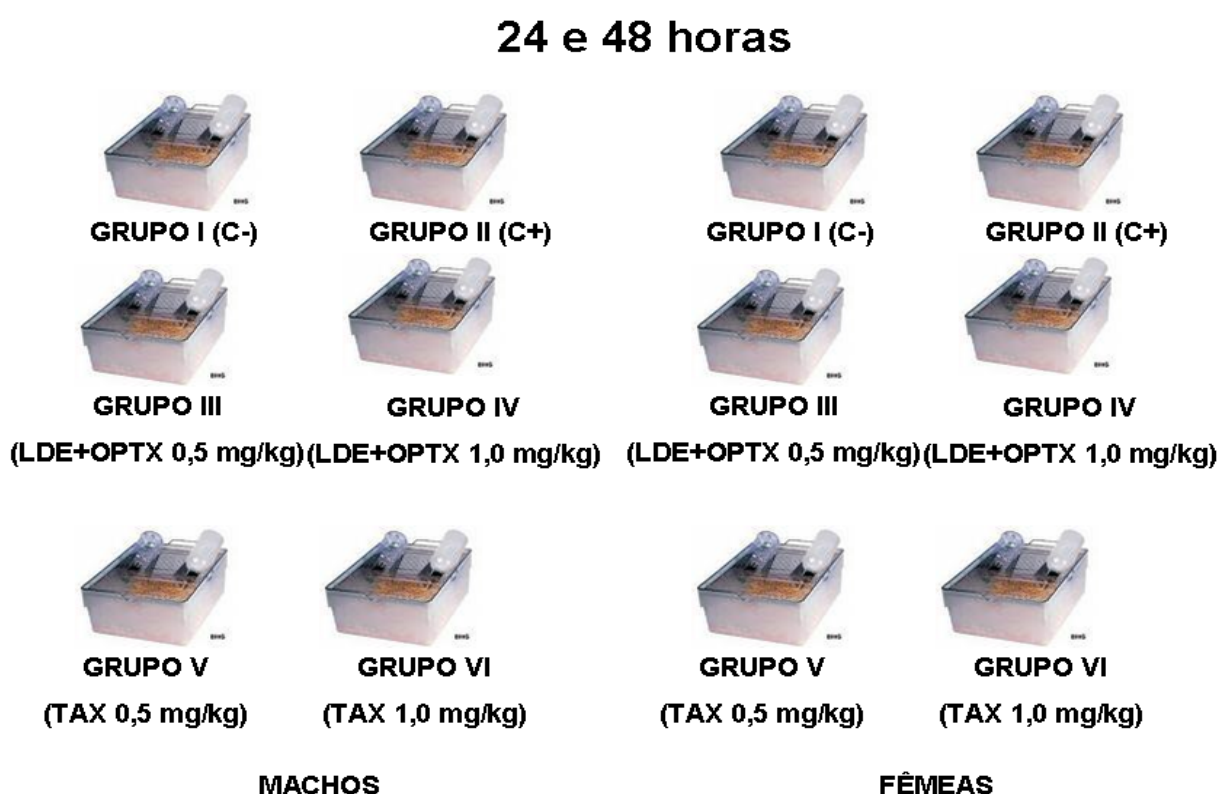


Figura 6 – Divisão dos grupos de camundongos utilizados no teste do Micronúcleo

Todas as lâminas, incluindo aquelas do controle positivo e negativo, foram codificadas antes da análise. A proporção de eritrócitos imaturos (PCE) dentre o total de eritrócitos (PCE + NCE) foi determinada contando-se pelo menos 2000 eritrócitos (PCE + NCE) por animal. Para avaliação de células micronucleadas, foram analisados pelo menos 2000 PCE por animal.

4.9 Aspectos éticos

Antes da coleta de sangue para o estudo com células normais, os voluntários foram conscientizados a respeito da finalidade do estudo e na concordância assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo B), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFAM (CAE nº 0044.0.115.000-10)(anexo C). Os participantes foram entrevistados por um dos pesquisadores através de uma ficha de avaliação contendo questões relacionadas a sua saúde (anexo D). Os pesquisadores se responsabilizaram pela confidencialidade das informações fornecidas pelos voluntários. A pesquisa foi conduzida de acordo com a resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementares.

As amostras de sangue foram identificadas por algarismos arábicos. O volume de sangue coletado e não utilizado foi armazenado de acordo com a resolução nº 347/2005 do Conselho Nacional de Saúde.

O trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFAM com o protocolo nº 019/2011-CEEA (anexo E).

4. 10 Análise estatística

Os resultados foram analisados e comparados por análise de variância *one way* (ANOVA) seguida por Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS

Os resultados, discussão e conclusões deste trabalho foram inseridos no artigo científico, intitulado: “**Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects of paclitaxel oleate linked to a cholesterol-rich lipid emulsion and commercial Paclitaxel**” e apresentado a seguir.

O artigo foi formatado conforme as orientações da revista **Food and Chemical Toxicology** (as orientações aos autores estão em documento pdf anexo ao trabalho).

6. ARTIGO CIENTÍFICO

Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects of commercial Paclitaxel and paclitaxel oleate linked to a cholesterol-rich lipid emulsion

Francivaldo de Oliveira Lima Versiani^a, Ana Carolina Lima Ralph^a, Gleyce dos Santos Barbosa^a, Raquel Carvalho Montenegro^b, Raul Cavalcante Maranhão^c, Marne Carvalho de Vasconcellos^{a,*}.

a. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas. Alexandre Amorim Street, 330 - Aparecida, Manaus, Amazonas, Brazil.

b. Faculty of Biotechnology, Federal University Federal of Pará. Augusto Corrêa Street, no.1 – Guamá, Belém, Pará, Brazil.

c. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,

Francivaldo de Oliveira Lima Versiani – fran_farmbio@yahoo.com.br

Ana Carolina Lima Ralph – ana_carolina267@hotmail.com

Gleyce dos Santos Barbosa – gleycepocahontas@hotmail.com

Raquel Carvalho Montenegro – rcm.montengro@gmail.com

Raul Cavalcante Maranhão – ramarans@usp.br

Marne Carvalho de Vasconcellos – marne@ufam.edu.br

*Corresponding author: marne@ufam.edu.br

Abstract

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of breast and ovarian cancer, even in advanced stages. Because of its side effects, paclitaxel has been incorporated into nanoparticle to in other to abolish its toxicity. In this way, this study aimed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of paclitaxel oleate (OPTX) incorporated into cholesterol-rich lipid nanoemulsion (LDE), when compared with commercial paclitaxel (Taxilan®). The lytic effects were performed in mice and human erythrocytes are described as followed: LDE+OPTX: 59,04 μ M; OPTX, TAX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 58,26 μ M. As for human erythrocytes none of the compounds caused hemolysis, except OA. Cytotoxicity studies on gastric cancer cell line (ACP02) showed an IC_{50} of: LDE+OPTX: 17,65 μ M; OPTX, OA, PTX: >100 μ M; LDE: 51,75 μ M. As for breast cancer cell line (MCF-7) the IC_{50} were: LDE+OPTX: 12,41 μ M (9,38-16,41); OPTX, OA, PTX: >100 μ M; LDE: 25,53 μ M (21,23-30,70). As for breast cancer cell line (MDA-MB-231) the IC_{50} after 72h were: LDE+OPTX: 21,82 μ M (19,20-24,80); OPTX, PTX, OA: >100 μ M; LDE: 26,29 μ M (24,17-28,59). The cytotoxicity after 24h in human lymphocytes showed an IC_{50} of: LDE+OPTX, LDE, OPTX, OA, PTX: >100 μ M; TAX: 40,39 μ M. To 48h: OPTX, OA, PTX: >100 μ M; TAX: 24,61 μ M; LDE: 47,20 μ M; LDE+OPTX: 40,78 μ M; TAX: 24,61 μ M. After 72h treatment, IC_{50} were: OPTX, AOL: >100 μ M; LDE: 39,06 μ M; LDE+OPTX: 33,99 μ M. Nanoemulsion showed greater cytotoxicity into tumor cells than lymphocytes. Comet assay showed that the nanoemulsion is genotoxic for both lymphocytes and tumor cells. Micronuclei assay after 24 and 48 hours, did not show increase on the frequency of micronuclei for nanoemulsion. Therefore, it was found that the cholesterol-rich nanoemulsion with paclitaxel oleate is cytotoxic to tumor cells and normal cells, causing DNA damage in lymphocytes and tumor cells only at 7.5 and 10 μ M.

