

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO
DOXORRUBICINA

Belo Horizonte

2016

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO
DOXORRUBICINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Coorientador: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte

2016

S586a Silva, Juliana de Oliveira.
Avaliação da biodistribuição e da toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina / Juliana de Oliveira Silva. – 2016.
91 f. : il.

Orientador: André Luís Branco de Barros.
Co-orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Câncer – Teses. 2. Agentes antineoplásicos – Teses. 3. Lipossomas – Teses. 4. Doxorubicina – Teses. 5. Toxicidade – Teses. 6. Farmacocinética – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Oliveira, Mônica Cristina de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 616.994



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG


FOLHA DE APROVAÇÃO

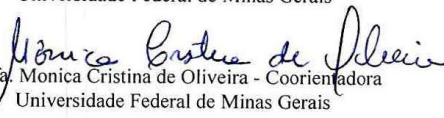
Avaliação da biodistribuição e toxicidade aguda in vivo de lipossomas pH-sensíveis e circulação prolongada contendo doxorubicina


JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 01 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. André Luís Branco de Barros - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Profa. Monica Cristina de Oliveira - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Lucas Antonio Miranda Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais


Profa. Ana Paula Lucas Mota
UFMG

Belo Horizonte, 1 de agosto de 2016.

**Dedico este trabalho aos meus pais
Renata e Giovani e a minha avó Maria Augusta.**

Obrigada por me apoiarem,

De onde estejam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Renata e Giovani por me darem apoio sempre e por me apoiarem em todas as minhas decisões. Agradeço ainda por serem meu ponto forte. Agradeço a minha irmã por estar sempre por perto e se orgulhar de mim.

A todos que estiveram sempre por perto, me apoiando, me trazendo momentos leves e divertidos e principalmente me ouvindo reclamar pacientemente.

Agradeço ao Prof. André pela confiança desde o momento que aceitou meu pedido de orientação. Obrigada por contribuir enormemente com o meu crescimento acadêmico e profissional, transmitindo seu conhecimento e despendendo seu tempo, sempre disposto a me ajudar, e por ter se tornado, além de orientador, um amigo. Obrigada por acreditar em mim.

Aos Profs. Varlbert e Mônica por me receberem tão bem no Laboratório de Radioisótopos e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, sendo exemplos de profissionalismo e seriedade.

A Profa. Elaine pelo apoio constante durante todo o mestrado, tendo sempre considerações importantes e engrandecedoras para este trabalho.

A Profa. Karina e ao Prof. Adriano do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FAFAR/UFMG) e Profa. Andrea da Escola de Farmácia (UFOP), pelas colaborações fundamentais para finalização deste projeto.

Aos Profs. Geovanni e Enio do Laboratório de Patologia Comparada (ICB/UFMG), por todos os ensinamentos e colaboração, e principalmente, por despertarem em mim, desde a graduação, o interesse pelo estudo do novo, me motivando a prosseguir na carreira acadêmica.

As Andrezetas: Renata, Pequena, Carol e Lizi. Por estarem sempre por perto, dispostas a ajudar, a tomar um café ou apenas focar sobre a vida alheia, tornando tudo mais leve. Agradeço especialmente a Renata, por ter me ajudado muito em todas as etapas desse trabalho.

Aos todos os amigos do LTF e Radioisótopos pelo apoio e pela convivência.

Aos alunos de IC Sued e Nara por me auxiliarem na execução deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Vinícius e Vanderli pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos técnicos Adelaide e Batista, pela gentileza e grande auxílio nos experimentos em animais.

Agradeço a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Cada pessoa envolvida, direta ou indiretamente, neste trabalho teve papel importante para que fosse finalizado. Muito Obrigada!

“Onde foi, se posso perguntar?”

- disse Thorin a Gandalf, enquanto cavalgavam.

- Ver o caminho para a frente.”

(J.R.R. Tolkien)

RESUMO

A doxorrubina (DOX) é um agente antineoplásico da classe dos antibióticos antracíclicos amplamente utilizado no controle do crescimento de tumores sólidos, no entanto, os efeitos adversos graves deste medicamento, sobretudo a cardiotoxicidade acentuada e por vezes irreversível, tem limitado o uso clínico da DOX. Neste contexto, uso de lipossomas responsivos a variações de pH tem se mostrado uma estratégia promissora de entrega específica de fármacos citotóxicos na região tumoral. Os estudos pré-clínicos de biodistribuição e toxicidade aguda são etapas fundamentais no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, pois determinam as vias de eliminação e acúmulo deste novo produto, permitindo inferir dados relacionados a atividade e possíveis alvos de toxicidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biodistribuição e toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorrubina. Os estudos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob número de protocolo (302/14). Para o estudo de biodistribuição, DOX marcada com o radioisótopo tecnécio-99m foi encapsulada em lipossomas pH-sensíveis (SpHL-DOX-^{99m}Tc) e não pH-sensíveis (nSpHL-DOX-^{99m}Tc). Foram obtidos lipossomas com tamanho de partícula, potencial zeta, teor de encapsulação e perfil de liberação esperados e adequados ao uso intravenoso (IV). A pH-sensibilidade foi comprovada *in vitro*. SpHL-DOX-^{99m}Tc e nSpHL-DOX-^{99m}Tc apresentaram perfil de depuração sanguínea semelhantes em camundongos BALB/c fêmeas sadios, no entanto, SpHL-DOX-^{99m}Tc apresentou área sobre a curva 1,36 vezes maior que a encontrada para nSpHL-DOX-^{99m}. SpHL-DOX-^{99m}Tc e nSpHL-DOX-^{99m}Tc apresentaram biodistribuição esperada em camundongos portadores de tumor murino de células 4T1, com acúmulo de radiação em fígado e baço, além de acúmulo específico na região tumoral. Observou-se acúmulo significativamente maior de SpHL-DOX-^{99m}Tc na região do tumor. Para o estudo de toxicidade, camundongos sadios foram tratados com DOX ou SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg) em dose única por via intravenosa, e observados por 14 dias. Observou-se mortalidade de 100% dos animais tratados com 17,5 mg/kg de DOX, sendo que não houve mortalidade nos demais grupos. Após os 14 dias, os animais foram eutanasiados e o sangue e órgãos coletados para exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Observou-se diminuição significativa na toxicidade renal, hepática e cardíaca nos animais tratados

com SpHL-DOX devido a alterações morfológicas, bioquímicas e eletrocardiográficas significativamente menores quando comparados aos animais tratados com DOX em todas as doses. Foi possível concluir com este trabalho que lipossomas pH-sensíveis promovem maior acúmulo do fármaco na região do tumor e seu uso é capaz de reduzir a toxicidade sistêmica da DOX.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an anthracyclic antineoplastic agent widely used on control of solid tumors, however, severe side effects of this drug, especially severe and sometimes irreversible cardiotoxicity, has limited the DOX use. In this context, the use of liposomes responsive to pH variation has shown a promising strategy to specific delivery of cytotoxic drugs into the tumor. Preclinical studies of biodistribution and acute toxicity are critical steps in pharmaceuticals development. This studies can determine the routes of elimination and accumulation of this new product, allowing to infer data related to activity and possible toxicity targets. Therefore, the aim of this study was evaluate the biodistribution and *in vivo* acute toxicity of doxorubicin pH-sensitive, prolonged circulation liposome. *In vivo* studies were approved by the Ethics Committee on Animal Use with protocol number (302/14). To the biodistribution study, DOX was labeled with radioisotope technetium-99m and was encapsulated in pH-sensitive liposomes (SpHL-DOX-^{99m}Tc) and not pH-sensitive liposomes (nSpHL-DOX-^{99m}Tc). Liposomes were obtained with particle size, zeta potential, encapsulating percentage and leakage profile expected and suitable for intravenous (IV). The pH-sensitivity was confirmed *in vitro*. SpHL-DOX-^{99m}Tc and nSpHL-DOX-^{99m}Tc showed the same blood clearance profile in healthy females Balb/c mice, however, SpHL-DOX-^{99m}Tc showed area under curve 1.36 times higher than nSpHL-DOX-^{99m}Tc. SpHL-DOX-^{99m}Tc and nSpHL-DOX-^{99m}Tc showed expected biodistribution in mice with 4T1 tumor cells. Was observed radiation accumulation in liver and spleen. There was higher accumulation of SpHL-DOX-^{99m}Tc in the tumor. To toxicity studies, healthy mice were treated with DOX and SpHL-DOX (10, 15, and 17.5 mg/kg) in single dose intravenously and they was observed for 14 days. There was 100% of mortality of the animals treated with 17.5 mg/kg DOX. After 14 days, the animals were euthanized and blood and organ collected for haematological, biochemical and histopathological tests. It was observed protective effect in kidney, heart and liver of animals treated with SpHL-DOX because of morphological, biochemical and electrocardiographic changes significantly lower when compared to animals treated with doxorubicin. In conclusion, pH-sensitive liposomes promote higher DOX accumulation in the tumor and its use can reduce the systemic toxicity of this drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da DOX.....	19
Figura 2: Representação esquemática de um lipossoma.....	22
Figura 3: Representação esquemática da organização dos derivados da fosfatidiletanolamina (PE) e do hemissuccinato de colesterila (CHEMS).....	24

CAPÍTULO 1

Figure 1: Blood clearance of SpHL-[^{99m} Tc]DOX and nSpHL-[^{99m} Tc]DOX in healthy BALB/c female mice.....	48
Figure 2: Biodistribution profile of SpHL-[^{99m} Tc]DOX following intravenous tail-vein administration in tumor-bearing BALB/c.....	50
Figure 3: Biodistribution profile of nSpHL-[^{99m} Tc]DOX following intravenous tail-vein administration in tumor-bearing BALB/c mice.....	51
Figure 4: Tumor-to-muscle ratios 1, 4 and 24 h post administration of the SpHL-[^{99m} Tc]DOX and nSpHL-[^{99m} Tc]DOX in tumor-bearing BALB/c mice.....	52

CAPÍTULO 2

Figura 1: Porcentagem de variação do peso de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg).....	69
Figura 2: Porcentagem de camundongos BALB/c sobreviventes tratados com Salina, DOX (17,5 mg/kg) e SpHL-DOX (17,5 mg/kg).....	69

Figura 3: Fotomicrografias de fígado, rins e coração de camundongos BALB/c tratados com DOX ou SpHL-DOX.....	74
Figura 4: Gráficos de variação de parâmetros eletrocardiográficos de camundongos BALB/c tratados com 15 mg/kg de DOX e SpHL-DOX.....	76
Figura 5: Porcentagem de variação do peso de camundongos BALB/c tratados com Salina e nSpHL-DOX (17,5 mg/kg).....	77
Figura 6: Gráficos de variação de parâmetros eletrocardiográficos de camundongos Balb/c tratados com 15 mg/kg de DOX e nSpHL-DOX.....	79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Physicochemical characterization of liposomes SpHL, nSpHL, SpHL- ^[99mTc] DOX and nSpHL- ^[99mTc] DOX.....	46
Table 2. Leakage profile of ^[99mTc] DOX from SpHL and nSpHL at different pH.....	47

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Caracterização físico-química de SpHL e SpHL-DOX. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média.....	68
Tabela 2: Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg).....	71
Tabela 3: Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg).....	72
Tabela 4: Descrição histológica das alterações cardíacas de animais tratados com Salina, DOX (10 e 15 mg/kg) e SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg).....	75
Tabela 5: Caracterização físico-química de SpHL e SpHL-DOX.....	77
Tabela 6: Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com Salina e nSpHL-DOX (17,5 mg/kg).....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

DOX	Doxorrubicina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
p53	Proteína 53
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
PEG	Polietilenoglicol
PE	Fosfatidiletanolamina
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
CHEMS	Hemissuccinato de colestera
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SpHL	Lipossomas pH-Sensíveis
nSpHL-DOX	Lipossomas não pH-Sensíveis
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diasteroilfosfatidil-etanolamina-polietilenoglicol
H&E	Hematoxilina e Eosina
MPS	Sistema Fagocitário Mononuclear
AUC	Área Sobre a Curva
DMT	Dose Máxima Tolerada
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ALT	Alanina Amino Transferase

AST Aspartato Amino Transferase

CK-MB Creatinoquinase MB

ECG Eletrocardiograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	18
1.2 DOXORRUBICINA.....	19
1.2.1 Cardiotoxicidade relacionada a DOX.....	20
1.3 LIPOSSOMAS	21
1.3.1 Lipossomas pH-sensíveis.....	23
1.3.2 Lipossomas de Doxorubicina.....	24
1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE NOVOS FÁRMACOS.....	25
1.4.1 Estudos de Biodistribuição e Depuração Sanguínea.....	25
1.4.2 Estudos de Toxicidade Aguda.....	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO 1	
pH-Sensitive, Long Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: A Feasibility Animal Study	
1 INTRODUCTION.....	38
2 MATERIAL AND METHODS	40
2.1 MATERIALS.....	41
2.2 RADIOLABELING PROCEDURE.....	41
2.3 RADIOCHEMICAL PURITY EVALUATION.....	42
2.4 LIPOSOME PREPARATION.....	42
2.5 ENCAPSULATION OF [^{99m} Tc]DOX.....	43

2.6 PARTICLE SIZE AND ZETA POTENTIAL.....	43
2.7 IN VITRO LEAKAGE PROFILE.....	43
2.8 pH SENSITIVITY EVALUATION.....	44
2.9 BLOOD CLEARANCE.....	44
2.10 CELL CULTURE.....	44
2.11 TUMOR CELL INOCULATION.....	44
2.12 HISTOLOGICAL ANALYSIS.....	45
2.13 BIODISTRIBUTION STUDIES.....	45
2.14 STATISTICAL ANALYSIS.....	45
3 RESULTS.....	45
3.1 RADIOCHEMICAL PURITY.....	45
3.2 LIPOSOMES CHARACTERIZATION.....	46
3.3 ENCAPSULATION PERCENTAGE AND IN VITRO LEAKAGE PROFILE.....	46
3.4 pH SENSITIVITY EVALUATION.....	47
3.5 BLOOD CLEARANCE.....	47
3.6 HISTOLOGIC EVALUATION.....	48
3.7 BIODISTRIBUTION STUDIES.....	49
4 DISCUSSION.....	52
5 REFERENCES.....	55
 CAPÍTULO 2	
Avaliação da Toxicidade Aguda in vivo de Lipossomas pH-Sensíveis de Circulação Prolongada Contendo Doxorubicina	
1 INTRODUÇÃO	59

2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
2.1 MATERIAIS.....	60
2.2 TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i> DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (SpHL-DOX)	61
2.2.1 Preparo dos SpHL-DOX.....	61
2.2.1.1 Preparo dos SpHL brancos.....	62
2.2.1.2 Encapsulação da DOX (SpHL-DOX)	62
2.2.2 Caracterização Físico-Química.....	62
2.2.2.1 Diâmetro médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta.....	62
2.2.2.2 Teor de Encapsulação.....	63
2.2.3 Estudos de Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> de SpHL-DOX.....	63
2.2.3.1 Investigação Hematológica e Bioquímica.....	64
2.2.3.2 Investigação Histopatológica.....	65
2.2.3.3 Análise Eletrocardiográfica.....	65
2.3 TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i> DE LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (nSpHL-DOX).....	66
2.3.1 Preparo e Caracterização dos Lipossomas.....	66
2.3.2 Estudos de Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> de nSpHL-DOX.....	66
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3 RESULTADOS	68
3.1 TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i> DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (SpHL-DOX).....	68
3.1.1 Caracterização Físico-Química.....	68

3.1.1 Avaliação de Peso, Sinais Clínicos e Mortalidade dos Animais....	68
3.1.2 Investigação Hematológica.....	70
3.1.3 Investigação Bioquímica.....	71
3.1.4 Investigação Histopatológica.....	72
3.1.5 Eletrocardiograma.....	75
3.2 TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i> DE LIPOSSOMAS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (nSpHL-DOX).....	76
3.2.1 Caracterização Físico-Química de nSpHL-DOX.....	76
3.2.2 Avaliação de Peso, Sinais Clínicos e Mortalidade dos Animais.....	77
3.2.3 Investigação Hematológica.....	78
3.2.3 Invertigação Histopatológica.....	78
3.2.4 Eletrocardiograma	79
4 DISCUSSÃO.....	80
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CONCLUSÕES GERAIS.....	88
PERSPECTIVAS.....	89
ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O termo câncer tem sido utilizado para denominar, genericamente, as neoplasias malignas sendo um conjunto complexo e heterogêneo de doenças de bases genéticas. Apesar da heterogeneidade de comportamentos clínicos, os diferentes tipos de câncer tem em comum a perda do controle proliferativo das células afetadas e a capacidade destas de invadir tecidos adjacentes, atingir a circulação sistêmica e gerar metástases. As células neoplásicas diferem das células normais de um tecido tanto em aspectos morfológicos (atipias celulares) quanto bioquímicos (alterações gênicas e metabólicas) (BRASILEIRO FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009; STRICKER & KUMAR, 2010; BRASIL, 2015).

Devido a crescente incidência e mortalidade pelo câncer observada nas últimas décadas, este tem sido considerado um problema de saúde pública com grande impacto econômico e social (IARC, 2014; SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2016). Em 2012, foram relatados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes pela doença em todo o mundo (IARC, 2014). No Brasil são estimados mais de 600.000 novos casos por ano sendo a segunda causa mais frequente de mortalidade, com 190.000 mortes (BRASIL, 2015).

Dentre os tipos tumorais mais incidentes no Brasil estão o câncer de mama entre as mulheres e o câncer de próstata entre os homens, com previsão de 57.960 e 61.200 novos casos, respectivamente, para o ano de 2016 (BRASIL, 2015). Esta tendência é semelhante a observada em outros países para o mesmo período (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2016). No entanto, neoplasias fortemente associadas a hábitos de vida e baixo status de desenvolvimento como os tumores de pulmão e do trato gastrointestinal ainda possuem alta incidência na população brasileira (BRASIL, 2015).

