

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich

por

Laís Maroni Portugal

Belo Horizonte

Fevereiro/2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich

por

Laís Maroni Portugal

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Coorientação: Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte

Fevereiro/2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P839a Portugal, Laís Maroni.
2012

Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich / Laís Maroni Portugal. – Belo Horizonte, 2012.

XXV. 97 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 112 -122.

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Neoplasias/quimioterapia 2. Lipossomos/uso terapêutico 3. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais/métodos 4. Carcinoma de Ehrlich/quimioterapia I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira de (Orientação). III. Oliveira, Mônica Cristina de (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.994

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich

por

Laís Maroni Portugal

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (**Presidente**)

Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Dra. Mariléia Chaves Andrade

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Dra. Sílvia Passos Andrade

Suplente: Dra. Cristina Toscano Fonseca

Tese defendida e aprovada em: 27/02/2012

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Dr. Olindo Assis Martins Filho – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Ms. Amanda Cardoso de Oliveira Silveira – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte

Ms. Ana Flávia de Carvalho Ribeiro – Instituto de Ciências Biológicas

Ms. Cristina Maria de Souza – Instituto de Ciências Biológicas

Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes – Instituto de Ciências Biológicas

Dr. Geovani Dantas Cassali – Instituto de Ciências Biológicas

Dra. Marília Martins Melo – Escola de Veterinária

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasília

Dra. Iramaya Rodrigues Caldas

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Diamantina

Dra. Elaine Amaral Leite – Departamento de Farmácia-Bioquímica

SUPORTE FINANCEIRO:

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CPqRR/FIOCRUZ: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de um oásis e
cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.
Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que
enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.
Naquele dia, percebi que eu não era o melhor e que talvez nunca tivesse sido.
Deixei de me importar com quem ganha ou perde.
Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir;
e que o melhor triunfo é poder chamar alguém de amigo.
Descobri que o amor é mais do que um simples estado de enamoramento,
o amor é uma filosofia de vida.
Naquele dia deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados
e passei a ser uma tênue luz no presente.
Aprendi que de nada vale ser luz e não iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar...
agora simplesmente durmo para sonhar.”*

(Walter Elias Disney)

Dedico este trabalho ao meu bem mais precioso - minha FAMÍLIA:

meus pais, *Flávio e Joyce*

minhas irmãs, *Letícia e Ludmila*

meu esposo, *André.*

VII

Agradecimentos

À minha família, por dividirem comigo os momentos de angústia e dificuldades. Vocês são fontes constantes de amor, dedicação, apoio e alegria.

Ao André, por ser companheiro diário e sempre me dar força para continuar. Você é meu maior exemplo de superação e vitória.

À Dra. Andréa Teixeira de Carvalho pela confiança em meu trabalho e pela orientação.

À Profa. Mônica Cristina de Oliveira pela amizade, oportunidade, confiança e pela co-orientação deste trabalho.

À Dra. Iramaya Rodrigues Caldas, que abriu o caminho para que eu viesse desenvolver o projeto do doutorado no CPqRR.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, agradeço pela oportunidade de trabalho em seu laboratório e pela convivência e aprendizado diários.

Aos colaboradores Ms. Amanda Cardoso de Oliveira Silveira, Profa. Elaine Maria de Souza Fagundes, Prof. Geovani Dantas Cassali, Profa. Marília Martins Melo, Dra. Iramaya Rodrigues Caldas, Profa. Elaine Amaral Leite, Ms. Cristina Maria de Souza, Ms. Ana Flávia de Carvalho Ribeiro, que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao apoio técnico do LBDM: Fabiana Paixão, Fabiana Rocha, Roquéia Ferreira, Salvina Campos, Rebeca Lima, Bruno Marteleto, Máisa de Oliveira e da Plataforma de Citometria, Ana Beatriz pela amizade e pela disponibilidade no que fosse preciso.

Às grandes amizades feitas no LBDM durante o trabalho. Amanda Cardoso, Amanda Fagundes, Ana Carolina Campi, Aretha Silva, Bruno Marteleto, Bruno Trindade, Camila Magalhães, Dâmarys Pires, Daniel Chaves, Danielle Vitelli, Danielle Zauli, Erick Eidy, Fabiana Paixão, Fabiana Rocha, Fernanda Freire, Fernanda Trindade, Jamilson Neves, Jerusa Arantes, Livia Passos, Luíza Pacheco, Máisa de Oliveira, Marco Túlio Porto, Marília Vasconcelos, Matheus Fernandes, Maurício Azevedo, Rafaella Gaiotti, Rebeca Lima, Renato Abdala, Renato Sathler, Salvina Campos, Simone Brutman: obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF – FAFAR/UFMG): Eduardo, Elaine, Talita, Álvaro, Cristiane Giuberti, Sália, Soninha, José Geraldo, Luciene, André, Guilherme Carneiro, Martinha, Isabel, João, Diego, Samuel, Elton, Andréa, Daniel, Juliana, Ricardo, Juçara, Danielle, que fizeram parte desses anos de trabalho, agradeço pela amizade e convivência.

Aos funcionários do Biotério do CPqRR, especialmente do Biotério de Experimentação, pelos cuidados diários destinados aos animais do trabalho: Vera, Thiago, Jaci e Moisés.

Agradeço aos colegas da pós-graduação pela convivência no dia-a-dia das disciplinas e pelos desabafos nos corredores do CPqRR.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos órgãos financiadores, fundamentais para a realização deste trabalho.

Sobretudo, agradeço a Deus, por estar sempre iluminando os meus passos, colocando pessoas especiais na minha vida e abrindo portas para novos desafios.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e à Faculdade de Farmácia da UFMG, pela oportunidade de realização do Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

Sumário

Lista de Figuras	XIV
Lista de Tabelas	XIX
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XX
Resumo	XXII
Abstract.....	XXIV
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 REVISÃO DE LITERATURA	31
3.1 Aspectos gerais do câncer.....	32
3.2 Carcinomatose peritoneal.....	33
3.3 Tumor de Ehrlich.....	35
3.4 Tratamentos utilizados no câncer.....	36
3.5 Cisplatina	37
3.6 Lipossomas	40
3.7 Lipossomas contendo CDDP	43
3.7.1 Administração intraperitoneal.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Material.....	47
4.2 Preparação de SpHL-CDDP	47
4.2.1 Solução de CDDP	47
4.2.2 Preparação de SpHL-CDDP.....	47
4.2.2.1 Obtenção de uma emulsão água/óleo (O/A)	47
4.2.2.2 Obtenção de lipossomas.....	48
	XI

4.3 Caracterização química e físico-química de SpHL-CDDP.....	48
4.3.1 Determinação do teor de encapsulação.....	48
4.3.2 Determinação do diâmetro e potencial zeta.....	49
4.4 Experimentação in vivo.....	50
4.4.1 Animais do estudo.....	50
4.4.2 Inoculação de células do tumor ascítico de Ehrlich.....	50
4.4.3 Delineamento experimental para avaliação da sobrevida e eficácia antitumoral após tratamento.....	50
4.4.4 Coleta de sangue e líquido ascítico.....	51
4.4.5 Análise da viabilidade celular e quantificação da apoptose.....	52
4.4.5.1 Estratégia de análise dos dados no citômetro de fluxo.....	52
4.4.6 Avaliação do ciclo celular.....	53
4.4.6.1 Estratégia de análise dos dados no citômetro de fluxo.....	54
4.4.7 Avaliações hematológicas e bioquímicas.....	56
4.4.8 Avaliações microscópicas.....	57
4.4.9 Determinação dos níveis de VEGF no líquido ascítico.....	58
4.4.10 Caracterização das citocinas e quimiocina presentes no líquido ascítico.....	58
4.4.11 Estratégias de análise dos dados no citômetro de fluxo.....	59
4.4.12 Considerações éticas.....	60
4.4.13 Análises estatísticas.....	61
5 RESULTADOS.....	62
5.1 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	63
5.2 Estudo da eficácia antitumoral.....	63
5.2.1 Sobrevida.....	63
5.2.2 Características gerais dos animais.....	65
5.2.3 Diâmetro da circunferência abdominal.....	66
5.3 Perfil das células tumorais.....	69

5.3.1 Viabilidade celular	69
5.3.2 Apoptose	70
5.3.3 Avaliação do ciclo celular	73
5.4 Avaliação toxicológica	75
5.4.1 Peso corporal dos animais	75
5.4.2 Estudo histopatológico	76
5.4.2.1 Rins, fígado e baço	76
5.4.3 Investigações hematológicas	79
5.4.4 Investigações bioquímicas	81
5.4.4.1 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal	81
5.4.4.2 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática	82
5.5 Avaliação da resposta do tratamento com SpHL-CDDP	84
5.5.1 Quantificação de VEGF no líquido ascítico	84
5.5.2 Quantificação de citocinas e quimiocinas	85
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	105
8 PERSPECTIVAS	107
9 ANEXOS	109
9.1 UFMG/CETEA Certificado	110
9.2 MS/FIOCRUZ/CEUA Licença	111
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

Lista de Figuras

- Figura 1.** Biologia das metástases (adaptado de ALBERTS, 2004)..... 34
- Figura 2.** Fórmula estrutural da cisplatina..... 38
- Figura 3.** Formação dos aductos da CDDP. O átomo de platina se liga covalentemente à posição N7 da guanina e N3 da adenina, formando ligações cruzadas 1,2 ou 1,3 intrafilamentos ou ligações cruzadas interfilamentos. Pt (platina), G (guanina), A (adenina). Adaptado de BOULIKAS, 2004 (45)..... 39
- Figura 4.** Características estruturais dos vários tipos de lipossomas: convencionais - (A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma e (B) fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; (C) catiônico; (D) de circulação prolongada (Stealth®) – com polímero hidrofílico na superfície; (E, F) sítio-específicos com anticorpos ligantes e (G) com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossomas – com envelope viral na superfície; (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos. Adaptado de Batista, 2007 (68)..... 42
- Figura 5.** Representação esquemática do lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa, com material hidrofílico em seu interior, envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos lípides (B). 43
- Figura 6.** Delineamento experimental para avaliação da sobrevida e eficácia antitumoral, após tratamento de camundongos Suíços com formulações de CDDP (SpHL-CDDP ou CDDP livre) por via intraperitoneal. Os animais foram submetidos aos tratamentos em tempos diferentes, 3 e 7 dias após a inoculação das células tumorais (TR3 e TR7, respectivamente), e foram eutanasiados 7 dias após os mesmos. Os animais dos grupos-controle foram submetidos à administração intraperitoneal de solução de NaCl 0,9 % (p/v) ou SpHL. Os animais do estudo de sobrevida foram mantidos até completar 30 dias de experimento. O estudo foi realizado com dose de 12 mg/Kg. 51
- Figura 7.** Análise representativa de viabilidade celular (Anexina-V e Iodeto de propídeo - PI) por citometria de fluxo. (A) Gráfico de densidade de tamanho - FSC versus granulidade - SSC utilizado para a seleção da população de células tumorais. (B) Gráfico bidimensional de densidade de FL1/Anexina-V-FITC versus FL3/PI utilizado para quantificar o percentual de células apoptóticas/necróticas e células vivas na população de células tumorais. As subpopulações celulares foram divididas em quatro quadrantes: Q1 representa células consideradas mortas por necrose (marcadas positivamente apenas por PI); Q2 representa

células em estágio avançado de apoptose (células duplamente marcadas, tanto por PI quanto por anexina-V-FITC); Q3 representa células em estágio inicial de apoptose (marcadas somente por anexina-V-FITC) e Q4 representa células vivas (sem marcação, duplamente negativas para anexina-V-FITC e PI)..... 53

Figura 8. Análise representativa do ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Gráfico de densidade de tamanho - FSC versus granulosidade - SSC utilizado para a seleção da população de células tumorais. (B) Histograma de FL3/Iodeto de propídeo-PI versus número de células, utilizado para determinar as fases do ciclo celular da população de células tumorais. 54

Figura 9. Análise da distribuição das fases do ciclo celular nas células do tumor de Ehrlich, após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (A), CDDP livre (12 mg/Kg, B), SpHL (dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, C), ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, D), representativos do regime de tratamento TR7. Células do tumor de Ehrlich foram coletadas e ressuspensas com solução fluorocrômica hipotônica, contendo iodeto de propídeo (PI). Histogramas representativos de conteúdo de DNA (eixo x, fluorescência FL3/PI) versus número de eventos destacam os perfis de ciclo celular obtidos nos diferentes grupos avaliados. Os resultados estão expressos como percentual de eventos positivos para cada fase do ciclo celular nas amostras avaliadas. Cada gráfico representa a análise de somente um animal de cada grupo mencionado acima..... 55

Figura 10. Representação esquemática da análise de citocinas e quimiocina, através do ensaio com microesferas fluorescentes por citometria de fluxo – *Cytometric Bead Array* (CBA). (A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de densidade de tamanho - FSC versus granulosidade - SSC. (B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas/quimiocina com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de densidade FL2 versus FL3. (C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL3) onde avalia-se a intensidade média de fluorescência 3 (FL3) versus número de eventos, capaz de discriminar as diferentes microesferas..... 60

Figura 11. Avaliação da sobrevivência de camundongos Suíços fêmeas tratados com dose de 12 mg/Kg, 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os camundongos foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (○), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ●), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲). 64

Figura 12. Perfil do abdômen de camundongos Suíços fêmeas tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (A), solução de CDDP livre (dose igual a 12 mg/kg) (B), SpHL (C) e com SpHL-CDDP (D) (dose igual a 12 mg/kg)..... 65

Figura 13. Mensuração da circunferência abdominal dos animais..... 66

Figura 14. Variação do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados 3 (TR3, em A) e 7 (TR7, em B) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich e volume de líquido ascítico retirados dos animais tratados com 3 (TR3, em C) e 7 (TR7, em D) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os tratamentos utilizados foram: solução de NaCl 0,9% (p/v) (○ ou □), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ● ou ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △ ou □), SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲ ou ■). ^{∞,a}Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v). ^{#,c}Representa diferença entre o grupo tratado com SpHL-CDDP e o grupo tratado com SpHL. ^{†,b}Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com SpHL-CDDP. 68

Figura 15. Variação do diâmetro da circunferência abdominal dos camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e submetidos aos regimes de tratamento TR3 ou TR7. No painel A está representada a evolução do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados com solução de cisplatina livre (CDDP) no regime de tratamento TR3 (●) ou TR7 (●). No B está representada a evolução do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados com lipossoma de cisplatina (SpHL-CDDP) no regime de tratamento TR3 (▲) ou TR7 (▲). *Indica que houve diferença entre os regimes de tratamento TR3 e TR7. 69

Figura 16. Avaliação das células de tumor de Ehrlich viáveis retiradas da cavidade abdominal de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a implantação do tumor, por marcação de anexina-V/PI. Os animais foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou com SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■). Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média. n.d. Representa ausência de células tumorais nos animais do grupo CDDP. O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle no regime de tratamento TR3. O número de animais foi igual a 6 para o tratamento com CDDP livre, 9 para o tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) e igual a 9 para o grupo tratado com solução SpHL-CDDP e igual a 6 para o grupo tratado com SpHL no regime de tratamento TR7; n.d= significa ausência de células tumorais nos animais do grupo tratado com CDDP livre. 70

Figura 17. Análise de células de tumor de Ehrlich retiradas de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 ou 7 dias após a implantação do tumor. Os painéis A e D, B e E, C e F representam células marcadas somente com anexina-V, anexina-V + PI e somente com PI, respectivamente. Os animais foram tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □), SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■). ^cRepresenta diferença estatística significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média. n.d. Significa ausência de células tumorais nos animais do grupo tratado com CDDP livre. O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle. 71

Figura 18. Distribuição dos perfis de células de tumor de Ehrlich retiradas da cavidade abdominal de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a implantação do tumor, por marcação de anexina-V/PI. Os animais foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg). O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle no regime de tratamento TR3. O número de animais foi igual a 6 para o tratamento com CDDP livre, 9 para o tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) e igual a 9 para o grupo tratado com solução SpHL-CDDP e igual a 6 para o grupo tratado com SpHL no regime de tratamento TR7. 72

Figura 19. Porcentagem das fases do ciclo celular das células do tumor de Ehrlich após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■), no regime de tratamento TR3 (A) e no regime de tratamento TR7 (B). ^aRepresenta diferença significativa entre as fases indicadas e a mesma fase no grupo de tratamento com solução de NaCl 0,9% (p/v). ^bRepresenta diferença significativa entre a fase indicada e a mesma fase no grupo de tratamento com solução de CDDP livre. ^cRepresenta diferença significativa entre a fase indicada e a mesma fase no grupo de tratamento com SpHL. ND indica que a porcentagem das fases do ciclo celular não foi determinada para o grupo tratado com CDDP livre devido à presença de ascite em somente um animal. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média. 74

Figura 20. Avaliação da variação de peso corporal de camundongos Suíços fêmeas tratados com dose de 12 mg/Kg, 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os camundongos foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (○), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ●), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲). [∞]Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com solução de NaCl 0,9%

(p/v). [†]Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com SpHL-CDDP..... 75

Figura 21. Fotomicrografias dos tecidos renal, hepático e esplênico de camundongos Suíços portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg). Painéis A e B representam fotomicrografias do tecido renal de camundongos Suíços portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com CDDP livre (A) ou SpHL-CDDP (B). As setas indicam a presença de proteína dentro do lúmen tubular. Painéis C e D representam os perfis do fígado de camundongos após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (também observado em camundongos tratados com SpHL) e CDDP livre (também observado em camundongos tratados com SpHL-CDDP), respectivamente. No painel E, as setas indicam células tumorais aderidas à cápsula do fígado. Painel F indica o perfil do baço de camundongos após tratamento com SpHL-CDDP (também observado em camundongos tratados com SpHL). As setas indicam a presença de vacúolos. Coloração: HE. Ampliação original: x 200..... 78

Figura 22. Quantificação dos níveis de VEGF no líquido ascítico retirado dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■), nos regimes de tratamento TR3 e TR7. ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com NaCl 0,9% (p/v). ^cRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média..... 84

Figura 23. Análise da produção de citocinas/quimiocinas IL-12p70, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , CCL-2 do líquido ascítico obtido de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e submetidos aos tratamentos com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou com SpHL-CDDP, 3 (TR3) ou 7 dias após a inoculação do tumor (TR7). ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com NaCl 0,9% (p/v). ^bRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com CDDP livre. ^cRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. ^dRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL-CDDP. Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos como a média ± erro padrão da média. 86

Figura 24. Diagrama mostrando o resumo da expressão das citocinas e quimiocina analisadas, comparando os grupo tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP e seus respectivos grupos-controle..... 87

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Relação de químicas, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda 57
- Tabela 2.** Características físico-químicas das formulações de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada..... 63
- Tabela 3.** Perfil geral de animais tratados no TR3 ou TR7, em quatro diferentes grupos de tratamento, na dose de 12 mg/Kg 76
- Tabela 4.** Parâmetros hematológicos de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 (TR7) dias, após inoculação do tumor com solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP, com dose de 12 mg/Kg 80
- Tabela 5.** Níveis de uréia e creatinina de camundongos Suíços fêmeas portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 dias (TR7), após inoculação do tumor com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP (na dose de 12 mg/Kg)81
- Tabela 6.** Valores do índice de uréia/creatinina de camundongos Suíços fêmeas portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados 3 (TR3) ou 7 dias (TR7), após inoculação do tumor com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP (na dose de 12 mg/Kg)..... 82
- Tabela 7.** Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 (TR7) dias, após inoculação do tumor com solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP, com dose de 12 mg/Kg..... 83

Lista de abreviaturas e símbolos

ALT	Alanina aminotransferase.
ANOVA	Análise de variância.
CBA	<i>Cytometric bead array</i> – Ensaio citométrico com microesferas.
CDDP	Cisplatina.
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais.
CHEMS	Hemisuccinato de colestera.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
CP	Carcinomatose peritoneal.
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou.
DL ₅₀	Dose letal capaz de matar 50% dos animais do estudo.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina.
DP	Desvio padrão.
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina associada a polietilenoglicol 2000.
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético.
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima.
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FL	Fluorescência.
FSC	<i>Forward Scatter</i> – Tamanho celular.
HE	Hematoxilina-eosina.
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina.
HFS	Solução fluorocrômica hipotônica.
ICB	Instituto de Ciências Biológicas.
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal.
i.v.	Intravenosa.
MFI	Intensidade média de fluorescência
PBS	Tampão salino fosfato.
PEG	Polietilenoglicol.

pH	Potencial hidrogeniônico.
PI	Iodeto de propídio.
p/v	Porcentagem peso por volume.
RNA	Ácido ribonucléico.
SSC	<i>Side Scatter</i> – Granulosidade celular.
SFM	Sistema fagocitário mononuclear.
SpHL	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada sem cisplatina.
SpHL-CDDP	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina.
SPI-077	Lipossoma de circulação prolongada contendo cisplatina.
TE	Teor de encapsulação.
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TR	Dia de tratamento após inoculação do tumor.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
UI	Unidades internacionais.
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

Cisplatina (CDDP) é um dos agentes ativos citotóxicos mais comumente usados no tratamento da carcinomatose peritoneal. A inconveniência de seu uso clínico são os efeitos colaterais sistêmicos, como nefrotoxicidade e mielotoxicidade. Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo CDDP (SpHL-CDDP) foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa com o objetivo de promover a liberação de CDDP mais próximo do tumor, bem como diminuir a toxicidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antitumoral e toxicidade de SpHL-CDDP, após a administração intraperitoneal em camundongos portadores de tumor nas fases inicial ou avançada, com uma dose de 12 mg/Kg. A sobrevivência foi monitorada e amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e hematológicas. Rins, fígado e baço foram removidos para exame histopatológico. As células tumorais foram avaliadas, segundo sua viabilidade e ciclo celular. Os resultados demonstraram que a sobrevivência de animais tratados com SpHL-CDDP foi maior do que aqueles tratados com CDDP livre. A morte celular causada pelo tratamento com SpHL-CDDP ocorreu através da indução de apoptose com a parada do ciclo celular na fase G₀/G₁. O tratamento de camundongos que apresentam câncer inicial com ambas as formulações provocou a supressão de granulócitos. Camundongos tratados com CDDP livre apresentaram também diminuição da contagem de plaquetas, o que sugere alta mielotoxicidade. No modelo de câncer avançado, o tratamento com SpHL-CDDP permitiu melhoria da resposta imune. Camundongos portadores de câncer em estágio inicial e tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresentaram menor índice de uréia/creatinina, em comparação ao grupo controle salina. Esses achados indicam que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir o dano renal causado por carcinomatose peritoneal. A análise microscópica dos rins de camundongos tratados com SpHL-CDDP mostrou alteração morfológica discreta, enquanto necrose tubular foi observada para animais tratados com CDDP livre. Em relação à hepatotoxicidade, nenhuma alteração nos parâmetros

de química clínica foi observada. Estes achados revelam que SpHL-CDDP pode melhorar a eficácia antitumoral e diminuir a toxicidade renal e da medula óssea. A dosagem de VEGF no líquido ascítico mostrou que ambas as formulações contendo CDDP, em ambos os estágios de tratamento, diminuíram a capacidade angiogênica do tumor de Ehrlich, apresentando efeito antitumoral. O estudo imunológico mostrou que o tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresenta um perfil modulado de resposta imune, com diminuição das citocinas pró-inflamatórias e de citocinas reguladoras. Portanto, estes resultados abrem a possibilidade de uso futuro de SpHL-CDDP para o tratamento da carcinomatose peritoneal.

Abstract

Cisplatin (CDDP) is one of the most active cytotoxic agents commonly used on treatment of peritoneal carcinomatosis. The inconvenience of its clinical use is systemic side effects, such as nephrotoxicity and myelotoxicity. Long-circulating and pH-sensitive liposomes containing CDDP (SpHL-CDDP) were developed by our research group in order to promote the release of CDDP near the tumor as well decrease of its toxicity. The aim of this study was to evaluate the antitumor efficacy and toxicity of SpHL-CDDP after intraperitoneal administration in initial or disseminated tumor bearing mice, at a dose of 12 mg/Kg. The survival was monitored and blood samples were collected for biochemical and hematological analysis. Kidney, liver and spleen were removed to histopathological examination. Tumor cells were evaluated according to their viability and cell cycle. The survival of animals treated with SpHL-CDDP was higher than those treated with free CDDP. The cell death caused by treatment with SpHL-CDDP occurred through induction of apoptosis with a cell cycle arrest at G0/G1 phase. The treatment of mice presenting initial cancer with both formulations provoked a suppression of granulocytes. Mice treated with free CDDP showed also a decrease of platelets count, which suggests a high myelotoxicity. Mice affected by cancer at an early stage and treated with free CDDP or SpHL-CDDP showed lower urea/creatinine index as compared to the saline control group. These findings indicate that both treatments were able to reduce the renal damage caused by peritoneal carcinomatosis. Microscopic analysis of kidneys from mice treated with SpHL-CDDP showed a discrete morphological alteration, while tubular necrosis was observed for free CDDP treated mice. Concerning hepatotoxicity, no alteration in clinical chemistry parameters was observed. These findings reveal that SpHL-CDDP can improve the antitumor efficacy and decrease renal and bone marrow toxicity. VEGF levels in ascitic fluid showed that both formulations containing CDDP administered in both development stages, decreased angiogenic capacity of Ehrlich tumor, showing their antitumor

effect. The immunological study showed that treatment with free CDDP or SpHL-CDDP presents an immune response modulated profile, with reduction of pro-inflammatory and regulatory cytokines. Overall, the results presented in this thesis indicate a promising future application of SpHL-CDDP to peritoneal carcinomatosis treatment.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença crônico-degenerativa caracterizada por um desvio nos mecanismos de controle da proliferação e diferenciação celular. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2012, serão válidas também para o ano de 2013, e apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão o câncer de pele do tipo não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (1).

Uma das principais formas de intervenção médica no tratamento do câncer é a quimioterapia, cuja tendência atual é a utilização de fármacos cada vez mais seletivos e com menor número ou isentos de efeitos adversos. A cisplatina (CDDP) é um dos fármacos amplamente utilizado no tratamento quimioterápico. Ela vem sendo frequentemente utilizada como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (2–5) e tem sido utilizada também no tratamento da carcinomatose peritoneal (6). A cisplatina apresenta, entretanto, uso clínico restrito em função dos efeitos tóxicos produzidos pelo fármaco, os quais incluem, principalmente, nefrotoxicidade aguda e neurotoxicidade crônica (7). O desenvolvimento de fármacos análogos e de novas formulações são estratégias atualmente utilizadas para aumentar a eficácia e segurança de utilização deste fármaco. Uma forma de reduzir os efeitos colaterais e tóxicos, assim como aumentar o índice terapêutico da cisplatina, é a sua encapsulação em lipossomas (8).

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP) foram desenvolvidos e avaliados quanto à sua toxicidade, citotoxicidade e biodistribuição em modelo experimental de camundongos acometidos pelo tumor de Ehrlich (9,10). Esses lipossomas de CDDP permitiram um aumento da concentração do fármaco na região tumoral da ordem de duas vezes, quando comparado com a CDDP livre em modelo animal experimental de tumor sólido (11). Além disso, foi observada uma maior captação da CDDP pelo tecido renal quando administrada sob a forma livre do que sob a forma encapsulada em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, após sua administração por via endovenosa, assim como intraperitoneal, o que refletiu na redução da toxicidade renal. No momento atual, como etapa complementar da avaliação pré-clínica dessa nova formulação de CDDP, faz-se necessário avaliar a sua eficácia antitumoral e toxicidade no caso do tratamento da carcinomatose peritoneal por via intraperitoneal em modelo animal experimental.