Keywords: Nanoemulsion, LDE, Paclitaxel Oleate, Gastric cancer, human lymphocytes, breast cancer.

1. Introduction

Paclitaxel, which belongs to the taxane family, is an important antitumor agent used to treat cancer, particularly, breast cancer in advanced stages, including metastatic (Miele et al., 2009). Their cytotoxicity derives from competence to stabilize the microtubules have formed preventing its depolymerization and therefore blocking cell division (Schiff and Horwitz, 1979). The taxanes are agents that have high affinity to microtubules, affecting, thus, mitosis, motility and intracellular transport in neoplastic cells, leading to cell death by apoptosis. Taxanes have been demonstrated to be have a potent anticancer activity against various cancers, including lung cancer and non-small cell ovarian cancer, alone or in combination with other antitumor agents. However, the paclitaxel molecule is highly lipophilic, requiring the use of lipophilic solvents to improve its solubility in the formulations. However, these formulations containing lipids may be associated with significant dose-limiting toxicity (Miele et al., 2009; Pires et al., 2008).

The development of nanotechnology related to medicine has brought about great advances in the diagnosis and treatment of cancer allowing overcome obstacles arising from the toxicity and pharmacokinetics of antitumor agents. Nanocarriers systems present some advantages such as reduced volume of distribution (Drummond et al., 1999), improve the pharmacokinetics and increases the biodistribution of the therapeutic agent in the target organ, resulting in increased efficacy (Au et al., 2001; Fetterly and Straubinger, 2003; Hoarau et al., 2004; Moghimi and Szebeni, 2003). The toxicity of the drug is diminished as a result of preferential accumulation in target organs and low concentration in normal tissues. In addition, many nanocarriers have the ability to increase the solubility of hydrophobic compounds in water to make them more suitable for parenteral administration (Koo et al., 2005; Kristl et al., 2003).

Nanocarriers made of biocompatible materials have been investigated as safe alternatives to existing vehicles such as Cremophor EL, used in the formulation of Paclitaxel, due to acute hypersensitivity reactions and neurotoxicity (Gelderblom et al., 2001; ten Tije et al., 2003; van Zuylen et al., 2001).

Low Density Lipoprotein (LDL) is the major transporter of cholesterol in human plasma, representing about 70% of total plasma cholesterol. Each LDL particle contains about 1500 molecules of cholesterol esters, surrounded by a polar shell of phospholipids, free cholesterol and apolipoprotein B. The LDL particles enter the cells predominantly by receptor-mediated endocytosis, the initial step being binding of LDL to specific cell surface receptor. LDL bound to the receptor is internalized and degraded in lysosomes, releasing free cholesterol to be used in the synthesis of new membranes and production of steroid hormones (Vitols et al., 1990).

Cancer patients have changes in lipid metabolism with decreased plasma lipoprotein while there is increased uptake of lipids by increasing expression of receptors for LDL in the membrane of tumor cells. This increase of receptors expression is explained in cancer cells, which present rapid proliferation that requires greater demand for cholesterol and phospholipids for the synthesis of new cell membranes. The possibility of using LDL as a drug delivery system is based on inherent properties of the LDL particle and its receptor. LDL might be able to transport lipophilic drugs to have a cytotoxic effect, while the drug is protected. In addition, the drug incorporated into the LDL would have a higher concentration in cancer cells by because of the increasing expression of the same receptors leading to protection to normal cells (Genta, 2006).

Maranhão *et al.* (1994) showed that particles of cholesterol-rich nanoemulsion are recognized on cells through the LDL receptors. The nanoemulsion is made up of a

core of cholesterol esters and the amount of triglycerides surrounded by a monolayer of phosphatidylcholine with free cholesterol. The lipid nanoemulsion is made without proteins, but in contact with the plasma acquires Apo lipoprotein-E (apo-E) and other apolipoproteins (Maranhao et al., 1993; Maranhao et al., 1992; Pires et al., 2008). The apo-E molecule gives the nanoparticle the ability to recognize the LDL receptors in the cell membrane. A common strategy to make chemotherapy more stable when associated with LDL or artificial lipid emulsions is attaching lipophilic groups to the original molecule. In this context, Lundberg et al. (2003) demonstrated that a lipophilic derivative of paclitaxel incorporated in a lipid emulsion improved the pharmacokinetic parameters of the commercial paclitaxel (Taxol®).

Previously (Ades et al., 2001; Graziani et al., 2002), it was demonstrated that, in patients with breast cancer and ovarian cancer, the nanoemulsion concentration in the tumors was five (Graziani et al., 2002) and eight (Ades et al., 2001) times more in tumor than in normal tissue, respectively. The nanoemulsion can, therefore, serve as a vehicle to chemotherapeutic agents to target tumors, leading to a decreasing in the systemic toxicity and enhancing the antitumor action of these drugs (Pires et al., 2008).

In this sense, the study proposed herein aims to compare the cytotoxicity effects of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion versus commercial paclitaxel (Taxilan) on human cancer cells and normal cells *in vitro* and to study the genotoxic potential of both formulations of paclitaxel in cell models and a mutagenic effect in DBA mice.

2. Material and Methods

2.1 LDE Preparation

The rich nanoemulsion cholesterol called LDE was prepared from a lipid mixture composed of 40 mg of cholesteryl oleate, 20 mg phosphatidylcholine, 1 mg triolein and 0.5 mg of cholesterol. The emulsification of lipids by prolonged ultrasonic irradiation in aqueous solutions is a two-step process of ultracentrifugation of crude emulsion with density adjustment by addition of KBr. The LDE microemulsion was prepared as described by Ginsburg and colleagues (1982) and modified by Maranhão et al. (1993). For experiments, the LDE microemulsion was dialyzed in saline and filtered through a membrane of 0.22 μ m. Paclitaxel oleate was solubilized in ethanol before adding into the emulsion. The solution was sonicated for 30 min at 70 °C using a sonicator (Branson 450 sonoprobe - Danbury CT) equipped with a titanium probe (1 cm). The paclitaxel oleate was centrifuged at 3000 rpm for 15 min to separate unbound paclitaxel oleate. LDE-paclitaxel oleate was passed through the 0.22 μ m filter and stored at 4°C until its use. The yield of each preparation was determined by the liquid layer chromatography before each use.

2.2 Hemolytic assay

The test was performed in 96-well plates using a 2% mouse erythrocyte or human erythrocyte suspension in 0.85% NaCl containing 10 mM CaCl_2 , following the method described by Berlinck et al. (1996). The compounds were tested at concentrations ranging from 3.9 to 1000.0 μ g/ml. After incubation at room temperature for 30 min and centrifugation, the supernatant was removed and the liberated hemoglobin was measured spectrophotometrically as the absorbance at 540 nm.

2.3 Culture of cells

Cell line and cell culture

ACP02 human gastric adenocarcinoma cells, MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cells were obtained from Children's Mercy Hospital (Kansas City, MO,

USA). The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin at 37°C, with 5% CO₂. The cells were split every 3 days and diluted 1 day before each experiment.

Peripheral venous blood (10 mL) was collected in heparinized vials from four normal, healthy donors, two women and two men, with no history of smoking/drinking or chronic use of medication. The blood was washed with PBS and lymphocytes were isolated using a gradient of Ficoll – Histopaque (1 blood: 1 ficoll). This procedure was used for Alamar Blue™ and comet assays. All procedures were conducted under local Ethics Committee of Federal University of Amazon (CAE nº 0044.0.115.000-10).

2.4 Alamar Blue

Peripheral blood lymphocytes (PBL) and cancer cells seeded in 96-well plates (10⁵ and 10⁴ cells per well, respectively) were treated with 1.56 to 100 µM and the Alamar Blue™ assay was performed (Ahmed et al., 1994). Substances were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), added to each well and incubated for 24 h, 48 h and 72 h. Taxilan was used as positive control. Control groups received the same amount of DMSO (0.1%). Four hours and two hours before the end of the incubations, 10 µL of Alamar Blue™ was added to each well in PBL and cancer cells, respectively. The fluorescent signal was monitored using a multiplate reader using 530-560 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength. The fluorescent signal generated from the assay was proportional to the number of living cells in the sample, according to manufacture.