Devido ao grande impacto e importância do câncer na sociedade, estratégias terapêuticas tem sido desenvolvidas e aprimoradas visando o controle e a cura desta doença. A intervenção cirúrgica foi a primeira modalidade de tratamento

utilizada no controle do câncer, sendo que até 60% dos pacientes são tratados cirurgicamente (KOWALSKI, 2002; COSTA & LEITE, 2009). Os tratamentos locais (cirurgia e radioterapia) são responsáveis pelo tratamento de até um terço dos pacientes portadores de câncer, no entanto, a quimioterapia é largamente utilizada no combate de tumores invasivos e metastáticos e na terapia de neoplasias hematológicas devido a necessidade de uma abordagem sistêmica (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Atualmente, há diversas classes de antineoplásicos disponíveis para uso, que interagem com grande variedade de sítios, como ciclo celular, receptores hormonais, receptores de fatores de crescimento e vias metabólicas. O objetivo primário da quimioterapia é a morte das células tumorais, no entanto, devido a baixa especificidade da maioria dos agentes quimioterápicos, células saudáveis podem ser afetadas resultando em efeitos adversos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

1.2 DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DOX) é um fármaco antineoplásico da classe dos antibióticos antracíclicos produzido como metabólito secundário pelo *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Figura 1). Devido a sua alta atividade antitumoral, é amplamente utilizada no tratamento de carcinomas de mama, pulmões, tireóide e ovário, sarcomas e tumores sistêmicos, como linfomas e leucemias (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; OCTAVIA *et al.*, 2012; VEJPONGSA & YEH, 2014).

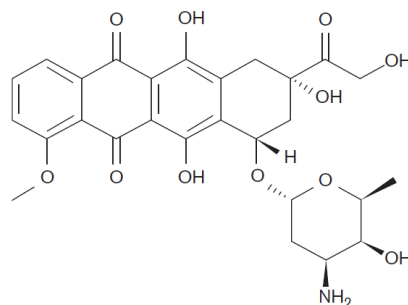


FIGURA 1 - Estrutura química da DOX

Fonte: FERNANDES *et al.*, 2016

O mecanismo de ação da DOX é baseado no intercalamento ao DNA, provocando ruptura da fita dupla ou fita simples, bem como a troca de cromátides irmãs, afetando assim a síntese de DNA e RNA. O mecanismo de ruptura do DNA também pode estar relacionado a ligação da doxorubicina a Topoisomerase II, impedindo sua ação de reparo do DNA. Outro mecanismo proposto é a geração de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species-ROS) pelo grupo quinona da doxorubicina nos tecidos normais e tumorais. A exposição das células a doxorubicina e outras antraciclinas resulta em ativação das vias de apoptose, como sensores de lesão do DNA e a via das caspases, além de inativação de genes supressores de tumor, como p53 (CHABNER *et al.*, 2005).

Apesar da alta atividade contra uma grande variedade de tipos tumorais, os efeitos adversos da doxorubicina, como mielossupressão, náuseas e vômitos, alopecia, mucosite e efeitos de extravasamento (escape de fármacos do vaso sanguíneo no momento da administração, causando efeitos locais) limitam sua utilização (ADAMI *et al.*, 2001, CHABNER *et al.*, 2005, OCTAVIA *et al.* 2012).

1.2.1 Cardiotoxicidade relacionada a DOX

O efeito tóxico mais relevante e, por vezes irreversível, da DOX é a cardiomiopatia. Este efeito é dose-dependente, ocorrendo mais frequentemente quando as doses cumulativas excedem 500 mg/m², podendo ocasionar dois tipos principais de cardiomiopatias: uma forma aguda, que se manifesta por alterações eletrocardiográficas (anomalias no intervalo ST e onda T) e arritmias, diminuição da fração de ejeção e, em casos mais graves lesões miocárdicas e insuficiência cardíaca congestiva; outra forma crônica, que se manifesta com o uso crônico da DOX, caracterizada por insuficiência cardíaca congestiva não responsiva a digitálicos, provocando uma mortalidade superior a 50% em pacientes que desenvolvem essa forma de cardiomiopatia (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; CHABNER *et al.*, 2005; OCTAVIA *et al.*, 2012, SAPALLAROSSA *et al.*, 2016).

Além das formas clássicas de cardiotoxicidade da DOX, tem sido descritos casos de cardiomiopatia tardia (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; VEJPONGSA & YEH, 2014; MURTAGH *et al.*, 2016). Os sintomas manifestam-se vários anos após o tratamento com baixas doses do fármaco. São observados defeitos na condução elétrica cardíaca, aumento de níveis séricos de Peptídeo Natriurético Cerebral (Brain-type Natriuretic Peptide – BNP) e diminuição da fração de ejeção (MURTAGH *et al.*, 2016).

São propostas diversas hipóteses de mecanismos para a patogênese da cardiotoxicidade de antracíclicos. A hipótese clássica atribui o dano aos cardiomiócitos aos ROS liberados pela ação intracelular da DOX em células normais e tumorais (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; OCTAVIA *et al.*, 2012; VEJPONGSA & YEH, 2014). Outras propostas envolvem a inibição da enzima Topoisomerase 2 β e ativação de vias pró-apoptóticas, culminando em morte celular - característicos do mecanismo de ação deste fármaco - e dano oxidativo mitocondrial (BUGGER *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; VEJPONGSA & YEH, 2014).

A fim de melhorar o perfil de segurança da DOX, a encapsulação deste fármaco em nanoestruturas, principalmente lipossomas, tem sido considerada uma importante estratégia. Tais nanoestruturas tem se mostrado úteis como ferramenta para aumento de seletividade do fármaco, por se acumularem preferencialmente nos tecidos-alvo, diminuindo os danos aos tecidos saudáveis (SANTOS *et al.*, 2009; BARENHOLZ, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PROKOPOWICZ, 2014; AKHTARI *et al.*, 2016).

1.3 LIPOSSOMAS

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Estes sistemas foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores (1965), que desenvolveram sistemas lipídicos que se assemelhavam as membranas celulares. No entanto, a encapsulação de fármacos e enzimas nestas vesículas e a idealização de sistemas de *drug delivery* foi descrita apenas em 1971, por Gregoriadis e Ryman (MALAM,

LOIZIDOU & SEIFALIAN, 2009; ALLEN & CULLIS, 2013; KRAFT *et al.*, 2014). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, que são acomodadas no centro aquoso, na bicamada lipídica ou na interface, respectivamente (Figura 2). Esta característica confere grande versatilidade a esse tipo de nanoestrutura, tornando-os tão amplamente estudados e utilizados (KRAFT *et al.*, 2014). Os primeiros lipossomas desenvolvidos para o carregamento de fármacos, chamados de convencionais, eram rapidamente reconhecidos, opsonizados e eliminados da circulação sistêmica pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) (fígado, baço e medula óssea), tendo assim cinética pouco favorável e potencial toxicidade a estes órgãos (VEMURI & RHODES, 1995; FONTES *et al.*, 2005).

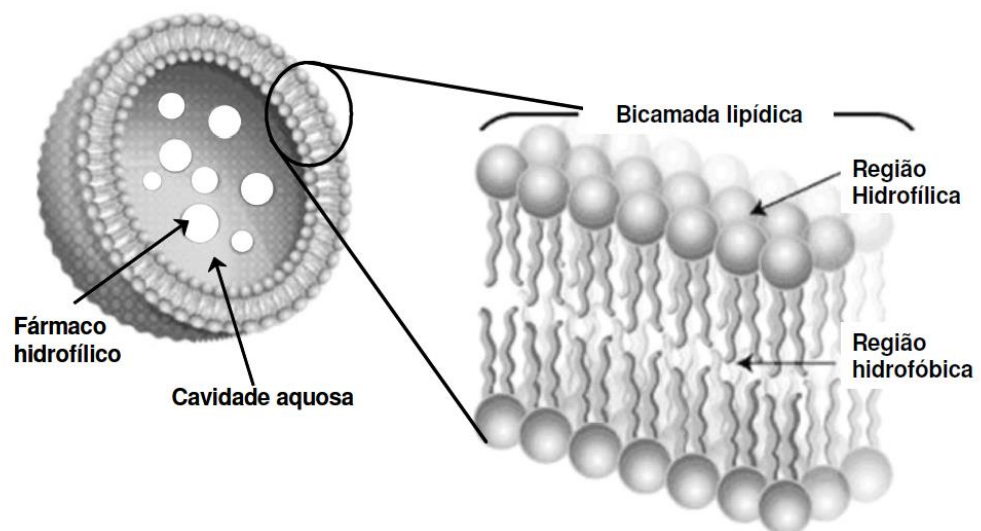


FIGURA 2 - Representação esquemática de um lipossoma.

Fonte: LEITE, 2010.

Com o posterior desenvolvimento dos lipossomas com tecnologia Stealth[®], também conhecidos como lipossomas de circulação prolongada, que contém moléculas de polímeros hidrofílicos, por exemplo o polietilenoglicol (PEG) em sua superfície externa, pode-se alterar a farmacocinética destas nanopartículas, devido ao menor reconhecimento pelas células do SFM, aumentando assim o aporte de fármaco na região de interesse (FEENEY *et al.*, 2014; SUK *et al.*, 2016). Concentrações de 5-10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de

massa molecular 1000-2000 Da são suficientes para conferir estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

1.3.1 Lipossomas pH-sensíveis

A fim de aumentar a especificidade de entrega de fármaco na região tumoral, tem-se desenvolvido nanoestruturas que respondem a variações de pH (LEITE *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Estas nanoestruturas, quando endocitadas pelas células, podem liberar seu conteúdo no interior de endossomas, organelas que possuem pH ácido (OLIVEIRA *et al.*, 1998, HEINRICH *et al.*, 2016). Além disso, devido a características fisiopatológica dos tumores sólidos, sabe-se que a alta atividade proliferativa das células tumorais impede a nutrição e oxigenação adequada de todo tecido. As áreas de hipóxia, associadas a intensos processos de glicólise, promovem mudanças no microambiente tumoral, gerando um gradiente de pH em relação aos tecidos saudáveis, aumentando seletivamente a liberação de fármaco nessa região por nanoestruturas pH-sensíveis (BARROS *et al.*, 2013; HEINRICH *et al.*, 2016).

Dentre as partículas que respondem a variações de pH, os lipossomas são os mais estudados. Esses lipossomas exibem transições de fases, características dos seus constituintes fosfolipídicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido e são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4) (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, a temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas (LEITE *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio

ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (Figura 3) (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Neste contexto, lipossomas pH-sensíveis são uma estratégia interessante para aumentar a concentração de fármaco no tecido de interesse e reduzir a concentração do mesmo em áreas não alvo. No entanto, lipossomas de longa circulação e pH-sensíveis contendo doxorrubicina ainda não estão disponíveis para uso clínico.

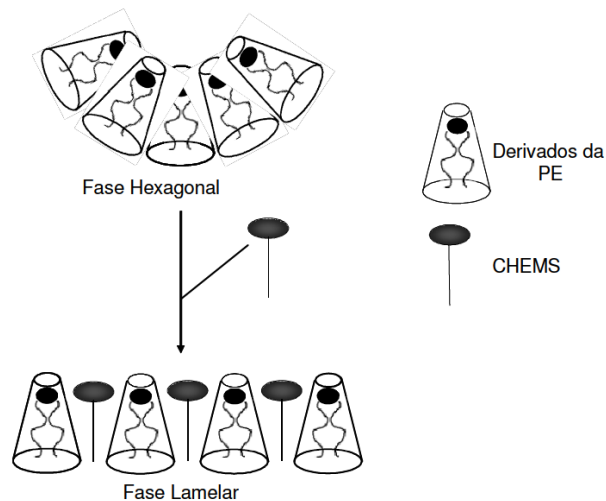


FIGURA 3 - Representação esquemática da organização dos derivados da fosfatidiletanolamina (PE) e do hemissuccinato de colesterila (CHEMS)

Fonte: LEITE, 2010.

1.3.2 Lipossomas de Doxorrubicina

Os lipossomas de DOX tem sido estudados desde a década de 80 como estratégia para diminuir a toxicidade e melhorar parâmetros farmacocinéticos desse fármaco altamente eficaz para uma grande gama de tumores (TARDI, BOMAN & CULLIS, 1996; GABIZON *et al.*, 2002). A encapsulação da DOX em lipossomas peguados (Stealth®) mostrou-se promissora, fazendo com que este tipo de lipossoma fosse o primeiro a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), sob o nome comercial de Doxil®/Caelyx® em 1995. Foram inicialmente aprovados para o uso em portadores de sarcoma de Kaposi associado ao HIV, sendo aprovados para o uso em tumores de mama metastáticos apenas em 2003 (BARENHOLZ, 2012; ALLEN & CULLIS, 2013; DAWIDCZYK *et al.*, 2014).

No entanto, apesar desse sistema apresentar melhora de parâmetros farmacocinéticos e de segurança da DOX, não foram observados aumento na atividade antitumoral comparado ao fármaco livre. Diante disso, a busca de novas formulações lipossomais que sejam capazes de aumentar a atividade antitumoral da DOX tem sido estudadas, sendo a estratégia de partículas responsivas a pH bastante promissoras.

1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE NOVOS FÁRMACOS

1.4.1 Estudos de Biodistribuição e Depuração Sanguínea

Os estudos farmacocinéticos são parte fundamental no desenvolvimento de novos fármacos. Esses estudos tem como objetivos principais o conhecimento da capacidade do novo produto atingir o tecido alvo, bem como suas vias de eliminação. Essas características são de extrema importância para prever, preliminarmente, sua atividade farmacológica e perfil de segurança (LAMATTINA & GOLAN, 2009).

Os métodos clássicos para detecção de fármacos nos órgãos-alvo, tecidos e líquidos corporais envolvem metodologias cromatográficas, muitas vezes, cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) (WEI *et al.*, 2008; LUCAS *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Este método, apesar da alta sensibilidade e especificidade, demanda alto custo de equipamentos e reagentes, além de dificuldades inerentes ao preparo de amostras biológicas.

Uma das alternativas aos métodos cromatográficos mais importantes para a avaliação da biodistribuição de moléculas é o uso da marcação com radiotraçadores, sendo o tecnécio metaestável (^{99m}Tc) o mais utilizado. O amplo uso desse isótopo é resultado de sua alta disponibilidade, baixo custo e, ainda, por apresentar características nucleares e físicas extremamente favoráveis para um radiofármaco: emissão gama de baixa energia (140 keV) e meia-vida curta (6 horas), oferecendo um baixo risco de exposição à radiação (JURISSON, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003).

O ^{99m}Tc é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). Deste modo, é capaz de

formar complexos entre o metal deficiente de elétrons e átomos ou grupos funcionais (aminas, amidas, tióis, fosfinas, oximas e isonitrilas) capazes de doar pares de elétrons (ARAÚJO, 1998). A estabilidade dos estados de oxidação do ^{99m}Tc depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, 1990; SAHA, 1998). O íon pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) tem estado de oxidação +7 para o ^{99m}Tc , isso o torna uma espécie não reativa e incapaz de ligar a algum composto, sendo necessária a redução do tecnécio, do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 1998).

No meio aquoso, o ^{99m}Tc é quimicamente estável, na forma de pertecnetato, $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Quando injetado no organismo, o pertecnetato é captado pela glândula tireóide devido à sua similaridade com o iodeto, em relação ao seu raio atômico e à carga negativa. Quando reduzido e não ligado quimicamente a outra molécula, o ^{99m}Tc forma espécies coloidais que se acumulam nos órgãos dos SFM. Estas espécies de ^{99m}Tc são caracterizadas e quantificadas como impurezas radioquímicas associadas as reações de radiomarcagem de moléculas e, portanto, devem ser minimizadas para evitar interpretações equivocadas dos estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas (ASSIS, 2007; BARROS, 2012).

Este radioisótopo, devido a suas características favoráveis relacionadas a custo e obtenção, tem sido utilizado para determinar, com adequada especificidade e sensibilidade, a biodistribuição e depuração sanguínea de grande variedade de moléculas e nanopartículas, tais como antimicrobianos, peptídeos, antitumorais, incluindo a DOX e lipossomas (KOUKOURAKIS, 2002; BAO *et al.*, 2003; POLYAK *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2011; FAHEEM *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2015).

1.4.2 Estudos de Toxicidade Aguda

Além dos estudos de biodistribuição e depuração sanguínea, os estudos de toxicidade são uma etapa importante quando se objetiva a introdução de novos produtos farmacêuticos para o uso clínico (LIU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014).

Atualmente, há um grande esforço das agências de bioética em reduzir o uso roedores e outros grandes animais nos estudos de segurança de novos produtos

para uso humano. Tem sido propostos métodos *in vitro*, utilizando células em cultura, podendo-se prever a toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva e métodos *in silico* que utilizam modelos matemáticos e moleculares, sendo denominados métodos alternativos (KHLEBTSOV & DYKMAN, 2011; BASKETTER *et al.*, 2012). Apesar dos estudos utilizando estas novas metodologias gerarem resultados adequados quanto a toxicidade aguda de novas moléculas e nanopartículas, modelos animais roedores ainda tem sido amplamente utilizados para estes estudos, por serem obtidos resultados que consideram a farmacocinética e farmacodinâmica em organismos vivos, sendo imprescindíveis para avaliação do real potencial terapêutico ou tóxico de um novo fármaco ou sistema (LIU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014).