Cabe ressaltar que existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer. A associação deste conhecimento à nanotecnologia pode levar a contribuições importantes no desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Nesse contexto, aspirando possíveis aplicações clínicas de SpHL-CDDP, a hipótese desta tese de doutorado foi de que este sistema de entrega seja mais eficaz e menos tóxico do que a droga livre (CDDP), utilizada atualmente no tratamento do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a eficácia e a toxicidade do tratamento da carcinomatose peritoneal inicial e avançada, simulada em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich, utilizando SpHL-CDDP intraperitoneal.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a eficácia dos tratamentos, tendo como parâmetros principais: a sobrevivência, a variação da circunferência abdominal dos animais e a presença de ascite;

Avaliar o perfil das células tumorais retiradas da cavidade abdominal dos animais por meio de estudos de viabilidade, apoptose e ciclo celular;

Avaliar a toxicidade de SpHL-CDDP, acompanhando o peso dos animais, alterações histológicas (baço, fígado e rins), hematológicas e bioquímicas (indicativas de mielotoxicidade, toxicidade renal, toxicidade hepática);

Avaliar a resposta ao tratamento com lipossomas de cisplatina, caracterizando fatores solúveis associados à angiogênese e inflamação no líquido ascítico dos animais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do câncer

A multiplicação e a diferenciação morfológica e funcional são processos essenciais para os seres vivos. Esses dois processos recebem influências de um grande número de agentes internos e externos às células, porém estão sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Não é surpresa que, com certa frequência, surjam transtornos nos mecanismos que os controlam. Alterações nesse sistema regulador resultam em distúrbios do crescimento e da diferenciação ou distúrbios de ambos ao mesmo tempo, e uma das consequências são as chamadas neoplasias (12).

Do ponto de vista clínico, evolutivo e comportamental, as neoplasias são divididas em duas categorias: benignas e malignas. As neoplasias benignas caracterizam-se pela presença de células bem diferenciadas, com atipias celulares e arquiteturais discretas, baixo índice mitótico, crescimento lento e expansivo, com tumor bem delimitado e geralmente não recidivam após cirurgia. Por outro lado, as neoplasias malignas, também denominadas câncer, apresentam alterações na expressão gênica com tendências à síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária, suas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células normais, são mais resistentes a hipóxia, mais indiferenciadas, tem menor adesão entre si, motilidade considerável e geralmente originam metástase (12).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (13).

O câncer pode acometer órgãos de origem histopatológica distinta e apresentar diferentes comportamentos biológicos, dependendo do tipo de célula acometida, da sua velocidade de proliferação, bem como da sua capacidade de invadir tecidos vizinhos. Esse processo de invasão e alastramento, conhecido como metástase, pode atingir o sistema circulatório, permitindo que as células malignas alcancem vias de disseminação, como por

exemplo, vasos sanguíneos e linfáticos, e atinjam outros sítios distantes do local original, e neles iniciem novas colônias de células neoplásicas (14).

Pode-se dizer que o câncer é uma doença essencialmente genética, contendo ainda, vários fatores que favorecem o seu desenvolvimento: a ação de substâncias químicas presentes no meio ambiente ou na alimentação, a transformação por vírus ou mutações e a influência de agentes físicos como a radiação. Todos esses fatores desencadeiam a transformação de uma célula normal em célula cancerosa, a partir de alterações do seu DNA (15). Do ponto de vista molecular, os processos de iniciação e progressão do câncer envolvem etapas nas quais o DNA acumula uma série de mutações decorrentes de alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos. Essas alterações, estruturais e/ou funcionais, levam à ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, além de comprometer também genes de reparo e de apoptose (16).

Outra característica importante dos tecidos patológicos (tumores, inflamações e infecções) é a presença de um pH extracelular menor que o pH dos tecidos normais (17). O pH intracelular de ambos os tecidos é relativamente similar, devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Segundo Stubbs e colaboradores (18), a principal explicação para essa diferença de gradiente de pH entre tecidos normais e tumorais está relacionada com o clareamento ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da célula cancerosa.

3.2 Carcinomatose peritoneal

A metástase é o aspecto do câncer mais temido e menos compreendido. Ao disseminar-se pelo corpo, o câncer torna-se mais difícil de ser erradicado por cirurgia ou por irradiação localizada, sendo, assim, letal. A metástase também é um processo de muitas etapas: as células devem despregar-se do tumor primário, invadir o tecido vizinho e os vasos e estabelecer colônias em locais distantes do tumor primário, conseguindo um suprimento de sangue, por meio da angiogênese (Figura 1) (19).

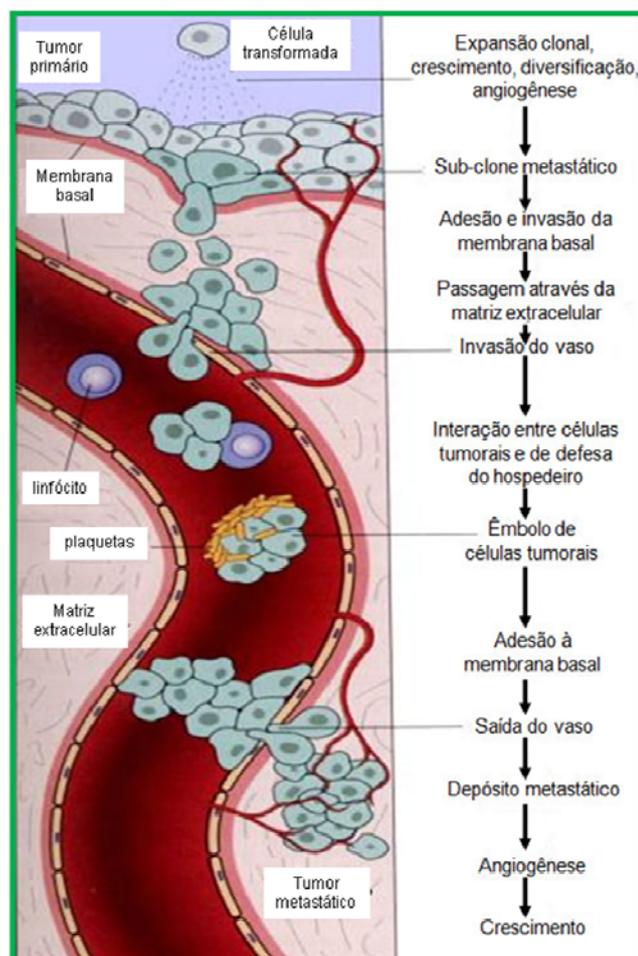


Figura 1. Biologia das metástases (adaptado de ALBERTS, 2004).

A carcinomatose peritoneal (CP) é um estágio metastático de vários tipos de câncer e ocorre quando o câncer primário – de pulmão (20), coloretal (21), ginecológico (22) – se metastatiza para a cavidade abdominal, alcançando o peritônio. Embora ela possa ser diagnosticada por procedimentos cirúrgicos, tais como, biópsia peritoneal laparoscópica, é diagnosticada, em muitos pacientes, por técnicas de imagem ou pela presença de células malignas no líquido ascítico. Os sintomas mais específicos relacionados à carcinomatose peritoneal são distensão abdominal, edema na parte baixa da perna, constipação e dor abdominal (20).

A carcinomatose peritoneal é causa frequente de morte de pacientes com câncer ovariano avançado (23). A cavidade peritoneal é o principal local de doença no câncer de ovário e a justificativa para o tratamento intraperitoneal neste tipo de câncer é que o peritônio, o local predominante do tumor, recebe altas concentrações de agentes antitumorais, enquanto tecidos normais, tais como a medula óssea, tendem a ser relativamente poupados (24).

3.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específico e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas e foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906 (25). Este tumor cresce em várias linhagens dessa espécie animal na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal e na forma sólida, quando inoculado por via subcutânea. O tumor de Ehrlich apresenta células intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada e núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes. O índice mitótico é alto, com várias figuras de mitose atípicas. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares. No tumor sólido, observam-se extensas áreas de necrose e hemorragia.

Segundo Kodama (26), a agressividade do tumor de Ehrlich não depende do grau de hemorragia e não é alterada pela linhagem do camundongo onde é feito o repique, porém cada linhagem reage de maneira específica, podendo apresentar maior ou menor tempo de sobrevivência. Estudos realizados em camundongos Suíços demonstraram que o tumor de Ehrlich, quando inoculado na cavidade peritoneal, desencadeia discreta resposta inflamatória: praticamente não há infiltração de macrófagos e o influxo de células polimorfonucleares para a cavidade é tardio, só ocorrendo a partir do sexto dia após a inoculação (27).

Estudos confirmaram ainda que o desenvolvimento do tumor de Ehrlich sólido e ascítico é marcado por neutrofilia, trombocitopenia, esplenomegalia, hematopoese esplênica e pela presença de grande quantidade de macrófagos supressores (28,29). O mecanismo que desencadeia essas alterações não é conhecido, contudo existem fortes indícios de que o fator estimulador de colônia (CSF) e o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) produzido pelas células tumorais estejam envolvidos (30).

Líquido ascítico ou fluido ascítico consiste num líquido presente em quantidade anormalmente aumentada na cavidade abdominal. Normalmente, existe uma quantidade mínima de fluido na cavidade peritoneal. Este fluido tem a função de lubrificar a cavidade abdominal, permitindo um movimento de deslize das alças intestinais entre si à medida que se faz necessário em virtude da progressão dos alimentos durante a digestão e produção do bolo fecal. O fluido peritoneal ou líquido peritoneal normalmente é um líquido claro, estéril e viscoso produzido sob a forma de ultrafiltrado do plasma, sob influência da permeabilidade

vascular e das forças hidrostáticas e oncóticas. Seu volume não ultrapassa os 50 mL em indivíduos normais e seu aumento é designado ascite (31).

Apesar de estar, na maior parte das vezes, relacionado ao câncer, como no caso do câncer ovariano (32), o aumento do líquido ascítico pode ocorrer em várias outras situações e doenças, tais como: peritonite tuberculosa (33) e pacientes com hepatite B transplantados (34).

O tumor de Ehrlich ascítico cresce produzindo, nos primeiros dias, um líquido bastante fluídico com baixa população celular, que progride até o sétimo ou nono dias. Neste período ocorre diminuição do número de células e o líquido torna-se hemorrágico e fibrinoso, coagulando-se de forma relativamente rápida. Normalmente, dependendo do número de células inoculadas, o animal pode sobreviver cerca de 20 a 25 dias após a inoculação intraperitoneal, o que depende da linhagem dos camundongos (35).

O tumor de Ehrlich é muito utilizado como modelo para verificar a influência do estresse sobre o câncer (36,37) e no estudo da resposta imunológica do hospedeiro ao tumor (28,29). O crescimento do tumor de Ehrlich ainda sofre influência de toxinas ofídicas como o veneno da *Echis coloratus* (38), de drogas neurolépticas (39) e de agentes químicos como fluoracil (40).

3.4 Tratamentos utilizados no câncer

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a erradicação da doença. Entretanto, nas situações onde a cura é impossível, o foco passa a ser a melhoria dos sintomas e a preservação da qualidade de vida associada a um aumento de sobrevida dos pacientes (1). Atualmente, as modalidades de tratamento do câncer incluem processos cirúrgicos, terapia radioativa, quimioterapia e terapia biológica (imunoterapia e terapia gênica). A aplicação isolada ou a associação de tais modalidades tem maximizado a chance de cura ou o controle da doença (16).

A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor está em estágio inicial e o paciente não apresenta metástase. A terapia radioativa é frequentemente combinada com a cirurgia, com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a

recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito utilizada (41). Entretanto, em aproximadamente dois terços dos pacientes, a neoplasia se caracteriza por micrometástases e torna-se necessário uma terapia sistêmica que pode ser efetuada com o tratamento quimioterápico (16).

O principal objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Na terapia antitumoral, a maioria dos agentes quimioterápicos atua indiscriminadamente, lesando células tumorais e também as células normais, particularmente, as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, as capilares e as do sistema imunológico causando, portanto, uma série de efeitos adversos altamente deletérios para o organismo. É o que ocorre nos tratamentos com vimblastina, vincristina, taxol, CDDP, dentre outros (16). Nesse contexto, um dos grandes desafios enfrentados na quimioterapia do câncer é o desenvolvimento de agentes antineoplásicos que apresentem baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral.

Atualmente, é sabido que não existem fármacos que satisfaçam os critérios acima mencionados, o que faz com que os profissionais da área da Oncologia optem por medicamentos que apresentam certo grau de toxicidade e que, sendo assim, não podem ser administrados em doses maiores, na tentativa de se obter melhores resultados. Dentre os quimioterápicos mais utilizados, destacam-se os derivados de platina, como a CDDP.

3.5 Cisplatina

A CDDP foi reconhecida como agente antitumoral a partir de uma observação feita por Barnett Rosenberg e seus colegas de trabalho, ao estudar possíveis efeitos de um campo elétrico sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Rosenberg observou que as bactérias apresentavam um crescimento totalmente irregular e filamentosos e, de forma inesperada, paravam de se dividir. Esse fato foi atribuído não aos fenômenos elétricos, mas sim à presença de um agente químico, a CDDP. Estudos posteriores determinaram que o isômero cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ era o principal responsável pela alteração no padrão de crescimento das bactérias. Em seguida, demonstraram que esse mesmo isômero apresentou elevada atividade antitumoral em ratos implantados com sarcoma 180 e leucemia 1210 (42). Já em 1978, a CDDP foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), Agência Reguladora para Drogas e Alimentos americana, para uso clínico.

Considerado um dos quimioterápicos mais efetivos e potentes na terapia antitumoral, a CDDP é frequentemente utilizada em combinação com outros fármacos como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (2,3,43). Atualmente, a CDDP vem sendo também utilizada no tratamento da carcinomatose peritoneal, patologia comum em pacientes com câncer ginecológico e do trato gastrintestinal (24).

Quimicamente, a CDDP é o cis-diaminodicloroplatina (II), um complexo inorgânico divalente de configuração planar formado por um átomo de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amônio na posição *cis* do plano horizontal (Figura 2).

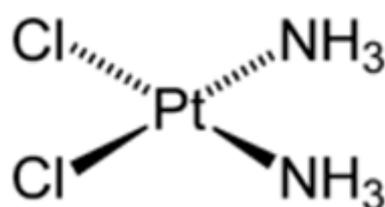


Figura 2. Fórmula estrutural da cisplatina

Sabe-se que o mecanismo de ação da CDDP está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA (44). O principal sítio de ligação da CDDP com o DNA é o N7 da guanina, embora a ligação com N3 da adenina também seja relatada. Ela desencadeia ligações cruzadas intra- e interfilamentos, em particular com a guanina e adenina, mudando a conformação do DNA e inibindo a sua síntese. Após penetrar na célula, os íons cloreto de sua molécula são lentamente deslocados por moléculas de água formando complexos de platina carregados positivamente que interagem com sítios nucleofílicos de DNA, RNA e proteínas (Figura 3). Boulikas e Vougiouka (44) demonstraram que as alterações conformacionais ocasionadas pela ligação da CDDP ao DNA afetam os processos de replicação e transcrição, provocando torções da fita de DNA, que dificultam a ação das enzimas de reparo e o remodelamento da cromatina e levam a célula tumoral à morte por apoptose.

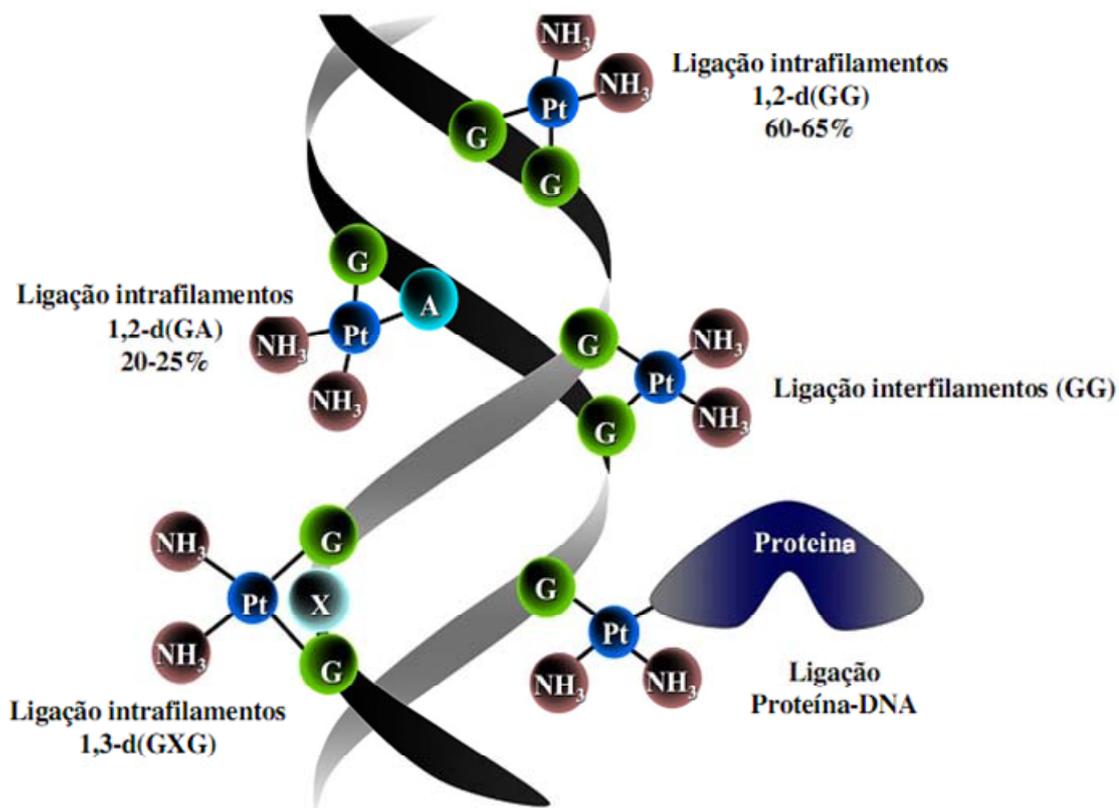


Figura 3. Formação dos aductos da CDDP. O átomo de platina se liga covalentemente à posição N7 da guanina e N3 da adenina, formando ligações cruzadas 1,2 ou 1,3 intrafilamentosas ou ligações cruzadas interfilamentosas. Pt (platina), G (guanina), A (adenina). Adaptado de BOULIKAS, 2004 (45).

Estudos já demonstraram também que o tratamento com este fármaco leva à ativação de numerosas vias de transdução de sinais (46). As propriedades citotóxicas destes compostos, assim como de numerosos análogos, têm sido atribuídas à sua habilidade de formar ligações cruzadas do tipo interfilamentares como também intrafilamentares (47). Mais recentemente, tem-se dado particular ênfase à capacidade da CDDP em provocar mutações no DNA e alterar a ligação DNA-proteína (48).

Atualmente, é aceitável dizer que as tentativas para reparar o dano ao DNA causado pela CDDP podem resultar no desencadeamento da apoptose, também conhecida como morte celular programada. No entanto, sabe-se que a CDDP é capaz de induzir dois modos diferentes de morte celular: apoptose e necrose. A apoptose é caracterizada por encolhimento celular, condensação da cromatina com a ativação endógena de endonucleases, fragmentação

do DNA e a formação de corpos apoptóticos, enquanto os traços característicos de células em necrose são perda citosólica, inchaço e perda precoce de integridade da membrana (49).

A CDDP é comumente administrada por via parenteral, principalmente por via intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.). No entanto, a administração continuada deste quimioterápico é bastante limitada em função de reações adversas graves, incluindo toxicidade aguda como náusea e vômitos, além de efeitos adversos crônicos, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade e ototoxicidade (43).

Embora a CDDP seja um agente quimioterápico altamente eficaz, apresenta uma limitação – a resistência. Os mecanismos de resistência ainda não são completamente conhecidos, mas sabe-se que são influenciados por muitos fatores, afetando o acúmulo intracelular de CDDP por inativação de glutathione, o aumento do reparo do DNA, a alteração da expressão de genes reguladores, a perda da função da p53 (50), a hiper-expressão de p73 (51) e o alto nível de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (52).

Na tentativa de contornar esses inconvenientes e melhorar o índice terapêutico da CDDP, tem sido proposto o desenvolvimento de análogos menos tóxicos que a CDDP, como por exemplo, carboplatina e oxaliplatina. Porém, nenhum deles apresenta amplo espectro de ação como a CDDP (45). Outra estratégia adotada refere-se a modificações farmacotécnicas, como a encapsulação de CDDP em sistemas de liberação de fármacos, tais como microesferas (53,54), nanocápsulas (8,55), micelas (56,57) e lipossomas (11,45,58).

3.6 Lipossomas

Os lipossomas são sistemas lipídicos convenientes para o transporte de fármacos e de agentes de diagnóstico. Eles foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores (59) como modelo de membrana biológica. Durante estudos para avaliar a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, Bangham observou que alguns lípidos se organizavam espontaneamente em meio aquoso em bicamadas formando vesículas esféricas, os lipossomas (59). Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram dispersas coloidalmente em um meio aquoso externo. Em 1971, Gregoriadis e colaboradores (60) propuseram a utilização dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos. O grande potencial terapêutico dos lipossomas deve-se à sua versatilidade estrutural em termos

de tamanho, composição lipídica, carga superficial, fluidez da membrana e sua capacidade de incorporar fármacos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos.

Inicialmente, o desenvolvimento de sistemas vesiculares encontrou muitas limitações farmacotécnicas e farmacológicas. As limitações farmacotécnicas foram relacionadas à instabilidade físico-química e biológica dos lipossomas e à baixa eficiência de encapsulação dos fármacos, enquanto as limitações farmacológicas foram atribuídas à rápida captura dos lipossomas pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), após administração sistêmica. Estudos sobre o comportamento *in vivo* dessa primeira geração de lipossomas, denominados convencionais, demonstraram que eles se acumulavam rapidamente em tecidos ricos em macrófagos, tais como fígado, baço e medula óssea, e eram rapidamente eliminados da circulação sanguínea, limitando sua utilização para outros tecidos (61).

Diante disso, a incorporação de glicolípides na membrana lipídica, bem como modificações químicas na superfície dos lipossomas foram propostas com o objetivo de preparar lipossomas capazes de escapar do SFM e que apresentassem tempo de circulação sanguínea prolongado (62). Esses lipossomas modificados, conhecidos como lipossomas furtivos ou de circulação prolongada, representaram um grande passo para a sua aplicação *in vivo*. Allen e Chonn (1987) desenvolveram os primeiros lipossomas de circulação prolongada, contendo monosialogangliosídeos e observaram uma redução significativa na captação pelos macrófagos do SFM (63). Em 1990, Klibanov e colaboradores mostraram que a incorporação de derivados lipídicos de polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), na bicamada lipídica aumentava significativamente o tempo de circulação sanguínea dos lipossomas (64). Segundo esses autores, a presença de grupos volumosos hidrofílicos na superfície dos lipossomas constitui um impedimento estérico à ligação de proteínas plasmáticas, opsoninas, impedindo o reconhecimento e a destruição dos lipossomas pelas células do SFM.

Atualmente, existem mais de dez preparações lipossomais usadas na Medicina (Figura 4) e estão sendo cada vez mais desenvolvidas para uma variedade de drogas (65): a formulação SPI-077 (fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao metoxipolietilenoglicol e colesterol) permitiu o aumento da concentração da CDDP na região tumoral, melhora da eficácia terapêutica e redução da toxicidade em camundongos acometidos com carcinoma de cólon e pulmão (66); a formulação denominada LipoplatinTM (dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-MPEG2000)

levou a uma menor nefrotoxicidade em relação ao tratamento com o fármaco livre em camundongos e ratos (45,67).

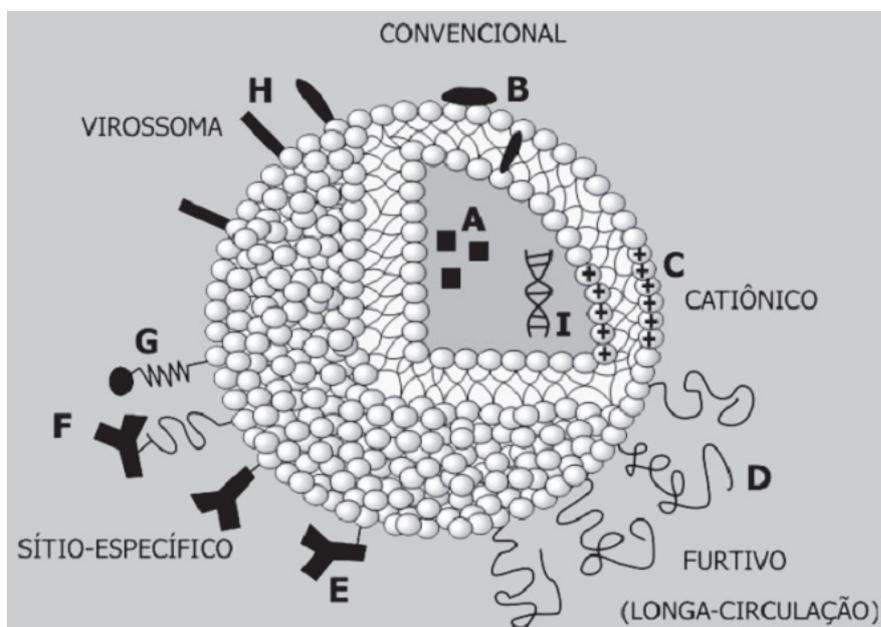


Figura 4. Características estruturais dos vários tipos de lipossomas: convencionais - (A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma e (B) fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; (C) catiônico; (D) de circulação prolongada (Stealth®) – com polímero hidrofílico na superfície; (E, F) sítio-específicos com anticorpos ligantes e (G) com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossomas – com envelope viral na superfície; (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos. Adaptado de Batista, 2007 (68).

Por causa do seu pequeno tamanho, longo tempo de circulação e interação reduzida com elementos do sangue, os lipossomas tendem a ficar acumulados nos tumores. Além disso, doses mais altas de material encapsulado em lipossomas podem ser administradas com aumento da eficácia antitumoral e toxicidade reduzida ou ausente (69).

O desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada foi proposto na tentativa de aumentar a especificidade de interação dos lipossomas com as células-alvo e a quantidade do fármaco liberado nestas células.

Os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina, os quais se organizam em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentarem na forma de vesículas. A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemissuccinato de colestera

(CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Estes estabilizantes são capazes de se inserir entre as moléculas de fosfolípides, gerando repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no CHEMS, e os grupos fosfato dos fosfolípides, o que favorece a organização lamelar e a possibilidade de formação de lipossomas (Figura 5). A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um pH ácido, como por exemplo, nos tecidos tumorais, resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (70–72).

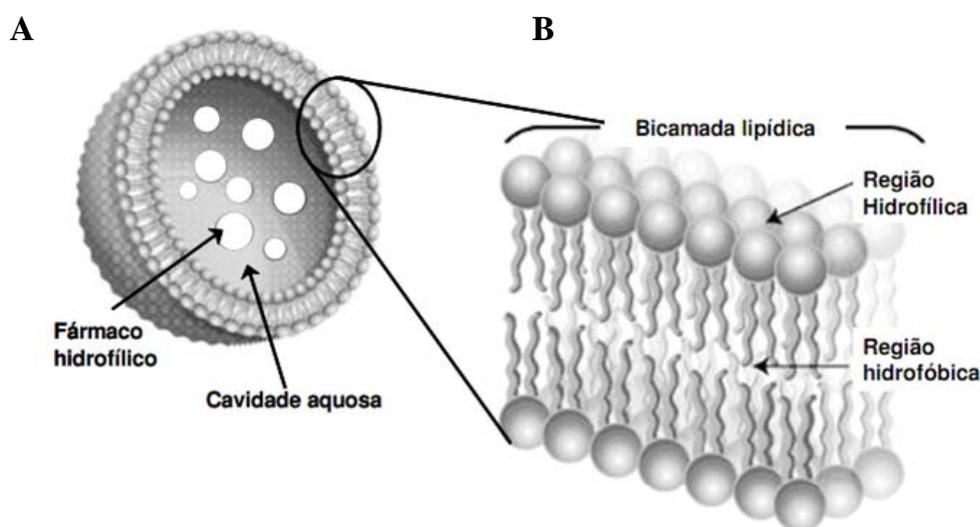


Figura 5. Representação esquemática do lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa, com material hidrofílico em seu interior, envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos lípides (B).