2.5 Comet Assay

The comet assay was performed according to the methodology proposed by Singh (1988), with some modifications. As a positive control was used doxorubicin and as negative control DMSO. Gastric adenocarcinoma cells were counted in a Neubauer chamber and 10^5 cells were placed in each well of a 24-well plate with 450 μ L of RPMI complete. After isolation, lymphocytes were placed in microtubes. The plate were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ for 24 h. After this time, the cells and lymphocytes were treated with different concentrations of the substances (10 μ M, 7,5 μ M, 5,0 μ M and 2,5 μ M), DMSO and doxorubicin (10 μ g/mL) for 3 h. Then 20 μ L of these cells were added to 90 μ L of low melting point agarose and this total was placed on microscope slides pre-coated with normal melting point agarose. This precoating was performed with the agarose at 60 °C, and the slides were kept at room temperature for 24 h until solidification. The slides containing the cells over agarose solution were covered with coverslips for a uniform distribution of the material and kept at 4 °C for solidification of agarose. After solidification, the coverslips were removed and the slides were placed in a lysing solution (stock lysis solution with 10% DMSO and 1% Triton X-100) for 1 h, in order to occur the denaturation of cell and nuclear membrane, allowing to DNA occupy the remaining space that was once the cell nucleus. The slides were removed from the lysing solution and placed horizontally in the electrophoresis vat which was filled with running buffer for 20 min to allow the unpacking of DNA. The electrophoresis was performed on ice and in the dark for 20 min at 20 V and current of 300 mA. After electrophoresis, the slides were removed and subjected to three washes of 5 min with neutralization solution to remove the alkalinity of the blades. Then they were fixed in ethanol. Subsequently, 40 μ L of ethidium bromide solution (20 μ g/ml) were applied on slides, covering them

with coverslips and analyzed with a fluorescence microscope. Were counted 50 comets/slide and classified according to the percentage of DNA in the comet tail, indicating the degree of breakage of DNA. Comet analysis was performed according to the pattern of scores determined by the size and intensity of the tail.

Data were analyzed using the mean and standard deviation of two experiments. In order to verify the occurrence of significant differences between different groups, data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, with significance level of 5 % ($p < 0.05$) in GraphPad Prism version 5.0.

2.6 Micronucleus Assay

This test was performed following the methodology described in OECD guideline for the testing of chemicals n° 474 (OECD, 1997). The animals were treated with Paclitaxel Oleate nanoemulsion and Taxilan and sacrificed at 24 h and 48 h after treatment to remove the bone marrow. Were used healthy young adults (between 6 and 8 weeks old) were randomly distributed for both control and treated groups. The animals were individually identified, were acclimated to vivarium conditions for at least three days before the start of the study. The weight variation of animals was minimal and not exceed 20% of the average weight of each sex. In each control group and treated with the test substance were included five animals of each sex, the temperature of the animal holding room was 22 °C (± 3 °C) and 12 h light/dark cycle. The animals were kept in polypropylene box and ventilated shelving in groups of five animals of the same sex. For food, was used mice feed and filtered water was provided without restriction of quantity. Paclitaxel nanoemulsion and Taxilan were already ready to use. The negative and positive groups were included in each study and were tested at the same time as the treated groups. The animals were treated once with the test substances intravenously, and twelve treatment groups (Paclitaxel

nanoemulsion 0,5 mg/kg and 1,0 mg/kg, in 24 h and 48 h). The positive control was Cyclophosphamide intravenously at a dose of 50 mg/kg and the negative control was saline 0.9% intravenously too. The bone marrow samples were collected on two occasions after administration of test substance: 24 h and 48 h. After sacrificing the animal, a sample of the material was collected from bone marrow of the femur with a small amount (3 mL) of fetal calf serum. The cell preparations were stained with Leishman dye and properly analyzed for the presence of micronuclei. There were prepared two slides for each animal. All slides, including those of positive and negative controls were coded before analysis. For the evaluation of micronucleated cells were analyzed at least 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) per animal.

Data were analyzed using the mean and standard deviation of ten animals. In order to verify the occurrence of significant differences between different groups, data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, with significant level of 5 % ($p < 0.05$) using GraphPad Prism version 5.0.

3. Results and discussion

3.1 Hemolytic activity

In order to verify whether the observed cytotoxicity effects is related to membrane disruption, nanoemulsion of paclitaxel and components of nanoemulsion were tested for their ability to induce lysis of mice erythrocytes and human erythrocytes. These substances caused hemolysis in mouse erythrocytes however this activity was not observed in human erythrocytes (Table 1).

Table 1

Hemolytic activity in mice erythrocytes *Mus musculus* Swiss (A) and in human erythrocytes (B).

	LDE	OA	TAX	PTX	OPTX	LDE+OPTX
A	58.26 μM (42.59-79.69)	> 100	> 100	>100	> 100	59.04 μM (26.95-129.4)
B	n.h	94,2%	n.h	n.h	n.h	n.h

n.h – did not cause haemolysis; LDE – LDE Particle ; OA – Oleic Acid; TAX – Commercial Paclitaxel (Taxilan); OPTX – Paclitaxel Oleate; LDE+OPTX –Paclitaxel Oleate Nanoemulsion.

The lipid cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) is made without proteins, but in contact with the plasma acquires apo-E and other apolipoproteins (Maranhao et al., 1993; Maranhao et al., 1992; Mendes et al., 2009; Pires et al., 2008). The apo-E nanoemulsion gives the ability to be recognized by LDL receptors (Graziani et al., 2002). LDE can thus function as a vehicle to target chemotherapeutic agents to cancers with high expression of LDL receptors as in acute myeloid leukemia, multiple myeloma, breast and ovarian cancer, consequently decreasing the systemic toxicity and enhancing the antitumor action of these drugs (Mendes et al., 2009; Pinheiro et al., 2006; Pires et al., 2008).

Studies with LDE and paclitaxel performed by Dias et al (2007) showed that the combination of paclitaxel with LDE is stable in the bloodstream of cancer patients and the pharmacokinetic profile undergoes pronounced changes as compared to commercial formulation. Furthermore, the authors observed that the concentration of paclitaxel oleate and LDE is much higher in cervical cancer than in normal tissue.

Rodrigues et al (2005) found that derivatization of the association with LDE and paclitaxel results in a preparation with higher therapeutic index.

Some of the direct effects of paclitaxel can be observed by altering the viability of erythrocytes according to the conformational changes resulting in stomatocytosis, which seems to be associated with damage to the cell membrane, inducing the formation of pre-hemolytic (de Rossi et al., 2009).

Taking into account that the phospholipid bilayer of red blood cells has an affinity for nonpolar substances and that the LDE particle is rich in cholesterol, hemolysis caused by the LDE and OA was due to increased permeability to these substances, which consequently led cell lysis.

The erythrocyte lysis caused by LDE+OPTX can be justified by fact that nanoemulsions can be stabilized by both a surfactant and a mixture of surfactants and their use in parenteral formulations suggests two mechanisms: solubilization and osmotic lysis. It is usually assumed that at sufficiently high concentration of surfactants, the main mechanism of cell lysis is the solubility, and at low concentrations, the surfactant is intercalated in the membrane inducing permeability changes (Aparicio et al., 2005).

In contrast, TAX, despite having the surfactant Cremophor EL in its composition, PTX did not show hemolytic activity since this surfactant has had its hemolytic activity tested, and proven its absence (Aparicio et al., 2005). As the OPTX, which dissolved in dimethylsulfoxide, also did not show hemolytic activity.

This study also showed that only OA caused human erythrocytes lysis, while the OPTX + LDE and its vehicle, LDE, cause hemolysis only on mice erythrocytes. Part to justify such a situation it is assumed that the structural composition of erythrocyte membranes of humans and mice are quite different.

Human erythrocytes have lower permeability to certain molecules like anionic bicarbonate and chloride ions. Some anions such as anionic lactate and amino acids are transported by specific systems in human erythrocytes. The functional disruption of transport by an anion of a detergent can allow the passage of sodium and potassium ions from the cell. The loss of gradient of these ions can create an osmotic imbalance that results in osmotic lysis of red blood cells (Starek et al., 2008).