Com base nas diferentes regulamentações preconizadas por diversos órgãos internacionais para estudo de toxicidade aguda de novas moléculas (FDA, 1996; EMEA, 1998; ICH, 2009; OECD, 2001), tais investigações devem ser conduzidas em animais saudáveis, de origem conhecida, com peso e idade adequados por períodos pré-determinados. Os guias preconizam ainda que o período de acompanhamento dos animais seja de, no mínimo, quatorze dias pós-tratamento e que, em todos os grupos experimentais sejam avaliados os sinais clínicos, o peso corporal e a patologia clínica (hematológica e bioquímica) e ainda, que todos os animais sejam necropsiados (OECD, 2001).

Com o aumento do estudo e uso nanopartículas, um novo campo da toxicologia, chamada nanotoxicologia, tem surgido. No entanto, devido à falta de regulamentação específica para essas novas formas farmacêuticas, os estudos de nanotoxicidade ainda são controversos quanto a padronização e resultados. Entretanto, a nanotoxicologia tem ganhado interesse nos órgãos regulatórios, como o FDA, que recentemente recomendou o estudo de toxicidade para sistemas lipossomais utilizando a forma encapsulada, o fármaco livre e o carreador puro (FDA, 2010).

Diante do exposto, estudos pré-clínicos de farmacocinética e toxicidade de novos sistemas lipossomais contendo DOX, como lipossomas pH-sensíveis, possuem grande importância devido ao potencial de aumento da especificidade e perfil de segurança deste agente citotóxico.

2 OBJETIVOS

Avaliar a biodistribuição e a toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo DOX em modelo murino.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar físico-quimicamente lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo DOX (SpHL-DOX);
- Avaliar a biodistribuição e a depuração sanguínea de SpHL-DOX;
- Investigar a toxicidade aguda da formulação em animais saudáveis por meio de análises bioquímicas, hematológicas e histológicas;
- Investigar a cardiotoxicidade da formulação por meio de análises bioquímicas, histológicas e eletrocardiograma;
- Comparar a biodistribuição, a depuração sanguínea e a toxicidade aguda de SpHL-DOX com lipossomas de não pH-sensíveis contendo DOX (nSpHL-DOX) e a DOX livre.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, N. P. Extravasamento de drogas antineoplásicas notificação e cuidados prestados. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, n. 2, p. 143-151, 2001.

AKHTARIA, J. *et al.* Targeting, bio distributive and tumor growth inhibiting characterization of anti-HER2 antibody coupling to liposomal doxorubicin using BALB/c mice bearing TUBO tumors. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 505, p. 89-95, 2016.

ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, p. 36-48, 2013.

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ARAÚJO, J. G. V. C. **Estudos biológicos em hamsters infectados com Leishmania amazonensis empregando anticorpos (anti-amastigotas) marcados com ^{99m}Tecnécio**. 1998. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte. 1998.

ASSIS, D. N. **Biodistribuição do fluconazol marcado com ^{99m}tecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo experimental de infecção com Candida albicans**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte. 2007.

BANGHAN, A. D.; STANDISH, M. M. & WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BAO, A. *et al.* Direct ^{99m}Tc Labeling of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) for Pharmacokinetic and Non-Invasive Imaging Studies. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. v. 308, n. 2, p. 419-425, 2003.

BARENHOLZ, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 117-134, 2012.

BARROS, A. L. B. *et al.* Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, p. 7373–7375, 2011.

BARROS, A. L. B. *et al.* Long-Circulating, pH-Sensitive Liposomes versus Long-Circulating, Non-pH-Sensitive Liposomes as a Delivery System for Tumor Identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 9, p. 1-8, 2013.

BARROS, A. L. B. *et al.* Bombesin Encapsulated in Long-Circulating pH-Sensitive Liposomes as a Radiotracer for Breast Tumor Identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 11, p. 342-350, 2015.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L. & GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e Diferenciação Celulares. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 226.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.
Disponível em: <
www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf>.
Acesso em 12/06/2016.

BUGGER, H. *et al.* Uncoupling protein downregulation in doxorubicin induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. v. 67, n. 6, p. 1381-1388, 2011.

CHABNER, B. N. *et al.* Antineoplásicos. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 1041.

COSTA, P. & LEITE, R. C. B. O. Estratégias de enfrentamento utilizadas pelos pacientes oncológicos submetidos a cirurgias mutiladoras. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n. 4, p. 355-364, 2009.

DAWIDCZYK, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**. v. 187, p. 133-144, 2014.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products**. London: EMA, 1998. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/099796en.pdf>>. Acesso em: 10/06/2016.

FAHEEM, A. R. *et al.* ^{99m}Tc-Daunorubicin a potential brain imaging and theranostic agent: synthesis, quality control, characterization, biodistribution and scintigraphy. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 40, p. 148–152, 2013.

FERNANDES, R. S. *et al.* Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**. v. 37, n. 37, p. 307-312, 2016.

FEENEY, O. M. *et al.* 'Stealth' lipid-based formulations: Poly(ethylene glycol)-mediated digestion inhibition improves oral bioavailability of a model poorly water soluble drug. **Journal of Controlled Release**. v. 192, p. 219-227, 2014.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry - Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals**. 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm085389.pdf>>. Acesso em: 15/10/2014.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals**. 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>>. Acesso em: 10/06/2016.

FONTES, A. P. S.; CESAR, E. T. & BERALDO, H. A química Inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

GABIZON, A. *et al.* Dose Dependency of Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy of Pegylated Liposomal Doxorubicin (DOXIL) in Murine Models. **Journal of Drug Targeting**. v. 10, n. 7, p. 539-548, 2002.

GREGORIADIS, G & RYMAN, B. Liposomes as a carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases **Biochemical Journal**. v. 124, n. 5, 58p.

HEINRICH, A. K. *et al.* Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with pH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance. **Molecular Cancer Therapy**. v. 15, n. 5, p. 998-1007, 2016.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals**. 2009. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9_Step4_Guideline.pdf >. Acesso em: 10/06/2016.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

JURISSON, S. *et al.* Coordination compounds in nuclear medicine. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.

KHLEBTSOV, N. & DYKMANA, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. **Chemical Society Reviews**. v. 40, p.1647–1671, 2011.

KOUKOURAKIS, M. I. Reply: 99mTc-labelled Stealth liposomal doxorubicin (Caelyx®) in glioblastomas and metastatic brain tumours. **British Journal of Cancer**. v. 86, p. 660-661, 2002.

KOWALSKI, L. P. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 2. ed. São Paulo: Âmbito; 2002.

KRAFT, J. C. *et al.* Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 103, n. 1, p. 29-52, 2014.

LAMATTINA, J. C. & D. E. GOLAN. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 28.

LEITE, E. A. **Avaliação da toxicidade aguda e atividade atitumoral de lipossomas ph-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2010.

LEITE, E. A. *et al.* Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 8, p. 1-11, 2011.

LIU, C. *et al.* Preliminary evaluation of acute toxicity of 188Re–BMEDA–liposome in rats. **Journal of Applied Toxicology**. v. 30, p. 680-687, 2010.

LIU, S. *et al.* Single dose acute toxicity testing for N,N-bis(2-mercaptoethyl)-N0,N0 diethylethylenediamine in beagles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 69, p. 217–225, 2014.

LUCAS, A. T. *et al.* A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 119, p. 119-122, 2015.

MA, W. *et al.* Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 111, p. 215–221, 2015.

MALAM, Y; LOIZIDOU, M. & SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trend in Pharmacological Sciences**. v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.

MARQUES, F. L. N. *et al.* Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MURTAGH, G. *et al.* Late cardiac effects of chemotherapy in breast cancer survivors treated with adjuvant doxorubicin: 10-year follow-up. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 156, n. 3, p. 501-506, 2016.

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. **Textbook of radiopharmacy theory and practice**. v.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 3, p. 53-72.

OCTAVIA, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 52, p. 1213-1225, 2012.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – acute toxic class method.** 2001. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 10/06/2016.

OLIVEIRA, M. C. *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. **Biochimica et Biophysica Acta.** v., 1372, p. 301-310.

OLIVEIRA, M. C., *et al.* Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Science**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

POLYAK, A. *et al.* In vitro and biodistribution examinations of Tc-99m-labelled doxorubicin-loaded nanoparticles. **Nuclear Medicine Review.** v. 14, n. 2, p. 55-62, 2011.

PROKOPOWICZ, M. Formulation, characterisation and *in vitro* studies of doxorubicin-loaded silica–polydimethylsiloxane granules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 66, n. 23, p.10-19, 2015.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy.** 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998. 358 p.

SANTOS, A. C. S. *et al.* Cardioncologia: anormalidades eletrocardiográficas em pacienteS com cardiomiopatia pós-uso de doxorubicina. **Revista SOCERJ.** v. 22, n. 5, p. 281-288, 2009.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D. & JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians.** v. 66, p. 7-30, 2016.

SPALLAROSSA, P. *et al.* A recommended practical approach to the management of anthracycline-based chemotherapy cardiotoxicity: an opinion paper of the working group on drug cardiotoxicity and cardioprotection, Italian Society of Cardiology. **Journal of Cardiovascular Medicine.** v. 17, p. 84-92, 2016.

STEWART, B.W. & WILD, C. P. World Cancer Report 2014 Latest World Cancer Statistics. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.

STRICKER, T. P. & KUMAR, V. Neoplasias. In: ABBAS, A. K. *et al.* **Robbins e Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. P. 671.

SUK, J. S. *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 1, n. 99, p. 28-51, 2016.

TARDI, P. G.; BOMAN, N. L. & CULLIS, P. R. Liposomal Doxorubicin. **Journal of Drug Targeting.** v. 4, n. 3, p. 129-140, 1996.

ULRICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports,** v. 22, p. 129-150, 2002.

VEJPONGSA, P. & YEH, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities, **Journal of the American College of Cardiology.** v. 64, n. 9, 2014

VEMURI, S. & RHODES, C. T. Development and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae,** n. 70, p. 95-111, 1995.

WEI, G. *et al.* Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. **Biomedical Chromatography.** v. 22, p. 1252-1258, 2008.

WOJTACKI, J.; LEWICKA-NOWAK, E. & LESNIEWSKI-KMAK, K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention - review of the literature. **Medical Science Monitor**. v. 6, n. 2, p. 411-420, 2000.

YANG, D. J. *et al.* Imaging with ^{99m}Tc-ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**, p. 465-473, 2003.

ZHANG, C. *et al.* Quantification of DOX bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n. 1, p. 55-61, 2015.

ZHANG, S. *et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**. v. 18, n. 11, p. 1639-1645, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity. **Journal of Controlled Release**. v. 222, p. 56–66, 2016.

CAPÍTULO 1

**pH-Sensitive, Long Circulating Liposomes as an Alternative Tool to
Deliver Doxorubicin into Tumors: A Feasibility Animal Study
(Molecular Imaging and Biology - 2016 *in press*)**

ABSTRACT

Purpose: Therapeutic agents used in chemotherapy have low specificity leading to undesired severe side effects. Hence, the development of drug delivery systems that improve drug specificity, such as liposomes moieties, is an alternative to overcome chemotherapy limitations and increase anti-tumor efficacy. In this study, the biodistribution profile evaluation of pH-sensitive long-circulating liposomes (SpHL) containing [^{99m}Tc]DOX in 4T1 tumor-bearing BALB/c mice is described.

Procedures: [^{99m}Tc]DOX was radiolabeled by direct method. Liposomes were prepared and characterized. [^{99m}Tc]DOX was encapsulated into liposomes by freezing and thawing. Circulation time for SpHL-[^{99m}Tc]DOX was determined by measuring the blood activity from healthy animals. Biodistribution studies were carried out in tumor-bearing mice at 1, 4 and 24h after injection.

Results: Blood levels of the SpHL-[^{99m}Tc]DOX declined in a biphasic manner, with an α half-life of 14.1 min and β half-life of 129.0 min. High uptake was achieved in liver and spleen, due to the macrophages capture. Moreover, tumor uptake was higher than control tissue, resulting in high tumor-to-muscle ratios, indicating higher specificity for the tumor area.

Conclusion: [^{99m}Tc]DOX was successfully encapsulated in liposomes. Biodistribution indicated high tumor-to-muscle ratios in breast tumor-bearing BALB/c mice. In summary, these results showed the higher accumulation of SpHL-[^{99m}Tc]DOX in the tumor area, suggesting selective delivery of doxorubicin into tumor.

Key-Words: pH sensitive liposome, long circulating, doxorubicin, tumor, cancer, 4T1 murine model.

1 INTRODUCTION

Cancer is a public health issue and an important cause of death worldwide. In 2012, there were 14.1 million new cases of cancer and 8.2 million people died in consequence of this disease. Lungs, breast, colon, prostate and stomach are the most common types of cancer, corresponding to 40% of all cases diagnosed [1].

Therapeutic agents used in chemotherapy have low specificity, leading to undesired accumulation in healthy tissues, which may cause severe side effects [2, 3]. In this context, the development of drug delivery systems that improve drug specificity has, recently gained attention [2, 4]. Among these systems, nanocarriers including liposomes, polymeric micelles and lipid nanoparticles have been described. Liposomes have been studied as drug delivery systems since the 70s. Doxil® was the first liposomal formulation approved for clinical use by the Food and Drug Administration (FDA) in 1995 [5, 6]. Doxil® has been used in the treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma, ovarian cancer, multiple myeloma and metastatic breast cancer [7, 3]. Nowadays, there are other liposomal formulations approved for use in cancer's treatment or in advanced stage of clinical study [4, 7, 8].

The use of drug delivery systems in cancer treatment is based on specific pathophysiological characteristics of solid tumors [9]. Tumor vasculature is different from healthy tissues, presenting large gaps and fenestrations that allow the extravasation of colloidal systems. In addition, an ineffective lymphatic drainage hampers the clearance of these structures from tumor site. This potential to enhance concentration of drugs in the tumor area is a mechanism known as "enhanced permeability and retention (EPR)". Moreover, rapid cell proliferation promotes changes in the intratumoral microenvironment, turning the pH of this area more acid than the healthy tissues pH [9-11]. Based on these characteristics, the development of multifunctional nanostructures is an interesting approach to improve drug bioavailability.

In this context, we have developed a new formulation of long-circulating, pH-sensitive liposomes that might be used to increase the tumor uptake and, therefore, increase the drug concentration at tumor site. These liposomes are made of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), cholesteryl hemisuccinate (CHEMS), and distearoylphosphatidylethanolamine polyethyleneglycol2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀). CHEMS inserts between the DOPE molecules which is indispensable to form

liposome bilayers at a physiological pH. However, in an acid environment, including tumor site, CHEMS molecules are protonated and no longer stabilize DOPE. As a result, liposomes membrane is disrupted, releasing the encapsulated drug [12, 13]. Furthermore, the presence of DSPE-PEG₂₀₀₀ on bilayers of the liposomes results in increased blood-circulation time [14, 15] that can lead to a higher tumor accumulation due to the more passages through the tumor region [10].

Recent studies have reported the use of liposomes loaded with radiolabeled molecule as a probe for *in vivo* biodistribution studies [10, 14, 16, 17]. Our group have successfully radiolabeled doxorubicin with technetium-99m for imaging purposes [18]. Doxorubicin has several functional groups, such as –NH₂, –OH, –O–, that are able to form complexes with Tc-99m [19]. Therefore, this complex could be used, encapsulated in liposomes, as a probe for *in vivo* studies in order to evaluate the biodistribution of these nanoparticles.

The purpose of this study was to prepare and characterize long-circulating pH-sensitive liposomes (SpHL) containing [^{99m}Tc]DOX. In addition, a comparative study between SpHL and long-circulating non-pH sensitive liposomes (nSpHL) was also performed to evaluate the *in vivo* biodistribution profile of both formulations in a murine model (BALB/c mice) of 4T1 tumor cells.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIALS

Doxorubicin hydrochloride (DOX) was purchased from 141 ACIC Chemicals (Brantford, Ontario, Canada). Technetium (Na[^{99m}Tc]O₄) was obtained from an alumina-based Mo-99/Tc-99m generator. The phospholipids hydrogenate soy phosphatidylcholine (HSPC), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and distearoylphosphatidyl-ethanolamine polyethyleneglycol2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) were supplied by Lipoid GmbH - USA. Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) and cholesterol (CHOL) were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, USA). Glucose was purchased from Vetec Química Fina Ltda (São Paulo, Brazil). All solvents (high-performance liquid chromatography analytical grade) and other reagents, including SnCl₂·2H₂O, were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The subcutaneous tumor model was established in 8-10-week-old female

BALB/c mice purchased from CEBIO-UFMG (Belo Horizonte, Brazil). All animal studies were approved by the local Ethics Committee for Animal Experiments (CEUA/UFMG).

2.2 RADIOLABELING PROCEDURE

A solution containing DOX in PBS-buffer (pH 7.4) was prepared (0.1 mg/ml). To a sealed vial containing 1.0 ml of this solution was added 100 µg of SnCl₂·2H₂O solution in 0.25 M HCl (2.0 mg/ml). Then, an aliquot of 0.1 ml of Na^[99mTc]TcO₄ (37MBq) was added to the vial. The solution was kept at room temperature for 30 min.

2.3 RADIOCHEMICAL PURITY EVALUATION

Radiochemical purity analyses were performed by thin layer chromatography on silica gel (TLC-SG; Merck, Darmstadt, Germany). TLC-SG analysis was accomplished using acetone as mobile phase to determine the amount of free [^{99m}Tc]TcO₄⁻. The radioactivity of the strips was determined by a gamma counter (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA). The solution was purified from [^{99m}Tc]TcO₂ using a 0.22 µm syringe filter.