3.7 Lipossomas contendo CDDP

Especificamente para os lipossomas contendo CDDP, alguns estudos têm demonstrado que esses lipossomas podem modificar a distribuição tecidual do fármaco encapsulado, sendo esse comportamento dependente das características físico-químicas das vesículas e não do conteúdo encapsulado (72,73). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu lipossomas SpHL-CDDP que foram capazes de promover uma maior concentração do fármaco na região peritoneal de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, em relação ao tratamento com o fármaco livre (74). Ainda, como esperado, foi observada uma menor concentração de CDDP no sangue, após tratamento com estes lipossomas, quando comparado com o

tratamento feito utilizando a droga livre. Esses achados explicam a redução de efeitos colaterais sistêmicos após administração i.p. de SpHL-CDDP, como demonstrado por Leite e colaboradores (10).

Diante disso, a utilização de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada como carreadores de agente antineoplásicos, especificamente de CDDP, pode também ser uma alternativa para a redução da toxicidade do fármaco, bem como para o aumento de sua eficácia antitumoral, devido a uma liberação preferencial na região tumoral.

3.7.1 Administração intraperitoneal

A justificativa para a terapia intraperitoneal no câncer de ovário, por exemplo, é que o peritônio, local predominante de tumor, recebe a exposição contínua de altas concentrações de agentes antitumorais, enquanto os tecidos normais, tais como a medula óssea, são relativamente poupados.

Armstrong e colaboradores (2006) descreveram um passo notável no tratamento de câncer ovariano avançado, usando a quimioterapia i.p.. A carcinomatose proveniente do carcinoma ovariano apresenta uma condição de tratamento extremamente complicada, e a maioria das pacientes apresenta recidiva e morte. Nessas situações, elevar simplesmente as doses do quimioterápico administrado por via i.v. parece não ser satisfatório. No entanto, um estudo no qual foi realizada a administração loco-regional de CDDP na cavidade abdominal levou a redução de 25% de mortalidade em comparação com o grupo cuja administração foi realizada por via i.v. (24).

Embora existam evidências de efeitos superiores da CDDP administrada por via i.p. em relação à via i.v. após cirurgia citoredutora, o problema de sua toxicidade ainda permanece e parece ser um grande obstáculo para implementação efetiva da via i.p. (24,75). Além disso, a administração i.p. da CDDP é limitada a pacientes que após cirurgia citoredutora apresentam nódulos residuais com diâmetro inferior a 0,5 cm (76). Porém, a penetração de CDDP nas doses usuais não é suficiente para destruir as células tumorais localizadas no centro de grandes tumores. Para penetrar profundamente em um tumor, o fármaco deve estar em contato com o mesmo por um período de tempo prolongado ou em uma concentração consideravelmente mais alta. Entretanto, como a CDDP é um composto hidrossolúvel de baixa massa molar (300 Da), ela é absorvida rapidamente, através dos capilares e atinge a

circulação sanguínea, o que resulta em altas concentrações plasmáticas do fármaco e, conseqüentemente, nos efeitos adversos graves mencionados anteriormente.

Uma estratégia a ser adotada visando manter o agente antineoplásico por um maior período de tempo na cavidade i.p. é o emprego de sistemas controladores da liberação, os lipossomas, já citados anteriormente. Como as partículas corpusculares são absorvidas lentamente pelo sistema linfático, não são capazes de atravessar diretamente para a circulação sanguínea mediante a passagem pela membrana peritoneal, ficando retidas na cavidade peritoneal. Portanto, o uso dos lipossomas contendo agentes antitumorais no tratamento da carcinomatose peritoneal poderia ter uma aplicação potencial no tratamento da carcinomatose peritoneal (53).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemisuccinato de colestera (CHEMS) e a solução padrão de fósforo foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A CDDP foi adquirida da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). N-2-hidroxiethylpiperazina (HEPES) e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

O metanol, acetato de etila e dimetilformamida, todos os solventes para HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Ohio, EUA). Clorofórmio P.A. e éter etílico P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio P.A. e o isopropanol foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada (deionizador marca Permution, Paraná, Brasil) e destilada (destilador marca Tecnal, São Paulo, Brasil).

4.2 Preparação de SpHL-CDDP

4.2.1 Solução de CDDP

A concentração da solução de CDDP utilizada foi de 2 mg/mL e a mesma foi preparada em solução de NaCl 0,9% (p/v).

4.2.2 Preparação de SpHL-CDDP

4.2.2.1 Obtenção de uma emulsão água/óleo (O/A)

A preparação dos lipossomas foi realizada pelo método de evaporação em fase reversa, como descrito anteriormente por Carvalho-Júnior e colaboradores (9). Os lipossomas foram preparados utilizando um rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Aliquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀, na concentração lipídica total igual a

40mM, razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente, foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação para eliminação do solvente. Em seguida, o filme lipídico obtido foi dissolvido em éter etílico e a solução de CDDP (2,0 mg/mL) foi adicionada à solução lipídica. A razão entre as fases aquosa e etílica foi igual a 1:3, respectivamente. A mistura obtida foi submetida ao vórtex durante 3 minutos, produzindo uma emulsão do tipo água/óleo. Para obtenção dos SpHL, foi adicionada à solução lipídica uma solução de NaCl 0,9% (p/v), sendo o volume utilizado igual àquele de solução de CDDP.

4.2.2.2 Obtenção de lipossomas

A emulsão O/A foi submetida à evaporação sob vácuo a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas. Os lipossomas obtidos foram calibrados, utilizando um extrusor Lipex Biomembranes modelo T001 (Vancouver, Canadá), mediante sua passagem através de membranas de policarbonato de 0,4 µm e 0,2 µm (5 ciclos em cada membrana). A CDDP não encapsulada foi separada dos lipossomas mediante ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima™ L-80XP, Beckman Coulter) a 150.000 g, a 10°C, durante 90 minutos, para a obtenção dos lipossomas purificados. Os SpHL foram preparados nas mesmas condições descritas acima.

4.3 Caracterização química e físico-química de SpHL-CDDP

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro, potencial zeta, teor de encapsulação e eficiência de encapsulação através da determinação da razão molar CDDP:fosfolípide.

4.3.1 Determinação do teor de encapsulação

O método de doseamento da CDDP utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O aparato consistiu de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector DAD modelo 2996 (Waters Instruments, Milford, EUA), conectado a um computador apresentando o programa *Empower*, versão 2.0. Para a separação da CDDP foi utilizada uma pré-coluna 4 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha) conectada a uma

coluna Lichrosper[®] 100 NH₂, 25 cm x 4 mm, 10 μm (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente utilizado foi constituído por metanol, acetato de etila, N,N-dimetilformamida e água, na proporção 4:4:1:1, respectivamente. O volume de injeção foi 20 μL, em fluxo igual a 1,0 mL.min⁻¹ e a CDDP eluída foi detectada em comprimento de onda igual a 310 nm.

Inicialmente, a membrana lipídica dos SpHL-CDDP foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:2 e, em seguida, a preparação foi diluída 1,5 vezes com o sistema eluente e injetada no cromatógrafo. A quantidade de CDDP foi determinada nos lipossomas antes da ultracentrifugação (SpHL-CDDP não purificados) e após a ultracentrifugação (SpHL-CDDP purificados). O teor de encapsulação (TE) da CDDP foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE = \frac{[CDDP]_{\text{SpHL-CDDP purificados}}}{[CDDP]_{\text{SpHL-CDDP não purificados}}} \times 100$$

4.3.2 Determinação do diâmetro e potencial zeta

A análise do diâmetro das vesículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). Para a realização das medidas, aproximadamente 50 μL de lipossomas (brancos ou contendo CDDP) foram diluídos em 5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v), até a obtenção de uma contagem adequada de partículas. As medidas foram efetuadas à temperatura de 25°C, utilizando um ângulo de incidência do laser de 90° e análise monomodal. O índice de polidispersão reflete o perfil de homogeneidade do diâmetro das vesículas e amostras com índice de polidispersão inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas.

O potencial zeta das vesículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons associado à mobilidade eletroforética, utilizando também o equipamento Zetasizer 3000 HSA. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão.

4.4 Experimentação in vivo

4.4.1 Animais do estudo

Foram utilizados 240 camundongos Suíços fêmeas, com 2 meses de idade e peso corporal de aproximadamente 25-30 g, obtidos no Biotério de Produção do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação e tiveram livre acesso à ração e água.

4.4.2 Inoculação de células do tumor ascítico de Ehrlich

As células de tumor de Ehrlich foram gentilmente cedidas pelo Prof. Geovani Dantas Cassali do Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, que também foi responsável pela manutenção de todo procedimento experimental necessário para obtenção de células frescas do tumor ao longo dos experimentos da tese. Após a retirada das células dos animais era realizada a contagem e avaliação da viabilidade celular mediante o emprego do teste de exclusão com azul de tripan. A inoculação das células de tumor de Ehrlich foi feita por via intraperitoneal, injetando-se $2,5 \times 10^6$ células/animal num volume igual a 0,2 mL. Todos os animais receberam células tumorais no tempo 0 do estudo.

4.4.3 Delineamento experimental para avaliação da sobrevida e eficácia antitumoral após tratamento

Os animais do experimento foram divididos em 2 grupos e 4 subgrupos. O primeiro grupo foi tratado no 3º dia após a implantação das células de tumor de Ehrlich, quando o tumor ainda encontrava-se em estágio inicial de desenvolvimento (TR3) e o segundo, no 7º dia após implantação das células de tumor de Ehrlich, quando o tumor já encontrava-se em estágio avançado (TR7). Os subgrupos de tratamento foram divididos nos subgrupos seguintes: solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL e SpHL-CDDP.

Para cada grupo dos tratamentos TR3 ou TR7, foi mantido um grupo de animais para

avaliação de sobrevivência (n= 10 para cada tratamento). Estes animais destinados ao estudo de sobrevivência foram acompanhados diariamente, até completarem 30 dias de experimento. O peso corporal destes animais foi registrado 3 vezes por semana.

Os animais utilizados no experimento de eficácia antitumoral foram tratados com dose equivalente a 12 mg/Kg de CDDP livre, SpHL-CDDP, solução salina (controle 1) e lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos (controle 2, SpHL). Os animais foram acompanhados até o dia da eutanásia, 7 dias após o tratamento (TR3 ou TR7). O desenvolvimento da ascite foi acompanhado mediante a mensuração da circunferência do abdômen de cada animal, utilizando fita métrica comum. Foi feito o acompanhamento do peso corporal, consumo hídrico e de ração, 3 vezes por semana.

O delineamento experimental está demonstrado na Figura 6.

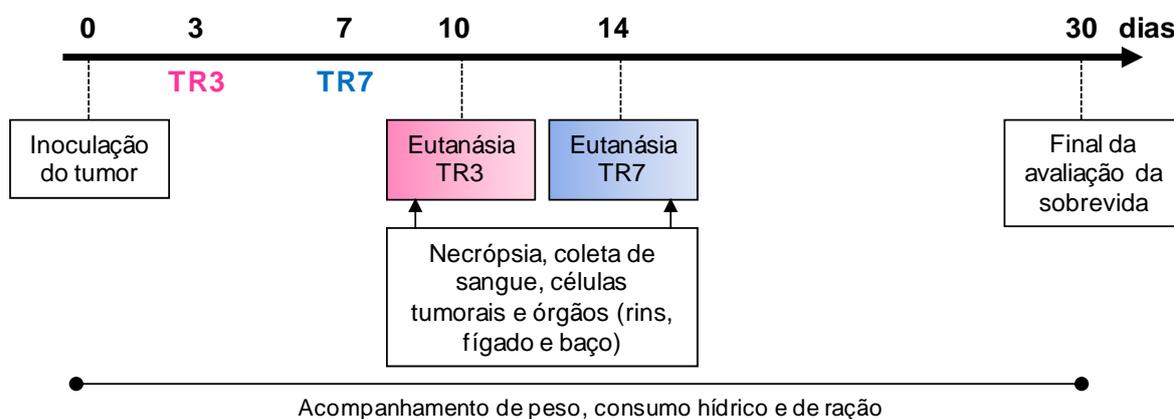


Figura 6. Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência e eficácia antitumoral, após tratamento de camundongos Suíços com formulações de CDDP (SpHL-CDDP ou CDDP livre) por via intraperitoneal. Os animais foram submetidos aos tratamentos em tempos diferentes, 3 e 7 dias após a inoculação das células tumorais (TR3 e TR7, respectivamente), e foram eutanasiados 7 dias após os mesmos. Os animais dos grupos-controle foram submetidos à administração intraperitoneal de solução de NaCl 0,9 % (p/v) ou SpHL. Os animais do estudo de sobrevivência foram mantidos até completar 30 dias de experimento. O estudo foi realizado com dose de 12 mg/Kg.

4.4.4 Coleta de sangue e líquido ascítico

Os animais foram submetidos à eutanásia no 7º dia após o tratamento. Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina, com doses de 7,5 mg/Kg e 60 mg/Kg, respectivamente. O anestésico foi

administrado por via intramuscular, na face posterior da coxa do animal. Após anestésias os animais, o sangue foi coletado por via retro-orbital com auxílio de tubos de micro-hematócrito e distribuído em dois microtubos de 1,5 mL, um sem e outro com 5 µL de EDTA 10% (p/v). Em cada animal, foi feita uma incisão longitudinal na cavidade abdominal para coleta do líquido ascítico. O líquido ascítico contendo as células tumorais foi armazenado para análises posteriores (viabilidade celular, apoptose e ciclo celular). Nos casos em que não havia líquido ascítico, foi feita lavagem da cavidade abdominal, utilizando 1 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v), estéril, para se recuperar as células tumorais.

4.4.5 Análise da viabilidade celular e quantificação da apoptose

A apoptose das células presentes no líquido ascítico foi avaliada com o emprego do kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (SIGMA, EUA). A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico, normalmente mantido no folheto interno das membranas celulares. Quando uma célula morre por apoptose, a fosfatidilserina torna-se exposta na superfície da célula. Sendo assim, é comum, em protocolos laboratoriais, utilizar a anexina-V, uma proteína de ligação para fosfolípidos, para marcar as células que estão em apoptose. As células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% (p/v) estéril e ressuspensas nesse mesmo diluente, de modo a se obter uma concentração final de 1×10^7 células/mL, após contagem em câmara de Neubauer. Numa alíquota contendo 1×10^6 células/mL, foram adicionados 300 µL do tampão de ligação (HEPES/NaOH 100 mM, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM), 2,5 µL de Anexina-V FITC e 5 µL de solução iodeto de propídeo- PI (100 µg/mL em 10 mM de K₃PO₄, contendo 150 mM NaCl). A suspensão foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur[®], BD, EUA), adquirindo-se 20.000 eventos/amostra.

4.4.5.1 Estratégia de análise dos dados no citômetro de fluxo

A análise de células apoptóticas foi realizada segundo estratégia proposta por Lecoecur, Prévost e Gougeon (77). Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse em gráficos de densidade de FSC versus SSC (Figura 7A). Após a seleção da região de interesse, a frequência das subpopulações celulares foi obtida em gráficos bidimensionais de densidade de fluorescência de FL1/Anexina V-FITC versus

FL3/PI (Figura 7B). Na Figura 7B, as subpopulações celulares foram divididas em quatro quadrantes, onde células presentes em Q1 foram consideradas mortas por necrose (marcadas positivamente apenas por PI); em Q2, células em estágio avançado de apoptose (células duplamente marcadas, tanto por PI quanto por anexina-V-FITC); em Q3, células em estágio inicial de apoptose (marcadas somente por anexina-V-FITC) e em Q4, células vivas (sem marcação, duplamente negativas para Anexina V-FITC e PI).

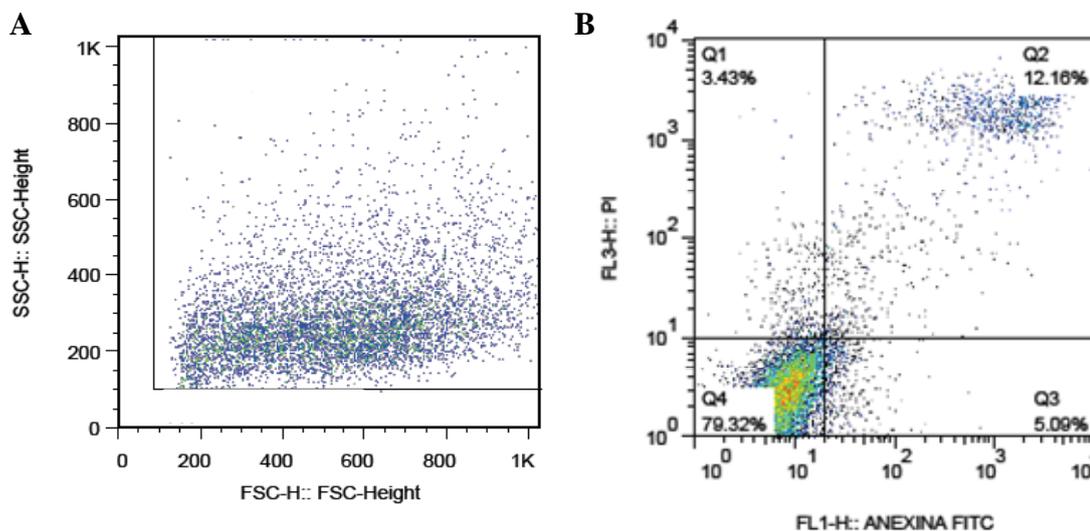


Figura 7. Análise representativa de viabilidade celular (Anexina-V e Iodeto de propídeo - PI) por citometria de fluxo. (A) Gráfico de densidade de tamanho - FSC versus granulicidade - SSC utilizado para a seleção da população de células tumorais. (B) Gráfico bidimensional de densidade de FL1/Anexina-V-FITC versus FL3/PI utilizado para quantificar o percentual de células apoptóticas/necróticas e células vivas na população de células tumorais. As subpopulações celulares foram divididas em quatro quadrantes: Q1 representa células consideradas mortas por necrose (marcadas positivamente apenas por PI); Q2 representa células em estágio avançado de apoptose (células duplamente marcadas, tanto por PI quanto por anexina-V-FITC); Q3 representa células em estágio inicial de apoptose (marcadas somente por anexina-V-FITC) e Q4 representa células vivas (sem marcação, duplamente negativas para anexina-V-FITC e PI).

4.4.6 Avaliação do ciclo celular

As células retiradas do líquido ascítico foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v), de modo a se obter uma concentração final de 1×10^7 células/mL, após contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, 3×10^5 células/mL foram transferidas para um tubo de poliestireno e centrifugadas a 300 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada em vórtex. Foram adicionados 300 μ L da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e triton X 100 0,1% (p/v)]

(Sigma – T-8787, EUA), 50 µg/mL de PI e água milli-Q (volume final = 50 mL). Posteriormente, as células foram incubadas durante 4 horas, a 4°C, ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCalibur®, BD, EUA), adquirindo-se 20.000 eventos/amostra.

4.4.6.1 Estratégia de análise dos dados no citômetro de fluxo

A Figura 8 ilustra a sequência de passos para a análise de células tumorais, marcadas com HFS para avaliação do ciclo celular das células tumorais retiradas dos animais. A análise foi realizada segundo estratégia proposta por Kumar e colaboradores (78). A análise consistiu na seleção da população celular de interesse em gráficos de densidade de FSC versus SSC (Figura 8A). Após a seleção da região de interesse, a frequência de subpopulações celulares foi obtida em histograma, onde foram determinadas as regiões referentes a cada fase do ciclo celular, a saber: Sub-G0/G1, G0/G1, S, G2/M (Figura 8B).

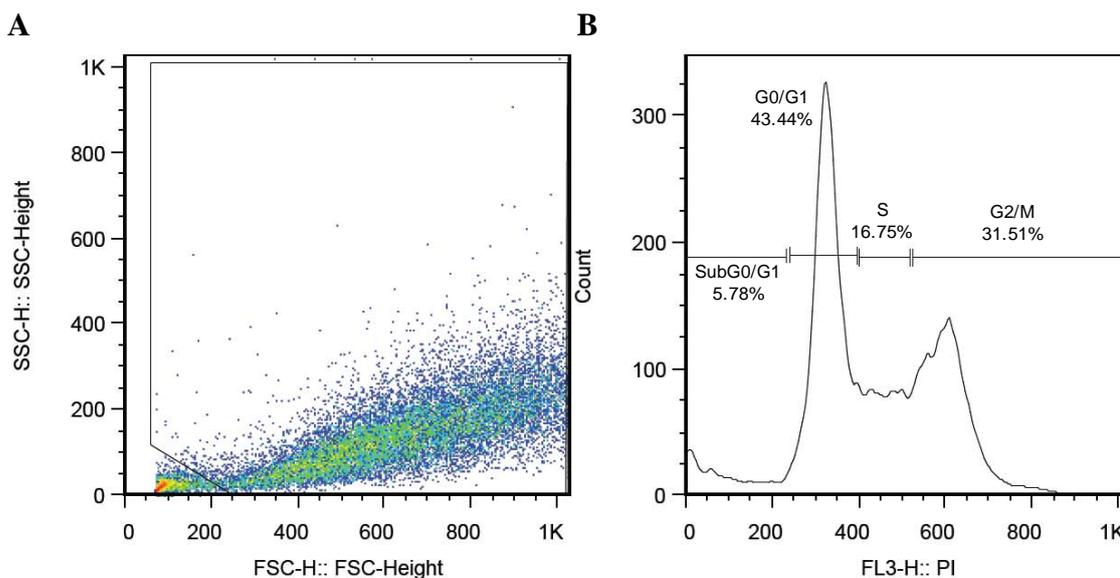


Figura 8. Análise representativa do ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Gráfico de densidade de tamanho - FSC versus granulosidade - SSC utilizado para a seleção da população de células tumorais. (B) Histograma de FL3/Iodeto de propídeo-PI versus número de células, utilizado para determinar as fases do ciclo celular da população de células tumorais.

Os perfis representativos das fases do ciclo celular obtidos após a administração de diferentes tratamentos de camundongos Suíços acometidos por tumor ascítico de Ehrlich estão representados na Figura 9. Uma análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina sugeriu

que no contexto *ex vivo*, na dose de 12 mg/Kg, o tratamento com SpHL-CDDP reduziu a viabilidade celular induzindo mecanismos de apoptose. Para confirmar nossas observações, foi investigado o conteúdo de DNA das células peritoneais após os diferentes tratamentos. Foi utilizado o protocolo que é baseado no princípio de que células apoptóticas, entre outras características, são caracterizadas pela fragmentação do DNA e, conseqüentemente, perda do conteúdo nuclear. O uso de um fluorocromo, como o PI, que é capaz de se ligar e marcar o DNA, faz ser possível obter uma avaliação rápida e precisa do conteúdo de DNA celular por citometria de fluxo. Como demonstrado anteriormente (Figura 8), os tratamentos com solução NaCl 0,9% (p/v) e SpHL (grupos controle) mostraram que a maioria das células estão viáveis, com uma distribuição típica em fases Sub G0/G1, G0/G1, S e G2/M na citometria de fluxo. Ao contrário, após o tratamento dos camundongos com CDDP livre ou SpHL-CDDP, observa-se que a maioria das células estão em fases Sub G0/G1 ou G0/G1 do ciclo celular.

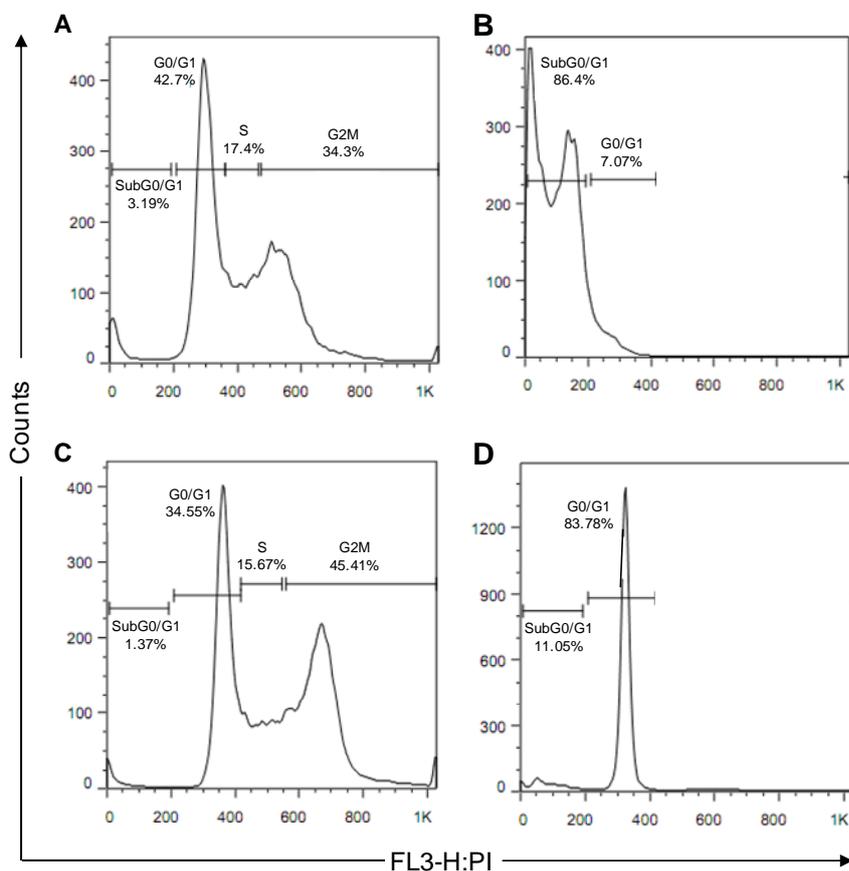


Figura 9. Análise da distribuição das fases do ciclo celular nas células do tumor de Ehrlich, após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (A), CDDP livre (12 mg/Kg, B), SpHL (dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, C), ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, D), representativos do regime de tratamento TR7. Células do tumor de Ehrlich foram coletadas e ressuspensas com solução fluorocrômica hipotônica, contendo iodeto de propídeo (PI). Histogramas representativos de conteúdo de DNA (eixo x, fluorescência FL3/PI) versus número de eventos

destacam os perfis de ciclo celular obtidos nos diferentes grupos avaliados. Os resultados estão expressos como percentual de eventos positivos para cada fase do ciclo celular nas amostras avaliadas. Cada gráfico representa a análise de somente um animal de cada grupo mencionado acima.

4.4.7 Avaliações hematológicas e bioquímicas

Todas as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG sob a supervisão da Dra. Marília Martins Melo.

Para a realização dos exames hematológicos, o sangue periférico foi armazenado em solução de EDTA 10% (p/v) e os parâmetros hematológicos avaliados foram o número absoluto de eritrócitos, leucócitos e subpopulações de granulócitos, linfócitos e monócitos; número de plaquetas; concentração de hemoglobina; hematócrito (volume globular). Todas as análises foram realizadas usando um analisador automatizado (Abacus Vet Junior, Diatron R Messtechnik GmbH, Áustria).