Hemolytic substances are those capable of causing damage to the cell plasma membrane. However, correlating cytotoxicity with hemolytic activity, can suggest that the mechanism of cytotoxicity can be or not related to damage to cell membranes (Costa, 2006 ; Wang et al, 2007).

3.2 Effects of Paclitaxel on tumor cells and Peripheral Blood Lymphocytes (PBL)

The effects of paclitaxel on cell viability were determined by Alamar blue after 24, 48 and 72h of treatment. The tables 2 and 3 showed values of IC₅₀ ranging from 12.41 in ACP 02 to 40.78 μ M in PBL.

Table 2

Citotoxicity in gastric and breast adenocarcinoma cells after 72h. The IC₅₀ values represent the interval of 95%.

Linagem	LDE	AO	PTX	OPTX	LDE+OPTX
ACP02	51.75 μ M (48.43-55.30)	>100	>100	>100	17.65 μ M (15.91-19.58)
MCF-7	25.53 μ M (21.23 – 30.70)	>100	>100	>100	12.41 μ M (9.38 – 16.41)
MDA231	26.29 μ M (24.17 - 28.59)	>100	>100	>100	21.82 μ M (19.20 - 24.80)

LDE – LDE Particle; OA – Oleic Acid; PTX – Paclitaxel used in nanoemulsion preparation; OPTX – Paclitaxel Oleate; LDE +OPTX – Paclitaxel Oleate Nanoemulsion.

Table 3

Citotoxicity in peripheral blood lymphocytes. The IC₅₀ values represent the interval of 95%.

inhibitory concentration 50% (IC) / Values in μ M						
PBL	LDE	OA	PTX	OPTX	LDE+OPTX	TAX
24 HOURS	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	40.39 (28.23 – 57.78)
48 HOURS	47.20 (37.00 – 60.23)	> 100	> 100	> 100	40.78 (31.41 – 52.93)	24.61 (15.61 – 38.79)
72 HOURS	39.06 (34.42 – 44.32)	> 100	> 100	> 100	33.99 (28.30- 40.84)	12.50 (9.148 – 17.08)

PBL – *peripheral blood lymphocytes*; LDE – LDE Particle; OA – Oleic Acid; TAX – Commercial Paclitaxel (Taxilan); OPTX – Paclitaxel Oleate; LDE+OPTX – Paclitaxel Oleate Nanoemulsion.

Lundberg et al (2003) determined the IC_{50} after 24, 48, 72 and 96 hours using the MTT assay in HeLa cells to paclitaxel oleate associated with lipid nanoemulsion. The study showed that the nanoemulsion of paclitaxel oleate is cytotoxic to cells and that toxicity is concentration-dependent, especially in the range between 24 and 48 hours. The results for IC_{50} were: 5500 nM, 500 nM, 150 nM and 100 nM, respectively.

Rodrigues et al (2005) demonstrated by the MTT assay (3 - (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), using cell line NCI H292 lung carcinoma, found an IC_{50} of 0.15 μ M for the LDE + OPTX and 0.11 μ M for commercial paclitaxel (Taxol ®), both of which were dissolved in Cremophor EL. The presence of Cremophor EL as a vehicle was responsible for the enhanced cytotoxicity of the substances according to the results found by the authors.

Nikanjam et al. (2007) using paclitaxel oleate and paclitaxel oleate associated with a lipid emulsion similar to LDL, assessed the cytotoxicity to HeLa cells and multiforme glioblastoma (SF-767) after 72 hours by a cell proliferation assay nonradioactive (CellTiter96). This study also evaluated the cytotoxicity of the nanoemulsion in lines of multiforme glioblastoma (SF-267, SF-263 and U-251) whose expression of LDL receptors has been previously determined. The IC_{50} found in three strains, respectively: 7.5 μ M, 2.2 μ M and 6.9 μ M.

The analysis showed that the strain with increased expression of receptors (SF-263) was more sensitive to the drug. The differences found comparing IC_{50} of our work may have occurred because of differences in the expression of LDL receptors of tumor lines, not determined in this study and the methodology employed to evaluate the cytotoxicity.

The Alamar Blue is a test used to indicate growth or cell viability in the monitoring of cell proliferation in culture (Ahmed et al., 1994). Studies have reported that the

Alamar blue is comparable in sensitivity to the test of thymidine incorporation and reduction of tetrazolium (MTT) to measure cell proliferation and cytotoxicity (Ahmed et al., 1994; de Fries and Mitsunashi, 1995; Page et al., 1993).

Our results indicate that the OPTX, OA and PTX did not show cytotoxicity at the concentrations tested, both in lymphocytes and ACP02 as in MCF-7 at all times. Rodrigues et al. (2005) reported in their experiments that the paclitaxel oleate showed no antitumor activity, appearing as an inactive molecule.

3.3 Genotoxic activity

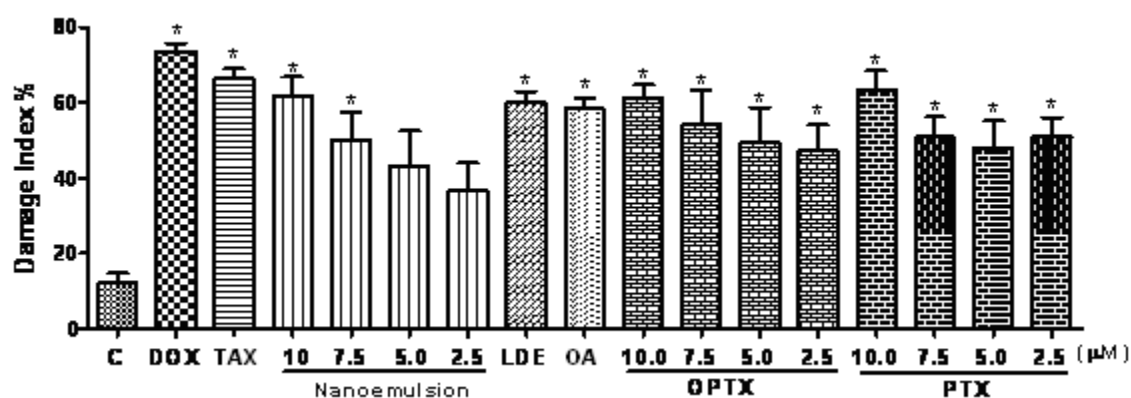


Fig. 1. Substances damage index in peripheral blood lymphocytes

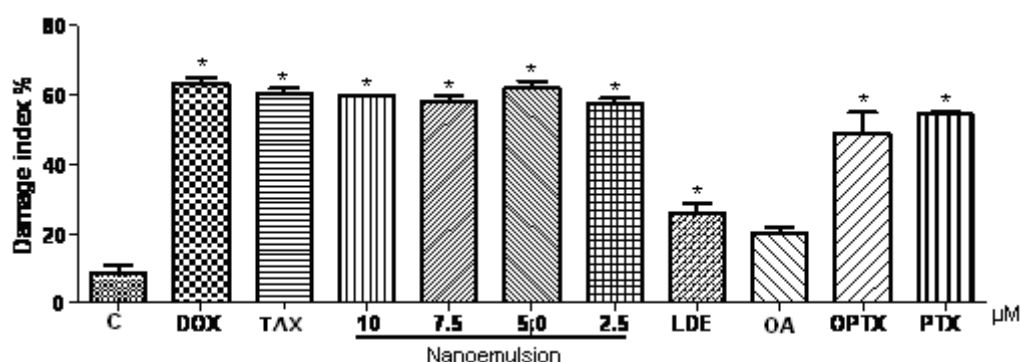


Fig. 2. Substances damage index in ACP02

The DNA damage and defective DNA repair system are the basic molecular events that lead to the initiation and progression of cancer. For this reason, many studies

using the comet test to investigate DNA damage and repair in various tumor cells in response to a variety of damage-causing agents (McKenna et al., 2008).

The concentrations used in the study for the Comet test was based on studies like Digue et al. (1999) and Branham et al. (2004).

Branham et al. (2004), studying paclitaxel damage and repair in lymphocytes by the Comet test, verified the presence of little damage at concentrations 100 and 500 nM, and significant damage at a concentration of 10 μ M. At a concentration of 30 μ M found more damage than the previous one with the presence of apoptotic cells. In this study it was found that the concentration of 10 μ M and the time of 4 hours were ideal conditions for the study of repair. It was found that the effect of DNA damage by paclitaxel is concentration-dependent.