2.4 LIPOSOME PREPARATION

Chloroform aliquots of DOPE, CHEMS and DSPE-PEG₂₀₀₀ (for SpHL) or HSPC, CHOL and DSPE-PEG₂₀₀₀ (for nSpHL) in a lipid concentration of 40 mM (molar ratio 5.7:3.8:0.5) were transferred to a flask and the solvent was removed under reduced pressure. For SpHL, the lipid film obtained was dissolved under vigorous stirring, at room temperature, in NaCl solution 0.9% (w/v) and an aliquot of NaOH (0.1 M) was added at a CHEMS/NaOH (mol/mol) ratio of 1:1. For nSpHL, the lipid film obtained was dissolved in NaCl solution 0.9% (w/v) at the same condition. The final pH of vesicle dispersions formed was 7. Liposomes were submitted to a filtration through 0.4 µm, 0.2 µm and 0.1 µm polycarbonate membranes (5 cycles for each).

2.5 ENCAPSULATION OF [^{99m}Tc]DOX

After preparation, 1.0 ml of SpHL and nSpHL were incubated with 1.0 ml of fresh [^{99m}Tc]DOX solution. The freezing/thawing process (3 cycles for 5 min) was used for encapsulating the radiolabeled complex. Glucose was used as a cryoprotectant at 2:1 sugar:phospholipid ratio (w/w) according to previous studies published by de Barros et al., 2015. Liposomes were purified by ultracentrifugation at 150.000 x g at 4 °C for 120 min (ultracentrifuge L-80XP Optima®, Beckman Coulter, USA) and the encapsulation percentage (EP) was determined by the following equation.

$$\%EP = \frac{\text{Amount of radioactivity (pellet)} \times 100}{\text{Amount of radioactivity (pellet + supernatant)}}$$

2.6 PARTICLE SIZE AND ZETA POTENTIAL

The mean particle diameter was measured by dynamic light scattering (DLS) at a fixed angle of 90° and 25°C. The zeta potential was evaluate by eletrophoretic mobility. Mean diameter and zeta potential were measured before and after the encapsulation process. Analyses were performed in triplicate using the Zetasizer Nano ZS90 equipment (Malvern Instruments, England). The samples were dilutes using a 0.9% (w/v) NaCl solution at a ratio of 1:100.

2.7 IN VITRO LEAKAGE PROFILE

Ultra-filters (Amicon Ultra, Millipore, USA, MW 50 KDa) were used to estimate the amount of [^{99m}Tc]DOX leaked from SpHL and nSpHL. A volume of 90 µl of purified SpHL-[^{99m}Tc]DOX or purified nSpHL-[^{99m}Tc]DOX was incubated at 37°C, under agitation, with 1.0 ml of fresh plasma obtained from the whole blood. [^{99m}Tc]DOX leakage was determined from samples taken at 10, 30, 60, 120, 240, 480 and 1440 min after incubation. The samples were placed into ultra-filters and centrifuged at 14000 x g for 30 min. The percentage of leaked [^{99m}Tc]DOX was calculated as shown in the following equation.

$$\% \text{ of leakage } [^{99m}\text{Tc}]\text{DOX} = \frac{\text{Amount of radioactivity (filtrate)}}{\text{Amount of radioactivity (filter + filtrate)}}$$

2.8 pH SENSITIVITY EVALUATION

$[^{99m}\text{Tc}]\text{DOX}$ leakage from SpHL and nSpHL at different pHs was evaluated in order to confirm pH sensitivity property of the SpHL in contrast to nSpHL. SpHL and nSpHL were prepared and purified as aforementioned. Afterwards, the pellets were reconstituted with solutions at pHs 6.0 and 6.5 and incubated at 37 °C for 10 min. The samples were purified in ultracentrifuge again at the same conditions. The percentage of leaked $[^{99m}\text{Tc}]\text{DOX}$ was calculated as previously described.

2.9 BLOOD CLEARANCE

SpHL- $[^{99m}\text{Tc}]\text{DOX}$ or nSpHL- $[^{99m}\text{Tc}]\text{DOX}$ was administered to healthy mouse (n=6) through the tail vein, and blood samples (~20 μl each) were collected at 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 1080, 1320 and 1440 min post-injection. Blood samples were collected from the tail vein, weighted and blood uptake was determined by a gamma counter. A blood decay curve was plotted using the percentage of injected dose per gram (%ID/g) as function of time. Blood circulation time was analyzed using GraphPad PRISM, version 5.00 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA).

2.10 CELL CULTURE

4T1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were kept in humidified air containing 5% CO_2 at 37°C.

2.11 TUMOR CELL INOCULATION

Aliquots (100 μl) of 2.5×10^6 4T1 cells in Phosphate Buffer Saline (PBS) were injected subcutaneously into the right thigh of female BALB/c mice (17–23 g). Tumor

cells were allowed to grow *in vivo* for 10-12 days. Breast tumor-bearing BALB/c mice were used for biodistribution studies and scintigraphic images.

2.12 HISTOLOGICAL ANALYSIS

Formalin-fixed tumor samples were dehydrated gradually in ethanol, embedded in paraffin, cut into 4 μm sections, stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy to characterize the tumor cells.

2.13 BIODISTRIBUTION STUDIES

Aliquots of 3.7 MBq of SpHL- $^{99\text{m}}\text{Tc}$]DOX or nSpHL- $^{99\text{m}}\text{Tc}$]DOX were injected intravenously into tumor-bearing BALB/c mice ($n = 6$). A solution of xylazine (15 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) was used to anesthetize animals. At 1, 4, and 24 h after administration organs and tissues, such as liver, spleen, kidneys, stomach, lungs, blood, muscle, thyroid, intestines, and tumor, were harvested and weighted, then radioactivity was determined by a scintillation counter. Data were disclosed as %ID/g of each collected tissue.

2.14 STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as mean \pm SD. The difference among experimental groups was tested using the unpaired *t* test. Differences were considered statistically significant when P values were < 0.05 . All data were analyzed by GraphPad PRISM, version 5.00 software (GraphPad Software Inc.).

3 RESULTS

3.1 RADIOCHEMICAL PURITY

The complex $^{99\text{m}}\text{Tc}$]DOX showed radiochemical purity of $99.1 \pm 0.8\%$. Radiocolloids produced in the reaction were removed by filtration syringe filters (pore size = 0.22 μm). This finding is in agreement with results already reported by our group for this complex [18].

3.2 LIPOSOMES CHARACTERIZATION

The physicochemical characterization of liposomes (SpHL, nSpHL, SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX) is shown in Table 1. Although a slight size difference could be noticed between SpHL (114.8 nm) and nSpHL (135.1 nm), by analyzing the particle distribution it is possible to confirm the similarity of both formulations since more than 99% of them are smaller than 200nm. Therefore, SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX showed an appropriate size and homogeneity for intravenous administration.

TABLE 1
Physicochemical characterization of liposomes SpHL, nSpHL, SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX.

	Size (nm)	Number of vesicles <200 nm (%)	Polidispersivity index(PDI)	Zeta Potencial (mV)
SpHL	114.8 ± 3.8	99.8 ± 0.3	0.06 ± 0.01	-3.2 ± 0.2
nSpHL	134.9 ± 1.2	99.4 ± 0.1	0.08 ± 0.02	-2.0 ± 0.2
SpHL-[^{99m} Tc]DOX	115.7 ± 2.6	99.9 ± 0.1	0.08 ± 0.04	-3.9 ± 0.2
nSpHL-[^{99m} Tc]DOX	135.2 ± 2.0	99.5 ± 0.1	0.05 ± 0.02	-2.4 ± 0.2

3.3 ENCAPSULATION PERCENTAGE AND IN VITRO LEAKAGE PROFILE

SpHL and nSpHL after incubation with [^{99m}Tc]DOX solution was added to pre-formed liposomes (SpHL or nSpHL), in presence of glucose. After freezing/thawing process, SpHL and nSpHL showed encapsulation percentage of 25.5 ± 0.6 and 37.0 ± 5.4, respectively. In order to ensure the retention of ^{99m}Tc-DOX into liposomes over the experiments, *in vitro* leakage profile of [^{99m}Tc]DOX from both SpHL and nSpHL was performed. It was observed a maximum leakage of radiolabeled complex (31.0% for SpHL-[^{99m}Tc]DOX and 34.4% for nSpHL-[^{99m}Tc]DOX) throughout the experiment. These results indicate that both SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX can be used for further *in vivo* studies since even after long period of time (24 hours) about 70% of the radioactivity remains inside the liposomes. A high stability is extremely

important for nanoparticle scintigraphic imaging probes, otherwise biodistribution would no longer reflect the nanoparticle fate.

3.4 pH SENSITIVITY EVALUATION

In vitro pH sensitivity was evaluated for SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX at different pHs (7.4, 6.5 and 6.0) and the results are shown in Table 2. It was observed that, in a presence of an acid medium, SpHL showed an increased [^{99m}Tc]DOX leakage when compared to nSpHL. Such a difference was not observed under neutral pH (7.4). These findings confirm the pH-sensitivity for SpHL, which might be beneficial for the drug delivery in the tumor microenvironment.

TABLE 2

Leakage profile of [^{99m}Tc]DOX from SpHL and nSpHL at different pH.

	SpHL-[^{99m} Tc]DOX	nSpHL-[^{99m} Tc]DOX
pH 7.4	13.5 ± 2.0	12.8 ± 1.2
pH 6.5	53.7 ± 3.2*	29.7 ± 7.8
pH 6.0	51.3 ± 3.0*	30.8 ± 0.8

*Represents statistical differences ($p < 0.05$) between SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX at same pH.

3.5 BLOOD CLEARANCE

Figure 1 shows the blood clearance profile of SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX after intravenous injection in healthy BALB/c female mice. It was possible to observe a biphasic clearance profile for SpHL-[^{99m}Tc]DOX with a fast half-life of 14.1 min and a long half-life of 129.0 min, and area under curve (AUC) of 6113 %ID/min. A similar profile was observed for nSpHL-[^{99m}Tc]DOX with a fast half-life of 5.1 min, long half-life of 140.6 min, and AUC of 4480 %ID/min. AUC for SpHL-[^{99m}Tc]DOX was 1.36 times higher than nSpHL-[^{99m}Tc]DOX, indicating that a higher amount of SpHL-[^{99m}Tc]DOX could be found in the bloodstream at the same time point. This finding suggests that SpHL-[^{99m}Tc]DOX may reach higher tumor uptake.

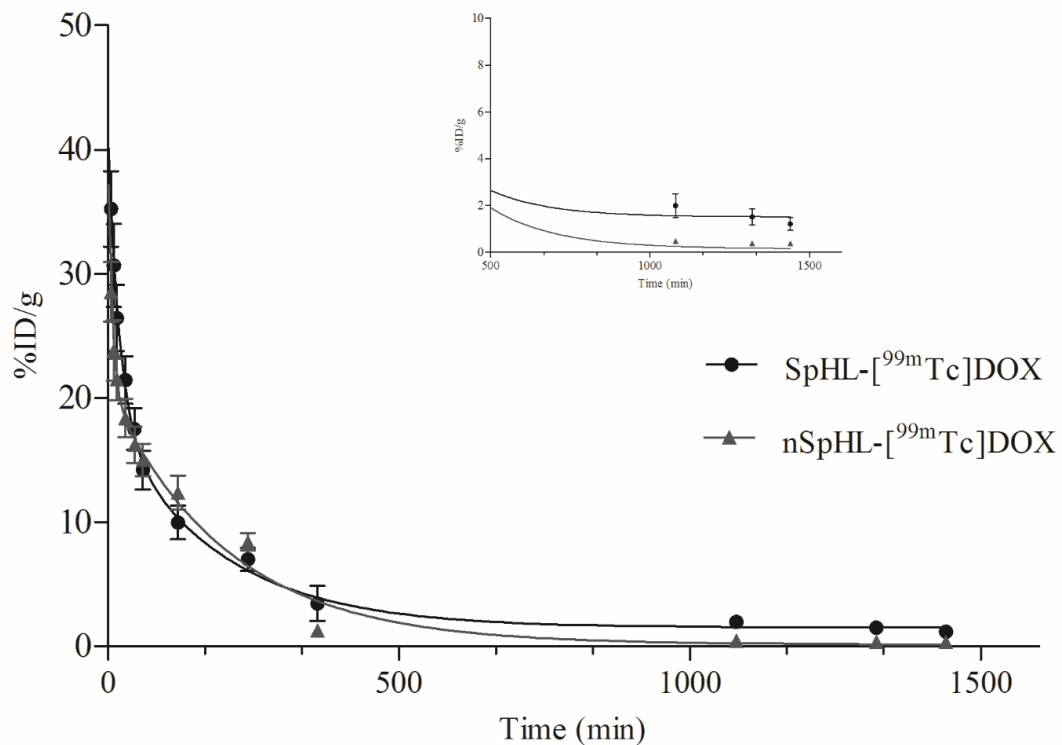


FIGURE 1 - Blood clearance of SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX in healthy BALB/c female mice. All data are the mean percentage (n = 6) of the injected dose of SpHL-[^{99m}Tc]DOX or nSpHL-[^{99m}Tc]DOX per gram of blood, ± the standard deviation of the mean (*Insert*: Blood clearance at later time – from 500 to 1440 min).

3.6 HISTOLOGIC EVALUATION

Histological sections of the tumor site stained by hematoxylin and eosin (H&E) showed morphological features compatibles with 4T1 cells murine breast carcinoma [20]. Neoplastic cells were organized into solid pattern and featured round to oval nucleus with wide and eosinophilic cytoplasm, which is characteristic of epithelial cells. The cells showed accentuated nuclear pleomorphism with presence of multiple and evident nucleoli.

3.7 BIODISTRIBUTION STUDIES

Figures 2 and 3 show the biodistribution of SpHL- ^{99m}Tc]DOX and nSpHL- ^{99m}Tc]DOX after intravenous injection in 4T1 tumor-bearing female BALB/c mice, respectively. It was observed, for both formulations, high uptake in liver and spleen, which are organs rich in macrophages. Low uptake in kidneys and intestines was observed, indicating high stability for both formulations, since those organs are the elimination route for ^{99m}Tc]DOX [18]. Results showed a significant uptake in the tumor when compared to the contralateral muscle ($p < 0.05$) for both liposomes throughout the experiment. Noteworthy, a higher muscle uptake is achieved for SpHL- ^{99m}Tc]DOX in comparison to nSpHL- ^{99m}Tc]DOX, likely due to the higher AUC presented by SpHL- ^{99m}Tc]DOX.

Figure 4 shows tumor-to-muscle ratios achieved after intravenous injection of SpHL- ^{99m}Tc]DOX or nSpHL- ^{99m}Tc]DOX in 4T1 tumor-bearing mice. Ratios were higher than 2.0 for all evaluated timeframes. The obtained tumor-to-muscle ratio for SpHL- ^{99m}Tc]DOX was significantly higher than the obtained for nSpHL- ^{99m}Tc]DOX ($p < 0.05$) at 4 and 24 h. This finding suggests that pH sensitivity presented by SpHL contributed to the achievement of higher uptakes in the tumor tissue.

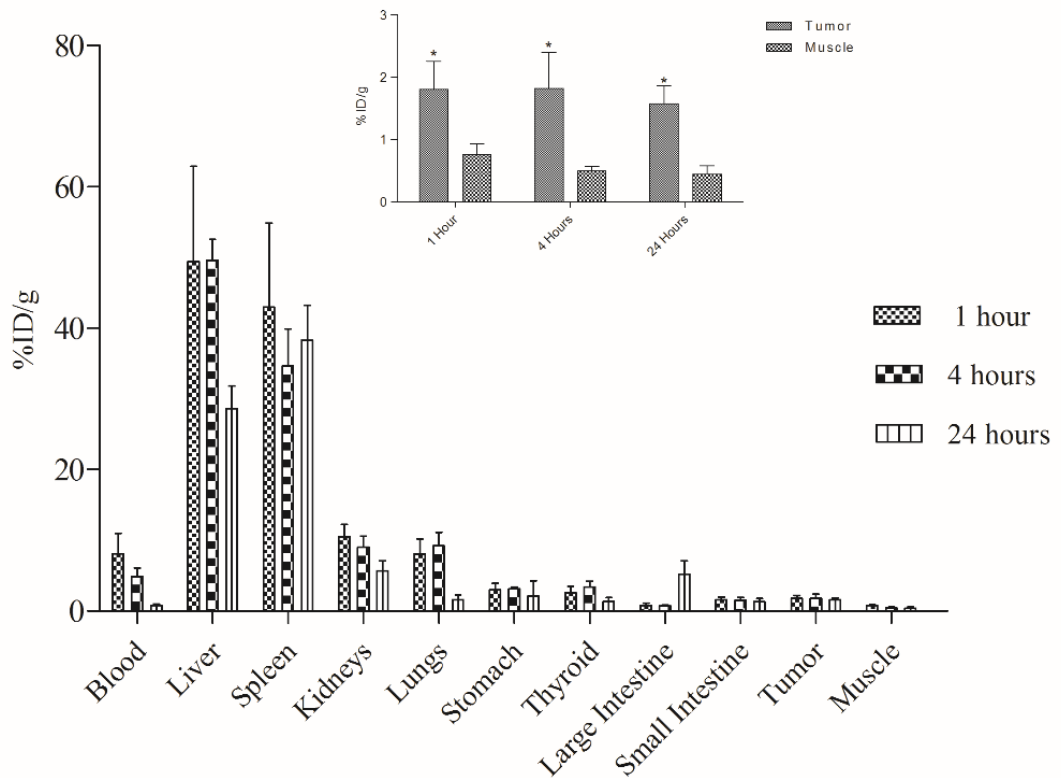


FIGURE 2 - Biodistribution profile of SpHL-[^{99m}Tc]DOX following intravenous tail-vein administration in tumor-bearing BALB/c mice (n = 6) (inset: tumor and muscle uptake at 1, 4, and 24 h after injection). All data are the mean percentage (n = 6) of the injected dose of SpHL-[^{99m}Tc]DOX per gram of blood, ± the standard deviation of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences between tumor and muscle uptake at the same time point (p < 0.05).