Após a realização do hemograma, o sangue foi centrifugado a 400 g (Centrífuga Excelsa Baby, Fanem LTDA, São Paulo, Brasil) para obtenção do plasma, que foi utilizado na determinação do perfil protéico total e fracionado. O valor da proteína total plasmática foi estimado em refratômetro 301 (Ningbo Utech International, Ningbo, China) e o perfil protéico fracionado (albumina, alfa, beta e gama globulinas) foi determinado por eletroforese em gel de agarose (Celmigel), utilizando tampão Tris (Celmigel) de acordo com o protocolo do fabricante. A leitura foi realizada empregando-se o programa Celm SE-250. Os resultados foram expressos em g/dL.

A amostra de sangue coletada sem adição de anticoagulante foi submetida à centrifugação a 1900 g, por 10 minutos. O soro obtido foi congelado a -20°C e, posteriormente, utilizado para determinações de alanina aminotransferase (ALT), uréia e creatinina (kits Bioclin, Minas Gerais, Brasil). O resultado de ALT foi expresso em UI/L e os resultados de uréia e creatinina foram expressos em mg/dL. Todos os testes bioquímicos foram realizados com o emprego do analisador bioquímico TP Analyser (Thermoplate, China).

Tabela 1. Relação de químicas, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda

Química	Metodologia	Reação	λ (nm)
Proteínas Totais	Refratometria: quando uma luz penetra num líquido ela muda de direção; isto é chamado de refração. O ângulo de refração, medido em graus, indica a mudança de direção do feixe de luz. Um refratômetro obtém e transforma os ângulos de refração em valores de índices de refração (nD).	--	--
Proteínas Fracionadas	Eletroforese em gel de agarose: técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa.	--	--
Creatinina	Método colorimétrico: a creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha. Cor proporcional à concentração de creatinina na amostra.	Cinética de dois pontos	510 nm
Uréia	Enzimático UV: a uréia é hidrolisada pela urease produzindo amônia + CO ₂ . A diminuição da absorbância é proporcional à concentração da uréia na amostra.	Cinética de dois pontos	340 nm
ALT	ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato que é reduzido a lactato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da ALT na amostra.	Cinética	340 nm

4.4.8 Avaliações microscópicas

O baço, fígado e rins foram retirados de todos os animais, pesados em balança eletrônica de precisão, fixados em formol a 10% (v/v) e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Seções de cada tecido foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica. As fotomicrografias foram capturadas com o emprego de microscópio ótico (Carl Zeiss Axiovert[®], Alemanha) acoplado a um computador. O *software* utilizado na captura das fotomicrografias foi o Carl Zeiss AxioVision 4.8[®].

4.4.9 Determinação dos níveis de VEGF no líquido ascítico

Pelo fato da expressão do VEGF estar relacionada ao processo de angiogênese do tumor, uma intervenção farmacológica que afete a expressão deste fator de crescimento pode influenciar na progressão e no prognóstico da doença (79). A dosagem do VEGF no líquido ascítico retirado dos animais foi realizada utilizando-se o kit mouse VEGF (R & D Systems, EUA).

Placas de 96 poços (Nunc A/S, Dinamarca) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100µL do anticorpo de captura, diluído em PBS, de acordo com indicações do fabricante. As placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas por 1h a 37°C com PBS 1X suplementado com BSA 1% (Sigma, St Louis, MO, EUA). Cem microlitros das amostras e do padrão (diluído de forma seriada) foram incubados por 2h a 37°C. A ligação de anticorpos anti-VEGF foi revelada usando o complexo streptavidina-peroxidase por 20 minutos a 37°C. Para finalizar, foram adicionados 100 µL da solução de substrato, que consistia de H₂O₂ acrescido do cromógeno tetrametilbenzidina (1:1). A absorbância resultante foi lida em dois comprimentos de onda diferentes (450 nm e 540 nm), após adição de 50µL de H₂SO₄ 2N em todos os poços (Leitora de ELISA, Spectra Max M5, Molecular Devices, EUA). Cada amostra foi feita em duplicata e o programa utilizado para capturar as absorbâncias foi o Softmax Pro 5 (Molecular Devices, EUA). Após as leituras, foi calculada a média entre as absorbâncias e, posteriormente, a diferença entre o valor da leitura do comprimento de 450 nm menos o valor da leitura do comprimento de 540 nm. Amostras que apresentavam valores dessa diferença acima de 3, eram diluídas até serem adequadas ao experimento. Os resultados foram expressos em pg/mL, obtidos a partir de uma curva padrão, que continha sete pontos, de onde se obtinha a equação da reta, utilizada como referência para o cálculo de concentração das amostras analisadas.

4.4.10 Caracterização das citocinas e quimiocina presentes no líquido ascítico

Foram dosadas as citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF, IL-12p70 e a quimiocina CCL-2 no líquido ascítico retirado dos animais. Os níveis dos analitos avaliados foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD, Pharmingen, EUA) que emprega

uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para os analitos de interesse, que são detectados nos canais FL3/FL4. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de até vinte analitos em um mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra (80). Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada do protocolo original proposto pelo fabricante, com algumas modificações: alíquotas de 25 μ L de líquido ascítico, assim como alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas/quimiocina submetidos a diluição seriada foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL e incubadas com 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas/quimiocina, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF, IL-12p70, CCL-2 (Mouse Inflammation Kit, BD, Pharmingen, EUA) mais 18 μ L do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas/quimiocina, conjugados com ficoeritrina - PE (reagente B). As amostras foram incubadas por 3 horas, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L de solução tampão fornecida pelo kit e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos a 18° C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, EUA), adquirindo-se 1800 eventos/amostra.

4.4.11 Estratégias de análise dos dados no citômetro de fluxo

Após as etapas de marcação e aquisição das amostras, a seleção da população de microesferas foi obtida em gráficos de densidade de FSC versus SSC em citômetro de fluxo FACScalibur (BD, EUA). Selecionada a população de interesse, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de densidade FL3 x FL2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2), dada pela intensidade média de fluorescência (*Mean Fluorescence Intensity* – MFI) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada analito presente na amostra (Figura 10).

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa dos analitos, uma curva padrão foi construída, baseada nos dados dos padrões de citocinas em concentrações de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4° parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi

utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

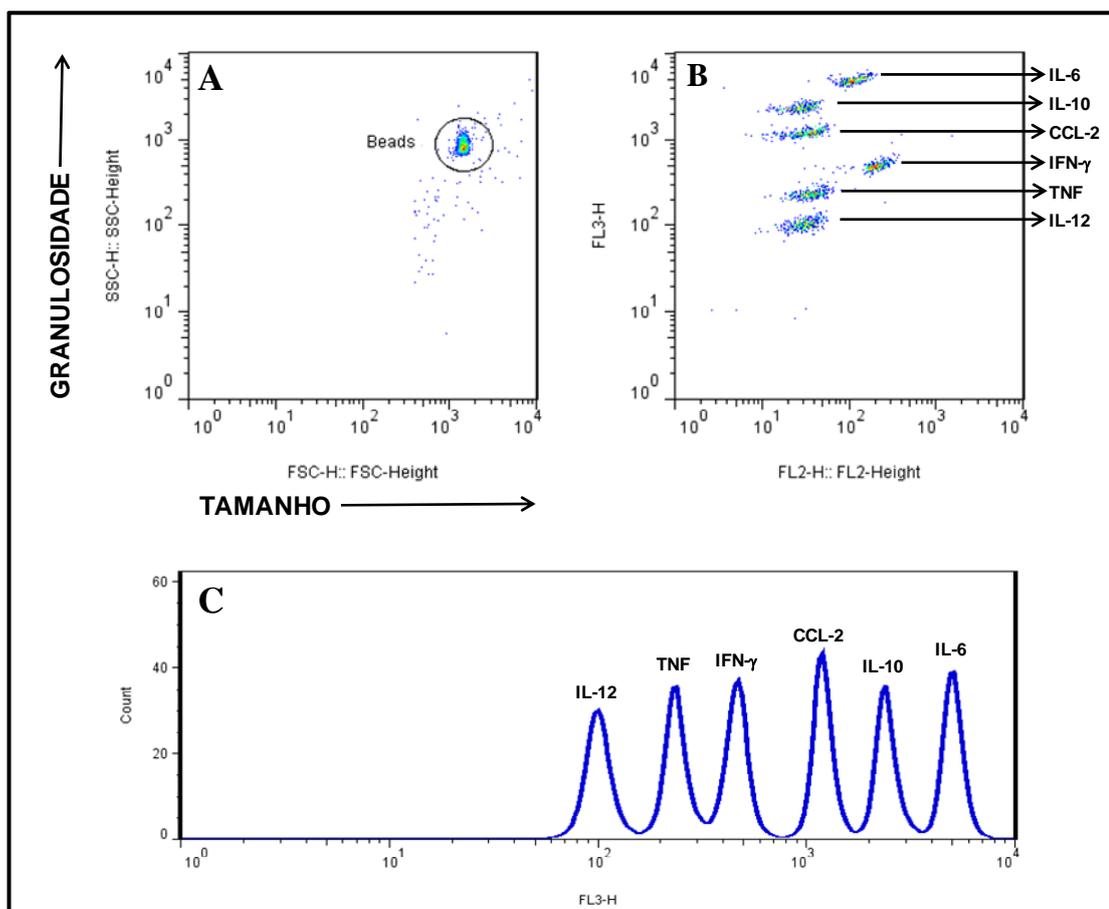


Figura 10. Representação esquemática da análise de citocinas e quimiocina, através do ensaio com microesferas fluorescentes por citometria de fluxo – *Cytometric Bead Array* (CBA). (A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de densidade de tamanho - FSC versus granulidade - SSC. (B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas/quimiocina com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de densidade FL2 versus FL3. (C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL3) onde avalia-se a intensidade média de fluorescência 3 (FL3) versus número de eventos, capaz de discriminar as diferentes microesferas.

4.4.12 Considerações éticas

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 165/07) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA, FIOCRUZ (licença LW-14/09) – (Anexos I e II).

4.4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas primeiramente pelo programa Minitab (versão 15.1.1, San Diego, EUA) para testar as três hipóteses: independência, normalidade e variância dos grupos de dados. Os dados que apresentaram como verdadeiras as três hipóteses foram considerados paramétricos, sendo avaliados pela Análise de Variância - ANOVA seguida pelo teste de Tukey. As demais amostras foram consideradas não paramétricas e os testes empregados foram Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunns. Para as avaliações de sobrevida, foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Em ambos os casos, o programa estatístico utilizado para as análises foi o Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química dos lipossomas

A Tabela 2 apresenta as características físico-químicas das diferentes formulações lipossomais contendo ou não CDDP, na dose de 12 mg/Kg. Esta dose foi escolhida após estudos feitos pelo nosso grupo de pesquisa, onde Leite e colaboradores (10) observaram que a DL₅₀ da CDDP livre é de 14,9 mg/Kg para camundongos Suíços fêmeas. Utilizando então a dose de 12 mg/Kg, poderíamos ter como controle do nosso estudo, o grupo tratado com CDDP livre. SpHL e SpHL-CDDP apresentaram diâmetro médio variando entre 157 e 207 nm e as populações das vesículas foram consideradas monodispersas (IP < 0,3). A formulação de SpHL-CDDP apresentou teor de encapsulação da droga (CDDP) em torno de 25%. Todas as formulações exibiram um potencial zeta próximo da neutralidade. Os dados de diâmetro, teor de encapsulação e potencial zeta encontrados foram similares àqueles descritos anteriormente por Júnior e colaboradores (11) e Leite e colaboradores (10), após utilizarem mesma formulação que o nosso estudo.

Tabela 2. Características físico-químicas das formulações de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada

Formulações	Diâmetro médio (nm) ± DP	Índice de Polidispersão ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP	Porcentagem Encapsulação (%) ± DP
SpHL	182 ± 25	0,09 ± 0,03	-2,7 ± 0,9	
SpHL-CDDP	177 ± 16	0,08 ± 0,03	-2,6 ± 1,0	25,0 ± 5,0

*Cada valor representa média ± desvio padrão. O número de experimentos foi de 10 para cada formulação.

5.2 Estudo da eficácia antitumoral

5.2.1 Sobrevida

Na Figura 11A, o grupo tratado com SpHL-CDDP, no regime de tratamento TR3, apresentou sobrevida maior, quando comparado ao grupo tratado com SpHL (p=0,0034). A mediana de sobrevida dos grupos estudados foi: solução de NaCl 0,9% (p/v) – 18 dias; CDDP

livre – 26,5 dias; SpHL – 13 dias; SpHL-CDDP – superior a 30 dias. Convém destacar que no grupo tratado com SpHL-CDDP, é possível observar que em 30 dias de experimento havia 67% de animais vivos, enquanto que no grupo tratado com CDDP livre havia somente 30% de animais vivos.

Nos animais tratados 7 dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich (TR7), o grupo tratado com a solução de CDDP livre apresentou taxa de sobrevida menor, quando comparado com o grupo tratado com SpHL-CDDP, com valor de $p < 0,0001$. Além disso, o tratamento com SpHL-CDDP apresentou maior sobrevida, quando comparado ao seu controle (SpHL) (Figura 11B). Neste regime de tratamento, a mediana de sobrevida dos grupos estudados foi: solução de NaCl 0,9% (p/v) – 17,5 dias; CDDP livre – 14 dias; SpHL – 16 dias; SpHL-CDDP – 26 dias.

Em ambos os regimes de tratamento estudados (TR3 e TR7), foi possível observar que o tratamento com SpHL-CDDP aumentou a sobrevida dos animais acometidos pelo tumor ascítico de Ehrlich, sendo portanto, vantajoso em relação aos outros tratamentos. Ainda sim, é possível observar que, mesmo aumentando a sobrevida dos animais no grupo tratado com SpHL-CDDP no regime TR7, o regime TR3 apresentou-se mais eficaz, já que foi capaz de permitir a sobrevivência de 67% dos animais neste grupo.

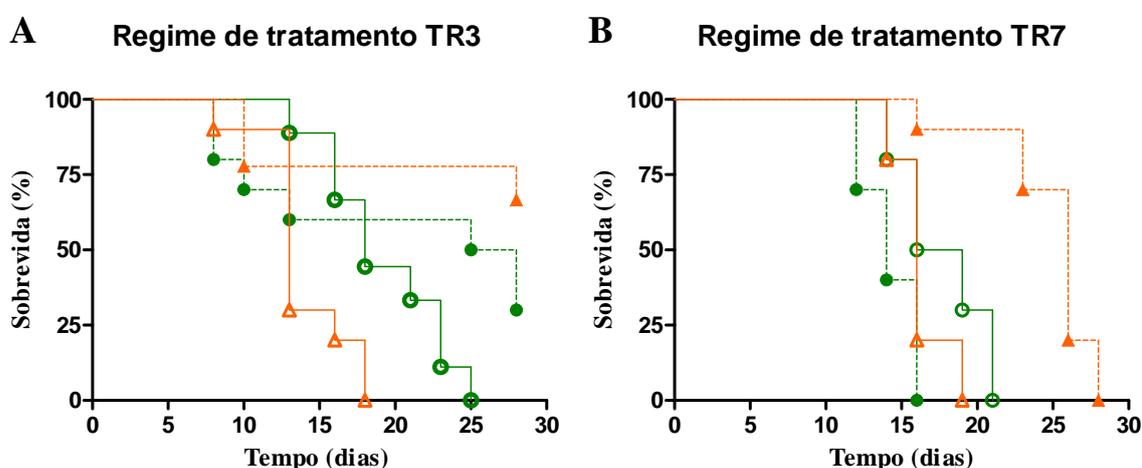


Figura 11. Avaliação da sobrevida de camundongos Suíços fêmeas tratados com dose de 12 mg/Kg, 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os camundongos foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (○), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ●), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲).

5.2.2 Características gerais dos animais

Os animais tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e SpHL apresentaram aumento da circunferência abdominal de forma semelhante, como demonstrado na Figura 12A e 12C. Os animais tratados com CDDP livre (Figura 12B) apresentaram, além da diminuição da circunferência abdominal, sinais de diarreia, ataxia e fraqueza, que podem estar relacionados com a toxicidade da droga. Em todos os casos, os animais tratados com SpHL-CDDP apresentaram diminuição da circunferência abdominal, mas sem os sinais clínicos vistos nos animais do grupo tratado com CDDP livre (Figura 12D).

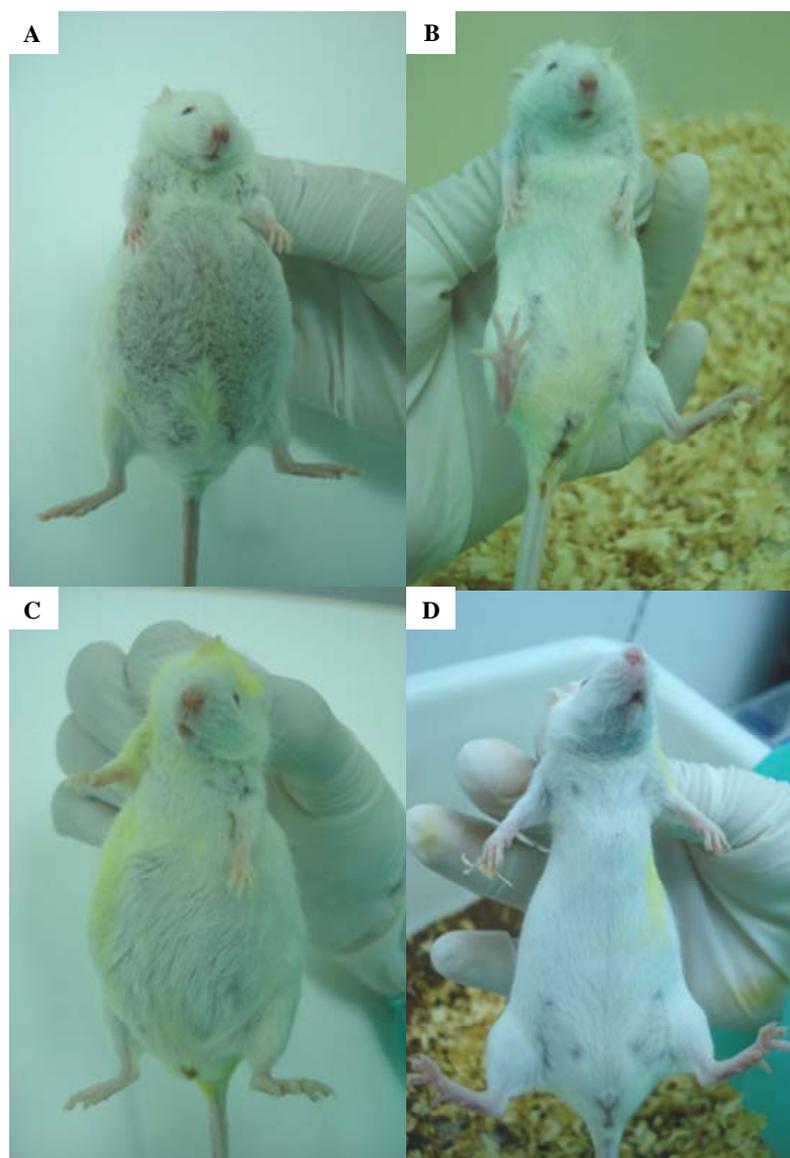


Figura 12. Perfil do abdômen de camundongos Suíços fêmeas tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (A), solução de CDDP livre (dose igual a 12 mg/kg) (B), SpHL (C) e com SpHL-CDDP (D) (dose igual a 12 mg/kg).

5.2.3 Diâmetro da circunferência abdominal

Para a avaliação da curva de crescimento tumoral, foram feitas mensurações da circunferência abdominal com o uso de fita métrica, conforme protocolo previamente descrito por Da Silva (25) e Verçosa Júnior e colaboradores (81). A Figura 13 mostra como foi feita esta mensuração.

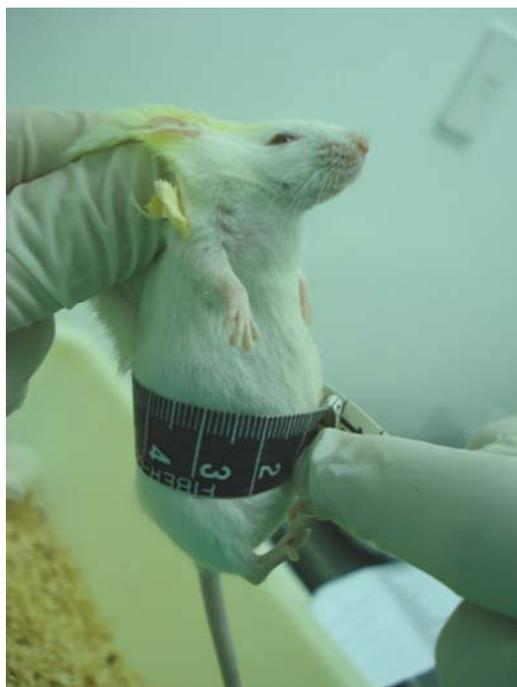


Figura 13. Mensuração da circunferência abdominal dos animais.

Ao avaliar o diâmetro da circunferência abdominal dos animais, foi observado que no regime de tratamento TR3 (Figura 14A), houve diferença a partir do 6º dia após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. No 6º dia, o diâmetro da circunferência abdominal dos animais do grupo tratado com CDDP livre foi menor do que aquele do grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0340$). Ainda no 6º dia, os animais do grupo tratado com SpHL-CDDP apresentaram menor circunferência abdominal do que o seu controle (SpHL), com valor de $p=0,0064$. No 6º dia não houve diferença entre a circunferência abdominal dos animais do grupo tratado com CDDP livre em relação àqueles do grupo SpHL-CDDP.

No 8º dia após a inoculação das células do tumor de Ehrlich, os grupos tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresentaram menor circunferência abdominal em relação aos seus grupos controles, solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p<0,0001$) e SpHL ($p=0,0004$),

respectivamente. No 8º dia não houve diferença entre a circunferência abdominal dos animais do grupo tratado com CDDP livre em relação àqueles do grupo SpHL-CDDP.

No 10º dia, os grupos tratados com CDDP livre ou com SpHL-CDDP também apresentaram menor circunferência abdominal em relação aos seus respectivos controles, solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0014$) e SpHL ($p=0,0007$), respectivamente. Ainda no 10º dia, não houve diferença entre a circunferência abdominal dos animais do grupo tratado com CDDP livre em relação àqueles do grupo SpHL-CDDP.

A Figura 14B mostra a comparação da circunferência abdominal dos animais tratados com dose de 12 mg/Kg, no regime de tratamento TR7. Foi observado que no 11º dia, os animais do grupo tratado com CDDP livre apresentaram menor circunferência abdominal que os animais do grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0003$). No 13º dia, os animais do grupo tratado com CDDP livre apresentaram menor circunferência abdominal em relação aos grupos tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p<0,0001$) e com SpHL-CDDP ($p=0,0005$).

As Figuras 14C e 14D representam o volume de líquido ascítico retirado dos animais no dia da eutanásia, nos regimes de tratamento TR3 e TR7, respectivamente. No regime de tratamento TR3, observou-se que o volume de líquido ascítico encontrado nos animais tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL foi maior do que aqueles obtidos em animais tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP ($p=0,0016$ e $p=0,0002$, respectivamente). Na Figura 14D observou-se que os animais tratados com CDDP ou SpHL-CDDP novamente apresentaram volume de líquido ascítico menor do que os animais nos seus respectivos grupos controle. No entanto, observou-se também que os animais tratados com SpHL-CDDP apresentaram maior volume de líquido ascítico do que os animais tratados com CDDP livre ($p=0,0166$).

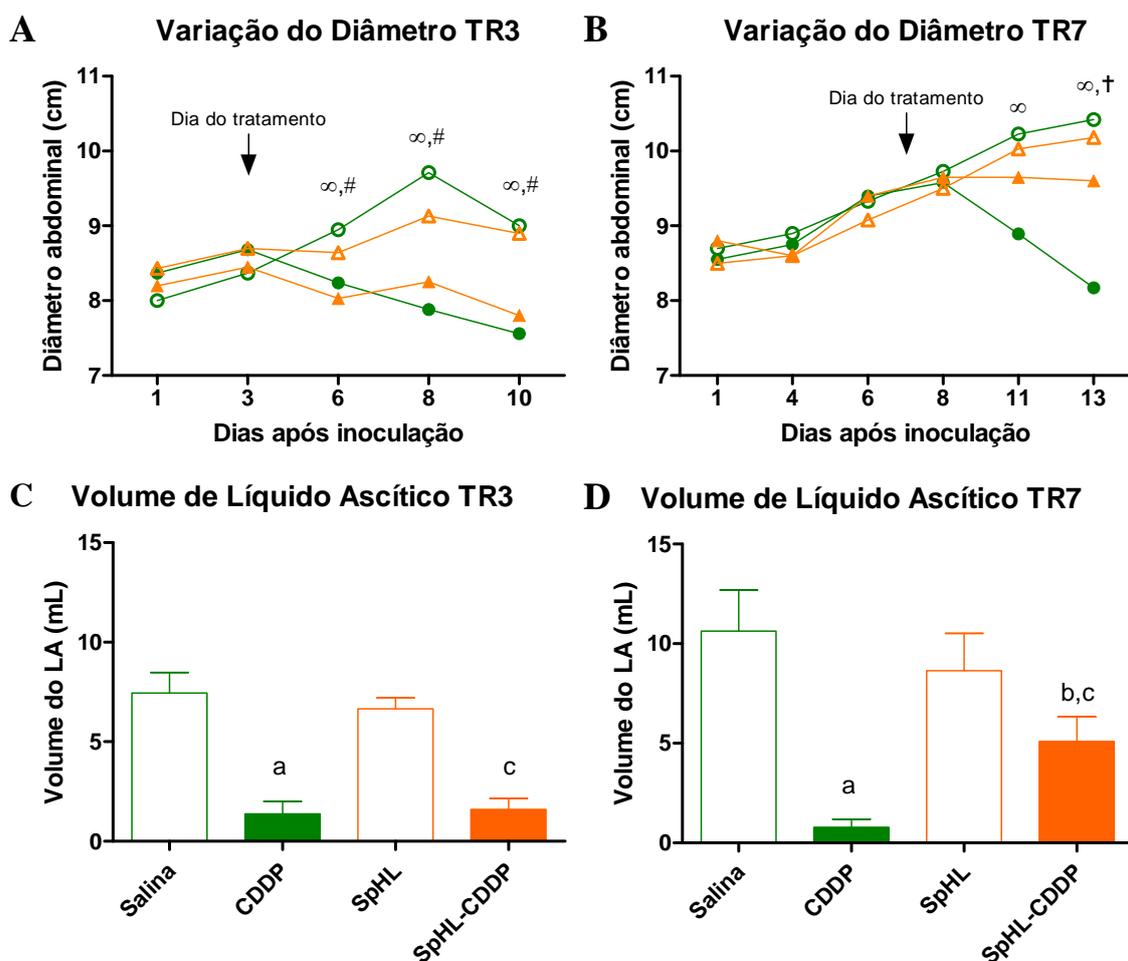


Figura 14. Variação do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados 3 (TR3, em A) e 7 (TR7, em B) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich e volume de líquido ascítico retirados dos animais tratados com 3 (TR3, em C) e 7 (TR7, em D) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os tratamentos utilizados foram: solução de NaCl 0,9% (p/v) (○ ou □), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ● ou ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △ ou □), SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲ ou ■). ^{∞,a}Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v). ^{#,c}Representa diferença entre o grupo tratado com SpHL-CDDP e o grupo tratado com SpHL. ^{+ ,b}Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com SpHL-CDDP.