Our results (Figure 1) also show significant damage to DNA at concentrations of 10 and 7.5 μ M to OPTX+LDE and for all concentrations PTX and OPTX.

These results are discordant for OPTX in the previous study because the effect does not appear PTX concentration-dependent. OPTX+LDE already seems to have this effect only in lymphocytes.

You can see that despite being inactive, the OPTX caused DNA damage in lymphocytes at all concentrations tested. According to Rodrigues et al. (2005) the molecule of OPTX is inactive and therefore does not induce DNA damage to lymphocytes and APC02. AOL and LDE also caused damage, but only at a concentration of 10 μ M.

It is known that micronuclei can be induced by two distinct mechanisms: DNA damage and interference with the mitotic apparatus. Aneuploidy is defined as a disturbance in the number of chromosomes induced by interference with the mitotic apparatus and does not correlate with gene mutation or clastogenicity which results in

chromosomal aberrations via DNA damage (Hashimoto et al., 2010). Paclitaxel is known as aneugenic agent by interfering with the organization of the mitotic spindle (Galmarini et al., 2007).

3.4 Mutagenicity activity

None of the animals died during the experiment and they did not exhibit any of the stereotypical symptoms associated with toxicity such as ataxy, diarrhea, increased diuresis, abdominal writhings or seizures. The effects of paclitaxel nanoemulsion on micronucleus induction in mouse bone-marrow are provided in Tables 4 and 5. The frequencies of MNPCEs were similar to the negative control after 24 and 48 h of treatment (Tables 4 and 5). These effects were similar for male and female animals.

Table 4

Frequency of polychromatic erythrocytes micronucleated (PCEMN) in bone marrow of mice of both sexes treated with two concentrations of LDE+OPTX and TAX after 24 hours of exposure.

Treatment	Dose (mg/kg)	PCE	PCEMN	
			N	%
NaCl 0.9% ^a		16000	17	0.17
Cyclophosphamide ^b	50	16000	198*	1.98
LDE+OPTX	0.5	16000	17	0.17
	1.0	16000	9	0.09
TAX	0.5	16000	10	0.01
	1.0	16000	12	0.12

a – negative control; b – positive control. * $p < 0.001$; OPTX+LDE

– Paclitaxel Oleate Nanoemulsion.; PAX – commercial Paclitaxel

Table 5

Frequency of polychromatic erythrocytes micronucleated (PCEMN) in bone marrow of mice of both sexes treated with two concentrations of LDE+OPTX and TAX after 48 hours of exposure.

Treatment	Dose (mg/kg)	PCE	PCEMN	
			N	%
NaCl 0.9% ^a		16000	4	0.04
Cyclophosphamide ^b	50	16000	33*	0.33
LDE+OPTX	0.5	16000	6	0.06
	1.0	16000	8	0.08
TAX	0.5	16000	7	0.07
	1.0	16000	7	0.07

a – negative control; b – positive control. * $p < 0.001$; OPTX+LDE – Paclitaxel Oleate Nanoemulsion.; PAX – commercial Paclitaxel

Tables 4 and 5 show that the paclitaxel nanoemulsion (LDE+OPTX) and the commercial paclitaxel (TAX) did not induce increased formation of micronuclei in bone marrow of mice at 24 and 48 hours. However, Comet assay results indicated that both were capable of causing DNA damage in both lymphocytes and cells of gastric cancer and breast cancer.

Tinwell and Ashby (1994) showed that commercial paclitaxel increased micronucleated erythrocytes after 24h, using injection of 50 mg/kg, intraperitoneally, in CBA mice.

Jagetia and Naiak (1996) reported that commercial paclitaxel increased micronucleated erythrocytes after 24h, using injection of 10 µg/kg, intraperitoneally, in Swiss mice.

Mughal et al. (2010) in an animal study, using peripheral blood lymphocytes, found an increase in micronucleus formation and DNA damage by Comet and Micronucleus assay, respectively, at the same commercial Paclitaxel (Genexol) concentration used in our study (0.5 and 1.0 mg / kg). The DNA damage was observed in the period of 6-

12 hours while the frequency of micronuclei increased in the period of 12-24 hours. We observed the maximum frequency of DNA damage and micronuclei in 36-48 hours, finding a positive correlation between the tests.

Digue et al. (1999) in a study with human lymphocytes using the micronucleus assay *in vitro* reported that paclitaxel is highly genotoxic to human lymphocytes after 48 hours.

4. Conclusion

The LDE is an appropriate vehicle for lipophilic drugs such as paclitaxel. The results showed that the nanoemulsion and paclitaxel oleate showed cytotoxicity and genotoxicity to human lymphocytes and cells of breast and gastric adenocarcinoma but not mutagenesis.

Acknowledgments

We wish to thank CNPq, FAPEAM and FAPESP, for their financial support, consisting of both grants and fellowship awards.

References

- Ades, A., Carvalho, J.P., Graziani, S.R., Amancio, R.F., Souen, J.S., Pinotti, J.A., Maranhao, R.C., 2001. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol* 82, 84-87.
- Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Jr., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211-224.
- Aparicio, R.M., Jose Garcia-Celma, M., Pilar Vinardell, M., Mitjans, M., 2005. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *J Pharm Biomed Anal* 39, 1063-1067.
- Au, J.L., Jang, S.H., Zheng, J., Chen, C.T., Song, S., Hu, L., Wientjes, M.G., 2001. Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. *J Control Release* 74, 31-46.
- Berlinck, R.G., Ogawa, C.A., Almeida, A.M., Sanchez, M.A., Malpezzi, E.L., Costa, L.V., Hajdu, E., de Freitas, J.C., 1996. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 115, 155-163.
- Branham, M.T., Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2004. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutat Res* 560, 11-17.

- Costa, P.M., 2006. Avaliação do potencial antitumoral dos hidrobenzofuranóides isolados das folhas da *Tapirira guianensis* (anacardiaceae), Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- de Fries, R., Mitsuhashi, M., 1995. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to ³H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 9, 89-95.
- de Rossi, T., Panis, C., Victorino, V.J., Freitas, L.F., Herrera, A.C.S.A., Cecchini, A.L., Cecchini, R., 2009. Breast cancer and oxidative stress in chemotherapy. *Appl. cancer res* 29, 150-156.
- Dias, M.L., Carvalho, J.P., Rodrigues, D.G., Graziani, S.R., Maranhao, R.C., 2007. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* 59, 105-111.
- Digue, L., Orsiere, T., De Meo, M., Mattei, M.G., Depetris, D., Duffaud, F., Favre, R., Botta, A., 1999. Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 34, 269-278.
- Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D.B., Papahadjopoulos, D., 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51, 691-743.
- Fetterly, G.J., Straubinger, R.M., 2003. Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats. *AAPS PharmSci* 5, E32.
- Galmarini, C.M., Bouchet, B.P., Falette, N., Vila, L., Lamblot, C., Audouyoud, C., Bertholon, J., Puisieux, A., 2007. Weekly administration of paclitaxel induces long-term aneugenicity in nude mice. *Cancer Biol Ther* 6, 377-382.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A., 2001. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 37, 1590-1598.
- Genta, M.L.N.D., 2006. Farmacocinética e captação tecidual do paclitaxel associado à nanoemulsão (LDE) em pacientes com neoplasias malignas do trato genital feminino., Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ginsburg, G.S., Small, D.M., Atkinson, D., 1982. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 257, 8216-8227.
- Graziani, S.R., Igreja, F.A., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amancio, R.F., Pinotti, J.A., Maranhao, R.C., 2002. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 85, 493-497.
- Hashimoto, K., Nakajima, Y., Matsumura, S., Chatani, F., 2010. An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. *Toxicol In Vitro* 24, 208-216.
- Hatakeyama, S., Hayasaki, Y., Masuda, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1996. Mechanism for mouse strain differences in the protective effect of Sudan III against the in vivo genotoxicity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol Lett* 89, 231-239.
- Hoarau, D., Delmas, P., David, S., Roux, E., Leroux, J.C., 2004. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res* 21, 1783-1789.