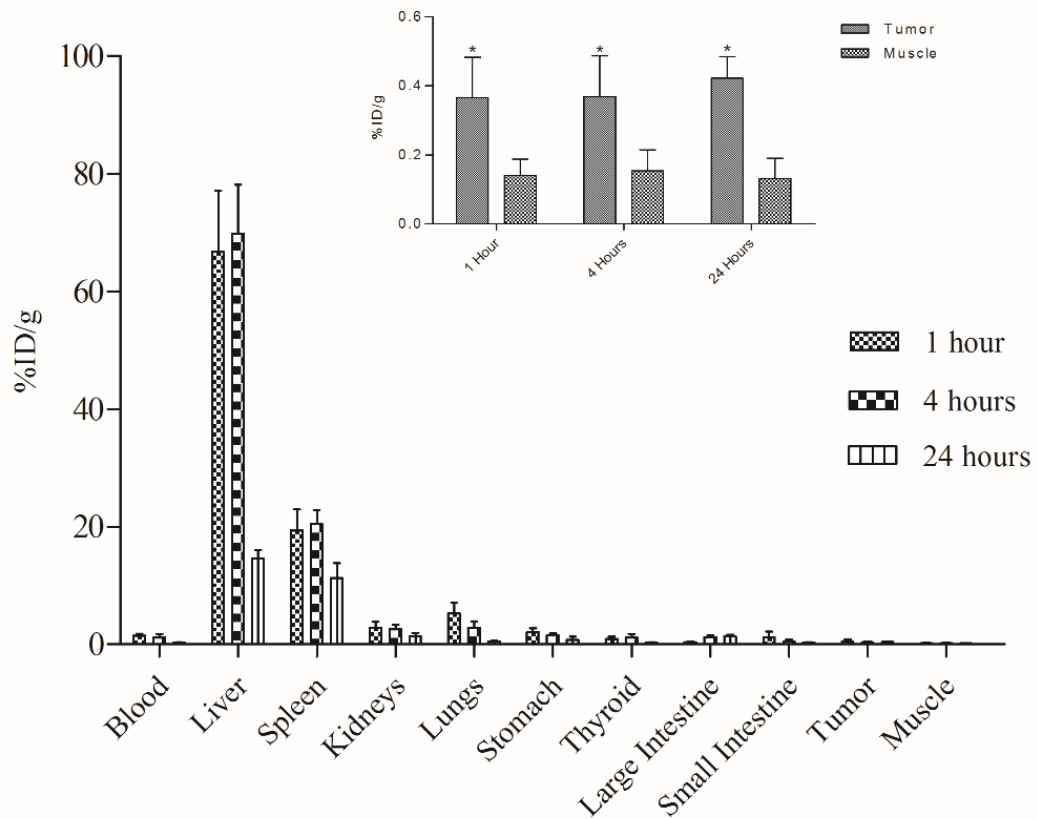


FIGURE 3 - Biodistribution profile of nSpHL- ^{99m}Tc]DOX following intravenous tail-vein administration in tumor-bearing BALB/c mice ($n = 6$) (inset: tumor and muscle uptake at 1, 4, and 24 h after injection). All data are the mean percentage ($n = 6$) of the injected dose of nSpHL- ^{99m}Tc]DOX per gram of blood, \pm the standard deviation of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences between tumor and muscle uptake at the same time point ($p < 0.05$).

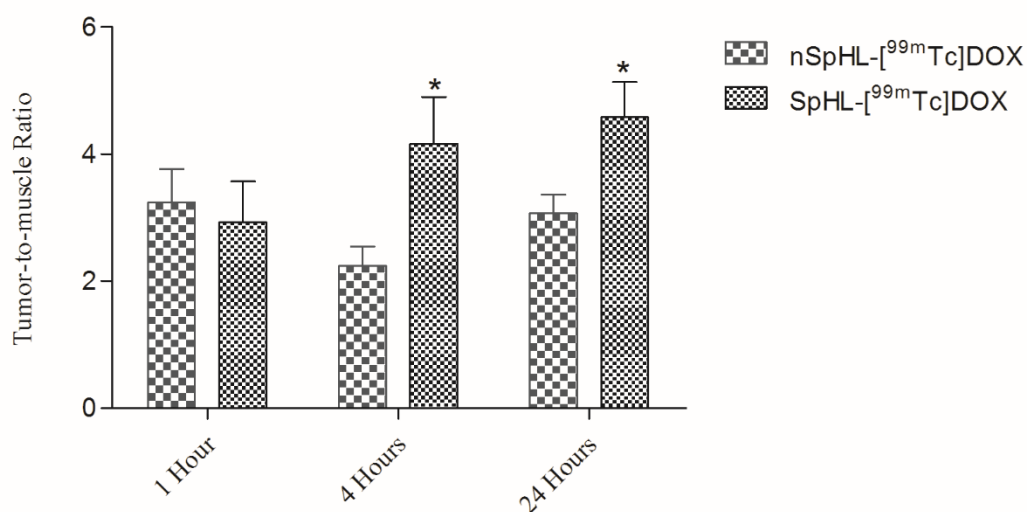


FIGURE 4 - Tumor-to-muscle ratios 1, 4 and 24 h post administration of the SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX in tumor-bearing BALB/c mice. (n = 6) Asterisks mean statistical difference between the liposomal formulations (p < 0.05).

4 DISCUSSION

Liposomes are spherical vesicles spontaneously formed when phospholipids are exposed to an aqueous environment that are able to encapsulate and deliver both hydrophilic and lipophilic substances. Liposomes constitute the most clinically established type of nanosystem for various therapeutic applications, especially in cancer treatment and diagnosis [7, 10, 16].

These nanosystems have recently gained prominence in cancer treatment due to their potential to increase specificity, decrease toxicity and modify the pharmacokinetic profile of the therapeutic agents currently in clinical use [4, 7, 9]. Among the nanocarriers approved by FDA for clinical use, the PEGylated liposome containing doxorubicin (Doxil®) is worth mentioning [4, 6, 7].

In this study, we present a new strategy to selectively delivery doxorubicin into tumors. Herein, it was demonstrated that encapsulating doxorubicin into liposomes SpHL (pH-sensitive liposomes) and nSpHL (non pH-sensitive liposomes) lead to alterations on the free drug pharmacokinetics, confirmed by the changes on the biodistribution profiles. Liposomes (SpHL or nSpHL) showed high liver and spleen uptake, indicating capture by the cells of mononuclear phagocyte system (MPS), as expected for nanoparticles. In contrast, studies conducted by Fernandes et al., 2016,

showed high kidneys and intestines uptakes for [^{99m}Tc]DOX [18, 21, 22]. Worth mentioning here that [^{99m}Tc]DOX, in this specific study, was used only as an imaging probe to track liposomes fate. We do not expect any antitumor effect by these systems (SpHL-[^{99m}Tc]DOX or nSpHL-[^{99m}Tc]DOX). The major focus of this study was to demonstrate the ability of SpHL to deliver drugs or probes (i.e. [^{99m}Tc]DOX) to tumor compared to nSpHL.

Previous studies demonstrate the ability of pH-sensitive liposomes in releasing their content under an acid environment, such as tumor regions [10, 16]. In this study, this ability was demonstrated *in vitro*, confirming that the encapsulation process of [^{99m}Tc]DOX complex in SpHL did not affect pH-sensitivity properties.

Both formulations could reach the tumor in higher concentration than the contralateral muscle, used as control. Noteworthy is the higher tumor uptake for SpHL-[^{99m}Tc]DOX when compared to nSpHL-[^{99m}Tc]DOX. Throughout the experiment, tumor uptake for the pH sensitive formulation was about 4-fold greater than those presented by the non-pH sensitive formulation. This fact might be explained by the higher blood concentration at the investigated timeframes, indicating lower MPS uptake for SpHL-[^{99m}Tc]DOX. Indeed, liposomal formulations, even when functionalized with hydrophilic polymers on their surfaces, are widely recognized and captured by macrophages present in the MPS organs [10, 17, 23]. However, liver and spleen uptake for SpHL-[^{99m}Tc]DOX was significant lower than those shown by nSpHL-[^{99m}Tc]DOX (Fig. 3 and 4, respectively). The structural phospholipid HSPC, used to prepare nSpHL, presents a phase transition temperature (T_m) equals to 53 °C, which generate a more rigid liposome membrane at corporal temperature. This fact may contribute to the improved nanoparticle recognition by MPS, reflecting lower blood concentration and AUC, and higher liver and spleen uptake for nSpHL-[^{99m}Tc]DOX.

Importantly, tumor-to-muscle ratios presented by both formulations were higher than 2.0 throughout the experiment, indicating that liposomes on their own, are capable of accumulating in tumor areas through EPR effect. However, when comparing tumor-to-muscle ratios between SpHL-[^{99m}Tc]DOX and nSpHL-[^{99m}Tc]DOX (Fig. 5) it is possible to notice a higher ratio for the pH-sensitive formulation at 4 and 24 h, indicating higher affinity for the tumor site by SpHL-[^{99m}Tc]DOX.

In conclusion, this feasibility study presents a new formulation as a tool to improve tumor uptake. State-of-the-art composition alongside with a pH-sensitivity property promote higher accumulation in tumor, suggesting that SpHL can be a promising alternative to effectively delivery antitumor drugs, including doxorubicin.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support and fellowships.

5 REFERENCES

- [1] Stewart BW, Wild CP (2014) World Cancer Report 2014 Latest World Cancer Statistics. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [2] Steichen DS, Caldorera-Moore M, Peppas NA (2013) A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci* 48:416-427.
- [3] Giovinazzo H, Kumar P, Sheikh A, et al. (2016) Technetium Tc99m sulfur colloid phenotypic probe for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated liposomal doxorubicin in women with ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 77:565-573.
- [4] Dawidczyk CM, Kim C, Park JH, et al. (2014) State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J Control Release* 187:133-144.
- [5] Lasic DD (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* 7:302-321.
- [6] Barenholz Y (2012) Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 160:117-34.
- [7] Allen TM, Cullis PR (2013) Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 65:36-48.
- [8] Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJY. (2014) Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci* 103: 29–52.
- [9] Leite EA, Lana AM, Junior AD, et al. (2012) Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. *J Biomed Nanotechnol* 8:229-239.

- [10] Barros ALB, Mota LG, Soares DC, et al. (2013) Long-circulating, pH-sensitive liposomes versus long-circulating, non-pH-sensitive liposomes as a delivery system for tumor identification. *J Biomed Nanotechnol* 9:1636-1643.
- [11] Heinrich AK, Lucas H, Schindler L, et al. (2016) Improved tumor specific drug accumulation by polymer therapeutics with pH-sensitive drug release overcomes chemotherapy resistance. *Mol Cancer Ther* DOI: 10.1158/1535-7163.
- [12] Oliveira MC, Rosilio V, Lesieur P, et al. (2000) pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. *Biophys Chem* 87:127-137.
- [13] Santos GC, Reis ECO, Rocha TGR, et al. (2011) Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *J Liposome Res* 21:60-69.
- [14] Barros ALB, Mota LG, Soares DC, et al. (2011) Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. *Bioorg Med Chem Lett* 21:7373-7375.
- [15] Barros ALB, Tsourkas A, Saboury B, et al. (2012) Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI Res* 2:39.
- [16]] Barros ALB, Mota LG, Coelho MM, et al. (2015) Bombesin Encapsulated in Long-Circulating pH-Sensitive Liposomes as a Radiotracer for Breast Tumor Identification. *J Biomed Nanotechnol* 11:342-350.
- [17] Ferreira SM, Domingos GP, Ferreira DS, et al. (2012) Technetium-99m-labeled ceftizoxime loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes used to identify osteomyelitis. *Bioorg Med Chem Lett* 22:4605-4608.
- [18] Fernandes RS, Silva JO, Lopes SC et al (2016) Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. *Nucl Med Commun* 37:307-312.

- [19] Rizvi FA, Bokhari TH, Roohi S, Mushtaq A (2012) Direct labeling of doxorubicin with technetium-99m: its optimization, characterization and quality control. *J Radioanal Nucl Chem* 293:303–307.
- [20] Garcia CMS, Araújo MR, Lopes MTP, Ferreira MAND, Cassali GD (2014) Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4T1. *Braz J Vet Pathol* 7:158-165.
- [21] Araujo FI, Proença FPP, Ferreira CG et al (2015) Use of 99mTc-doxorubicin scintigraphy in females with breast cancer: a pilot study. *Br J Radiol* 88:1–7.
- [22] Kumar P, Singh B, Ghai A, Hazari PP, Mittal BR, Mishra AK. (2015) Development of a single vial kit formulation of [99mTc]-labeled doxorubicin for tumor imaging and treatment response assessment-preclinical evaluation and preliminary human results. *J Labelled Comp Radiopharm* 58:242–249.
- [23] Junior ADC, Mota LG, Nunan EA et al (2007) Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sci* 80:659.

CAPÍTULO 2

Avaliação da Toxicidade Aguda in vivo de Lipossomas pH-Sensíveis de Circulação Prolongada Contendo Doxorubicina

1 INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é um agente antineoplásico amplamente utilizado desde a década de 70 no tratamento de tumores malignos sólidos e hematológicos. Os mecanismos pelos quais esse fármaco atua sobre as células incluem ligação a topoisomerase II, intercalação ao DNA e geração de radicais livres do oxigênio (ROS), ativando vias de apoptose de células tumorais e sadias (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; CHABNER *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2012; DAMIANI *et al.*, 2016). A baixa especificidade da DOX é responsável por efeitos tóxicos sistêmicos severos, sendo a cardiotoxicidade o efeito mais característico, grave e limitante da dose (WOJTACKI, LEWICKA-NOWAK & LEÆNIEWSKI-KMAK, 2000; CHABNER *et al.*, 2005; OCTAVIA *et al.*, 2012, SAPALLAROSSA *et al.*, 2016). Além disso, a DOX é capaz de gerar efeitos tóxicos renais e hepáticos, provocando alterações morfológicas e funcionais nesses órgãos (EL-MOSELHY & EL-SHEIKH, 2013; KAMENDI *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2015).

Neste contexto, lipossomas tem se mostrado estratégias interessantes para diminuir a toxicidade sistêmica da DOX, sendo os lipossomas peguilados (Stealth®) as nanoestruturas mais extensivamente estudadas. Estes lipossomas apresentam em sua superfície moléculas de polietilenoglicol (PEG) que levam ao aumento do tempo de circulação dos lipossomas, permitindo que se acumulem passivamente na região tumoral em detrimento de tecidos sadios (WORKING *et al.*, 1994; GABIZON *et al.*, 2002; Barenholtz 2012).

Baseados nas características fisiopatológicas dos tumores sólidos, onde a alta atividade glicolítica associada a áreas de hipóxia promove um microambiente tumoral ácido (HEINRICH *et al.*, 2016), lipossomas responsivos a variações de pH tem sido desenvolvidos (OLIVEIRA *et al.*, 1998; LEITE *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2015). Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, a temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas. A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como

o hemissuccinato de coleslerila (CHEMS), que, em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000; LEITE *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2015). Estudos prévios com lipossomas pH-sensíveis contendo cisplatina mostraram-se promissores devido a redução da toxicidade sistêmica deste fármaco quando encapsulados, permitindo aumento da dose administrada em camundongos quando comparados ao fármaco livre (LEITE *et al.*, 2011; MARONI *et al.* 2012; CARLESSO *et al.*, 2016).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda hematológica, hepática, renal e cardíaca de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo DOX em modelo murino.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O cloridrato de doxorubicina (DOX) foi obtido da 141 ACIC Chemicals (Brantford, Ontário, Canadá). Os fosfolípides dioleil fosfatidil etanolamina (DOPE), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) e distearoil fosfatidil etanolamina polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemissuccinato de coleslerila (CHEMS) e colesterol (CHOL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Membranas de policarbonato foram adquiridas da Millipore (Billerica, EUA). O sal HEPES foi adquirido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Os camundongos utilizados nos estudos foram obtidos do Biotério Central - UFMG (Belo Horizonte, Brasil). Os kits para análises bioquímicas foram obtidos das empresas Labtest (Lagoa Santa, Brasil)

e Bioclin (Belo Horizonte, Brasil). Todos os estudos em modelo animal foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo de nº 302/14 (Anexo 1).

2.2 TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (SpHL-DOX)

2.2.1 Preparo dos SpHL-DOX

2.2.1.1 Preparo dos SpHL brancos

Os lipossomas foram preparados segundo a técnica de hidratação do filme lipídico (BANGHAN, 1965), seguido de calibração do tamanho por extrusão. Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram transferidas para um balão de fundo redondo (razão lipídica igual a 5,8:3,7:0,5 respectivamente, e concentração lipídica total de 20 mM) e o solvente removido em evaporador rotatório a baixa pressão. Após a obtenção do filme lipídico, foi adicionada quantidade suficiente de solução de NaOH 0,1 M para promover a completa ionização do CHEMS e então, o filme foi hidratado com solução de sulfato de amônio 300 mM e pH 7,4, a temperatura ambiente sob agitação vigorosa. Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante 5 ciclos de extrusão em membranas de policarbonato de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm, utilizando o extrusor Lipex Biomembranes, modelo T001 (Vancouver, Canadá). Após a etapa de calibração do tamanho das vesículas, o excesso de sulfato de amônio foi removido por ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima® L-80XP, Beckman Coulter, EUA) a 150.000 g, 4 °C, por 120 min. Após o ciclo de ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* reconstituído com solução tampão HEPES-salina pH 7,4, mantendo-se a concentração lipídica de 20 mM, obtendo-se uma suspensão de lipossomas branco.