Quando foram comparados os grupos do regime TR3 com os grupos do regime TR7, observou-se que o grupo de animais tratados com CDDP livre apresentou menor circunferência abdominal no TR3 em relação ao TR7 a partir do 3º dia do início do tratamento. Já os animais do grupo tratado com SpHL-CDDP apresentaram menor circunferência abdominal no TR3, desde o início do tratamento. Possivelmente estes resultados são decorrentes de uma disseminação menor do tumor no regime TR3, o que

conduz a uma melhor resposta antitumoral com o emprego de ambas as formulações contendo CDDP.

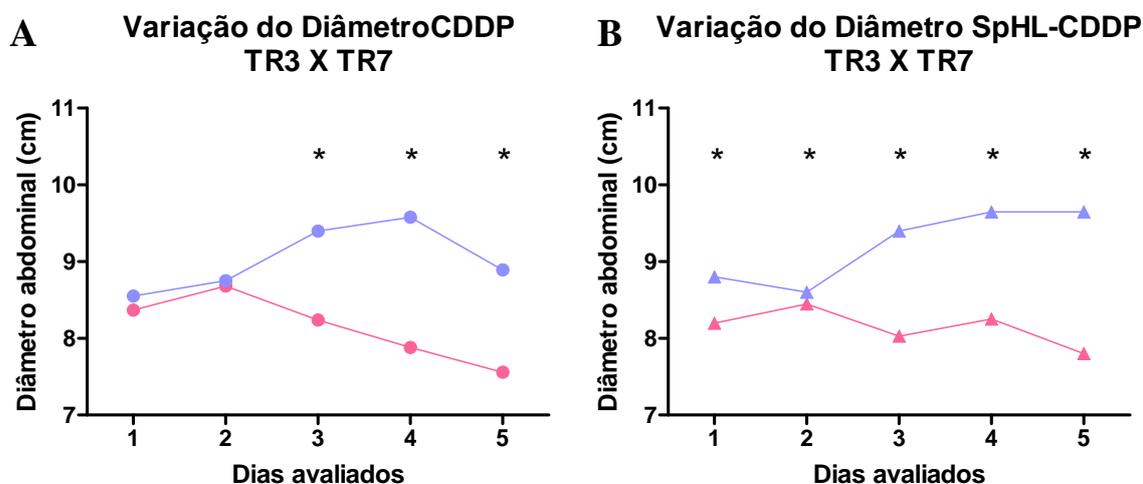


Figura 15. Variação do diâmetro da circunferência abdominal dos camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e submetidos aos regimes de tratamento TR3 ou TR7. No painel A está representada a evolução do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados com solução de cisplatina livre (CDDP) no regime de tratamento TR3 (●) ou TR7 (●). No B está representada a evolução do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados com lipossoma de cisplatina (SpHL-CDDP) no regime de tratamento TR3 (▲) ou TR7 (▲). *Indica que houve diferença entre os regimes de tratamento TR3 e TR7.

5.3 Perfil das células tumorais

5.3.1 Viabilidade celular

A Figura 16 representa a porcentagem de células viáveis obtidas pela técnica de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo, no regime de tratamento TR3 (16A) e no regime de tratamento TR7 (16B). No regime de tratamento TR3, observou-se menor número de células viáveis (Anexina-V/PI negativas, $p=0,0277$) no grupo tratado com SpHL-CDDP, quando comparado ao grupo tratado com SpHL. No regime de tratamento TR7, a análise do número de células viáveis (células duplo-negativas) mostrou que os animais tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresentaram número menor de células viáveis, quando comparados aos animais tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL ($p=0,0004$ e $p=0,0078$; $p=0,0411$ e $p=0,0496$, respectivamente), confirmando seu efeito citotóxico nas células tumorais. Estes resultados sugerem que num modelo experimental de tumor avançado

(TR7), ambas as formulações contendo CDDP são capazes de reduzir a proliferação celular, induzindo diferentes tipos de morte celular.

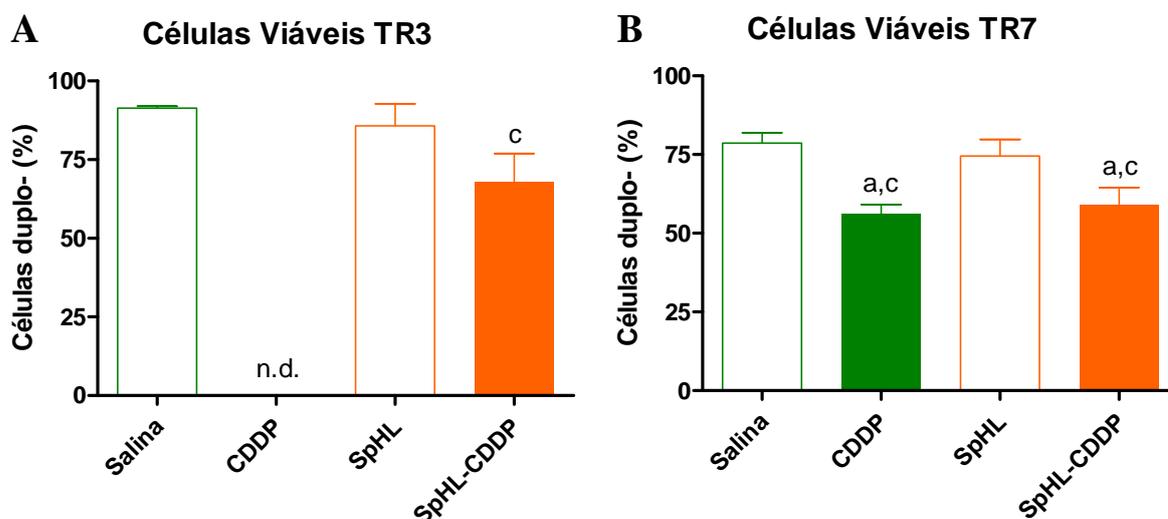


Figura 16. Avaliação das células de tumor de Ehrlich viáveis retiradas da cavidade abdominal de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a implantação do tumor, por marcação de anexina-V/PI. Os animais foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou com SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. n.d. Representa ausência de células tumorais nos animais do grupo CDDP. O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle no regime de tratamento TR3. O número de animais foi igual a 6 para o tratamento com CDDP livre, 9 para o tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) e igual a 9 para o grupo tratado com solução SpHL-CDDP e igual a 6 para o grupo tratado com SpHL no regime de tratamento TR7; n.d.= significa ausência de células tumorais nos animais do grupo tratado com CDDP livre.

5.3.2 Apoptose

O próximo passo foi investigar o impacto dos diferentes tratamentos (solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP) na viabilidade de células tumorais no contexto *in vivo*, para obter indícios sobre o mecanismo de morte celular induzida pelo tratamento com SpHL-CDDP. Para isso, foi investigada a exposição de fosfatidilserina utilizando Anexina-V fluorescente e Iodeto de propídeo (PI).

A Figura 17 representa o perfil destas células de Ehrlich retiradas da cavidade abdominal dos animais, no regime de tratamento TR3 (A, B, C) e no regime de tratamento

TR7 (D, E, F), ambos grupos com dose de 12 mg/Kg. Os animais tratados com SpHL-CDDP apresentaram maior número de células duplo-marcadas (Anexina-V/PI positivas, $p=0,0242$, Figura 17B) em relação aqueles tratados apenas com SpHL.

No regime de tratamento TR7, os animais tratados com SpHL-CDDP apresentaram maior número de células necróticas (PI positivas, Figura 17F) quando comparados aos grupos tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0040$) ou SpHL ($p=0,0028$). Por outro lado, os animais tratados com CDDP livre apresentaram maior número de células duplo-marcadas (Anexina-V+/PI+), quando comparados aos animais do grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0259$), sugerindo que neste tratamento as células tumorais estão em estágio avançado de apoptose.

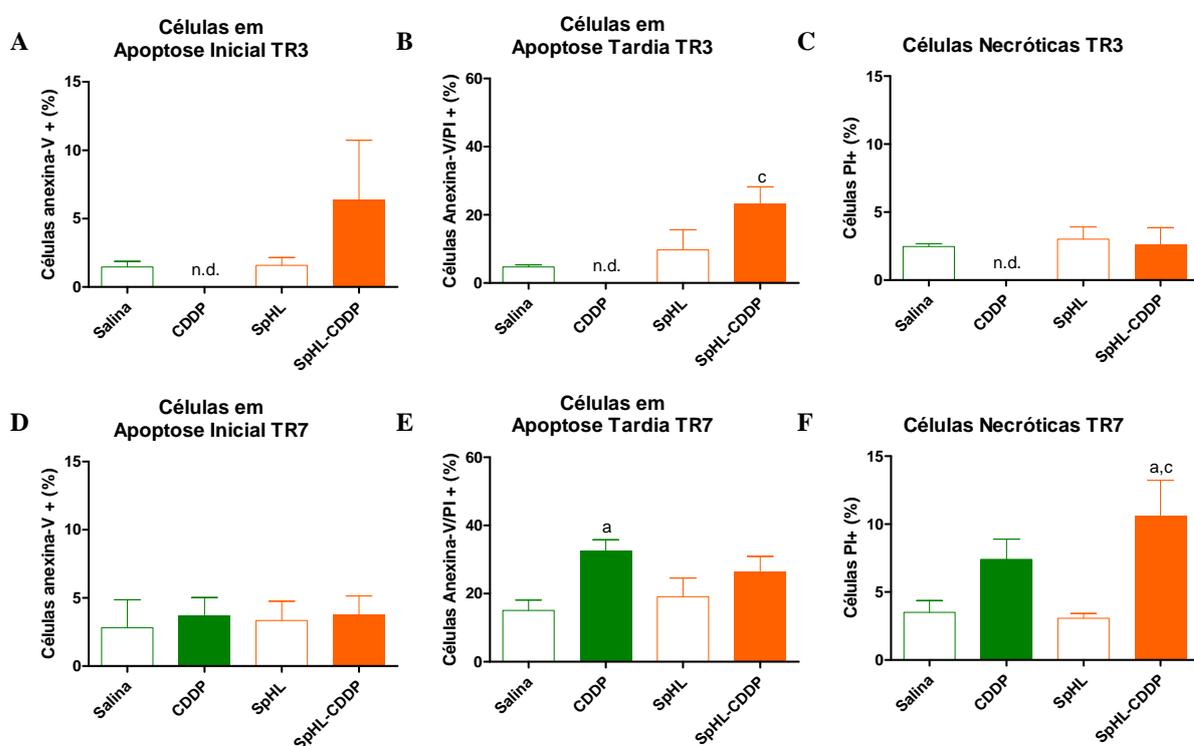


Figura 17. Análise de células de tumor de Ehrlich retiradas de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 ou 7 dias após a implantação do tumor. Os painéis A e D, B e E, C e F representam células marcadas somente com anexina-V, anexina-V + PI e somente com PI, respectivamente. Os animais foram tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) (\square), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, \blacksquare), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, \square), SpHL-CDDP (12 mg/Kg, \blacksquare). ^cRepresenta diferença estatística significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. n.d. Significa ausência de células tumorais nos animais do grupo tratado com CDDP livre. O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle.

A Figura 18 representa a visualização do perfil das células de cada grupo de tratamento, nos diferentes regimes (TR3 ou TR7). Observa-se que, no regime de tratamento TR3, a porcentagem de células em apoptose tardia e inicial é maior no grupo tratado com SpHL-CDDP do que em relação aos grupos controles demonstrados. Além disso, a porcentagem de células viáveis foi menor neste grupo contendo a formulação lipossomal da CDDP em relação aos grupos controles. No regime de tratamento TR7, observa-se um perfil muito parecido entre os grupos tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP, com uma porcentagem um pouco maior de células em apoptose tardia no grupo tratado com CDDP livre em relação ao tratado com SpHL-CDDP.

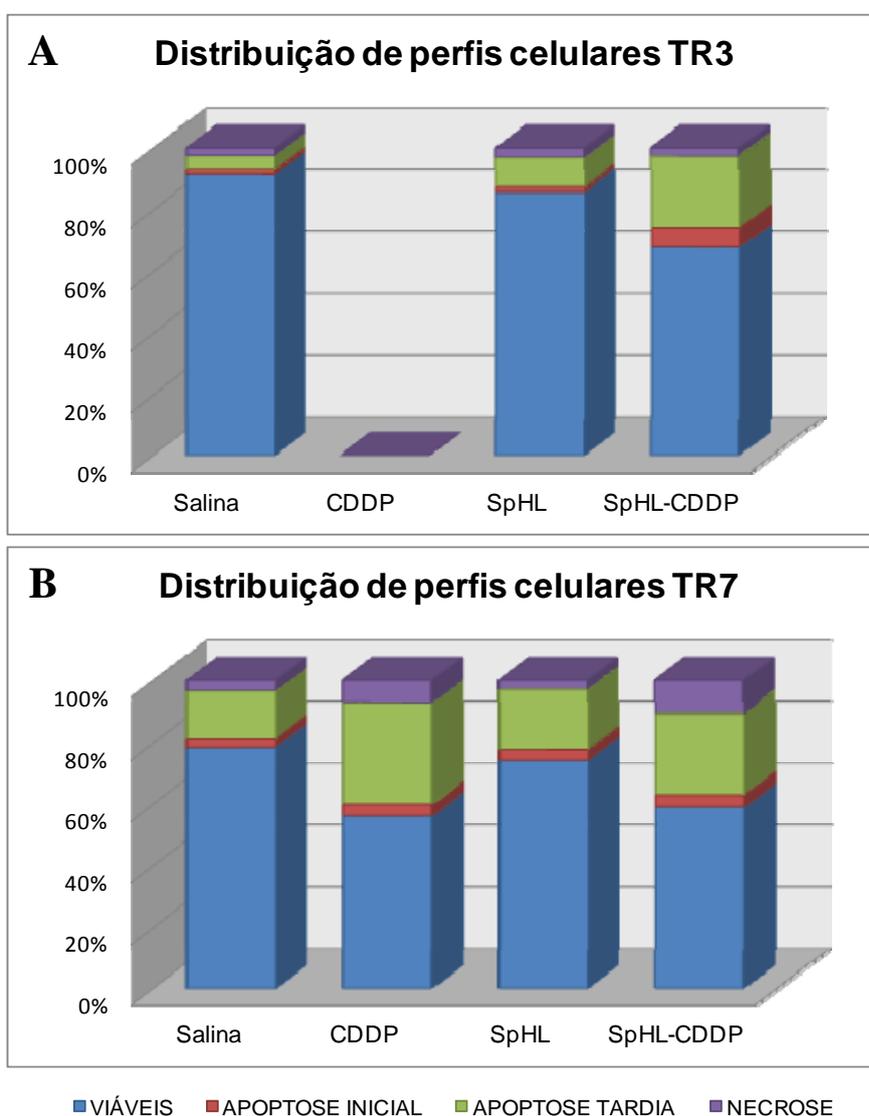


Figura 18. Distribuição dos perfis de células de tumor de Ehrlich retiradas da cavidade abdominal de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a implantação do tumor, por marcação de anexina-V/PI. Os animais foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose

lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg). O número de animais foi igual a 4 para o tratamento com SpHL-CDDP e igual a 10 para os grupos controle no regime de tratamento TR3. O número de animais foi igual a 6 para o tratamento com CDDP livre, 9 para o tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) e igual a 9 para o grupo tratado com solução SpHL-CDDP e igual a 6 para o grupo tratado com SpHL no regime de tratamento TR7.

5.3.3 Avaliação do ciclo celular

Na Figura 19A, é possível observar que após o regime de tratamento TR3 com SpHL-CDDP, houve uma alteração significativa no ciclo celular, quando comparado com os grupos controle, com aumento na porcentagem de células na fase G0/G1 (73,3%), e redução simultânea de células nas fases S e G2/M (1,9% e 6,2%, respectivamente). Nenhuma alteração foi observada no conteúdo de DNA sub-diplóide (DNA fragmentado), quando comparado com o grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL, neste regime de tratamento. Para o grupo tratado com CDDP livre, no regime de tratamento TR3, dos oito animais sobreviventes, sete animais não apresentaram ascite e as células tumorais não foram recuperadas após lavagem da cavidade abdominal. Sendo assim, não foi possível avaliar o perfil do ciclo celular das células tumorais destes animais.

No regime de tratamento TR7, animais tratados com SpHL-CDDP também apresentaram parada no ciclo celular, com 82,4% das células na fase G0/G1 e uma abolição total das fases S e G2/M (Figura 19B). Após administração de solução de CDDP livre em camundongos, foi observado que as células tumorais apresentavam-se principalmente nas fases Sub G0/G1 (59,3%) ou G0/G1 (48,1%) do ciclo celular. Além disso, aumento significativo no conteúdo de DNA sub-diplóide (DNA fragmentado, 59,3%) foi encontrado nas células dos animais tratados com solução de CDDP livre, quando comparado com os grupos controle, tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) e SpHL (4,6% e 6,7%, respectivamente), sugerindo indução da apoptose. Este valor obtido no grupo tratado com CDDP livre (59,3%) não foi diferentemente significativo daquele encontrado no grupo tratado com SpHL-CDDP (34,3%).

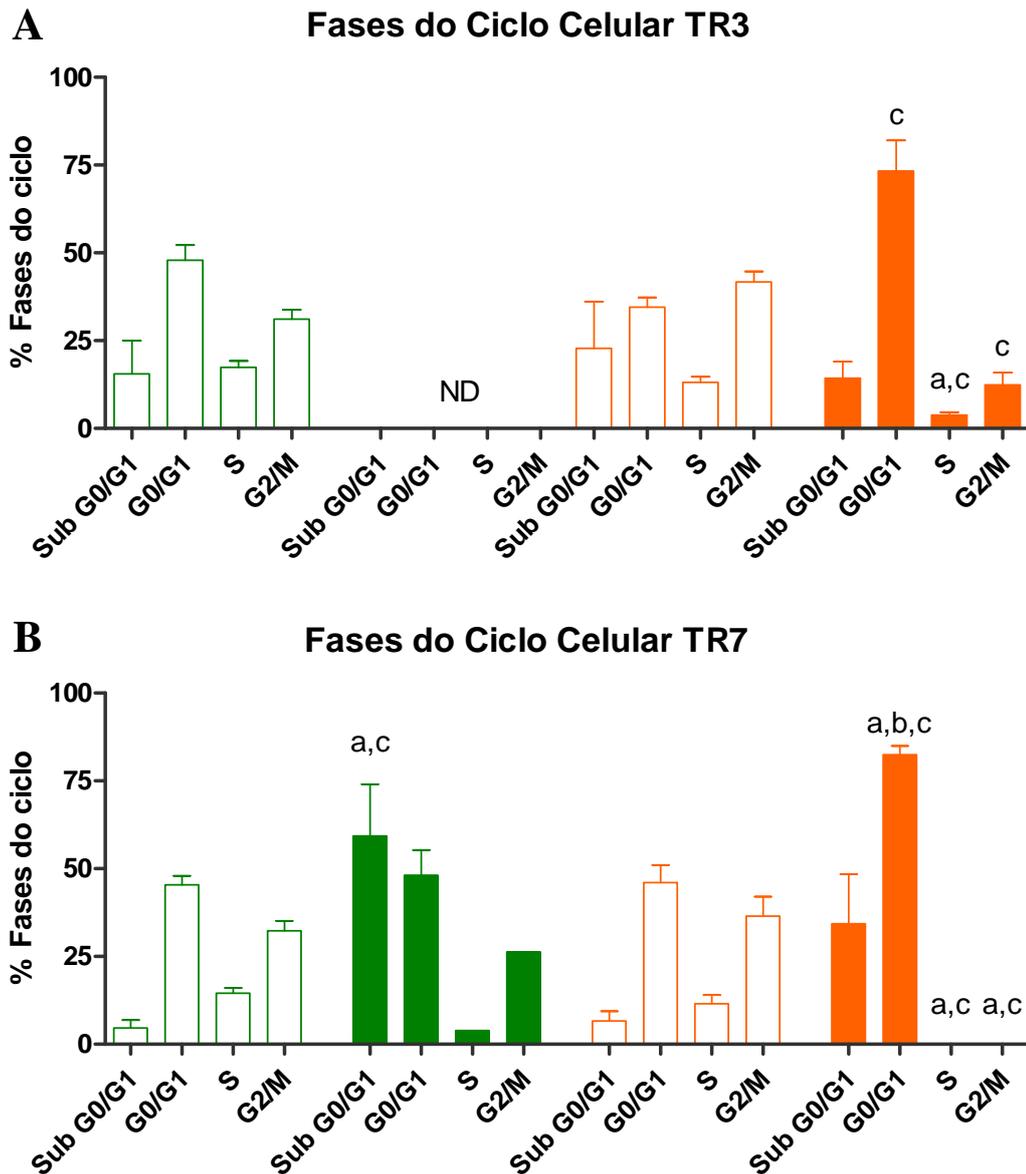


Figura 19. Porcentagem das fases do ciclo celular das células do tumor de Ehrlich após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■), no regime de tratamento TR3 (A) e no regime de tratamento TR7 (B). ^aRepresenta diferença significativa entre as fases indicadas e a mesma fase no grupo de tratamento com solução de NaCl 0,9% (p/v). ^bRepresenta diferença significativa entre a fase indicada e a mesma fase no grupo de tratamento com solução de CDDP livre. ^cRepresenta diferença significativa entre a fase indicada e a mesma fase no grupo de tratamento com SpHL. ND indica que a porcentagem das fases do ciclo celular não foi determinada para o grupo tratado com CDDP livre devido à presença de ascite em somente um animal. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

5.4 Avaliação toxicológica

5.4.1 Peso corporal dos animais

A Figura 20 representa a variação do peso corporal dos animais tratados com 12mg/Kg, nos regimes de tratamento TR3 ou TR7. No regime de tratamento TR3 (Figura 20A) é possível observar que houve diferença a partir do 6º dia de avaliação, entre os animais do grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v) e aqueles do grupo tratado com CDDP livre. Os valores de p para o 6º, 8º e 11º dias foram, respectivamente, $p=0,0417$, $p<0,0001$, $p=0,0004$).

No regime de tratamento TR7 (Figura 20B) nota-se que houve diferença entre os grupos somente a partir do 11º dia de avaliação. Neste dia, os animais do grupo tratado com CDDP livre apresentaram menor peso corporal em relação àqueles do grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0003$). No 13º dia de avaliação, os animais do grupo tratado com CDDP livre apresentaram menor peso corporal em relação àqueles animais dos grupos tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p<0,0001$) e SpHL-CDDP ($p=0,0001$).

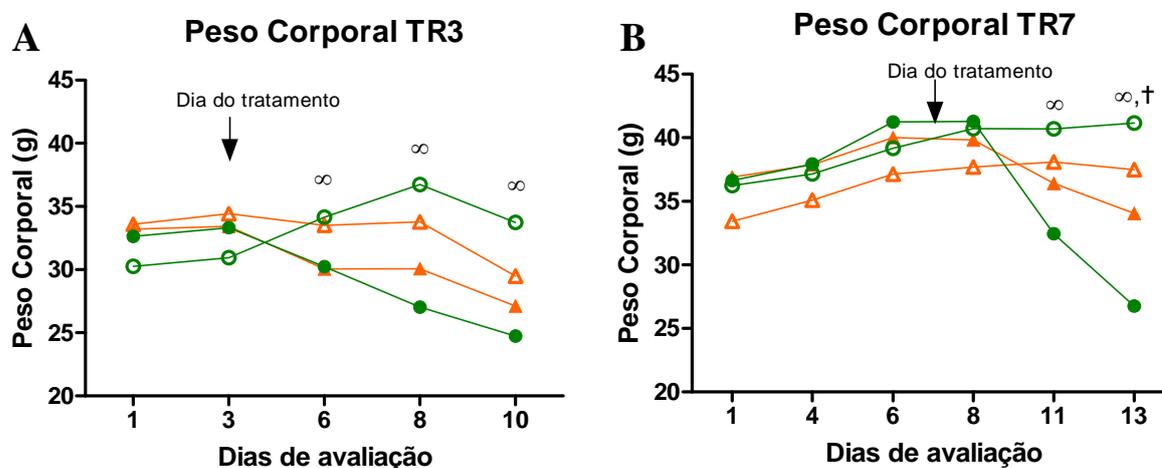


Figura 20. Avaliação da variação de peso corporal de camundongos Suíços fêmeas tratados com dose de 12 mg/Kg, 3 (TR3) e 7 (TR7) dias após a inoculação das células do tumor de Ehrlich. Os camundongos foram tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) (○), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ●), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, △) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ▲).[∞]Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v). [†]Representa diferença entre o grupo tratado com CDDP livre e o grupo tratado com SpHL-CDDP.

A Tabela 3 mostra o perfil geral de animais tratados no 3º (TR3) ou no 7º (TR7) dias após a inoculação do tumor, comparando entre os quatro diferentes grupos de tratamento: solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre (12 mg/Kg), SpHL (dose lipídica igual àquela administrada no tratamento com SpHL-CDDP) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg). É possível observar que o tratamento com SpHL-CDDP não levou nenhum animal à morte, em nenhum dos regimes de tratamento, o que o diferencia do grupo tratado com CDDP livre, que leva 2 animais a morte no regime de tratamento TR3 e 4 animais a morte no regime de tratamento TR7.

Tabela 3. Perfil geral de animais tratados no TR3 ou TR7, em quatro diferentes grupos de tratamento, na dose de 12 mg/Kg

Tratamentos	TR3			TR7		
	Com ascite	Sem ascite	Morte	Com ascite	Sem ascite	Morte
Salina	10	0	0	8	1	1
CDDP	1	7	2	2	4	4
SpHL	10	0	0	6	1	3
SpHL-CDDP	0	10	0	8	2	0

5.4.2 Estudo histopatológico

5.4.2.1 Rins, fígado e baço

Neste estudo, estão representadas fotomicrografias histológicas somente do regime de tratamento TR7, pelo fato de ambos os regimes de tratamento apresentarem o mesmo perfil patológico. A avaliação histopatológica de rins, fígado e baço de camundongos Suíços tratados com diferentes tratamentos, na dose de 12 mg/Kg (solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL e SpHL-CDDP) está representada na Figura 21. Camundongos tratados com 12mg/Kg de CDDP livre apresentaram necrose tubular tóxica grave (Figura 21A), caracterizada por degeneração de células tubulares com achatamento das células que revestem o córtex renal, juntamente com proteinúria nos túbulos medulares. Estas características estão de forma difusa, o que indica a ação tóxica da droga. Ao contrário, em camundongos tratados com SpHL-CDDP na mesma dose, foi somente observada discreta presença de proteína dentro do lúmen tubular, indicando redução na toxicidade renal induzida pela CDDP na formulação lipossomal (Figura 21B).

Em relação à toxicidade hepática, foi observada uma degeneração dos hepatócitos nas regiões periportais. A degeneração do fígado é comum em casos de caquexia neoplástica e pode ser causada por agentes tóxicos. Ela é caracterizada por vacuolização citoplásmica com um deslocamento do núcleo para a periferia. Na Figura 21C e D, somente as fotomicrografias histológicas de camundongos tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL-CDDP estão representadas porque as mesmas alterações patológicas foram observadas no fígado dos animais tratados com SpHL e CDDP livre. Praticamente não foi observada degeneração no fígado dos animais tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL (Figura 21C) e, ao contrário, degeneração grave foi encontrada no fígado de animais tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP (Figura 21D).