- Jagetia, G.C., Nayak, V., 1996. Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow. *Mutat Res* 349, 219-227.
- Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H., 2005. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine* 1, 193-212.
- Kristl, J., Volk, B., Gasperlin, M., Sentjurs, M., Jurkovic, P., 2003. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur J Pharm Sci* 19, 181-189.
- Lundberg, B.B., Risovic, V., Ramaswamy, M., Wasan, K.M., 2003. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J Control Release* 86, 93-100.
- Maranhao, R.C., Cesar, T.B., Pedroso-Mariani, S.R., Hirata, M.H., Mesquita, C.H., 1993. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids* 28, 691-696.
- Maranhao, 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., 1994. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res* 54, 4660-4666.
- Maranhao, R.C., Garicochea, B., Silva, E.L., Llacer, P.D., Pileggi, F.J., Chamone, D.A., 1992. 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* 25, 1003-1007.
- McKenna, D.J., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V.J., 2008. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 23, 183-190.
- Mendes, S., Graziani, S.R., Vitorio, T.S., Padoveze, A.F., Hegg, R., Bydlowski, S.P., Maranhao, R.C., 2009. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: a new strategy for neoadjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol* 112, 400-404.
- Menendez, J.A., del Mar Barbacid, M., Montero, S., Sevilla, E., Escrich, E., Solanas, M., Cortes-Funes, H., Colomer, R., 2001. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 37, 402-413.
- Miele, E., Spinelli, G.P., Tomao, F., Tomao, S., 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine* 4, 99-105.
- Moghimi, S.M., Szebeni, J., 2003. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 42, 463-478.
- Mughal, A., Vikram, A., Ramarao, P., Jena, G.B., 2010. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutat Res* 700, 86-94.
- Murador, P., Deffune, E., 2007. Structural aspects of the erythrocyte membrane. *Rev. bras. hematol. hemoter* 29, 168-178.
- Nikanjam, M., Gibbs, A.R., Hunt, C.A., Budinger, T.F., Forte, T.M., 2007. Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *J Control Release* 124, 163-171.
- OECD, 1997. Guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test., Paris, France.
- Page, B., Page, M., Noel, C., 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol* 3, 473-476.

- Pinheiro, K.V., Hungria, V.T., Ficker, E.S., Valduga, C.J., Mesquita, C.H., Maranhao, R.C., 2006. 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 Chemother Pharmacol* 57, 624-630.
- Pires, L.A., Hegg, R., Valduga, J., Graziani, S.R., Rodrigues, D.G., Maranhao, R.C., 2008. 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 Chemotherapy Pharmacology* 63, 281-287.
- Ramos, L.S., 1991. Interação de detergentes não-iônicos com a membrana eritrocitária: estudos sobre a ação de detergentes da série Tween., instituto de Biologia. UNICAMP, Campinas.
- Rodrigues, D.G., Maria, D.A., Fernandes, D.C., Valduga, C.J., Couto, R.D., Ibanez, O.C., Maranhao, R.C., 2005. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 55, 565-576.
- Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665-667.
- Schiff, P.B., Horwitz, S.B., 1979. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1561-1565.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Starek, A., Szabla, J., Kiec-Kononowicz, K., Szymczak, W., 2008. Comparison of the in vitro hemolytic effects produced by alkoxyacetic acids on human and rat erythrocytes. *Int J Occup Med Environ Health* 21, 147-155.
- ten Tije, A.J., Verweij, J., Loos, W.J., Sparreboom, A., 2003. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet* 42, 665-685.
- Tice, R.R., Luke, C.A., Drew, R.T., 1989. Effect of exposure route, regimen, and duration on benzene-induced genotoxic and cytotoxic bone marrow damage in mice. *Environ Health Perspect* 82, 65-74.
- Tinwell, H., Ashby, J., 1994. Genetic toxicity and potential carcinogenicity of taxol. *Carcinogenesis* 15, 1499-1501.
- van Zuylen, L., Verweij, J., Sparreboom, A., 2001. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs* 19, 125-141.
- Vitols, S., Angelin, B., Ericsson, S., Gahrton, G., Juliusson, G., Masquelier, M., Paul, C., Peterson, C., Rudling, M., Soderberg-Reid, K., et al., 1990. Uptake of low density lipoproteins by human leukemic cells in vivo: relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for selective chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2598-2602.
- Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M., Yu, B., 2007. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorg Med Chem* 15, 2528-2532.

7. REFERÊNCIAS

ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S.R.; AMANCIO, R.F.; SOUEN, J.S.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. . Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecologic Oncology**, V.82, p. 84–87, 2001.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, V. 170, N. 2, p. 211-224, 1994.

ALEXOPOULOS, C. G.; POURNARAS, S.; VASLAMATZIS, M.; AVGERINOS, A.; RAPTIS, S.. Changes in serum lipids and lipoprotein in cancer patients during chemotherapy. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, Vol. 30, p. 412-416, 1992.

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. **International Journal of Nanomedicine**, Vol. 5, p. 679-686, 2010.

ANDERSON, R. G. W.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.. Inefficient internalization of receptor-bound low density lipoprotein in human carcinoma A-431 cells. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 88, p. 441-452, 1981.

AU, J. L.; JANG, S. H.; ZHENG, J. ; CHEN, C. T.; SONG, S.; HU, L.; WIENTJES, M. G. Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. **Journal of Controlled Release**, Vol. 74, p. 31-46, 2001.

BALMIAN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature genetics**, (supplement) V. 33, p. 238-244, 2003.

BERLINCK, R. G.; OGAWA, R. G.; ALMEIDA, C. A.; SANCHEZ, M. A.; MALPEZZI, E. L.; COSTA, L. V.; HADJU, E.; DE FREITAS, J. C.. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, V. 115, N. 2, p. 155-163, 1996.

BONOMI, P.; KIM, K.; FAIRCLOUGH, D.; CELLA, D.; KUGLER, J.; ROWINSKY, E.; JIROUTEK, M.; JOHNSON, D.. Comparison of Survival and

Quality of Life in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Two Dose Levels of Paclitaxel Combined With Cisplatin Versus Etoposide With Cisplatin: Results of an Eastern Cooperative Oncology Group Trial. **Journal of Clinical Oncology**, Vol. 18, N. 3 (February), p. 623-631, 2000.

BURLISSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research**, V. 627, p. 31-35, 2007.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, V. 20, N. 4, p. 245- 254, 2005.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L.. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, Vol.29, N. 1, p. 51-59, 2009.

CHITHRANI, B. D.; STEWART, J.; ALLEN, C.; JAFFRAY, D. A. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. **Nanomedicine**, Vol. 5, N. 2, p. 118-127, 2009.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, Vol. 24, p. 950-954, 1992.

COLLINS A. R. The Comet Assay for DNA damage e repair: principles, applications e limitations. **Molecular Biotechnology**, V. 26, p. 249-261, 2004.

DE ROSSI, T.; PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; FREITAS, L. F. de; HERRERA, AMARAL, A. C. S.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R.. Breast Cancer and Oxidative Stress in Chemotherapy. **Applied Cancer Research**, Vol. 29, N. 4, p. 150-156, 2009.

DE FRIES, R. ; MITSUHASHI, M.. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. **Journal Clinical Lab Anal**, Vol. 9, p. 89-95, 1995.

DIGUE, L.; ORSIE`RE, T.; DE ME, M.; MATTE, M. G.; DEPETRIS, D.; DUFFAUD, F.; FAVRE, R.; BOTTA, A. Evaluation of the Genotoxic Activity of Paclitaxel by the in Vitro Micronucleus Test in Combination With Fluorescent in Situ Hybridization of a DNA Centromeric Probe and the Alkaline Single Cell Gel

Electrophoresis Technique (Comet Assay) in Human T-Lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, V. 34, p. 269-278, 1999.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, V. 23, N. 3, p. 191-205, 2008.

DRUMMOND, D. C.; MEYER, O.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological Reviews**, Vol. 51, N. 4, p. 691-743, 1999.

FABRICANT, M.; BROITMAN, S. A.. Evidence for deficiency of low density lipoprotein receptor on human colonic carcinoma cell lines. **Cancer Research**, Vol. 50, p.632-636, 1990.

FAYETTE, J.; MONTELLA, A.; CHABAUD, S.; BACHELOT, T. ; POMMIER, P. ; GIRODET, D. ; RACADOT, S. ; MONTBARBON, X. ; FAVIER, B. ; ZROUNBA, P.. Paclitaxel is effective in relapsed head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective study of 66 patients at a single institution. **Anti-Cancer Drugs**, Vol. 00, N. 00, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, V. 455, p. 81-95, 2000.