2.2.1.2 Encapsulação da DOX (SpHL-DOX)

Para a incorporação da DOX à formulação, foi utilizado o método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio. A cada 1 mL de suspensão de lipossomas branco, foram adicionados 2 mg de cloridrato de doxorubicina e a mistura resultante foi mantida sob refrigeração por 2 horas. Em seguida, a suspensão de SpHL-DOX foi purificada por ultracentrifugação utilizando-se os mesmos parâmetros citados anteriormente. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão HEPES-salina pH 7,4 mantendo-se a concentração lipídica de 20 mM.

2.2.2 Caracterização Físico-Química

2.2.2.1 Diâmetro médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão de SpHL e SpHL-DOX foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C, utilizando um ângulo de 90°. O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética associada a espectroscopia de correlação de fótons. As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas em tampão HEPES-salina pH 7,4 na proporção de 1:100 e as medidas foram realizadas em triplicata.

2.2.2.2 Teor de Encapsulação

A quantificação de DOX foi realizada por meio de HPLC e detecção fluorimétrica. Utilizou-se uma coluna ACE[®] C8 4,6 mm x 250 mm, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída pela

mistura metanol:tampão fosfato 0,01 M pH 3,0 na proporção volumétrica de 65:35, respectivamente. O volume de injeção foi de 20 µL, com tempo de corrida de 6,0 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL/minuto. Os produtos da eluição foram quantificados em detector de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação igual a 470 nm e emissão igual a 555 nm. Foi utilizada uma curva de calibração para obtenção da equação da reta e esta foi utilizada para a determinação da concentração das amostras eluídas.

Para a quantificação da DOX nas formulações lipossomais, a membrana lipídica foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:2 (v/v) e, em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente até atingir uma concentração teórica de doxorubicina igual a 40 ng/mL. A quantidade de doxorubicina foi determinada antes e após a ultracentrifugação e o teor de encapsulação (TE) da doxorubicina foi calculado de acordo com a equação 1:

$$TE(\%) = \frac{[DOX] \text{ após ultracentrifugação}}{[DOX] \text{ antes da ultracentrifugação}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.3 Estudos de Toxicidade Aguda *in vivo* de SpHL-DOX

A avaliação da toxicidade aguda *in vivo* foi realizada segundo as recomendações da OECD 423 de 2001, adaptada para formulações de uso parenteral. Os parâmetros avaliados para a determinação da toxicidade *in vivo* foram: observação comportamental, peso corporal, consumo de água e ração, análises bioquímicas, análises hematológicas, análises histopatológicas e medidas eletrocardiográficas.

Foram utilizados como modelos de toxicidade *in vivo* fêmeas de camundongos BALB/c sadios com idade entre 8-10 semanas e peso de 18g. Antes do início dos experimentos os animais foram ambientados por um período de, no mínimo, 5 dias.

Os camundongos receberam, por via endovenosa, dose única de DOX ou SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg). Os camundongos controle receberam, pela mesma via, solução salina ou SpHL (a dose de lípides foi equivalente a administrada nos animais tratados com 17,5 mg/kg de SpHL-DOX). Cada grupo

avaliado consistiu de 6 animais e as doses finais utilizadas foram determinadas experimentalmente.

Após os tratamentos, os animais foram observados por 14 dias. Durante o período de observação foram avaliados parâmetros comportamentais, consumo de água e ração, peso corporal, morbidade e mortalidade. A variação de peso foi calculada de acordo com o peso inicial dos animais. A dose máxima tolerada (DMT) foi definida como a maior dose que causou perda de peso inferior a 15%, não causou morte ou qualquer sinal de toxicidade proeminente durante os 14 dias de observação (VASSILEVA *et al.*, 2007).

Ao fim dos 14 dias de observação os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e eutanasiados. Sangue total foi coletado para as análises hematológicas e bioquímicas e os órgãos (fígado, rins e coração) removidos para análises histopatológicas.

2.2.3.1 Investigação Hematológica e Bioquímica

Foi coletado sangue total por punção do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os parâmetros hematológicos avaliados foram: hemoglobina, número de hemácias, hematócrito, global e diferencial de leucócitos e reticulócitos. Os parâmetros foram mensurados manualmente segundo técnicas descritas por Carvalho e Silva, 1988.

O sangue total coletado foi centrifugado (3000 rpm, 15 min) e plasma foi obtido para a quantificação de parâmetros bioquímicos. Os testes foram realizados em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) utilizando-se kits comerciais.

Foram avaliadas a função renal por meio da dosagem de ureia e creatinina, a função hepática por meio da dosagem de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) e a função cardíaca, por meio da dosagem de creatino quinase isoforma MB (CK-MB).

2.2.3.2 Investigação Histopatológica

Para análise histopatológica foram coletados fígado, rins e coração. Os materiais foram fixados em formol tamponado a 10% por um período de 24 a 48 horas e incluídos em blocos de parafina. Destes blocos, foram obtidas secções de 4 µm e estas foram coradas por hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por equipe de patologistas treinados e imagens foram capturadas por câmera acoplada a microscópio óptico.

2.2.3.3 Análise Eletrocardiográfica

Para a avaliação da função cardíaca *in vivo* por eletrocardiograma (ECG), foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c sadios com idade de 8-10 semanas e peso de 18g. Os animais foram divididos em 2 grupos de cinco animais cada: DOX (15 mg/kg), SpHL-DOX (15 mg/kg). Os registros foram adquiridos imediatamente antes da administração de DOX e SpHL-DOX e nos dias 1 e 7. A dose utilizada levou em consideração a ausência de mortalidade de animais durante o período do experimento, possibilitando a aquisição de registros em todos os tempos determinados.

O sinal do ECG foi obtido utilizando agulhas hipodérmicas de aço inoxidável como sensores. As agulhas foram inseridas no tecido subcutâneo do membro superior direito e inferior esquerdo, objetivando medir a diferença de potencial relativa a derivação DII. O sensor inserido no membro inferior direito foi ligado a blindagem do aparelho, para minimizar o ruído. Os sinais foram amostrados a uma frequência de 2000 Hz, por uma placa conversora analógico-digital Windaq Board (modelo DI 200, EUA). Os experimentos foram inicialmente analisados por inspeção visual do registro através do *software Win/Daq*. Posteriormente foram selecionados, em janelas de 180 segundos, instantes pré determinados pelos protocolos experimentais permitindo a análise de 5 a 9 ciclos cardíacos completos, dependendo da frequência cardíaca. Os registros armazenados serão analisados off-line e consistirão em medidas do intervalo QT (intervalo entre início de uma onda Q e o término de uma onda T do ECG), intervalo PR (intervalo entre o início de uma onda P e o término de uma onda R), do complexo QRS (inclui três ondas: Q, R e S,

medindo-se do início da onda Q até o término da onda S), da onda T e do intervalo RR (intervalo entre ondas R de dois ciclos consecutivos), para a determinação da frequência cardíaca.

2.3 TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS NÃO pH-SENSÍVEIS CONTENDO DOXORRUBICINA (nSpHL-DOX)

2.3.1 Preparo e Caracterização dos Lipossomas

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico, seguido de calibração de tamanho por extrusão. Alíquotas clorofórmicas de HSPC, CHOL e DSPE-mPEG₂₀₀₀ na (razão lipídica de 5,7:3,8:0,5 e concentração lipídica total de 20 mM) foram tomadas e transferidas para um balão de fundo redondo e o solvente foi removido por evaporador rotatório a baixa pressão. O filme lipídico obtido foi hidratado em solução de sulfato de amônio 300mM pH 7,4, mantendo-se a concentração lipídica de 20 mM. Os lipossomas foram calibrados e o excesso de sulfato de amônio foi retirado por ultracentrifugação. Alíquotas de 1 mL de lipossoma foram colocadas em contato com 2 mg de cloridrado de doxorubicina e aquecidas a 60 °C por 1 hora para a encapsuação do farmaco e obtenção de nSpHL-DOX. As etapas subsequentes de purificação e caracterização físico-química foram semelhantes às utilizadas para SpHL-DOX (item 2.2.2).

2.3.2 Estudos de Toxicidade Aguda *in vivo* de nSpHL-DOX

Para a determinação da toxicidade aguda *in vivo* de nSpHL-DOX, foram utilizados como modelos fêmeas de camundongos BALB/c sadios com idade entre 8-10 semanas e peso de 18g. Antes do início dos experimentos os animais foram ambientados por um período de, no mínimo, 5 dias.

Os camundongos receberam, por via endovenosa, dose única nSpHL-DOX (17,5 mg/kg). Os camundongos controle receberam, pela mesma via, solução salina ou nSpHL (a dose de lípides foi equivalente a administrada nos animais tratados com 17,5 mg/kg de nSpHL-DOX). Cada grupo experimental consistiu de 6 animais e a dose utilizada foi equivalente a DMT determinada para SpHL-DOX.

Após os tratamentos, os animais foram observados por 14 dias. Durante o período de observação foram avaliados parâmetros comportamentais, consumo de água e ração, peso corporal, morbidade e mortalidade. A variação de peso foi calculada de acordo com o peso inicial dos animais. Ao fim dos 14 dias de observação os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e eutanasiados. Sangue total foi coletado para as análises hematológica os órgãos (fígado, rins e coração) removidos para análises histopatológicas.

Avaliou-se também a função cardíaca *in vivo* por eletrocardiograma (ECG). Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c sadios com idade de 8-10 semanas e peso de 18g. Um grupo de cinco animais recebeu nSpHL-DOX (15 mg/kg) e os registros foram adquiridos imediatamente antes da administração de nSpHL-DOX e nos dias 1 e 7. A dose utilizada levou em consideração a ausência de mortalidade de animais tratados com DOX durante o período do experimento, possibilitando a aquisição de registros em todos os tempos determinados.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. Verificou-se a normalidade e homocedasticidade das variáveis e as que não apresentaram distribuição normal foram transformadas. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de hipótese através do teste t-Student no caso de dados paramétricos e teste de Mann-Whitney no caso de dados não-paramétricos. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor a 0,05 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA (SpHL-DOX)

3.1.1 Caracterização Físico-Química

Foram obtidos lipossomas branco (SpHL) com diâmetro médio e índice de polidispersão indicativos de amostras monodispersa e potencial zeta próximo da neutralidade, devido as moléculas de polietilenoglicol (PEG) na superfície do lipossoma. O processo de encapsulação da DOX não alterou os parâmetros físico-químicos da formulação (Tabela 1). Os lipossomas obtidos possuem características esperadas e adequadas para o uso intravenoso.

TABELA 1

Caracterização físico-química de SpHL e SpHL-DOX. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	Teor de Encapsulação (%)
SpHL	125,5 \pm 8,6	0,073 \pm 0,03	-3,50 \pm 0,81	-
SpHL-DOX	123,0 \pm 5,1	0,12 \pm 0,026	-3,63 \pm 0,90	99, 6 \pm 1,3

3.1.1 Avaliação de Peso, Sinais Clínicos e Mortalidade dos Animais

Durante toda a duração do experimento, não foi observada perda de peso, alteração comportamental ou sinais clínicos relacionados a toxicidade nos animais tratados com solução salina ou SpHL. Por esta razão, apenas os resultados relacionados ao grupo Salina foram expressos graficamente.

A figura 1 apresenta os resultados de variação de peso corporal dos animais tratados com Salina, DOX e SpHL-DOX. Em todos os grupos tratados com DOX (10 e 15 mg/kg) ou SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg), observou-se perda de peso gradativa, dose dependente e não superior a 13 %, com posterior recuperação parcial da perda ponderal ao final dos 14 dias. Nestes grupos, não foi observada mortalidade de animais. Entretanto, no grupo tratado com 17,5 mg/kg de DOX, houve acentuada perda de peso (20 % do peso inicial) ocasionando mortalidade de 100% dos animais ao 10º dia de observação (Figura 2). Houve redução do consumo de água e ração proporcional a porcentagem de variação do peso.

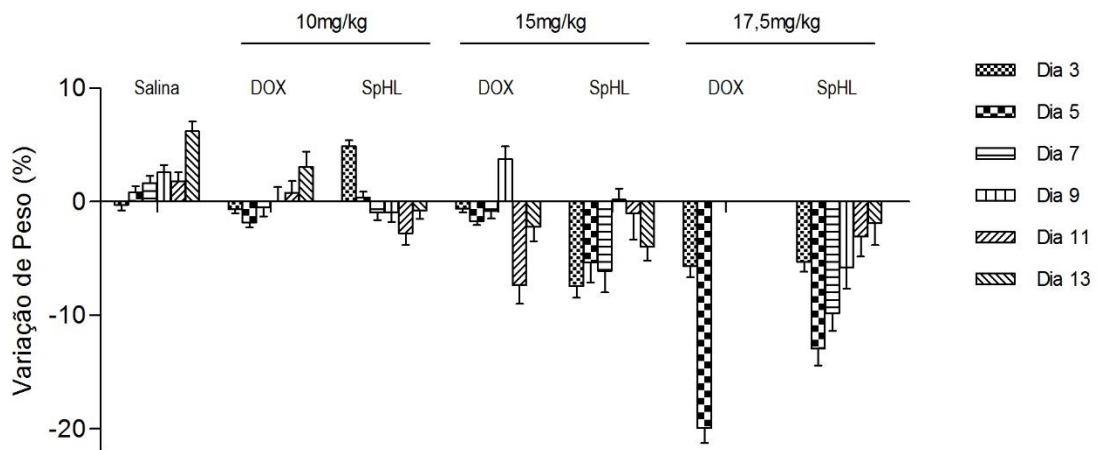


FIGURA 1 - Porcentagem de variação do peso de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

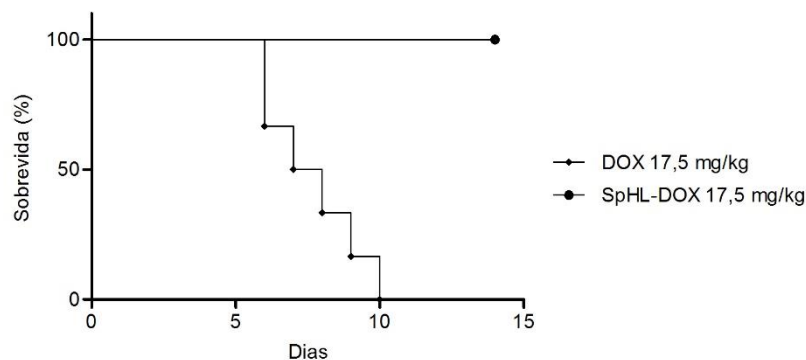


FIGURA 2 - Porcentagem de camundongos BALB/c sobreviventes tratados com Salina, DOX (17,5 mg/kg) e SpHL-DOX (17,5 mg/kg).

Em relação aos sinais clínicos e comportamentais, observou-se piloereção em todos os animais tratados com DOX ou SpHL-DOX desde o momento da administração, sendo a intensidade deste sinal dose dependente. Nos grupos DOX (10 e 15 mg/kg) e SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg), houve regressão da piloereção a partir do 8º dia, com total recuperação ao final do experimento. Observou-se ainda, nos animais tratados com 17,5 mg/kg de DOX, a partir do 5º dia, prostração intensa, diarreia, dificuldade respiratória e ascite.

3.1.2 Investigação Hematológica

As alterações hematológicas de animais tratados com DOX e SpHL-DOX estão apresentados na tabela 2. Não foram observadas alterações significativas na série eritrocitária madura, exceto para o grupo tratado com SpHL-DOX (17,5 mg/kg), onde observou-se diminuição significativa do número de hemácias e do hematócrito. Observou-se aumento significativo na porcentagem de reticulócitos circulantes para todas as doses de DOX e SpHL-DOX em relação aos animais tratados com salina. Foi observado ainda aumento acentuado da porcentagem de reticulócitos nos animais tratados com 15 mg/kg de SpHL-DOX, sendo este significativo em relação a mesma dose de DOX.

Na série leucocitária, observou-se redução significativa da global de leucócitos em todos os grupos tratados com DOX ou SpHL-DOX, sendo esta alteração representada por linfopenia verdadeira significativa. Não foram observadas alterações no número de eosinófilos, monócitos e basófilos.

TABELA 2

Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo Salina e DOX ou SpHL-DOX ($p < 0,05$). ^bRepresenta diferença significativa entre DOX e SpHL-DOX na mesma dose ($p < 0,05$).

Parâmetro	Salina	10 mg/kg		15 mg/kg		17,5 mg/kg
		DOX	SpHL	DOX	SpHL	SpHL
Hemácias (cél/mm ³ x 10 ⁶)	9,5 \pm 2,2	8,4 \pm 0,3	9,2 \pm 0,9	9,0 \pm 1,2	9,8 \pm 0,3	7,2 \pm 0,4 ^a
Hemoglobina (g/dL)	12,3 \pm 1,0	10,3 \pm 1,4	11,1 \pm 1,1	10,7 \pm 1,4	11,3 \pm 1,0	10,5 \pm 0,9
Hematócrito (%)	37 \pm 1	39 \pm 1	36 \pm 1	38 \pm 1	35 \pm 2	32 \pm 2 ^a
Reticulócitos (%)	0,75 \pm 0,02	1,08 \pm 0,2 ^a	1,54 \pm 0,5 ^a	1,64 \pm 0,2 ^a	5,94 \pm 0,7 ^{ab}	4,38 \pm 1,0 ^a
Global de Leucócitos (cél/mm ³ x 10 ³)	8,4 \pm 2,1	4,6 \pm 0,6 ^a	3,1 \pm 0,8 ^a	4,0 \pm 1,2 ^a	5,4 \pm 0,4 ^a	4,5 \pm 1,3 ^a
Neutrófilos (cél/mm ³ x 10 ³)	1,5 \pm 1,0	1,0 \pm 0,6	0,3 \pm 0,07	1,1 \pm 0,7	0,7 \pm 0,3	1,7 \pm 0,9
Linfócitos (cél/mm ³ x 10 ³)	6,8 \pm 1,5	3,1 \pm 0,6 ^a	2,8 \pm 0,7 ^a	3,0 \pm 0,4 ^a	4,8 \pm 0,3 ^a	2,3 \pm 0,2 ^a

3.1.3 Investigação Bioquímica

A tabela 3 apresenta parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal (Ureia e Creatinina), hepática (ALT e AST) e cardíaca (CK-MB).