Além disso, o estudo microscópico do fígado de camundongos fêmeas mostrou a presença de células tumorais aderidas à cápsula do órgão, comum a todos os tipos de tratamento utilizados no estudo (Figura 21E) e que aparecem, às vezes, circundadas por células inflamatórias. Este resultado mostra a disseminação de células tumorais da região peritoneal para o fígado.

A avaliação histológica do baço também mostrou células tumorais aderidas à cápsula do órgão, em camundongos tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL (dados não mostrados). Ao contrário, animais tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresentaram nenhuma ou poucas células tumorais aderidas. Interessantemente, vacúolos foram observados no baço de animais tratados com SpHL ou SpHL-CDDP (Figura 21F), que podem estar relacionados a componentes lipídicos dos lipossomas. Sabe-se que nanosistemas são capturados pelos órgãos do sistema mononuclear fagocitário, tais como o fígado e o baço.

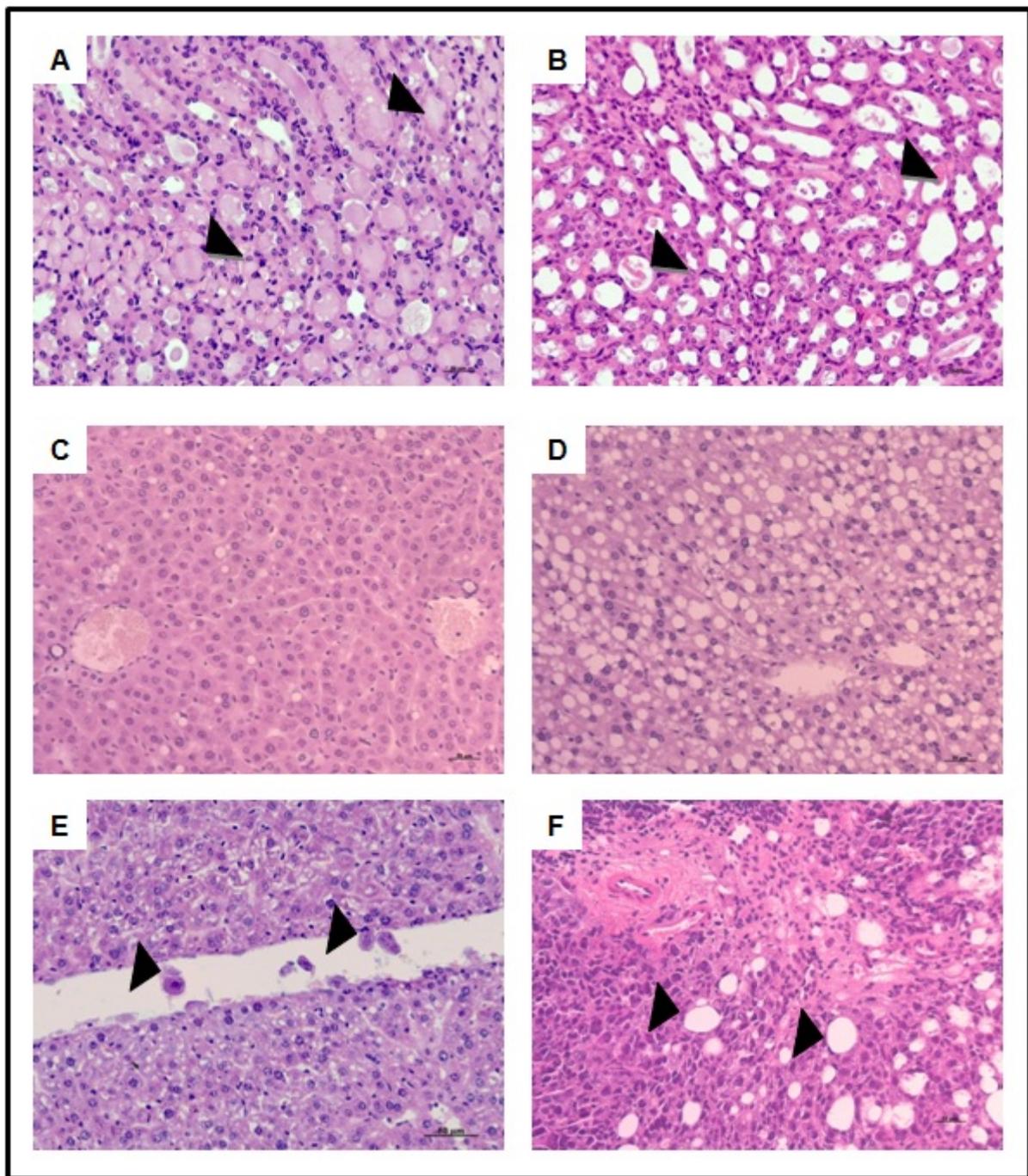


Figura 21. Fotomicrografias dos tecidos renal, hepático e esplênico de camundongos Suíços portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg). Painéis A e B representam fotomicrografias do tecido renal de camundongos Suíços portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com CDDP livre (A) ou SpHL-CDDP (B). As setas indicam a presença de proteína dentro do lúmen tubular. Painéis C e D representam os perfis do fígado de camundongos após tratamento com solução NaCl 0,9% (p/v) (também observado em camundongos tratados com SpHL) e CDDP livre (também observado em camundongos tratados com SpHL-CDDP), respectivamente. No painel E, as setas indicam células tumorais aderidas à cápsula do fígado. Painel F indica o perfil do baço de

camundongos após tratamento com SpHL-CDDP (também observado em camundongos tratados com SpHL). As setas indicam a presença de vacúolos. Coloração: HE. Ampliação original: x 200.

5.4.3 Investigações hematológicas

Alterações nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP em duas fases de desenvolvimento do tumor (TR3 e TR7), na dose de 12 mg/Kg estão mostradas na Tabela 4. Primeiramente foi avaliado o efeito dos dois tipos de tratamento (CDDP livre *versus* SpHL-CDDP) nos parâmetros hematológicos de camundongos Suíços. Para ambos os regimes de tratamento (TR3 e TR7), foi demonstrado que não houve diferença significativa na contagem de eritrócitos e nas medidas de hemoglobina e hematócrito, nos animais submetidos ao tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP, quando comparados aos seus respectivos grupos-controle. Estes resultados mostram que nenhuma das formulações contendo CDDP induz alterações nas células vermelhas do sangue. Ao avaliar as células brancas, observa-se que houve redução na contagem de leucócitos ao comparar o grupo tratado com SpHL-CDDP e o grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v), somente no regime de tratamento TR3. Esta diminuição pode ser atribuída à redução da contagem de granulócitos, também demonstrada na Tabela 4. O tratamento com CDDP livre não levou a alterações na contagem de leucócitos quando comparado com o grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v), no entanto, diminuição da contagem de granulócitos também foi observada. No esquema de tratamento TR7, a administração de SpHL-CDDP induziu aumento da contagem de leucócitos e/ou linfócitos quando comparado aos grupos controle, tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) e SpHL. Ao contrário, a administração de CDDP livre não levou a nenhuma alteração nestes parâmetros. A contagem de monócitos não apresentou diferença estatística em camundongos tratados com SpHL-CDDP ou CDDP livre, quando comparados àqueles animais dos grupos controle. Por outro lado, o nível de plaquetas foi reduzido em camundongos tratados com CDDP livre, quando comparado aos animais tratados com solução NaCl 0,9% (p/v), enquanto não houve alteração deste parâmetro em camundongos tratados com SpHL-CDDP. Vale ressaltar que praticamente todos os parâmetros hematológicos foram estatisticamente semelhantes entre os grupos-controle solução NaCl 0,9% (p/v) e SpHL.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 (TR7) dias, após inoculação do tumor com solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP, com dose de 12 mg/Kg

Parâmetros		Solução NaCl 0,9% (p/v)	CDDP livre	SpHL	SpHL-CDDP
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	TR3	10,7 ± 0,4	11,4 ± 0,3 ^b	9,4 ± 0,6	10,4 ± 0,3
	TR7	7,2 ± 1,2	9,9 ± 0,3	9,3 ± 1,0	9,0 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL)	TR3	14,9 ± 0,6	16,3 ± 0,5	13,4 ± 1,0	14,3 ± 0,2
	TR7	10,1 ± 1,7	13,9 ± 0,6	12,8 ± 1,3	12,8 ± 0,6
Hematócrito (%)	TR3	47,2 ± 2,7	52,1 ± 2,6 ^b	40,8 ± 3,2	44,1 ± 1,4
	TR7	34,7 ± 6,0	42 ± 1,6	36,2 ± 5,7	42,4 ± 2,5
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	TR3	18,3 ± 2,8	13,4 ± 2,2	18,1 ± 2,9	10,4 ± 1,2 ^a
	TR7	6,8 ± 2,2	11,3 ± 6,0	9,6 ± 2,3 ^a	15,8 ± 1,9 ^{a,b}
Granulócitos (10 ³ /mm ³)	TR3	12,8 ± 1,9	4,9 ± 1,1 ^a	13,4 ± 2,4	2,6 ± 0,7 ^{a,b}
	TR7	4,8 ± 1,8	5,7 ± 4,1	6,4 ± 2,0	10,9 ± 2,1
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	TR3	5,1 ± 1,1	8,1 ± 2,1	4,2 ± 0,8	7,6 ± 0,8
	TR7	1,8 ± 0,5	5,2 ± 2,0	2,7 ± 0,8	4,4 ± 0,5 ^a
Monócitos (10 ³ /mm ³)	TR3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	TR7	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	TR3	580,0 ± 78,3	234,0 ± 44,7 ^{a,b,c}	432,0 ± 48,7	464,0 ± 59,1
	TR7	337,0 ± 66,0	255,0 ± 23,9	452,0 ± 108,0	230,0 ± 32,8

^aRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v). ^bRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. ^cRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL-CDDP. No regime de tratamento TR3, o número de animais foi igual a 6, 8, 8 e 10 para os tratamentos solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL e SpHL-CDDP, respectivamente. No regime de tratamento TR7, o número de animais foi igual a 5, 4, 8 e 9 para os tratamentos solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL e SpHL-CDDP, respectivamente. O nível de significância foi considerado para valores de p < 0,05. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

5.4.4 Investigações bioquímicas

5.4.4.1 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal

Alterações nos indicadores de parâmetros químicos clínicos da toxicidade renal estão demonstradas na Tabela 5. A administração de CDDP livre ou SpHL-CDDP na dose de 12mg/Kg em camundongos não afetou os níveis de uréia e creatinina no sangue, quando comparados ao grupo tratado com solução NaCl 0,9% (p/v), em ambos os regimes de tratamento (TR3 e TR7). No regime de tratamento TR3 houve diminuição nas dosagens de uréia e creatinina em animais tratados com SpHL-CDDP em relação àqueles tratados com SpHL.

Tabela 5. Níveis de uréia e creatinina de camundongos Suíços fêmeas portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 dias (TR7), após inoculação do tumor com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP (na dose de 12 mg/Kg)

Tratamento	Parâmetros			
	Uréia (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)	
	TR3	TR7	TR3	TR7
Solução de NaCl 0,9% (p/v)	82,0 ± 48,9	149,8 ± 37,9	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,6
CDDP	47,1 ± 23,1	265,8 ± 235,8	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,8
SpHL	157,3 ± 55,1	183,6 ± 87,3	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,4
SpHL-CDDP	60,9 ± 18,3 ^a	207,3 ± 125,2	0,4 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,5

^aRepresenta diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com SpHL-CDDP e aquele tratado com SpHL. O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão.

Quando analisamos os valores do índice uréia/creatinina para os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP e comparando-os com seus respectivos grupos-controle, no regime de tratamento TR3, na dose de 12 mg/Kg, observa-se que houve um aumento significativo neste parâmetro. Camundongos tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL apresentaram índice uréia/creatinina sanguíneo 2 e 1,5 vezes maior que aqueles submetidos aos tratamentos com CDDP livre ou SpHL-CDDP, respectivamente (Tabela 6). Para o regime de tratamento TR7, não foi possível detectar nenhuma diferença no índice uréia/creatinina

entre os tratamentos realizados. Além disso, os valores deste índice foram maiores do que aqueles obtidos no regime de tratamento TR3.

Tabela 6. Valores do índice de uréia/creatinina de camundongos Suíços fêmeas portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados 3 (TR3) ou 7 dias (TR7), após inoculação do tumor com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP (na dose de 12 mg/Kg)

Tratamento	Índice Uréia/Creatinina	
	TR3	TR7
Solução de NaCl 0,9% (p/v)	206,6 ± 43,6	804,9 ± 206,3
CDDP	97,4 ± 13,2 ^a	824,3 ± 534,3
SpHL	217,7 ± 33,5	895,3 ± 222,6 ^b
SpHL-CDDP	139,7 ± 14,0 ^a	764,7 ± 163,2

^aRepresenta diferença significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seus respectivos grupos controle. ^bRepresenta diferença significativa entre os tratamentos com CDDP livre, comparando TR3 com TR7. O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão.

5.4.4.2 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática

O resultado dos indicadores de parâmetros químicos clínicos da função hepática está demonstrado na Tabela 7. Ao visualizar os dados obtidos na dose de 12 mg/Kg, observa-se que nenhuma alteração dos parâmetros hepáticos foi identificada, após tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP, quando comparados com seus respectivos grupos controle, indicando ausência de sinais de toxicidade hepática. No entanto, houve um leve aumento de β -globulina e uma leve diminuição de γ -globulina no grupo tratado com SpHL em relação àquele tratado com SpHL-CDDP.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e tratados 3 (TR3) ou 7 (TR7) dias, após inoculação do tumor com solução NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP, com dose de 12 mg/Kg

Parâmetros		Tratamento			
		Solução de NaCl 0,9% (p/v)	CDDP	SpHL	SpHL-CDDP
ALT (UI/L)	TR3	141,7 ± 103,9	109,0 ± 48,4	116,8 ± 67,0	91,7 ± 38,9
	TR7	189,8 ± 65,6	117,8 ± 77,4	131,1 ± 46,7	120,7 ± 37,7
Proteína Total (g/dL)	TR3	7,2 ± 1,1	7,9 ± 1,5	7,9 ± 1,0	7,7 ± 0,7
	TR7	6,3 ± 1,3	6,6 ± 0,4	5,9 ± 0,6	6,4 ± 0,6
Albumina ¹ (g/dL)	TR3	4,7 ± 0,9	5,3 ± 1,1	4,9 ± 0,5	5,6 ± 0,6
	TR7	3,8 ± 0,9	3,9 ± 0,3	3,3 ± 0,8	3,9 ± 0,8
α Globulina (g/dL)	TR3	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,3
	TR7	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
β Globulina (g/dL)	TR3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,2
	TR7	0,7 ± 0,7	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,7	0,8 ± 0,5
γ Globulina (g/dL)	TR3	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2
	TR7	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,3 ^a	0,9 ± 0,3

^aRepresenta diferença estatisticamente significativa entre o grupo indicado e o tratamento com SpHL-CDDP. O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão.

5.5 Avaliação da resposta do tratamento com SpHL-CDDP

5.5.1 Quantificação de VEGF no líquido ascítico

Sabendo-se que entre o grande número de fatores angiogênicos, o VEGF é amplamente expresso na maioria dos cânceres e é um componente muito importante na angiogênese tumoral, optou-se por fazer a quantificação deste fator de crescimento. A Figura 22 mostra a quantificação do VEGF no líquido ascítico retirado dos animais do estudo, tratados com dose de 12 mg/Kg. Na Figura 22, pode-se observar que, em animais tratados na dose de 12 mg/Kg, tanto no regime de tratamento TR3, quanto no regime de tratamento TR7, os grupos tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP apresentaram redução na expressão de VEGF em relação aos seus grupos controles ($p=0,0286$ em ambos os casos).

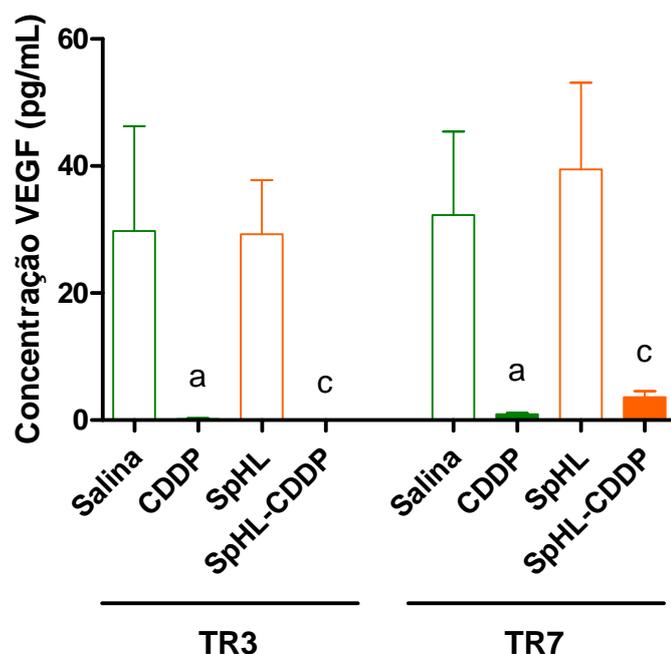


Figura 22. Quantificação dos níveis de VEGF no líquido ascítico retirado dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com solução NaCl 0,9% (p/v) (□), solução de CDDP livre (12 mg/Kg, ■), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg, □) ou SpHL-CDDP (12 mg/Kg, ■), nos regimes de tratamento TR3 e TR7. ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com NaCl 0,9% (p/v). ^cRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

5.5.2 Quantificação de citocinas e quimiocinas

A Figura 23 representa a quantificação das citocinas (TNF, IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-10) e quimiocina (CCL2) no líquido ascítico retirado da cavidade abdominal dos animais do estudo, tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, SpHL ou SpHL-CDDP, na dose de 12 mg/Kg, nos regimes de tratamento TR3 e TR7.

No regime de tratamento TR3, o perfil de IL-12p70, IFN- γ e IL-10 foi semelhante, apresentando redução na dosagem dessas citocinas nos grupos tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP, quando comparados aos seus respectivos grupos-controle. O perfil de alterações da citocina TNF e da quimiocina CCL-2 foi similar: os animais tratados com CDDP livre apresentaram valores menores de TNF e CCL-2 em relação ao seu controle ($p=0,0003$ e $p<0,0001$, respectivamente) e o grupo tratado com SpHL-CDDP apresentou valores menores em relação ao seu controle e ao grupo tratado com CDDP livre. A quantificação de IL-6 foi menor somente no grupo tratado com SpHL-CDDP em relação ao seu grupo controle ($p<0,0001$) e ao grupo tratado com CDDP livre ($p=0,0162$). No entanto, a quantificação de IL-6 nos animais do grupo tratado com SpHL foi maior do que naqueles animais tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ($p=0,0008$).

No regime de tratamento TR7, o perfil de IL-12p70, TNF e IFN- γ foi semelhante, apresentando redução na dosagem dessas citocinas no grupo tratado com CDDP livre, quando comparado aos seu respectivo grupo controle. A quantificação de IL-6 foi semelhante entre os grupos estudados, enquanto a quantificação de IL-10 foi menor nos grupos tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP em relação aos seus respectivos grupos-controle ($p=0,0264$ na comparação CDDP livre e seu grupo controle e $p=0,0358$ na comparação SpHL-CDDP e seu grupo controle), de forma semelhante ao perfil apresentado para TR3. A quantificação da quimiocina CCL-2 foi menor no grupo tratado com CDDP livre em relação ao seu grupo controle ($p=0,0036$) e ao grupo tratado com SpHL-CDDP ($p=0,0242$).

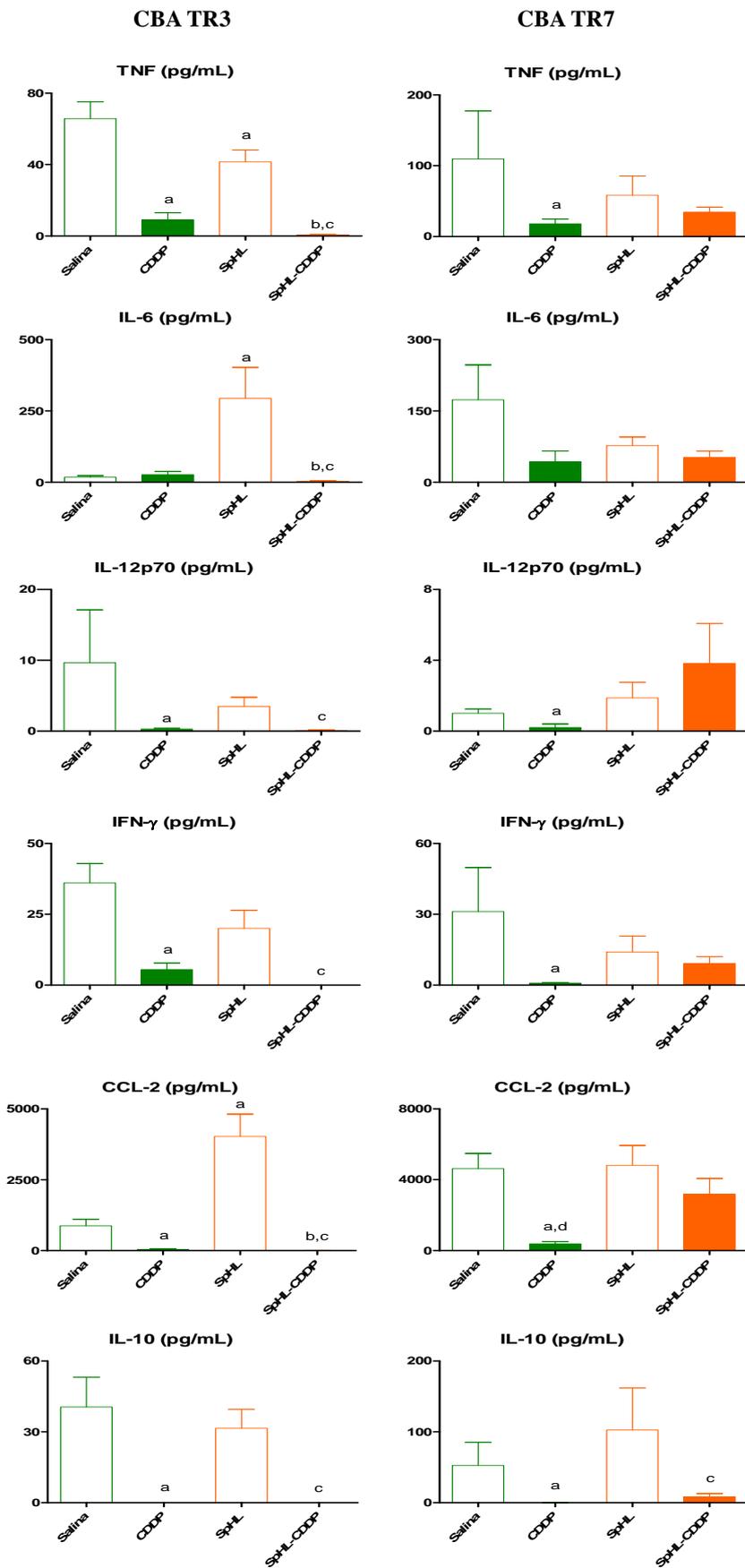


Figura 23. Análise da produção de citocinas/quimiocinas IL-12p70, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , CCL-2 do líquido ascítico obtido de camundongos Suíços fêmeas acometidos por tumor ascítico de Ehrlich e

submetidos aos tratamentos com solução de NaCl 0,9% (p/v), solução de CDDP livre (12 mg/Kg), lipossoma branco (SpHL, dose lipídica igual à administrada para o tratamento com SpHL-CDDP, 12 mg/Kg) ou com SpHL-CDDP, 3 (TR3) ou 7 dias após a inoculação do tumor (TR7). ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com NaCl 0,9% (p/v). ^bRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com CDDP livre. ^cRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL. ^dRepresenta diferença significativa entre o grupo indicado e o grupo tratado com SpHL-CDDP. Os resultados estão apresentados em pg/mL, expressos como a média ± erro padrão da média.

A Figura 24 mostra o diagrama com o resumo do que ocorreu quando foram comparados os grupos tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP e seus respectivos grupos-controle, nos dois regimes de tratamento estudados (TR3 e TR7). Observou-se que houve diminuição de TNF, IL-12p70, IFN- γ , CCL-2 e IL-10 no grupo tratado com CDDP livre, em relação àquele tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) nos dois regimes de tratamento. No regime de tratamento TR3, o grupo tratado com SpHL-CDDP apresentou diminuição de todas as citocinas (TNF, IL-6, IL-12p70, IFN- γ , IL-10) e quimiocina (CCL-2) analisadas, em relação ao seu controle (SpHL). Por outro lado, no regime de tratamento TR7 houve diminuição apenas de IL-10 no grupo tratado com SpHL-CDDP em relação ao seu controle.

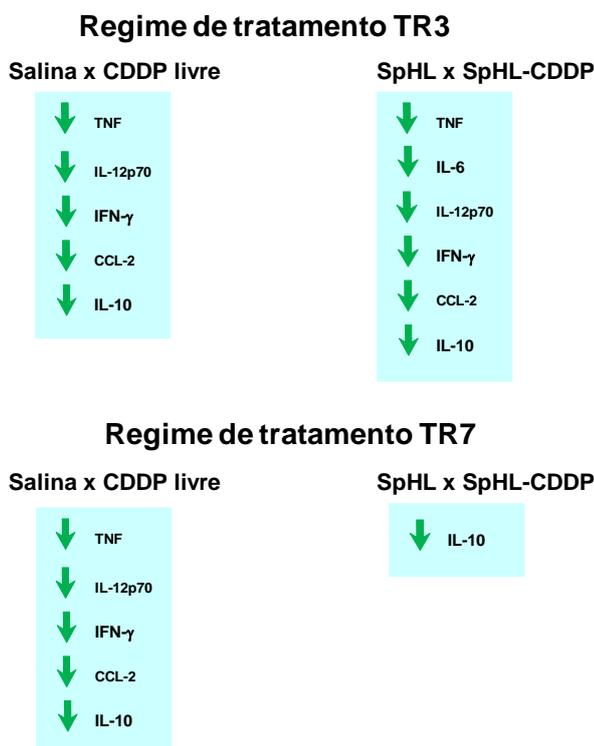


Figura 24. Diagrama mostrando o resumo da expressão das citocinas e quimiocina analisadas, comparando os grupo tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP e seus respectivos grupos-controle.

6 DISCUSSÃO

A fim de elucidar os fatores envolvidos na gênese do câncer, vários pesquisadores têm utilizado os tumores experimentais transplantáveis no estudo da carcinogênese física, química, viral e hormonal. Os tumores experimentais são mantidos em laboratório a partir do transplante em hospedeiros susceptíveis. A vantagem do uso dessas neoplasias, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo. O tumor de Ehrlich tem se mostrado um excelente modelo de neoplasia experimental. Trata-se de neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específico e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich. Apresenta células intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada e núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes. O índice mitótico é alto, com várias figuras de mitose atípicas. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares (25). A agressividade do tumor de Ehrlich não depende do grau de hemorragia e não é alterada pela linhagem do camundongo onde é feito o repique, porém cada linhagem reage de maneira específica podendo apresentar maior ou menor tempo de sobrevivência (26). O tumor de Ehrlich, quando inoculado por via intraperitoneal, cresce da forma ascítica, produzindo, nos primeiros dias, um líquido bastante fluídico com baixa população celular, que progride até o sétimo ou nono dias. Neste período, ocorre diminuição do número de células e o líquido torna-se hemorrágico e fibrinoso, coagulando-se de forma relativamente rápida. Normalmente o animal pode sobreviver cerca de 20 a 25 dias após a inoculação intraperitoneal, o que depende da linhagem dos camundongos, pois apesar da malignidade do tumor não se altera, cada linhagem parece reagir de uma maneira diferente (35). A caquexia causada pelo câncer é acusada como a maior causa de mortes em pacientes humanos e em animais portadores desta patologia (81). O desenvolvimento do tumor de Ehrlich, tanto na forma sólida como na ascítica, causa neutrofilia, trombocitopenia e presença de macrófagos supressores. No entanto, os processos causadores destas alterações ainda não foram esclarecidos (25). O tumor de Ehrlich tem sido muito utilizado em trabalhos relacionados ao câncer por ser um tumor de fácil manipulação, pelo fato da manutenção do tumor ser relativamente simples e principalmente, por ser espécie-específico (10,11,58,61,78,81–83).