FETTERLY, G. J.; STRAUBINGER, R. M. Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats. **American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) PharmSci**, Vol. 5, N. 4, p. 1-11, 2003.

FIRESTONE, R.. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. **Bioconjugate Chemistry**, Vol. 5, p. 105-113, 1994.

GAL, D.; MACDONALD, P.C.; PORTER, J.C.; SIMPSON, E.R. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoprotein metabolism. **International Journal of Cancer**, V. 28, p.315-319, 1981.

GAL, D.; PORTER, J.C.; SIMPSON, E.R. ; SNYDER, J. M.. Defective internalization of low density lipoprotein in epidermoid cervical cancer cells. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 92, p. 597-603, 1982.

GELDERBLUM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**, Vol. 37, p. 1590-1598, 2001.

GENTA, M. L. N. D.. **Farmacocinética e captação tecidual do paclitaxel associado à nanoemulsão (LDE) em pacientes com neoplasias malignas do trato genital feminino**. 2006. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, São Paulo.

GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. **Journal Biological Chemical**, V.57, p. 8216-8277, 1982.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, V. 455, p. 21-28, 2000.

GRAZIANI, S.R.; IGREJA, F.A.F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L.I.; BARBOZA, R.; AMÂNCIO, R.F.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. **Gynecologic Oncology**, V. 85, p.493-497, 2002.

HALEY, B.; FRENKEL, E.. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, Vol. 26, p. 57-64, 2008.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, V. 39, p. 843-858, 2001.

HO, Y.K.; SMITH, R.G.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. . Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, V. 52, p.1099-1114, 1978.

HOARAU, D.; DELMAS, P.; DAVID, S.; ROUX, E.; LEROUX, J. C. Novel long-circulating lipid nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, Vol. 21, N. 10, p. 1783-1789, 2004.

HOLMES, F.; WALTERS, R.; THERIAULT, R.; FORMAN, A.; NEWTON, L.; RABER, M.; BUZDAR, A.; FRYE, D.; HORTOBAGYI, G. Phase II trial of taxol an active drug in metastatic breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, V. 18, p. 1797-1805, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Endereço: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em 16.08.2011.

LEAL, M. F.; NASCIMENTO, J. L. M. do; SILVA, C. E. A. da; LAMARÃO, M. F. V.; CALCAGNOC, D. Q.; KHAYATA, A. S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; CABRAL, I. R., M. SMITH, A. C.; BURBANO, R. R.. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, Vol. 195, p. 85-91, 2009.

LOUREIRO, A. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química nova**, Vol. 25, N. 5, p. 777–793, 2002.

LUNDBERG, B. B.; RISOVIC, V.; RAMASWANY, M.; WASAN, K. M.. A lipophilic paclitaxel derivate incorporated a lipid emulsion for parenteral administration. **Journal of Control Release**, V. 86, p. 93-100, 2003.

JHA, A. W.. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, V. 23, N. 3, p. 207- 221, 2008.

JULIUSSON, G.; VITOLS, S.. Impaired low-density lipoprotein receptor activity in chronic B-lymphocytic leukemia cells. **European Journal of Haematology**, Vol. 40, p. 18-24, 1988.

KARLSSON, H. L..The comet assay in natoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Vol. 398, p. 651-666, 2010.

KRISTL, J.; VOLK, B.; GASPERLIN, M.; SENTJURC, M.; JURKOVIC, P. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 19, p. 181-189, 2003.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, V. 1, p. 193-212, 2005.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS; COTRAN. Pathology Basis of Disease, 7th ed. China: WB Saunders, 1552, 2004.

MA, W. W.. ADJEI, A.A. Novel Agents on the Horizon for Cancer Therapy. **CA Cancer Journal of Clinicians**, Vol. 59, p. 111-137, 2009.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D.. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, V.189, p.103-112, 1987.

MALETINSKA, L.; BLAKELY, E. A.; BJORNSTAD, K. A.; DEEN, D. F.; KNOFF, L. J.; FORTE, T. M.. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. **Cancer Research**, Vol. 60, p. 2300-2303, 2000.

MARANHÃO R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; LLACER, P.D.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, V.25, p. 1003-1007, 1992.

MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO, M.T.B; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H. Metabolic behavior in rats of a nanoprotein microemulsion resembling LDL. **Lipidis**, V.28, p. 691-696, 1993.

MARANHÃO R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; DORLHIAC-LLACER, P.; CADENA, S.M.S. COELHO, I.J.C.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Research**, V.54, p.4660-4666, 1994.

MARKERT, J. M.; DE VITA, V. T. ; HELLMAN, S. ; ROSENBERG, S. A.. Glioblastoma multiforme. **Jones and Bartlett Publishers**, Boston, MA, 2005.

MARTINEZ, G.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, S. A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation Research**, V. 544, p. 115-127, 2003.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

McGUIRE, W.P.; HOSKINS, W.J.; BRADY, M.F.; KUCERA, P.R.; PARTRIDGE, E.E.; LOOK, K.Y.; CLARKE-PEARSON, D.L.; DAVIDSON, M. Cyclophosphamide

and cisplatin compared with paclitaxel with patients with stage III and IV ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**, V. 334, p.1-6, 1996.

McKENNA, D. J.; McKEOWN, S. R.; McKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, V. 23, N. 3, p. 183- 190, 2008.

MENDES, S.; GRAZIANI, S. R.; VITÓRIO, T. S.; PADOVEZE, A. F.; HEGG, R.; BYDŁOWSKI, 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. **Gynecologic Oncology**, Vol. 112, p. 400-404, 2009.

MIELE, E.; SPINELLI, G. P.; MIELE, E.; TOMAO, F.; TOMAO, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**, V. 4, p. 99-105, 2009.

MOGHIMI, S. M.; SZE BENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, Vol. 42, p. 463-478, 2003.

NARAYANA, A.; LEIBEL, S. A.. **Textbook of radiation oncology**, Elsevier Inc., Philadelphia, PA, p. 463-495, 2004.

NIKANJAM, M.; GIBBS, A. R.; HUNT, C. A.; BUDINGER, T. F.; FORTE, T. M.. Sintetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. **Journal of Controlled Release**, Vol. 124, p. 163-171, 2007.

NORNOO, A. O.; OSBORNE, D. W.; CHOWC, D. S.-L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 349, p. 108–116, 2008.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. What do micronuclei contain?. **Mutagenesis**, V. 18, N. 3, p. 221-233, 2003.

OECD (Organization for Economic Co-operation and development). **Guideline for Testing of Chemicals**, Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD, Paris, France, 1997.

OJIMA, I.; CHEN, J.; SUN, L.; BORELLA, C. P.; WANG, T.; MILLER, M. L.; LIN, S.; GENG, X.; KUZNETSOVA, L.; QU, C.; GALLAGER, D.; ZHAO, X.; ZANARDI, I.; XIA, S.; HORWITZ, S. B.; CLAIR, J. M.; GUERRIERO, J. L.; BAR-SAGI, D.; VEITH, J. M.; PERA, P.; BERNACKI, R. J.. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Generation Taxoids. **Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 51, N. 11, p. 3203-3221, 2008.

PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOEL, C.. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal of Oncology**, Vol. 3, p. 473-476, 1993.

PIRES, L.A.; HEGG, R.; VALDUGA, 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 Chemotherapy Pharmacology**, V. 63, p. 281-287, 2008.

PINHEIRO, K.; HUNGRIA, V. T. M.; FICKER, E. S.; VALDUGA, C.; 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 Chemotherapy Pharmacology**, Vol. 57, p. 624-630, 2006.

PREET, R.; MOHAPATRA, P.; MOHANTY, S.; SAHU, S. K.; CHOUDHURI, T.; WYATT, M. D.; KUNDU, C. N.. Quinacrine has anti-cancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity. **Internacional Journal of Cancer**, Vol. 5, 2011.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

RODRIGUES, D.G.; MARIA, D.A.; FERNANDES, D.C.; VALDUGA, C.J.; COUTO, R.D.; IBANEZ, O.C.M.; MARANHÃO, R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, V. 55, p. 565-576, 2005.