Na análise dos parâmetros de toxicidade renal, observou-se aumento significativo de creatinina nos animais que receberam DOX, no entanto, a dosagem de ureia não apresentou padrão semelhante. Observou-se diminuição significativa da concentração sérica de ureia nos animais tratados com SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg).

Quanto a toxicidade hepática, observou-se aumento significativo de AST nos camundongos tratados com DOX (10 e 15 mg/kg) em relação aos animais tratados com Salina ou SpHL-DOX (10 15 e 17,5 mg/kg). Não foram observadas alterações na concentração sérica de ALT.

TABELA 3

Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX (10, 15) e SpHL-DOX (10, 15, 17,5 mg/kg). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo Salina e DOX ou SpHL-DOX ($p < 0,05$). ^bRepresenta diferença significativa entre DOX e SpHL-DOX na mesma dose ($p < 0,05$).

Parâmetro	Salina	10 mg/kg		15 mg/kg		17,5 mg/kg
		DOX	SpHL	DOX	SpHL	SpHL
Ureia (mg/dL)	51 \pm 7	57 \pm 6	40 \pm 10 ^{ab}	51 \pm 8	31 \pm 7 ^{ab}	28 \pm 4 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,32 \pm 0,05	0,53 \pm 0,05 ^{ab}	0,24 \pm 0,07	0,71 \pm 0,20 ^{ab}	0,42 \pm 0,07	0,50 \pm 0,2
ALT (U/L)	57 \pm 17	71 \pm 20	31 \pm 13	58 \pm 33	91 \pm 62	36 \pm 13
AST (U/L)	167 \pm 21	329 \pm 70 ^{ab}	126 \pm 41	425 \pm 140 ^{ab}	186 \pm 16	182 \pm 19
CK-MB (U/L)	25 \pm 7	41 \pm 11	29 \pm 6	61 \pm 13 ^{ab}	34 \pm 18	41 \pm 15

Em relação a toxicidade cardíaca, observou-se aumento significativo de CK-MB nos animais tratados com DOX (15 mg/kg) relativo ao grupo Salina e ao grupo SpHL-DOX na mesma dose. Qualitativamente, observa-se aumento dose-dependente, porém não significativo da concentração sérica de CK-MB nos animais tratados com SpHL-DOX.

3.1.4 Investigação Histopatológica

A figura 3 apresenta cortes histológicos de fígado, rins e pulmão.

Na análise de toxicidade hepática, todos os animais tratados com DOX (10 e 15 mg/kg) ou SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg) apresentaram áreas de degeneração localizadas perivascularmente, caracterizadas por hepatócitos vacuolizados, por vezes apresentando alteração da arquitetura tecidual usual, no entanto, sem evidência de necrose (Figuras 3B e 3C). Os animais tratados com DOX apresentaram degeneração perivascular de extensão e intensidade progressiva e dose dependente, sendo que os animais de tratados com 15 mg/kg de DOX

apresentaram comprometimento difuso do parênquima hepático de intensidade moderada a intensa. Entretanto, as áreas degenerativas apresentaram-se focalizadas, de intensidade discreta a moderada nos camundongos que receberam SpHL-DOX nas doses de 10, 15 e 17,5 mg/kg. Não foram observadas alterações morfológicas nos animais tratados com Salina ou SpHL (Figura 3A).

Em relação a toxicidade renal, os animais tratados com DOX na dose de 10 mg/kg apresentaram áreas multifocais de glomerulonefrite esclerosante em estágio inicial, caracterizadas por espessamento da parede glomerular e aumento e vesiculação das células mesangiais. Observou-se alteração semelhante nos animais tratados com DOX (15 mg/kg), acometendo difusamente o parênquima renal, apresentando ainda material hialino intratubular, sinal claro de comprometimento da função renal (Figura 3F). Nos animais tratados com SpHL-DOX (15 e 17,5 mg/kg), observou-se áreas focais de glomerulonefrite esclerosante e discreto acúmulo de material hialino intratubular. Os animais que receberam Salina, SpHL ou 10 mg/kg de SpHL-DOX não apresentaram alterações renais aparentes (Figuras 3D e 3E).

Quanto a toxicidade cardíaca, todos os animais tratados com DOX (10 e 15 mg/kg) ou SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg) apresentaram áreas de degeneração hialina, caracterizadas por fibras cardíacas hipertróficas, eosinofílicas e por vezes vacuolizadas (Figuras 3H e 3I). Observou-se aumento dose-dependente da extensão das lesões, sendo estas mais extensas nos animais tratados com DOX quando comparados com os animais tratados com SpHL-DOX na mesma dose, sendo a intensidade e extensão das lesões apresentadas na tabela 4. Os animais tratados com Salina ou SpHL não apresentaram alterações aparentes (Figura 3G).

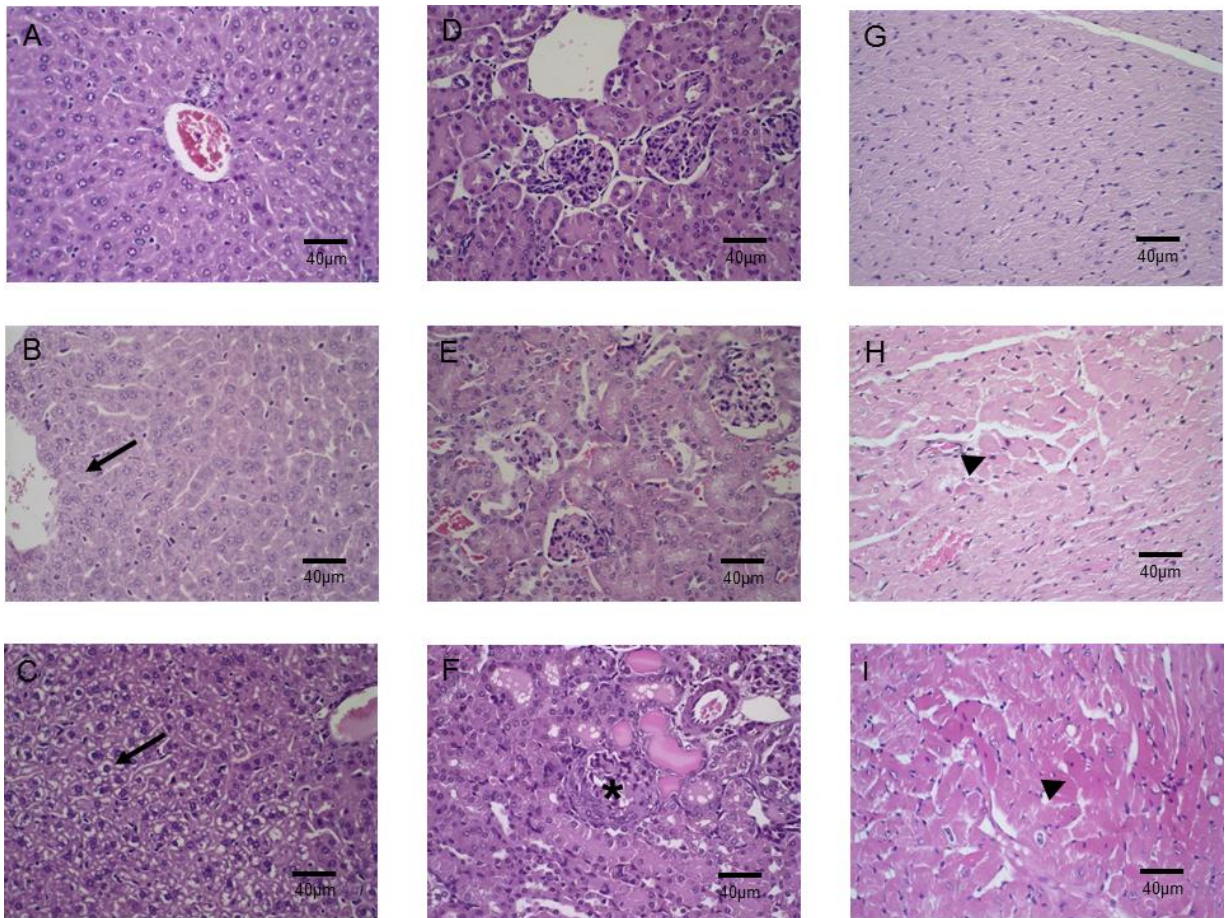


FIGURA 3 - Fotomicrografias de fígado, rins e coração de camundongos BALB/c tratados com DOX ou SpHL-DOX. (A) Fígado de animais tratados com Salina (B) Fígado de animais tratados com SpHL-DOX 10 mg/kg (C) Fígado de animais tratados com DOX 15 mg/kg (D) Rins de animais tratados com Salina (E) Rins de animais tratados com SpHL-DOX 10 mg/kg (F) Rins de animais tratados com DOX 15 mg/kg (G) Coração de animais tratados com Salina (H) Coração de animais tratados com SpHL-DOX 10 mg/kg (I) Coração de animais tratados com DOX 10 mg/kg. As setas indicam áreas degenerativas hepáticas. Os asteriscos indicam glomerulos em esclerose. As cabeças de seta indicam áreas de degeneração hialina. Coloração de Hematoxilina & Eosina. Aumento de 400X.

TABELA 4

Descrição histológica das alterações cardíacas de animais tratados com Salina, DOX (10 e 15 mg/kg) e SpHL-DOX (10, 15 e 17,5 mg/kg). SAA: sem alterações aparentes.

Parâmetro	10 mg/kg			15 mg/kg		17,5 mg/kg
	Salina	DOX	SpHL	DOX	SpHL	SpHL
Tipo de Alteração	SAA	Degeneração Hialina	Degeneração Hialina	Degeneração Hialina	Degeneração Hialina	Degeneração Hialina
Extensão		Multifocal	Focal	Multifocal	Multifocal	Multifocal
Intensidade		Discreta	Muito Discreta	Moderada	Discreta	Discreta/Moderada

3.1.5 Eletrocardiograma

Observa-se na figura 4 a variação do intervalo QT e da onda T do ECG.

Observou-se prolongamento de mais de 35% do intervalo QT em relação ao período controle (Dia 0) já no primeiro dia após tratamento com 15 mg/kg de DOX, sendo que o prolongamento deste intervalo foi significativamente menor (4%) para os animais tratados com a mesma dose de SpHL-DOX (Figura 4A).

No 7º dia após o tratamento, não foi observada redução do intervalo QT nos animais que receberam DOX, porém, observou-se aumento significativo (16%) deste parâmetro nos animais que receberam SpHL-DOX. No entanto, este aumento permaneceu significativamente menor em relação aos animais tratados com DOX (Figura 4A).

As alterações na onda T foram proporcionais as alterações do intervalo QT (Figura 4B).

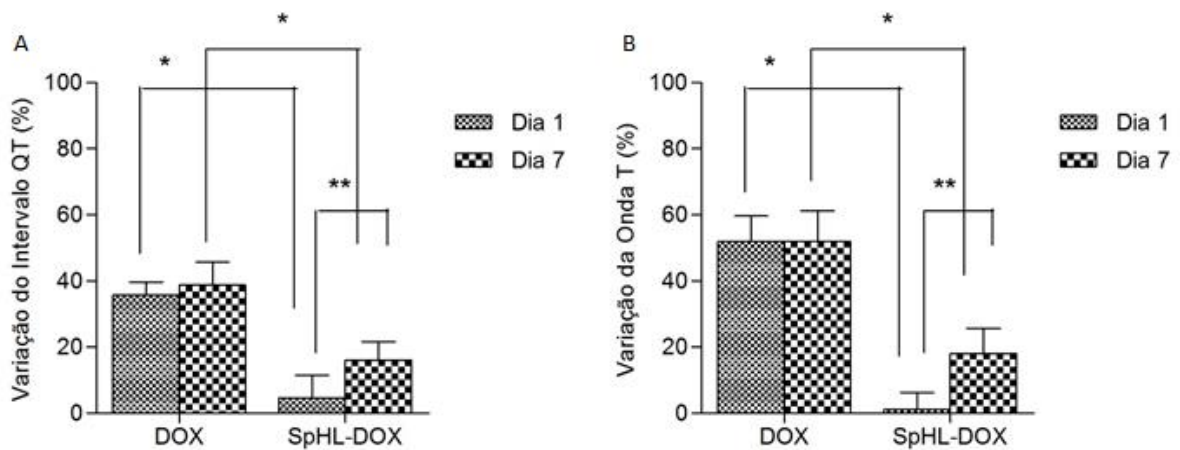


FIGURA 4 - Gráficos de variação de parâmetros eletrocardiográficos de camundongos BALB/c tratados com 15 mg/kg de DOX e SpHL-DOX. (A) Porcentagem de variação do intervalo QT. (B) Porcentagem de variação da onda T. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Representa diferença estatística entre DOX e SpHL-DOX. **Representa diferença estatística entre os dias 1 e 7.

3.2 TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS NÃO pH-SENSÍVEIS CONTENDO DOXORRUBICINA (nSpHL-DOX)

3.2.1 Caracterização Físico-Química de nSpHL-DOX

Foram obtidos lipossomas branco (nSpHL) com diâmetro médio e índice de polidispersão indicativos de amostras monodispersa e potencial zeta próximo da neutralidade, devido as moléculas de polietilenoglicol (PEG) na superfície do lipossoma. O processo de encapsulação da DOX não alterou os parâmetros físico-químicos da formulação (Tabela 5). Os lipossomas obtidos possuem características esperadas e adequadas para o uso intravenoso.

TABELA 5

Caracterização físico-química de SpHL e SpHL-DOX. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão (iP)	Potencial Zeta (mV)	Teor de Encapsulação (%)
nSpHL	132,4 \pm 4,3	0,019 \pm 0,020	-2,093 \pm 0,23	-
nSpHL-DOX	134,1 \pm 6,9	0,021 \pm 0,016	-2,031 \pm 0,41	90,5 \pm 6,9

3.2.2 Avaliação de Peso, Sinais Clínicos e Mortalidade dos Animais

Não foram observados sinais clínicos bem como perda de peso nos animais tratados com Salina ou nSpHL. Por esta razão, os dados relativos a análise ponderal de nSpHL não foram relatados graficamente.

Estão relatados na figura 5 os dados relativos a perda ponderal de animais tratados com 17,5 mg/kg de nSpHL-DOX. Houve perda de peso acentuada e irregular, observando-se, ao 11º dia de experimento, perda de peso superior a 20% do peso inicial, com recuperação ponderal discreta ao final dos 14 dias de experimento.

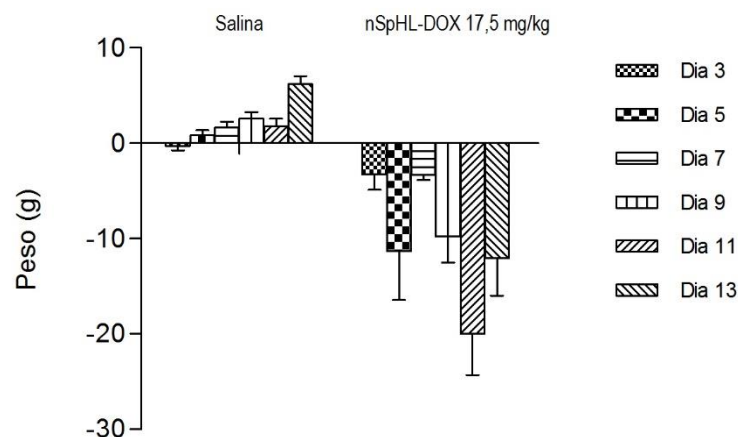


FIGURA 5 - Porcentagem de variação do peso de camundongos BALB/c tratados com Salina e nSpHL-DOX (17,5 mg/kg). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

Quanto aos sinais clínicos, observou-se piloereção de intensidade moderada a intensa durante todo o período de experimentação, observando-se ainda, ao 11º dia, animais moderadamente prostrados. O consumo de água e ração foi proporcional a variação ponderal.

3.2.3 Investigação Hematológica

Na análise do eritrograma observou-se diminuição significativa do número de hemácias e do hematócrito nos animais tratados com 17,5 mg/kg de nSpHL-DOX. Observou-se ainda leucopenia acentuada e significativa, caracterizada por linfopenia verdadeira também significativa (Tabela 6).

TABELA 6

Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com Salina e nSpHL-DOX (17,5 mg/kg). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. ^aRepresenta diferença significativa entre o grupo Salina e DOX ou SpHL-DOX ($p < 0,05$). ^bRepresenta diferença significativa entre DOX e SpHL-DOX na mesma dose ($p < 0,05$).