Em 1932, Loewenthal & Jahn descreveram que células obtidas do tumor de Ehrlich quando implantadas na cavidade peritoneal, eram capazes de crescer em suspensão no fluido ascítico. A partir deste trabalho, várias linhagens do tumor de Ehrlich sólido foram

transformadas em tumor ascítico, e mantidas pela passagem intraperitoneal das células neoplásicas (84). O tumor de Ehrlich na sua forma ascítica possui, geralmente, 100% de crescimento, não regredindo espontaneamente. Após a inoculação intraperitoneal de fluido ascítico fresco contendo cerca de um milhão de células neoplásicas, os camundongos apresentam cerca de 5 a 20 mL de líquido ascítico leitoso ou hemorrágico em 7 a 14 dias, vindo a morrer em 10 a 20 dias. Quando o líquido ascítico fresco (0,1 mL contendo cerca de um milhão de células neoplásicas) é injetado dentro da cavidade peritoneal de camundongos, as células proliferam nas superfícies do peritônio visceral e parietal. Durante os primeiros 3 dias não são observados nem ascite ou pequenos nódulos tumorais. Porém, ao final do 4º dia de crescimento tumoral, há uma pequena quantidade de líquido ascítico, cerca de 1,0 mL. Por volta do 7º dia, os camundongos mostram dilatação abdominal leve a moderada, apresentando de 2 a 7 mL de líquido branco leitoso na cavidade peritoneal e pelo 14º dia, a maioria dos animais mostra distensão abdominal moderada a intensa, tendo de 5 a 25 mL de líquido. Apesar de alguns autores afirmarem a não ocorrência de metástase (85), estudos observaram a presença de grande quantidade de células neoplásicas depositadas acima da cápsula do baço, fígado e rins (81). O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão de MHC. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (86). A não expressão de MHC na superfície de células tumorais de Ehrlich é considerada um mecanismo de evasão do tumor, porque dificulta o reconhecimento destas células por células do sistema imune, tornando o sistema imune ineficaz no combate desta doença (87). O tumor ascítico de Ehrlich é intensamente utilizado em sistemas experimentais, uma vez que facilita a definição da quantidade de células que serão transplantadas, o que permite certo grau de controle (88), podendo ser utilizado em estudos experimentais de carcinomatose peritoneal. No entanto, após trabalhar com o tumor ascítico de Ehrlich, observamos algumas dificuldades no modelo experimental: para se fazer a manutenção do tumor de Ehrlich, é necessário um número suficiente de animais disponíveis para serem utilizados antes que as células tumorais sejam inoculadas nos próprios animais do experimento. Além disso, é necessário um treinamento por parte da pessoa que executará o experimento com animais, além de um cuidado grande na hora de inocular as células na cavidade abdominal dos mesmos, para evitar que o tumor se desenvolva na forma sólida e que ocorra perfuração em algum órgão interno dos animais. Ainda, o número de células a ser

inoculado nos animais deve ser padronizado em estudo piloto para que não aconteça de alguns animais desenvolverem o tumor ascítico e outros não.

Embora a maioria das drogas administradas por via intraperitoneal sejam rapidamente eliminadas do líquido peritoneal, este método de administração pode atingir concentrações máximas muito mais elevadas no líquido peritoneal em comparação com o mesmo medicamento administrado por via i.v., sendo que essa variação pode chegar a 20 vezes maior em tratamentos com CDDP (89). No entanto, a quimioterapia i.p. é considerada limitada por ter uma absorção muito grande, através da membrana peritoneal. A CDDP é um componente de baixo peso molecular, que é rapidamente absorvida pelos capilares na serosa i.p. e transferida para a circulação sistêmica (90). Conseqüentemente, é observada uma toxicidade sistêmica, que se manifesta principalmente no tecido renal, que é o fator dose-limitante da terapia com CDDP, por reduzir a qualidade de vida dos pacientes e restringir os protocolos de tratamento (6). Sistemas nanoestruturados têm sido desenvolvidos no intuito de reduzir a toxicidade sistêmica da CDDP e aumentar a concentração do fármaco no local do tumor (45). Sendo assim, a idéia principal deste estudo foi avaliar a capacidade de um novo sistema nanoestruturado (lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, contendo CDDP) em combater ou eliminar o tumor ascítico de Ehrlich, desenvolvido nos animais do estudo. Além disso, o presente trabalho avalia possíveis alterações nas células tumorais retiradas da cavidade abdominal dos animais, bem como a toxicidade causada ou não por este sistema nanoestruturado, após tratamento dos animais com esse sistema nanoestruturado, em comparação com a droga livre. No nosso trabalho, optamos por estudar diferentes fases de desenvolvimento do tumor: estágio inicial - tratamento TR3 e estágio avançado - tratamento TR7.

Estudos pré-clínicos de fases I-II realizados com lipossomas de circulação prolongada de CDDP, constituído por fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao metoxipolietilenoglicol e colesterol mostraram que essa formulação não foi eficaz. A falta de eficácia foi atribuída à baixa disponibilidade e cinética de liberação lenta de tal forma que a concentração da droga não alcançou o efeito terapêutico esperado (58). Sendo assim, tornou-se necessário modificar a formulação lipídica para melhorar sua eficácia. Os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada foram desenvolvidos e descritos em 1998 por De Oliveira e colaboradores (70). Esses lipossomas são compostos por dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), hemisuccinato de coleslerila (CHEMS) e diestearoilfosfatidiletanolamina associada a metoxipolietilenoglicol 2000 (DSPE-

PEG). A construção de lipossomas pH-sensíveis aproveita o comportamento de fase polimórfica de fosfatidiletanolamina insaturados como DOPE, que forma uma fase hexagonal invertida (HII), não sendo capaz de formar vesículas. A obtenção de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, como o CHEMS, os quais encontram-se sob a forma ionizada em pH fisiológico. O CHEMS se distribui homogeneamente entre as moléculas de fosfatidiletanolamina e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupos carboxílicos presentes no CHEMS e os grupos fosfatos presentes nos fosfolípides favorece a organização lamelar e a formação dos lipossomas. Enquanto em pH fisiológico esses lipossomas são estáveis, sua exposição a um meio ácido, como é o caso dos tecidos tumorais, resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (70,72). Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo importantes estudos relacionados à biodistribuição por via i.p. (74), biodistribuição por via i.v. (11), eficácia antitumoral em modelos de tumor de Ehrlich (74), toxicidade (10) e produção desses lipossomas em escala piloto (91).

A encapsulação da CDDP neste novo sistema de liberação para a administração por via i.p. tem algumas vantagens potenciais. A rápida absorção da CDDP através da membrana peritoneal pode ser evitada, resultando, portanto, em sua retenção na cavidade peritoneal por um período maior de tempo e seu melhor influxo nas células tumorais (6,92). Essa localização de SpHL-CDDP próximo ao sítio tumoral pode favorecer a liberação preferencial da CDDP nessa região devido ao baixo pH, provocado pela intensa atividade das células tumorais de Ehrlich. Uma maior concentração de CDDP no sítio tumoral pode levar a uma penetração mais profunda dentro do tumor, melhorando, portanto, sua eficácia terapêutica.

As nanopartículas podem ser especificamente desenvolvidas para alcançar qualquer alvo ou para evitar interações com o sistema imune. Uma interação entre uma nanopartícula e o sistema imunológico é considerado desejável, se considerarmos as várias aplicações médicas benéficas que essa interação pode trazer (93). No entanto, quando nanopartículas são reconhecidas como sendo do próprio organismo ou quando não existe reconhecimento imune para elas, isso representa uma importante área de interesse quando o objetivo é simplesmente a entrega de alguma droga. Atualmente é bem aceito que as propriedades como tamanho das nanopartículas, carga superficial, hidrofobicidade / hidrofiliabilidade e os efeitos estéricos de revestimento das partículas são responsáveis pela compatibilidade desta nanopartícula com o sistema imunológico. Estudos sobre o comportamento *in vivo* da primeira geração de lipossomas, denominados convencionais, demonstraram que os mesmos se acumulavam

rapidamente em tecidos ricos em macrófagos, tais como fígado, baço e medula óssea e eram rapidamente eliminados da circulação sanguínea, limitando sua ação em outros tecidos (61). A partir disso, foram propostas a incorporação de glicolípides na membrana lipídica, bem como modificações químicas na superfície dos lipossomas com o objetivo de torná-los capazes de escapar do SFM e permanecerem um tempo maior na circulação sanguínea (62). Esses lipossomas modificados, conhecidos como lipossomas de circulação prolongada, representaram um grande passo para a sua aplicação *in vivo*. Moghimi (94) relata que as nanopartículas podem ser elaboradas ligando-se a elas PEG ou outros tipos de polímeros ideais para proporcionar um ambiente hidrofílico, protegendo-as contra o sistema imunológico, como é o caso dos lipossomas utilizados no nosso estudo. Porém, embora esses polímeros sirvam para esconder as nanopartículas do sistema imune, dados sugerem a formação de anticorpos PEG-específicos numa segunda administração de lipossomas revestidos de PEG (95,96). Conseqüentemente, esses anticorpos resultariam num procedimento acelerado de clareamento dos lipossomas revestidos de PEG no sangue e contribuiriam para uma mudança no perfil farmacocinético de injeções subsequentes de lipossomas-PEG. Embora a literatura não contenha dados mostrando alterações nos níveis de citocinas após administração desses lipossomas contendo PEG, sugerimos um efeito causado pela formulação lipossomal utilizada no nosso trabalho, após observar um aumento de IL-6 e CCL2 nos animais tratados com SpHL em relação àqueles tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v).

Para que um agente terapêutico seja aceito e escolhido na prática clínica, é necessária a realização de estudos numerosos, chamados estudos pré-clínicos (97). Os estudos pré-clínicos são essenciais para dar embasamento à administração de novos medicamentos em seres humanos. Esses estudos devem checar os parâmetros de segurança e eficácia, através da avaliação da toxicidade e da atividade *in vitro* e *in vivo*, fornecendo informações sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e a toxicologia de fármacos em desenvolvimento. Informações de segurança e eficácia obtidas nessa fase são fundamentais para estimar uma dose inicial a ser administrada em seres humanos e identificar parâmetros a serem monitorados para detectar possíveis efeitos adversos. Portanto, vale ressaltar que um grande número de entidades químicas não chega aos estudos clínicos, devido a riscos inaceitáveis detectados nos estudos pré-clínicos. Nesse estudo, foram investigados pontos importantes para uma futura validação de um novo agente terapêutico: avaliação da eficácia do tratamento, avaliação do perfil das células tumorais de Ehrlich retiradas da cavidade

abdominal dos animais, após o tratamento com SpHL-CDDP, avaliação de possíveis alterações hematológicas e bioquímicas nos animais, após tratamento i.p. com SpHL-CDDP (indicativas de toxicidade causada pela droga), além da avaliação da resposta ao tratamento frente à produção de citocinas, CCL2 e VEGF no líquido ascítico retirado dos animais.

No regime de tratamento TR3 foi observada a morte de dois animais, sendo que dos sete sobreviventes, apenas um animal apresentou líquido ascítico. É possível que a inexistência de líquido ascítico ocorra pela pronta disponibilidade do fármaco na região peritoneal, permitindo-o atuar contra a proliferação das células tumorais. Este resultado se correlaciona com a redução da circunferência abdominal observada anteriormente no tratamento com CDDP livre, em relação ao seu grupo controle, tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v). A morte de 20% dos animais do grupo tratado com CDDP livre, no regime de tratamento TR3 possivelmente é decorrente da toxicidade do fármaco livre, o que diferencia do tratamento realizado com SpHL-CDDP. Para melhor esclarecer essa parte de toxicidade, convém destacar que o tratamento com SpHL-CDDP no regime TR3 não induziu a morte de nenhum animal, o que indica que a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis é capaz de reduzir a toxicidade do fármaco livre. Além disso, foi possível recuperar células tumorais somente de quatro animais tratados com SpHL-CDDP, o que sugere que esta formulação permite igualmente controlar a proliferação do tumor ascítico, e portanto, a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis não compromete a sua eficácia antitumoral. A porcentagem de células vivas no estudo de viabilidade, através da marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo, foi menor no grupo tratado com SpHL-CDDP em relação àquele tratado com SpHL, no regime de tratamento TR3. Ainda, no regime de tratamento TR7, os grupos tratados com as duas formulações contendo CDDP (CDDP livre ou SpHL-CDDP) apresentaram menor porcentagem de células vivas em relação aos grupos-controle tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e SpHL, respectivamente. Neste caso, podemos dizer que houve efeito citotóxico da CDDP nas células tumorais, mesmo quando esta encontra-se encapsulada em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada.

Quando se observa os dados obtidos na avaliação da apoptose, nota-se que, quando o tratamento é administrado no estágio inicial de desenvolvimento do tumor (TR3), os lipossomas contendo CDDP são capazes de induzir a morte das células por apoptose (o grupo tratado com SpHL-CDDP apresentou maior porcentagem de células em apoptose tardia do que o seu grupo controle, tratado com SpHL). No entanto, quando o tratamento é administrado no estágio avançado de desenvolvimento do tumor (TR7), o grupo tratado com

SpHL-CDDP apresentou maior porcentagem de células em necrose, enquanto o grupo tratado com CDDP livre apresentou maior porcentagem de células em apoptose tardia. Autores sugerem que, devido a CDDP ser uma droga inespecífica e reagir não apenas com o DNA, mas também com proteínas, e, apesar de apoptose e necrose serem formas conceitualmente distintas de morte celular, com diferentes características morfológicas e bioquímicas, estes dois tipos de morte podem ocorrer simultaneamente em tecidos ou culturas de células expostas ao mesmo agente (98). Além disso, sabe-se que, em altas doses, a CDDP pode danificar moléculas envolvidas no fornecimento de energia celular (ATP) e também proteínas direta ou indiretamente envolvidas no processo de apoptose (p53, Bax, Bcl-2, caspases), levando à morte celular por necrose (98). A porcentagem de células vivas foi menor nos animais tratados com SpHL-CDDP no regime de tratamento TR3 em comparação com seu grupo controle e menor nos animais tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP no regime de tratamento TR7, em relação aos seus grupos-controle. Este resultado mostra que ambas as formulações contendo CDDP continuam apresentando efeito citotóxico nas células tumorais e que a formulação lipossomal apresenta o mesmo efeito citotóxico do que a droga livre (66). Diferente disso, Bandak e colaboradores observaram atividade citotóxica reduzida no tratamento com CDDP lipossomal (SPI-077) em relação ao tratamento com CDDP livre (99).

O tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich no estágio inicial com SpHL-CDDP (dose 12 mg/Kg) apresentou-se mais eficaz do que o observado no tratamento com a droga livre. Este fato pode ser demonstrado pela maior taxa de sobrevivência dos camundongos tratados com SpHL-CDDP em relação àqueles tratados com CDDP livre. Além disso, o tratamento com SpHL-CDDP evitou a formação de ascite nos animais tratados no regime de tratamento TR3. Provavelmente, este achado se deve à concentração mais alta da droga na região peritoneal, após a administração de SpHL-CDDP em relação à injeção de CDDP livre, como demonstrado previamente em estudos de biodistribuição (74). Assim, a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada não influencia a atividade antitumoral da droga livre.

A avaliação do perfil do ciclo celular de células tumorais de Ehrlich após administração de SpHL-CDDP confirmou a manutenção da atividade antitumoral desta formulação. A maioria das células apresentou parada na fase G0/G1, bloqueando, assim, a progressão do ciclo celular. Como já publicado, a parada em G0/G1 serve para dar às células um tempo para reparar danos importantes antes que a replicação do DNA ocorra, evitando assim a propagação de lesões genéticas para células descendentes e ativando a via apoptótica

(98,100). Tem sido relatado que alterações conformacionais causadas pela ligação de CDDP à molécula do DNA induzem um dano no DNA, que afeta a replicação e transcrição, provocando uma torção da fita de DNA, o que dificulta a ação das enzimas de reparo e o remodelamento da cromatina e leva as células tumorais à morte por apoptose (101). Sugere-se que a interação entre CDDP e DNA ocorreu no nosso estudo, uma vez que a análise do perfil do ciclo celular revelou que o tratamento com SpHL-CDDP resultou num aumento significativo de células em G0/G1, o que é característico de células que sofreram dano no DNA. Acredita-se que os danos que causam parada na fase G0/G1 sejam processos irreversíveis, que levam a célula à morte por apoptose (78). No caso do tratamento da carcinomatose peritoneal disseminada com SpHL-CDDP também foi alcançada uma melhoria da eficácia antitumoral em comparação com o tratamento com CDDP livre. A mediana de sobrevivência dos animais tratados com SpHL-CDDP foi de 26 dias enquanto a dos animais tratados com CDDP livre foi de 14 dias. Além disso, SpHL-CDDP bloqueou completamente a progressão do ciclo celular em fase G0/G1. Quando se administra a droga livre, ela se encontra disponível de forma mais rápida e portanto será mais rapidamente eliminada do organismo, não conseguindo realizar o bloqueio do ciclo celular das células tumorais de forma tão eficiente. Nesse caso, pode ser que algumas células escapem da ação desta droga e continuem o ciclo celular normalmente. Quando se administra a formulação lipossomal de CDDP, um dos princípios primordiais da encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada é o fato dele não ser capturado pelo sistema fagocítico mononuclear e se desestabilizar no sítio tumoral, onde será liberada a droga. Com isso, supõe-se que esses lipossomas são desestabilizados aos poucos, liberando o conteúdo encapsulado de forma mais lenta. Isto sugere um efeito de longa duração e de maior eficácia, não permitindo que algumas células tumorais escapem da ação da droga e continuem o ciclo celular normalmente, como acontece após administração da droga livre. Embora não esteja relatada na literatura a relação entre sistemas nanoestruturados contendo CDDP e o efeito deles nas células tumorais, estudos revelam que quando a CDDP é encapsulada em lipossomas, estes lipossomas impedem a ligação entre CDDP e proteínas e a CDDP é gradualmente liberada diretamente para as células tumorais, através de adsorção, havendo endocitose e fusão. Este é o mecanismo pelo qual se explica o aumento de morte celular (102).

Para avaliação da atividade toxicológica da formulação utilizada, alguns parâmetros hematológicos foram pesquisados. Em relação à toxicidade de SpHL-CDDP quando comparado com CDDP livre, na dose de 12 mg/Kg, é possível enfatizar os efeitos benéficos

desses lipossomas como carreadores de CDDP. Vale a pena destacar a menor taxa de mortalidade para camundongos que receberam o tratamento com SpHL-CDDP, quando comparados com aqueles tratados com CDDP livre. A maioria dos parâmetros hematológicos investigados após administração de CDDP livre ou SpHL-CDDP em camundongos portadores de tumor de Ehrlich inicial ou avançado mostrou um perfil similar. O tratamento de camundongos apresentando câncer na fase inicial com ambas as formulações provocou uma supressão de granulócitos, sugerindo supressão hematopoiética, que é bem conhecida em tratamentos com a administração de CDDP (103,104). Além disso, de acordo com dados obtidos da literatura, o tratamento com CDDP livre parece induzir alta mielotoxicidade (10,105), uma vez que também pode ser observada redução na contagem de plaquetas. Camundongos portadores de tumor disseminado e tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) apresentaram diminuição significativa de células brancas do sangue, quando comparados com animais portadores de tumor em estágio inicial de desenvolvimento, também tratados com a mesma solução. Contudo, a administração de SpHL-CDDP contribuiu para a melhoria dos parâmetros hematológicos dos camundongos, o que pode ser visto pelo aumento na contagem de leucócitos, quando comparado ao grupo tratado com salina. Este achado pode ser explicado pela maior eficácia antitumoral associada a provável toxicidade menor na medula óssea induzida pelo tratamento com SpHL-CDDP, quando comparado com o tratamento com CDDP livre.

No que diz respeito à toxicidade renal, dados da literatura mostram que a administração i.p. de CDDP livre em doses de 5 e 10 mg/Kg em camundongos machos e fêmeas não afetou os níveis de uréia e creatinina no sangue, quando comparado com o grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) (10). Neste mesmo estudo, os autores observaram que até mesmo quando altas doses de SpHL-CDDP foram administradas, a toxicidade renal ainda provou ser menor do que a observada após tratamento com CDDP livre. Além disso, o índice uréia/creatinina em camundongos tratados com SpHL-CDDP foi semelhante ao encontrado no grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) (10). De acordo com nossos dados, a toxicidade renal pode ser demonstrada pela determinação do índice uréia/creatinina, observando que somente a presença de carcinomatose peritoneal no estágio inicial ou disseminado é suficiente para induzir um dano renal. O alto valor sanguíneo do índice uréia/creatinina reflete a redução na perfusão renal, bem como a taxa de filtração glomerular. No entanto, é importante notar que o tratamento de camundongos com CDDP livre ou SpHL-CDDP no modelo experimental animal de carcinomatose peritoneal no estágio inicial foi

capaz de reduzir o dano renal. Este fato pode ser evidenciado pela redução do índice uréia/creatinina no sangue destes animais tratados com essas formulações. Este achado demonstra o efeito antitumoral de ambas as formulações contendo CDDP. Contudo, quando o tumor encontrava-se em estágio disseminado na região peritoneal (regime de tratamento TR7), não foi possível melhorar a função renal, após o tratamento dos animais com CDDP livre ou SpHL-CDDP, já que valores elevados do índice uréia/creatinina foram obtidos. Semelhante ao encontrado em outros estudos, a formulação contendo CDDP, desenvolvida pelo nosso grupo (SpHL-CDDP), é capaz de reduzir o dano renal causado pela CDDP (10,74).

Além disso, é importante notar que a análise histológica revelou que o tratamento com SpHL-CDDP reduziu a toxicidade renal em ambos os modelos animais experimentais. Muito provavelmente, a redução da alteração do tecido renal observado para camundongos tratados com SpHL-CDDP é devido à capacidade dos lipossomas em modificar a biodistribuição da droga, quando encapsulada. Estudos de biodistribuição, utilizando CDDP livre e SpHL-CDDP em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o coeficiente de partição tecido renal/sangue no tratamento com CDDP livre foi maior que no tratamento com SpHL-CDDP, de 3,8 no tratamento com CDDP livre para 1,8 no tratamento com SpHL-CDDP (74). Este achado indica que ocorre um grande extravasamento e captação da CDDP livre pelo tecido renal, que por sua vez pode induzir a nefrotoxicidade. Embora não tenha ocorrido formação de extensas massas tumorais metastatizadas, é importante ressaltar que houve presença de células tumorais aderidas às cápsulas do baço e do fígado de todos os grupos do nosso estudo. Verçosa-Júnior e colaboradores (81) observaram metástases no baço, fígado e rins, com grande quantidade de células neoplásicas depositadas acima da cápsula desses órgãos.

A captação de SpHL-CDDP por órgãos do sistema fagocítico mononuclear, visualizada no estudo histopatológico esplênico é confirmada em estudos anteriores, onde a área sob a curva concentração-tempo de SpHL-CDDP no baço foi de 1501 %ID x h enquanto que no tratamento com CDDP livre o valor desta área foi de 224,5 %ID x h (74). Embora ocorra a captação de SpHL-CDDP por órgãos do sistema fagocítico mononuclear e degeneração severa do tecido hepático observadas por análise histopatológica, não foi detectada toxicidade hepática no estágio inicial ou avançado do tumor ascítico de Ehrlich, a partir da análise dos parâmetros de química clínica, principalmente com a dosagem de alanina aminotransferase (ALT). Em pequenos animais, a dosagem sérica de ALT é o teste de escolha para avaliar o comprometimento hepático. Qualquer lesão tissular ou doença que afete o

parênquima hepático induz a liberação de ALT na corrente sanguínea. Dessa forma, ALT além de ser sensível é bastante específica para o diagnóstico de lesão hepática. O aumento desta enzima está relacionado com a extensão da lesão e não com a gravidade da mesma. Portanto, mesmo que uma lesão não cause morte celular, pode ser suficiente para induzir a liberação de ALT na corrente sanguínea (106).

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização da placenta, mas atualmente tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares preexistentes e para demonstrar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa (107). A angiogênese é um importante processo para a sobrevivência e progressão da neoplasia. A vascularização é requerida para que o tumor primário se mantenha vivo e, principalmente, para a disseminação das metástases. A angiogênese é necessária no início e no fim da cascata metastática. O processo de formação do vaso sanguíneo é similar à invasão por células tumorais e pode ser considerado como uma forma de invasão regulada, com eventos independentes de adesão, proteólise e migração, que caracterizam a propagação de células neoplásicas (108). Atualmente, a carcinomatose peritoneal é vista como uma doença regional e que em 30% dos pacientes é possível fazer tratamento. Foi desenvolvida então a técnica de associação entre cirurgia citorrredutora e quimioterapia hipertérmica intraperitoneal (109). No entanto, estudo em cães mostra que as características fisiológicas do tumor em resposta à hipóxia gerada pela terapia hipertérmica podem inclusive levar a expressão de alguns genes que influenciam a angiogênese, metástase e termorresistência (110). A angiogênese é mediada por várias moléculas que são lançadas tanto pelo tumor quanto pela célula do hospedeiro. Entre o grande número de fatores angiogênicos, o VEGF é amplamente expresso na maioria dos cânceres e é um componente muito importante na angiogênese tumoral (111). Ao realizar a quantificação do VEGF no líquido ascítico retirado dos animais observou-se redução nos níveis deste fator de crescimento nos grupos tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP, tanto quando o tumor encontrava-se no estágio inicial, quanto no estágio avançado de desenvolvimento, em relação aos seus grupos controles. O tratamento com ambas as formulações contendo CDDP, claramente diminuiu a capacidade angiogênica do tumor de Ehrlich, apresentando assim um efeito antitumoral. Estudos anteriores observaram que a administração da combinação de anticorpo anti-VEGF e CDDP reduziu a proliferação celular para 65% em 24h e 82% em 72h (82). Kumar e colaboradores (78) observaram que a droga utilizada por eles (isotiocianato de alila – AITC) interferia na

produção de VEGF em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, *in vivo*, de forma dose-dependente.