RUDLING, M. J.; REIHNER, E.; EINARSSON, K.; EWERTH, S.; ANGELIN, B.. Low density lipoprotein receptor-binding activity in human tissues: quantitative importance of hepatic receptors and evidence for regulation of their expression in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Vol. 87, 3469-3473, 1990a.

RUDLING, M. J.; ANGELIN, B.; PETERSON, C. O.; COLLINS, V. P.. Low density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumors and its relation to the cholesterol requirement. **Cancer Research**, Vol. 50, p. 483-491, 1990b.

SALMONM, S.E. Em **Farmacologia Básica & Clínica**, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

SCHIFF, P.; HORWITZ, S. Promotion of microtubules assembly *in vitro* by taxol. **Nature**, V. 277, p. 665-667, 1979.

SHAPOSHNIKOV, S. A.; SALENKO, V. B.; BRUNBORG, G.; NYGREN, J.; COLLINS, A. R. Single-cell electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments?. **Electrophoresis**, V. 29, p. 3005-3012, 2008.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor. Em: **Oncologia Molecular**, p.29, 2003.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D.. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 235, p. 179-192, 2002.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Vol. 175, p. 184-191, 1988.

TICE, R.R, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU J.C., SASAKI Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagen**, V. 35, p. 206-221, 2000.

TEN TIJE, A. J.; VERWEIJ, J.; LOOS, W. J.; SPARREBOOM, A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. **Clinical Pharmacokinetics**, Vol. 42, N. 7, p. 665-685, 2003.

YOUN, C. K.; SONG, P. I.; KIM, M. H.; KIM, J. S.; HYUN, J. W.; CHOI, S. J.; YOON, S. P.; CHUNG, M. H.; CHANG, I. Y.; YOU, H. J.. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase suppresses the oxidative stress-induced apoptosis through a p53-mediated signaling pathway in human fibroblasts. **Molecular Cancer Research**, V. 5, n. 10, p. 1083-1098, 2007.

VITOLS, S.; ANGELIN, B.; ERICSSON, S.; GAHRTON, G.; JULIUSSON, G.; MASQUELIER, M.; PAUL, C.; PETERSON, C.; RUDLING, M.; SODERBERG-REID, K.; TIDEFELT, U. Uptake of low density lipoproteins by human leukemic cells in vivo: Relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for selective chemotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Vol. 87, p. 2598-2602, 1990.

VITOLS, S; GAHRTON, G; PETERSON, C. Significance of the Low-density lipoprotein (LDL) receptor pathway for the in vitro accumulation of AD-32 incorporated into LDL in normal and leukemic white blood cells. **Cancer Treatment Reports**, Vol. 68, N. 3, p. 515-520, 1984a.

VITOLS, S; GAHRTON, G; OST, A.; PETERSON, C. Elevated lowdensity lipoprotein receptor activity in leukemic cells with monocytic differentiation. **Blood**, V. 63, p. 1186-1193, 1984b.

WANG, X.;YANG, L.; CHEN, Z.; SHIN, D. M.. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. **CA Cancer Journal of clinicians**, Vol. 58, p. 97-110, 2008.

WANG, M.; THANOU, M.. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, Vol. 62, p. 90-99, 2010.

WARD, L. S.. Entendendo a tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, Vol. 46, N. 4, p. 351-360, 2002.

XIAO, H.; VERDIER-PINARD, P.; FERNANDEZ-FUENTES, N.; BURD, B.; ANGELETTI, R.; FISER, A.; HORWITZ, S. B.; ORR, G. A.. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**, Vol. 103, N. 27, p. 10166-10173, 2006.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K.. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 86, p. 1707–1717, 2010.

ZUYLEN, L. van; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. **Investigational New Drugs**, Vol. 19, p. 125-141, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

PREPARAÇÃO DA NANOEMULSÃO

A nanoemulsão rica em colestrerol, denominada LDE, será preparada a partir de uma mistura lipídica composta por 40 mg de oleato de colesteril, 20 mg de fosfatidilcolina, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A emulsificação dos lipídios prolongada por irradiação ultra-sônica em meio aquoso é um processo de duas etapas da ultracentrifugação da emulsão bruta com ajuste de densidade através da adição de KBr. Para obter a microemulsão de LDE será utilizado o método descrito por Ginsburg e colaboradores (1982) e modificado por Maranhão e colaboradores (1993). A LDE será dializada em solução salina e filtrada em membrana de 0.22 μm para uso nos experimentos. O oleato de Paclitaxel será incorporado na LDE pela solubilização do oleato de Paclitaxel em etanol sendo adicionado dentro da emulsão. A solução será sonicada por 30 min a 70° C usando o sonicador (Branson Sonifer 450 – Danbury CT) equipado com uma sonda (1 cm) de titânio. O oleato de Paclitaxel será centrifugado a 3000 rpm por 15 min para separar o oleato de Paclitaxel não ligado. A LDE- oleato de Paclitaxel será passada pelo filtro de 0.22 μm e armazenada a 4° C até seu uso. O rendimento de cada preparação será doseado por cromatografia de camada líquida, antes de cada uso.



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

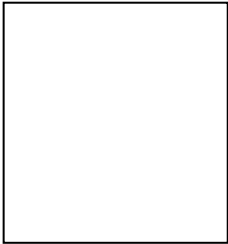
Convidamos o (a) Sr. (a). para participar do Projeto de Pesquisa “**Estudo da citotoxicidade e genotoxicidade de uma nanoemulsão de Paclitaxel**”, que será realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende utilizar linfócitos isolados de sangue de voluntários saudáveis para sabermos se a substância testada é segura ou se causa dano ao DNA de linfócitos humanos. Esta informação enriquecerá o conhecimento científico sobre as vantagens de uso de nanoestruturas como sistemas de liberação de fármacos.

Os pesquisadores, Dra. **Marne Carvalho de Vasconcellos** e **Francivaldo de Oliveira Lima Versiani** solicitam sua autorização para coletar (tirar) 10 mL de sangue para que este trabalho possa ser desenvolvido. Previamente, será preenchida uma ficha de avaliação contendo perguntas que serão usadas como roteiro para obter informações relacionadas a sua saúde. Posteriormente, será feita a coleta do sangue em uma veia de seu braço. O procedimento pode causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta. O volume de sangue que não for utilizado será armazenado, conforme a resolução n.º 347, de 13 de Janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde, para ser usado com a mesma finalidade em estudos futuros.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr. (a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta pesquisa científica.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com os pesquisadores pelo telefone (92) 3305-5000 (Secretaria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas) ou no endereço: Rua Alexandre Amorim, N. 330, Aparecida.

Afirmo que fui informado (a) sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

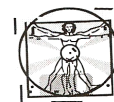
_____ ou		____ - ____ - ____
Assinatura do participante		Data
_____		____ - ____ - ____
Pesquisador Responsável		Data

Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 0044.0.115.000-10, intitulado: **“ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE UMA NANOEMULSÃO DE PACLITAXEL”**, tendo como pesquisador responsável Francivaldo de Oliveira Lima.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus (EEM) da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 28 de abril 2010.

Prof.MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador CEP/UFAM

ANEXO D

**UFAM****UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS****FICHA DE AVALIAÇÃO DE SAÚDE**

1. Qual a sua idade? _____
2. Você considera o seu consumo de bebidas alcoólicas:
☐ Baixo ☐ Moderado ☐ Elevado ☐ Não bebe
3. Em relação ao consumo de cigarro (fumo):
☐ Baixo ☐ Moderado ☐ Elevado ☐ Não fuma
4. Você está tomando algum medicamento hoje?
☐ Sim. Qual? _____ ☐ Não
5. Você possui alguma doença crônica?
(Diabetes, hipertensão, reumatismo, doença do coração, doença renal ou hepática)
☐ Sim. Qual? _____ ☐ Não
6. Você teve alguma doença recentemente? (últimos 30 dias)
☐ Sim. Qual? _____ ☐ Não



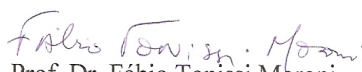
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 019/2011-CEEA, sobre “Estudos da citotoxicidade e genotoxicidade de uma nanoemulsão de paclitaxel” sob responsabilidade de **FRANCIVALDO DE OLIVEIRA LIMA VERSIANI e MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de **15/04/2011**.

Manaus, 19 de abril de 2011


Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni
Presidente do CEEA-UFAM