	Hemácias (mm ³ x 10 ⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Global de Leucócitos (mm ³ x 10 ³)	Neutrófilos (mm ³ x 10 ³)	Linfócitos (mm ³ x 10 ³)
Salina	9,5 \pm 2,2	12,3 \pm 1,0	37 \pm 1	8,4 \pm 2,1	1,5 \pm 1,0	4,8 \pm 0,3
nSpHL-DOX 17,5 mg/kg	7,6 \pm 0,6 ^a	9,8 \pm 0,8	33 \pm 2 ^a	1,9 \pm 0,6 ^a	0,6 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2 ^a

3.2.3 Invertigação Histopatológica

Observou-se alterações hepáticas, renais e cardíacas de características morfológicas semelhantes as encontradas para DOX e SpHL-DOX. Na análise da toxicidade hepática, foi observada degeneração perivascular hepática multifocal moderada a intensa. Quanto a toxicidade renal, foram observadas áreas focais de glomerulonefrite esclerosante de intensidade discreta e presença de acúmulo hialino

tubular de intensidade discreta a moderada. Em relação a cardiotoxicidade, observa-se comprometimento multifocal a difuso do coração, com multiplas áreas de degeneração hialina dos cardiomiócitos.

3.2.4 Eletrocardiograma

É apresentado na figura 6 a variação do intervalo QT e da onda T do ECG.

Observou-se prolongamento de aproximadamente 12% do intervalo QT em relação ao período controle (Dia 0) no primeiro dia após tratamento com 15 mg/kg de nSpHL-DOX sendo que o prolongamento deste intervalo foi significativamente menor em relação aos animais tratados com a mesma dose de DOX (Figura 6A).

No entanto, ao 7° dia após o tratamento, observou-se prolongamento do intervalo QT (51%) nos animais que receberam SpHL-DOX, sendo este aumento significativamente maior quando comparado aos animais tratados com DOX (Figura 6A).

As alterações na onda T foram proporcionais as alterações do intervalo QT (Figura 6B).

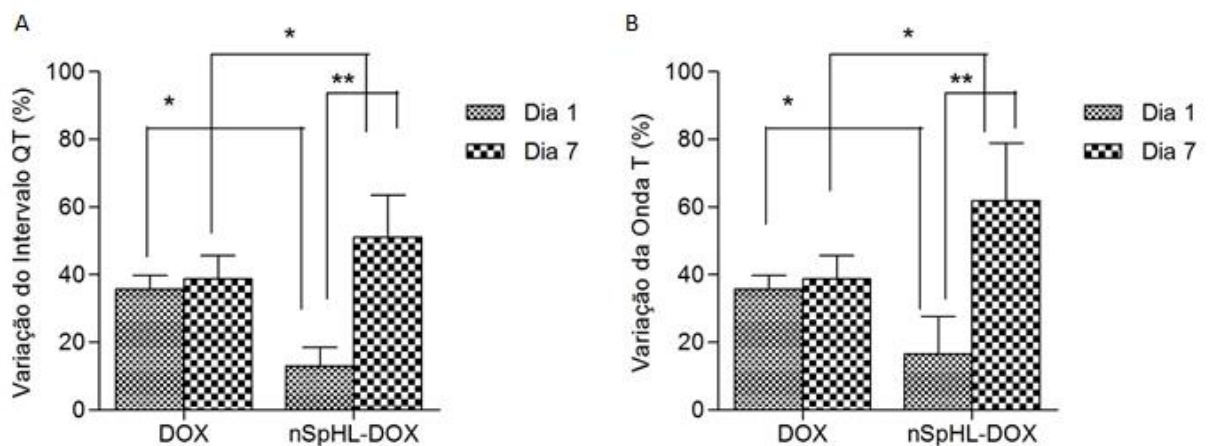


FIGURA 6 - Gráficos de variação de parâmetros eletrocardiográficos de camundongos Balb/c tratados com 15 mg/kg de DOX e nSpHL-DOX. (A) Porcentagem de variação do intervalo QT. (B) Porcentagem de variação da onda T. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

*Representa diferença estatística entre DOX e nSpHL-DOX. **Representa diferença estatística entre os dias 1 e 7.

4 DISCUSSÃO

Atualmente, o uso de nanoestruturas para o tratamento do câncer tem sido uma estratégia amplamente utilizada a fim de, principalmente, diminuir a toxicidade sistêmica de agentes citotóxicos (STEICHEN, CALDORERA-MOORE & PEPPAS, 2013; DAWIDCZYK *et al.*, 2014). Os lipossomas peguilados de DOX foram utilizados, pioneiramente, com este objetivo, sendo aprovados pela FDA para uso clínico em 1995 como estratégia para a diminuição da cardiotoxicidade intrínseca deste fármaco. No entanto, não foram observadas vantagens significativas quanto a atividade anti-tumoral (ALLEN & CULLIS, 2013; CHARROIS & ALLEN, 2003; OLSON *et al.*, 1982), justificando-se o estudo de novos nanossistemas com tecnologias que, potencialmente, aumentem a especificidade da DOX, aumentando assim sua atividade e reduzindo sua toxicidade. Os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada vem sendo estudados como uma importante ferramenta para aumentar a especificidade e diminuir a toxicidade de moléculas (LEITE *et al.*, 2011; MARONI *et al.* 2012; SOARES *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2013; CARLESSO *et al.*, 201).

No presente trabalho, o uso de SpHL-DOX reduziu significativamente a toxicidade sistêmica da DOX, quando comparado a sua forma livre. Observou-se diminuição da morbimortalidade dos animais, aumento da DMT e diminuição da toxicidade renal, hepática e cardíaca. Os sinais clínicos observados nos animais tratados com 17,5 mg/kg de DOX são compatíveis com efeitos relatados no uso de altas doses deste citotóxico (STORM *et al.*, 1989)

As lesões renais são um efeito adverso esperado em pacientes em uso de esquemas terapêuticos contendo DOX (REFAIE *et al.*, 2016; SU *et al.*, 2015). A diminuição da nefrotoxicidade nos animais tratados com SpHL-DOX foi caracterizada por diminuição da gravidade extensão das lesões escleróticas glomerulares e alterações tubulares renais e, além da preservação da

funcionalidade, refletida na manutenção dos níveis séricos de creatinina. A creatinina é um metabólito endógeno produzido a taxas constantes pelo organismo e filtrado livremente pelos glomérulos, sendo seu aumento na circulação sanguínea, um indicativo de lesão glomerular com diminuição da função renal (FRANK, 2010). Em lesões renais agudas ou em atividade observa-se aumento das concentrações séricas de ureia juntamente com o aumento dos níveis de creatinina. A ureia é um composto nitrogenado derivado do catabolismo hepático de aminoácidos, filtrados em até 60% pelos rins e seu aumento sérico pode ser resultante de mudanças na dieta, e alterações na função hepática e renal (FRANK, 2010). Este metabólito possui alta sensibilidade para detecção de perdas de função renal, pois se eleva precocemente em decorrência de lesões, retornando a níveis basais rapidamente após a diminuição da injúria. Neste estudo não foram observados aumentos nos níveis de ureia 14 dias após o tratamento com DOX ou SpHL-DOX em todas as doses, sendo este um indicativo de reversibilidade das lesões renais. O uso de formulações lipossomais é capaz de modificar a farmacocinética de fármacos, alterando assim as vias de eliminação e possíveis alvos de toxicidade. A encapsulação da DOX marcada com o radioisótopo tecnécio-99m em lipossomas pH-sensíveis modificou consideravelmente sua biodistribuição, sendo este detectado em menor extensão nos rins quando comparado a droga livre (FERNANDES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

Além da eliminação renal, a DOX é parcialmente eliminada por via hepatobiliar, sendo o fígado, um importante alvo de injúrias (SU *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). No presente estudo, animais tratados com SpHL-DOX ou DOX apresentaram lesões degenerativas hepáticas, no entanto, os animais tratados com DOX apresentaram lesões mais extensas e aumento significativo da concentração sérica de AST, um importante marcador de injúria hepática aguda e que pode indicar insuficiência cardíaca (KREFETZ & McMILLIN, 2010; RAZAVI-AZARKHIAVI, K. *et al.*, 2016), indicando menor toxicidade hepática de SpHL-DOX.

A cardiotoxicidade é o efeito adverso mais conhecido, grave e debilitante da DOX, se manifestando em grande parte dos pacientes que são tratados com este medicamento (VEJPONGSA & YEH, 2014). A injúria cardíaca relacionada a DOX é caracterizada por hialinização e vacuolização dos cardiomiócitos, sendo esta lesão responsável por prolongamento do intervalo QT no ECG e aumento dos níveis de

CK-MB em roedores (LIU *et al.*, 2016; RAZMARAI *et al.*, 2016; RAZAVI-AZARKHIAVI, K. *et al.*, 2016). No presente estudo, observou-se acentuado prolongamento do intervalo QT associado a lesões teciduais de maior extensão e gravidade e aumento dos níveis séricos de CK-MB (isoenzima liberada na circulação em casos de lesão cardíaca) em animais tratados com DOX, sendo estes parâmetros significativamente menores nos animais tratados com SpHL-DOX.

Em relação a toxicidade hematológica, a encapsulação da DOX em SpHL não foi capaz de alterar significativamente a série eritrocítica, causando apenas reticulocitose periférica discreta, exceto para os animais tratados com 17,5 mg/kg de DOX. O aumento do número de reticulócitos circulantes sugere processo regenerativo de injúrias a série vermelha, podendo-se inferir que a mielotoxicidade é reversível mesmo com a utilização de altas doses de fármaco. No entanto, foi observada leucopenia em todos os animais tratados com DOX ou SpHL-DOX. Este efeito adverso é característico e esperado de grande parte de agentes antineoplásicos, incluindo a DOX (CHABNER *et al.*, 2005).

Comparativamente, analisou-se a toxicidade sistêmica de lipossomas não pH-sensíveis contendo DOX (nSpHL-DOX). A DMT para esta formulação foi inferior a 17,5 mg/kg, devido a perda de peso superior a 15% observada nesses animais. Esta maior toxicidade foi confirmada pela acentuada leucopenia. Observou-se ainda, maior toxicidade cardíaca quando comparada a SpHL-DOX na mesma dose, caracterizada por extensas áreas de degeneração hialina e prolongamento do intervalo QT do ECG superior ao observado para a DOX sete dias após o tratamento.

Conclui-se neste estudo que a encapsulação da DOX em SpHL reduziu significativamente a toxicidade sistêmica deste agente antineoplásico, observando-se efeitos tóxicos cardíacos, hepáticos e renais significativamente menores para SpHL-DOX em todas as doses administradas sendo o uso destes lipossomas promissor para o tratamento de tumores. Os resultados obtidos sugerem que a composição dos SpHL-DOX contribuiu significativamente para a diminuição da toxicidade, visto que nSpHL-DOX apresentou acentuada toxicidade cardíaca, acompanhada por acentuada leucopenia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, p. 36-48, 2013.

BANGHAN, A. D.; STANDISH, M. M. & WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BARENHOLZ, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 117-134, 2012.

BARROS, A. L. B. *et al.* Long-Circulating, pH-Sensitive Liposomes versus Long-Circulating, Non-pH-Sensitive Liposomes as a Delivery System for Tumor Identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 9, p. 1-8, 2013.

BARROS, A. L. B. *et al.* Bombesin Encapsulated in Long-Circulating pH-Sensitive Liposomes as a Radiotracer for Breast Tumor Identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 11, p. 342-350, 2015.

CARLESSO, F. N. *et al.* Preliminary data of the antipancreatic tumor efficacy and toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposome containing cisplatin. **Nuclear Medicine Communications**. v. 37, n. 7, p. 727-734, 2016.

CARVALHO, M. G. & SILVA, M. B. S. . **Hematologia: Técnicas Laboratoriais e Interpretacao**. Belo Horizonte: Imprensa Universitaria, 1988. 139p .

CHABNER, B. N. *et al.* Antineoplásicos. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 1041.

CHARROIS, G. J. R. & ALLEN, T. M. Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: Influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1609, p. 102-108, 2003.

DAMIANI, R. M. *et al.* Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Archives in Toxicology*. *in press*, 2016.

DAWIDCZYK, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**. v. 187, p. 133-144, 2014.

EL-MOSELHY, M. A. & EL-SHEIKH, A. A. Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 68, n. 1, p. 101-110, 2013.

FERNANDES, R. S. *et al.* Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**. v. 37, n. 37, p. 307-312, 2016.

FRANK, E. L. Compostos nitrogenados não-proteicos. In: BISHOP, M. L., FODY, E. P. & SCHOEFF, L. **Química Clínica: princípios, procedimentos e correlações**. 5. Ed. Barueri: Manole, 2010. p. 237.

GABIZON, A. *et al.* Dose Dependency of Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy of Pegylated Liposomal Doxorubicin (DOXIL) in Murine Models. **Journal of Drug Targeting**. v. 10, n. 7, p. 539-548, 2002.

KAMENDI, H. *et al.* Doxorubicin: Comparison between 3-h continuous and bolus intravenous administration paradigms on cardio-renal axis, mitochondrial sphingolipids and pathology. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 15, v. 289, p. 560-572, 2015.

KREFETZ, R. G & McMILLIN, G. A. Enzima. In: BISHOP, M. L., FODY, E. P. & SCHOEFF, L. **Química Clínica: princípios, procedimentos e correlações**. 5. Ed. Barueri: Manole, 2010. p. 255.

LEITE, E. A. *et al.* Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 8, p. 1-11, 2011.

LIU, G. *et al.* Spironolactone Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. **Cardiovascular Therapy**. v. 34, n. 4, p. 216-224, 2016.

MARONI, L. C. *et al.* Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**. v. 237, p. 973–984, 2012.

OCTAVIA, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 52, p. 1213-1225, 2012.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – acute toxic class method**. 2001. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 10/06/2016.

OLIVEIRA, M. C. *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. **Biochimica et Biophysica Acta**. v., 1372, p. 301-310, 1998.

OLSON, F. *et al.* Characterization, Toxicity and Therapeutic Efficacy of Adriamycin Encapsulated in Liposome. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**. v. 16, n. 2, p. 167-176, 1982.

RAZAVI-AZARKHIAVI, K. *et al.* The Comparison of Biodistribution, Efficacy and Toxicity of Two PEGylated Liposomal Doxorubicin Formulations in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma: a Preclinical Study. **Drug Research**. v. 66, n. 6, p. 330-336, 2016.

RAZMARAI, N. D. V. M. *et al.* Cardioprotective Effect of Phenytoin on Doxorubicin-induced Cardiac Toxicity in a Rat Model. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 67, n. 3, p. 238-245, 2016.

REFAIE, M. M. M. *et al.* Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Journal of Toxicology**. v. 2016, pp. 9, 2016.

SILVA, J. O. *et al.* pH-Sensitive, Long-Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: a Feasibility Animal Study. **Molecular Imaging and Biology**. 2016, *in press*.

SOARES, D. C. F. *et al.* Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing ¹⁵⁹Gd-DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, p. 58–64, 2012.

SPALLAROSSA, P. *et al.* A recommended practical approach to the management of anthracycline-based chemotherapy cardiotoxicity: an opinion paper of the working group on drug cardiotoxicity and cardioprotection, Italian Society of Cardiology. **Journal of Cardiovascular Medicine**. v. 17, p. 84-92, 2016.

STEICHEN, S. D., CALDORERA-MOORE, M & PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 48, p. 416-427, 2013.

STORM, G. *et al.* A comparative study on the antitumor effect, cardiotoxicity and nephrotoxicity of doxorubicin given as a bolus, continuous infusion or entrapped in liposomes in the Lou/M Wsl rat. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 24, p. 341-348, 1989.

SU, Z. *et al.* Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. **Scientific Reports**. v. 14, n. 5, p. 1-14, 2015.

VASSILEVA, V. *et al.* Novel biocompatible intraperitoneal drug delivery system increases tolerability and therapeutic efficacy of paclitaxel in a human ovarian cancer xenograft model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 60, p. 907-914, 2007.

VEJPONGSA, P. & YEH, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities, **Journal of the American College of Cardiology**. v. 64, n. 9, 2014.

WOJTACKI, J.; LEWICKA-NOWAK, E. & LESNIEWSKI-KMAK, K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention - review of the literature. **Medical Science Monitor**. v. 6, n. 2, p. 411-420, 2000.

WORKING, P. K. *et al.* Pharmacokinetics, Biodistribution and Therapeutic Efficacy of Doxorubicin Encapsulated in Stealth Liposomes (Doxil). **Journal of Liposome Research**. v. 4, n. 1, p. 667-687, 1994.

ZHANG, C. *et al.* Quantification of DOX bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n. 1, p. 55-61, 2015.

ZHANG, S. *et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**. v. 18, n. 11, p. 1639-1645, 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

Pode-se concluir com este trabalho que lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina (SpHL-DOX) acumulam-se de forma mais efetiva na região tumoral, sendo a pH-sensibilidade um fator essencial para o aumento deste acúmulo. A encapsulação da doxorubicina em lipossomas pH-sensíveis contribuiu de forma efetiva para diminuição a toxicidade sistêmica da DOX devido a diminuição significativa da toxicidade hepática, renal e cardíaca. Estes fatores sugerem que SpHL-DOX são ferramentas inovadoras promissoras para o *delivery* de DOX no tratamento do câncer.

PERSPECTIVAS

- Caracterização das formulações (SpHL-DOX e nSpHL-DOX) pelas técnicas de AF4 e microscopia eletrônica de transmissão;
- Estudo de internalização intracelular *in vitro*;
- Estudo da pH-sensibilidade em cultura de células;
- Determinação das vias de morte celular ativadas por SpHL-DOX.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 302 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Desenvolvimento, estudo farmacocinético e estudos de toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina”, que tem como responsável André Luís Branco de Barros, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/12/2014. Este certificado espira-se em 02/12/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 302 / 2014, related to the Project entitled “Development, pharmacokinetic studies, toxicologic studies of long-circulating and pH-sensitive liposomes loading doxorubicin”, under the supervision of André Luis Branco de Barros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/12/2014. This certificate expires in 02/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 02/12/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br