Embora nós saibamos que a função principal do sistema imune dos mamíferos seja monitorar a homeostase tecidual, proteger contra patógenos invasores ou infecciosos e eliminar as células danosas, estudos clínicos e modelos de animais experimentais de carcinogênese ampliam nossa compreensão da complexa relação entre células do sistema imunológico e tumores em desenvolvimento (112). Coletivamente, alguns estudos sugerem que as células do sistema imune facilitam a invasão tumoral e a metástase, através de diferentes mecanismos (113). Balkwill & Mantovani sugerem que células inflamatórias e citocinas encontradas no tumor contribuem para o crescimento do tumor, progressão e imunossupressão (114). Vários produtos de genes pró-inflamatórios foram identificados como mediadores, exercendo papel fundamental na supressão da apoptose, proliferação, angiogênese, invasão e metástase. Dentre eles, podemos citar: TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, quimiocinas, VEGF. (115). Atualmente, há evidências de que citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6) e quimiocinas (CCL2, CCL3), produzidas pelas células tumorais e/ou por leucócitos e plaquetas associados ao tumor, podem contribuir diretamente para a progressão maligna. Várias citocinas e quimiocinas são induzidas por hipóxia, que é a diminuição de oxigênio presente no tecido tumoral e ausente no tecido normal (114). Nash e colaboradores sugerem que existam pelo menos dois caminhos pelos quais as citocinas podem auxiliar no crescimento das células tumorais: (1) Elas podem aumentar o crescimento do tumor diretamente funcionando como fatores de crescimento, promovendo metástases a partir da perda de adesão entre as células e/ou aumentando a angiogênese no tumor. (2) Elas também podem ser moduladoras importantes do sistema imunológico, aumentando o crescimento do tumor e bloqueando mecanismos de identificação e destruição do tumor mediados por células (116). Estudos indicam que IL-1 β , GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e VEGF são capazes de atrair células supressoras derivadas de células mielóides (MDSC) para o local do tumor (117,118). Estas células inibem a atividade de células T intratumorais e imunossuprime o organismo onde o tumor encontra-se instalado, o que resulta num prognóstico ruim (117).

Em organismos pluricelulares, as citocinas são mediadores intracelulares que regulam a sobrevivência, crescimento, diferenciação e as funções efetoras das células (119). Assim, não é surpresa que as citocinas afetem significativamente o crescimento dos tumores *in vivo*. Entretanto, elas também são produzidas por células cancerígenas e representam uma rede com

ampla variedade de constituintes funcionais e moleculares que podem agir como fatores promotores ou inibidores do crescimento tumoral. Como elas afetam o crescimento e função das células imunocompetentes, podem ativar ou modular respostas antitumorais específicas ou inespecíficas (120). O perfil de citocinas é, portanto, reflexo do estado imunológico do hospedeiro e pode ser utilizado para caracterizar a resposta imune celular. Analisando os resultados obtidos através da dosagem de citocinas no líquido ascítico, observamos que, de maneira geral, os animais portadores de carcinomatose peritoneal e tratados apenas com solução de NaCl 0,9% (p/v) e SpHL apresentaram maior concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p70, IL-6, TNF, IFN- γ) e da citocina reguladora (IL-10) no líquido ascítico em relação àqueles animais que foram tratados com as diferentes formulações contendo CDDP, principalmente no regime de tratamento TR3, o que sugere a presença de resposta inflamatória associada ao tumor. Pode-se dizer ainda que o tratamento administrado com diferentes formulações de CDDP apresenta-se mais eficiente no estágio inicial de desenvolvimento do tumor, já que, de maneira geral, é onde as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12p70, IFN- γ e TNF) estão em menor concentração quando comparados aos grupos controle (solução de NaCl 0,9% (p/v) e SpHL), mostrando que o tumor diminuiu após o tratamento. Esse dado é confirmado com a diminuição do diâmetro da circunferência abdominal dos animais tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP no regime de tratamento TR3 em relação aos seus grupos controle e com os dados que mostram que dos dez animais de cada grupo, sete/dez (no grupo CDDP livre) e dez/dez (no grupo SpHL-CDDP) não apresentaram formação de ascite. Estudo avaliando a liberação de citocinas por células endoteliais da veia umbilical humana, tratadas com componentes da platina *in vitro*, mostra que esses componentes da platina induzem a liberação de algumas citocinas, principalmente IL-1 e IL-6. Em compensação, a produção de IL-8 está diminuída (121). Aparentemente, a administração da formulação lipossomal contendo CDDP não é capaz de alterar o perfil de citocinas apresentado pelos animais, uma vez que apresentou perfil semelhante ao do grupo tratado com CDDP livre. Quando analisamos os dados obtidos quando o tratamento foi realizado já com o tumor em estágio avançado de desenvolvimento, a menor efetividade do fármaco está associada à reversão do perfil modulado de citocinas.

Autores sugerem que os principais mediadores responsáveis pela caquexia causada pelo câncer, também observada em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, sejam as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . Existem suspeitas de que o metabolismo de algumas destas citocinas ocorra no fígado, o que poderia causar danos na estrutura e/ou na produção de

enzimas deste órgão (122). No entanto, essas alterações nas enzimas hepáticas foram observadas de forma bem discreta no nosso estudo. Aparentemente, a IL-10 não teve atuação no modelo experimental escolhido por nós: pelo observado, entende-se que, nos grupos controle, como as citocinas pró-inflamatórias estão em nível aumentado, a IL-10 encontra-se aumentada para tentar regular a resposta pró-induzida pelo tumor. De forma geral, pode-se dizer que ambos tratamentos com CDDP livre ou SpHL-CDDP induzem um efeito modulador da resposta imune, tanto em citocinas de caráter inflamatório como regulador. Essa modulação está mais evidente ao tratamento com SpHL-CDDP em TR3, já que em TR7, as citocinas pró-inflamatórias que estavam moduladas voltam a aumentar em SpHL-CDDP, com exceção de IL-10, que ainda permanece em níveis baixos. Apesar de não termos feito a avaliação nos níveis de TGF- β e IL-4, é possível que essas citocinas estejam atuando como agentes moduladores, na ausência dos efeitos reguladores advindos de IL-10.

A proteína quimiotática de monócitos -1 ou CCL-2 é considerada uma quimiocina inflamatória, promotora da angiogênese (123), podendo ser produzida por uma variedade de células no microambiente do câncer, como monócitos e macrófagos, no caso do câncer de ovário (124). A manutenção da integridade vascular é rigidamente controlada por um equilíbrio de fatores de crescimento e citocinas de funções opostas para impedir ou acelerar a neovascularização e a hiperplasia (125). Deng e colaboradores (123), para determinar a influência potencial de células de câncer ovariano na produção de CCL-2 por macrófagos, isolou monócitos do sangue periférico, colocou-os em cultura e tratou as culturas com meio contendo OVCAR3 (linhagem de câncer de ovário humano) e determinou a concentração de CCL-2 no meio de cultura. Os resultados mostraram que, uma vez que infiltraram no tecido tumoral, macrófagos podem produzir uma quantidade significativa de CCL-2 sob a influência das células cancerosas.

Interessantemente, estes mesmos autores mostram que o VEGF é altamente expresso sob condições hipóxicas de um tumor maligno. Dessa forma, ele aumenta a permeabilidade vascular das células endoteliais, o que facilita o recrutamento de células do sistema imunológico, mais visivelmente macrófagos e células T, para o entorno imediato das células tumorais. Apesar de não termos feito estudo específico para avaliar o tipo celular presente no líquido ascítico, foi visível a presença de infiltrado inflamatório no local do tumor. É fato que, sendo o VEGF o fator de crescimento necessário no suprimento de oxigênio para o desenvolvimento do tumor e aumento da angiogênese, os grupos controle (tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e SpHL) deveriam e apresentaram níveis mais elevados desta

proteína do que os grupos tratados com diferentes formulações de CDDP. Os dados obtidos na dosagem de CCL-2 mostraram que os grupos tratados com diferentes formulações de CDDP apresentaram menor quantidade desta quimiocina em relação aos grupos controle. Esses dados corroboram com dados da literatura que mostram que no câncer ovariano epitelial, especificamente após estudo realizado no líquido ascítico, grandes quantidades de quimiocinas têm sido encontradas, dentre elas, CCL-2 e CCL-3, CXCL-8 e CCL-18. (126). Do ponto de vista imunológico, a atração de macrófagos para o local do tumor representa papel importante tanto no combate ao tumor, quanto na retirada de células já mortas pela droga administrada. No nosso estudo, há indícios de que CCL-2 esteja agindo com forças pró-angiogênicas, como sugerem alguns autores. Deng e colaboradores (123) mostraram que a habilidade em reduzir a expressão de um supressor endógeno de angiogênese (TNFSF15) sugere que CCL-2 é capaz de mudar o equilíbrio entre forças pró- e anti-angiogênese no microambiente do câncer, em favor da inflamação e neovascularização, tornando o CCL-2 mais um potente promotor da progressão do câncer, do que simplesmente um direcionador na migração de células endoteliais. Dados desses autores mostram que quanto maior o nível de VEGF na região tumoral, maior a expressão de CCL-2, após o extravasamento de macrófagos e células T do meio intra-vascular para o meio externo. Esses dados estão de acordo com os dados obtidos no nosso trabalho, onde os grupos controle, tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL apresentaram níveis maiores de VEGF e CCL-2 em relação aos grupos tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP, nos dois regimes de tratamento estudados.

Para considerar a formulação desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa uma formulação aplicável na prática clínica, o processo de preparo destes lipossomas como medicamentos deve ser reprodutível e garantir os limites aceitáveis para a esterilidade, presença de endotoxinas e outros padrões de controle de qualidade. Além disso, os lipossomas devem ser de tamanho definido, apresentando uma distribuição unimodal e apresentar altos níveis de reprodutibilidade na encapsulação da droga. Dados do nosso grupo de pesquisa sugerem que o processo de produção piloto de SpHL-CDDP, usando três estágios chamados evaporação em fase reversa, homogeneização sob alta pressão e ultrafiltração é eficiente e economicamente praticável e reprodutível em larga escala (91). Vale ressaltar aqui que a apirogenicidade e esterilidade de SpHL-CDDP podem ser alcançadas, utilizando matérias-primas estéreis e livres de endotoxina e realizando todo o procedimento sob condições assépticas. Estes autores observaram ainda que o SpHL-CDDP liofilizado foi superior em termos de retenção de CDDP, quando comparado à dispersão lipossomal líquida, concluindo

que, quando estabilizado com um crioprotetor adequado e liofilizado, o SpHL-CDDP pode ser um carreador de CDDP adequado na terapia anti-câncer.

7 CONCLUSÃO

O tratamento de camundongos suíços portadores de tumor ascítico de Ehrlich no estágio inicial ou avançado de desenvolvimento com SpHL-CDDP é capaz de melhorar a eficácia antitumoral, diminuir a toxicidade renal e da medula óssea, provocadas pela terapia baseada em CDDP e diminuir a angiogênese, um dos mecanismos responsáveis pela promoção e desenvolvimento do tumor. Portanto, estes resultados abrem a possibilidade de uso futuro de SpHL-CDDP para o tratamento da carcinomatose peritoneal

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar as vias de sinalização de morte celular desencadeadas no estudo já realizado;
- ✓ Utilizar altas doses de SpHL-CDDP para o tratamento da carcinomatose peritoneal;
- ✓ Estudar especificamente a interação entre os lipossomas pH-sensíveis e o sistema imune do animal acometido pela carcinomatose peritoneal.
- ✓ Avaliar a terapia combinada, associando tratamento i.v. e i.p. com SpHL-CDDP no combate à carcinomatose peritoneal.

9 ANEXOS

9.1 UFMG/CETEA Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 165/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação pré-clínica de lipossomas pH-sensíveis administrados por via intraperitoneal**", que tem como responsável **Mônica Cristina de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 12/2007**.

Este certificado expira-se em **19/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 165/2007**, related to the project entitled "**Preclinical evaluation of pH-sensitive liposomes administered by intraperitoneal route**", under the supervision of **Mônica Cristina de Oliveira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 19, 2007**.

This certificate expires in **December 19, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Dezembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert v1.0)

9.2 MS/FIOCRUZ/CEUA Licença



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-14/09

Certificamos que o protocolo (P-50/09-4), intitulado "Avaliação da eficácia do tratamento com lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich e seu efeito no ciclo celular e nas vias de transdução de sinais", sob a responsabilidade de ANDREA TEIXEIRA DE CARVALHO, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 05/10/2013 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 320 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 2 Mes(es), Peso: 30,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 5 de outubro de 2009

Dr^o Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118p. ISBN 978-85-7318-196-8 (versão impressa). ISBN 978-85-7318-194-4 (versão eletrônica). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2012.
2. Kondagunta GV, Bacik J, Donadio A, Bajorin D, Marion S, Sheinfeld J, et al. Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6549–55.
3. Muggia F, Fojo T. Platinums: extending their therapeutic spectrum. *J Chem* 2004;16:77–82.
4. Shirazi FH, Molepo JM, Stewart DJ, Ng CE, Raaphorst GP, Goel R. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140(2):211–8.
5. Le Chevalier T, Brisgand D, Douillard JY, Pujol JL, Alberola V, Monnier a, et al. Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *J Clin Oncol* 1994;12(2):360–7.
6. Phillips WT, Medina LA, Klipper R, Goins B. A Novel Approach for the Increased Delivery of Pharmaceutical Agents to Peritoneum and Associated Lymph Nodes. *Pharmacol Exp Ther* 2002;303(1):11–6.
7. Mattheolabakis G, Taoufik E, Haralambous S, Roberts M, Avgoustakis K. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71(2):190–5.
8. Velinova MJ, Staffhorst RWHM, Mulder WJM, Dries AS, Jansen BAJ, Kruijff BD, et al. Preparation and stability of lipid-coated nanocapsules of cisplatin: anionic phospholipid specificity. *Biochim Biophys Acta* 2004;1663:135 - 142.
9. Carvalho Júnior a D, Vieira FP, Melo VJD, Lopes MTP, Silveira JN, Ramaldes G a, et al. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(8):1149–57.
10. Leite EA, Giuberti CDS, Wainstein AJ a, Wainstein APDL, Coelho LGV, Lana AMQ, et al. Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. *Life Sci* 2009;84(19-20):641–9.
11. Júnior ADC, Mota LG, Nunan E a, Wainstein AJ a, Wainstein APDL, Leal AS, et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sci* 2007;80:659–64.

12. Brasileiro-Filho G, Guimarães R, Bogliolo L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro-Filho, G, editor. *Bogliolo Patologia Geral*. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. P. 148–192.
13. Instituto Nacional do Câncer. *Incidência de cancer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
14. Silva THÁ, Butera AP, Leal DHS, Alves RJ. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta$. *Braz J Pharmac Sci* 2007;43:1–17.
15. Dirks P, Rutka J. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle - a review. *Neurosurgery*. 1997;40:1000–15.
16. Almeida VLD, Leitão A, Reina LDCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* 2005;28(1):118–29.
17. Gullino P, Grantham F, Smith S, Haggerty A. Modifications of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. *J Natl Cancer Inst* 1965;34(6):857–69.
18. Stubbs M, Mc Sheehy P, Griffiths R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:13–30.
19. Alberts B et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p. ISBN 85-363-0272-0.
20. Su H, Tsai C, Perng R. Peritoneal carcinomatosis in lung cancer. *Respirology* 2008;13(3):465–7.
21. Da Silva RG, Sugarbaker PH. Analysis of prognostic factors in seventy patients having a complete cytoreduction plus perioperative intraperitoneal chemotherapy for carcinomatosis from colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2006;203(6):878–86.
22. Barbolina MV, Adley BP, Kelly DL, Fought AJ, Scholtens DM, Shea LD, et al. Motility-related actinin alpha-4 is associated with advanced and metastatic ovarian carcinoma. *Lab Invest* 2008;88(6):602–14.
23. Huynh H, Teo CCM, Soo KC. Bevacizumab and rapamycin inhibit tumor growth in peritoneal model of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2007;6(11):2959–66.
24. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354(1):34–43.
25. Da Silva A. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos (dissertação). Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

26. Kodama M, Kodama T. Enhancing Effect of Hydrocortisone on Hematogenous Metastasis of Ehrlich Ascites Tumor in Mice. *Cancer Res* 1975;35:1015–21.
27. Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* 1990;14(1):125–32.
28. Segura J, Barbero L, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett* 1997;414:1–6.
29. Segura J, Barbero L, Márquez J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett* 2000;74:111–5.
30. Morales J, Vélez D, Subiza J. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. *Exp Hematol* 1999;27(12):1757–67.
31. Karcher D, Pherson M. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson R, Pincus M, editores. *Henry's - Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. P. 502–5.
32. Gest C, Mirshahi P, Li H, Pritchard L-L, Joimel U, Blot E, et al. Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-IR as therapeutic targets. *Cancer Lett* 2012;317(2):207-17.
33. Saleh M, Hammad E, Ramadan M, Abd El-Rahman A, Enein A. The use of adenosine deaminase measurements and QuantiFERON in the rapid diagnosis of tuberculous peritonitis. *J Med Microbiol*. In press 2011.
34. Wang K, Zhu Z, Zheng H, Deng Y, Pan C, Sun L, et al. Protective hepatitis B surface antibodies in blood and ascites fluid in the early stage after liver transplantation for hepatitis B diseases. *Hepatol Res* 2011;42(3):280-7.
35. Dagli M. *Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental (tese)*. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP; 1989.
36. Bonamin L. *Stress & cancer. A influência do isolamento social no crescimento do tumor de ehrlich em camundongos (dissertação)*. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFP; 1990.
37. Palermo-Neto J, Massoco C, de Souza W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun* 2003;17:43–54.
38. Mady E. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venom on Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo. *J Venom Anim Toxins*. 2002;8(2):283–96.
39. Kleeb S, Rizzo M, Dagli M, Frussa-Filho R. Haloperidol increases spreading and nitric oxide production in macrophages from tumor-bearing mice: a possible mechanism for its antitumoral effect. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:575–80.

40. Yoneda K, Tetsuya Y, Eisaku U, Tokio O. The inhibitory action of BOF-A2, a 5-fluorouracil derivative, on squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1999;137(1):17–25.
41. Hospital A. C. Camargo. Tratamento com Radioterapia. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/index.php?page=18>. Acesso em: 20 jun. 2011.
42. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko J, Mansour V. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969;222(5191):385–6.
43. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003;1:47–61.
44. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003;10(6):1663–82.
45. Boulikas T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol Rep* 2004;12(1):3–12.
46. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33(1):9–23.
47. Kohno K, Uchiumi T, Niina I, Wakasugi T, Igarashi T, Momii Y, et al. Transcription factors and drug resistance. *Eur J Cancer* 2005;41(16):2577–86.
48. Gonçalves EM, Ventura CA, Yano T, Rodrigues Macedo ML, Genari SC. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. *Cell Biol Int* 2006;30(6):485–94.
49. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 2010;7:543–66.
50. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2001;61(16):6185–93.
51. Vikhanskaya F, Marchini S, Marabese M, Galliera E, Broggin M. p73 Overexpression Is Associated with Resistance to Treatment with DNA-damaging Agents in a Human Ovarian Cancer Cell Line. *Cancer Res* 2001;:935–8.
52. Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, Tsiatas ML, Liakos C, Tsitsilonis O, et al. Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):421–7.
53. Kumagai S, Sugiyama T, Nishida T, Ushijima K, Yakushiji M. Improvement of intraperitoneal chemotherapy for rat ovarian cancer using cisplatin-containing microspheres. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:412–7.

54. Tamura T, Imai J, Matsumoto A, Tanimoto M, Suzuki A. Organ distribution of cisplatin after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;54:1–7.
55. Burger KNJ, Staffhorst RWHM, de Vijlder HC, Velinova MJ, Bomans PH, Frederik PM, et al. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. *Nat Med* 2002;8(1):81–4.
56. Mizumura Y, Matsumura Y, Hamaguchi T, Nishiyama N, Kataoka K, Kawaguchi T, et al. Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:328–36.
57. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, et al. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 2003;63:8977–83.
58. Harrington KJ, Lewanski CR, Northcote AD, Whittaker J, Wellbank H, Vile RG, et al. Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077TM) in patients with inoperable head and neck cancer. *Ann Oncol* 2001;12:493–6.
59. Bangham A, Standish M, Watkins J. Diffusion of univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238–52.
60. Gregoriadis G, Leathwood P. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1971;14(2):95–9.
61. Allen TM, Hansen C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1991;1068:133–41.
62. Gabizon A, Papahadjopoulos D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:94–100.
63. Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 1987;223(1):42–6.
64. Klibanov A, Maruyama K, Torchilin V, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990;268(1):235–7.
65. Vemuri S, Rhodes C. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995;70(2):95–111.
66. Newman M, Colbern G, Working P, Engbers C, Amantea M. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43(1):1–7.
67. Devarajan P, Tarabishi R, Mishra J, Ma Q, Kourvetaris A, Vougiouka M, et al. Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals. *Anticancer Res* 2004;24:2193–200.

68. Batista C, De Carvalho C, Magalhães N. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Braz J Pharm Sci* 2007;43(2):167–79.
69. Working P, Newman M, Sullivan T, Brunner M, Podell M, Sahenk Z, et al. Comparative intravenous toxicity of cisplatin solution and cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 1998;46(1):155–65.
70. De Oliveira M, Fattal E, Couvreur P, Lesieur P, Bourgaux C, Ollivon M, et al. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. *Biochim Biophys Acta* 1998;1372:301–10.
71. De Oliveira M, Boutet V, Fattal E, Boquet D, Grognet J, Couvreur P, et al. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sci* 2000;67:1625–37.
72. Simões S, Moreira JN, Fonseca C, Düzgüneş N, de Lima MCP. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:947–65.
73. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 2005;5:161–71.
74. Araújo JGC, Mota LDG, Leite EA, Maroni LDC, Wainstein AJA, Coelho LGV, et al. Biodistribution and antitumoral effect of long-circulating and pH-sensitive liposomal cisplatin administered in Ehrlich tumor-bearing mice. *Exp Biol Med* 2011;236(7):808–15.
75. Gore M, du Bois A, Vergote I. Intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer remains experimental. *J Clin Oncol* 2006;24(28):4528–30.
76. Chauffert B, Favoulet P, Polycarpe E, Duvillard C, Beltramo J, Bichat F, et al. Rationale supporting the use of vasoconstrictors for intraperitoneal chemotherapy with platinum derivatives. *Surg Oncol clin N Am* 2003;12(3):835–48.
77. Lecoeur H, Prévost M, Gougeon M. Oncosis Is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V / propidium iodide assay. *Cytometry* 2001;44:65–72.
78. Kumar A, D'Souza SS, Tickoo S, Salimath BP, Singh HB. Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth in vivo. *Integr Cancer Ther* 2009;8(1):75–87.
79. Maeno T, Tanaka T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, Nakagawa J, et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all trans retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(2):246–53.

80. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho O a, Prata a, Silva LD a, Rabello a, Teixeira-Carvalho a, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 2006;146(1):124–32.
81. Verçosa Júnior D, Souza-Fagundes E, Cassali G, Ribeiro E, Zani C, Melo M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Ehrlich ascítico no camundongo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58(5):788–98.
82. Ghosh S, Maity P. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization in combination with cisplatin reduces EAC tumor growth. *Int Immunopharmacol* 2006;6(1550-9).
83. Belo A, Barcelos L, Ferreira M, Teixeira M, Andrade S. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci* 2004;74(23):2827–37.
84. Klein G, Klein E. The Transformation of a Solid Transplantable Mouse Carcinoma into an Ascites Tumor. *Cancer Res* 1951;11:466–9.
85. Sugiura K. Tumor transplantation. In: Gay W, editor. *Methods of Animal Experimentation*. London: Acad. Press NY and London; 1965. P. 171–222.
86. Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JAM. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci* 2004;75(2):245–55.
87. Brehmer JS. Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (dissertação). Itajaí (SC): Universidade do Vale do Itajaí; 2005.
88. De Oliveira A. Potencial metastático e reconhecimento da e-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich (tese). Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2005.
89. Howell S, Kirmani S, McClay E, Kim S, Braly P, Plaxe S. Intraperitoneal cisplatin-based chemotherapy for ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 1991;18:5–10.
90. Fujiyama J, Nakase Y, Osaki K, Sakakura C, Yamagishi H, Hagiwara A. Cisplatin incorporated in microspheres: development and fundamental studies for its clinical application. *J Control Release* 2003;89(3):397–408.
91. Giuberti C, Reis E, Rocha T, Leite E, Lacerda R, Ramaldes G, et al. Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *J Liposome Res* 2010;21(1):60–9.
92. Schrijvers DL. Extravasation: a dreaded complication of chemotherapy. *Ann Oncol* 2003;14(3):26–30.
93. Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinol* 2010;151(2):458–65.

94. Moghimi SM. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers. *Biochim Biophys Acta* 2002;1590(1-3):131–9.
95. Wang X, Ishida T, Kiwada H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 2007;119(2):236–44.
96. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, Kiwada H. PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 2007;122(3):349–55.
97. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Manual de orientação em pesquisa clínica e farmacovigilância. 2006. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/profissionais/biblioteca/pdf/Farmacovigilancia.pdf>. Acesso em: 05 set. 2011.
98. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001;59(4):657–63.
99. Bandak S, Goren D, Horowitz A, Tzemach D, Gabizon A. Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models. *Anticancer Drugs* 1999;10(10):911–20.
100. Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S, et al. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol* 2006;29:471–9.
101. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* 2003;10(6):1663–82.
102. Zhang X, Yang H, Gu K, Chen J, Rui M, Jiang G-L. In vitro and in vivo study of a nanoliposomal cisplatin as a radiosensitizer. *Int J Nanomedicine* 2011;6:437–44.
103. Asna N, Lewy H, Ashkenazi IE, Deutsch V, Peretz H, Inbar M, et al. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. *Life Sci* 2005;76(16):1825–34.
104. Working P, Newman M, Sullivan T, Brunner M, Podell M, Sahenk Z, et al. Comparative intravenous toxicity of cisplatin solution and cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 1998;46(1):155–65.
105. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33(1):9–23.
106. Kramer J, Hoffman W. Clinical enzymology. In: Kaneko J, Harvey J, Bruss M, editores. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6a. ed. California: Academic Press; 1997. P. 303–25.

107. Folkman J, Brem H. Angiogenesis and inflammation. In: Gallin, JI, Goldstein, IM, Snyderman, R, editores. *Inflammation basic principles and clinical correlates*. 3a. ed. New York: Raven Press; 1999. P. 821–39.
108. Folkman J. The vascularization of tumor. *Sci Am* 1976;234:59–73.
109. Costa L. Cirurgia em câncer colorretal. *Prática hospitalar*. 2008;57:23–5.
110. Vujaskovic Z, Poulson J, Gaskin A, Thrall D, Page R, Charles H, et al. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46(1):179–85.
111. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. *Life Sci* 2011;89:147–58.
112. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):24–37.
113. Man Y-gao, Mason J, Harley R, Kim YH, Zhu K, Gardner W a. Leukocyte-mediated cell dissemination and metastasis: findings from multiple types of human tumors. *J Cell Biochem* 2011;112:1154–67.
114. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*. 2001;357(9255):539–45.
115. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006;72(11):1605–21.
116. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer* 1999;6(1):93–107.
117. Young MR, Kolesiak K, Wright M a, Gabrilovich DI. Chemoattraction of femoral CD34+ progenitor cells by tumor-derived vascular endothelial cell growth factor. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(10):881–8.
118. Vasievich EA, Huang L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm* 2011;8(3):635–41.
119. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334:297–314.
120. Nicolini A, Carpi A, Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(5):325–37.
121. Shi Y, Inoue S, Shinozaki R, Fukue K, Kougo T. Release of cytokines from human umbilical vein endothelial cells treated with platinum compounds in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1998;89(7):757–67.

122. Korekane H, Nishikawa A, Imamura K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Arch Biochem Biophys* 2003;412(2):216–22.
123. Deng W, Gu X, Lu Y, Gu C, Zheng Y, Zhang Z, et al. Down-modulation of TNFSF15 in ovarian cancer by VEGF and MCP-1 is a pre-requisite for tumor neovascularization. *Angiogenesis* 2011;15(1):71-85.
124. Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, et al. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 1995;95(5):2391–6.
125. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;6219:58–61.
126. Schutyser E, Struyf S, Proost P, Opdenakker G, Laureys G, Verhasselt B, et al. Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma. *J Biol Chem* 2002;277(27):24584–93.