

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENATA SALGADO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CARREGADOS COM
DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EM MODELO
EXPERIMENTAL**

BELO HORIZONTE – MG

2016

RENATA SALGADO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CARREGADOS COM
DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Belo Horizonte – MG

2016



FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da biodistribuição e atividade antitumoral de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com doxorubicina e ácido docosahexaenoico em modelo experimental

RENATA SALGADO FERNANDES

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

Aprovada em 17 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Diego dos Santos Ferreira

Dr. Diego dos Santos Ferreira
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL

Mônica Cristina de Oliveira

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira
UFMG

André Luis Branco de Barros

Prof. Dr. André Luis Branco de Barros
UFMG

Lucas A.M. Ferreira

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira
UFMG

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2016.

COLABORADORES

Dr. Samuel Vidal Mussi – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Dra. Sávila Caldeira de Araújo Lopes – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Prof. Elaine Amaral Leite – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Laurita Soares Zica – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Mestranda Juliana de Oliveira Silva - Laboratório de Radioisótopos – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG

Prof. Valbert Nascimento Cardoso - Laboratório de Radioisótopos – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Prof. Geovanni Dantas Cassali – Laboratório de Patologia Comparada – Departamento de Patologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mara e Franz, por todo amor, dedicação e apoio incondicional. Por estarem sempre presentes, acreditarem em mim e darem suporte às minhas escolhas.

Ao meu irmão Rodrigo, pelo companheirismo e a amizade, por estar sempre comigo.

Ao prof. Lucas por ter me recebido tão bem no seu laboratório, pela confiança, por estar sempre presente, pela atenção e por todos os ensinamentos transmitidos. Pelo exemplo profissional, que contribuiu muito para a minha formação.

Ao André por ter sido, e ser, tão presente na minha vida. Por todas as orientações, por toda a paciência, confiança e ensinamentos, por toda a competência profissional e por ser o exemplo que eu quero seguir.

Às “Andrezetes” – Ju, Pequena, Lizi e Carol – pela amizade, convivência, ajudas e colaborações, pelas reclamações diárias e apoio, pelos momentos alegres e pelas dificuldades que passamos juntas. Um agradecimento especial à Ju, por ter sido parte fundamental nesse trabalho.

Ao Diego, pela presença mesmo com a distância física, por todas as conversas científicas pelo whatsapp e por todas as não científicas também.

Ao Samuel pela oportunidade e confiança em continuar o seu trabalho

À Laurita por ser sempre tão prestativa e pela oportunidade de poder passar meu conhecimento.

À prof^a Elaine por toda disponibilidade e contribuições, especialmente na análise estatística dos resultados.

Aos profs. Mônica, Gilson e Valbert pela convivência, excelentes aulas, pelo incentivo e por toda contribuição científica.

Ao prof. Geovanni pela gentileza em disponibilizar o Laboratório de Patologia Comparada para a realização das análises histológicas e pela atenção dispensada na análise dos resultados.

Ao Vanderli, por toda a dedicação ao laboratório, por ser sempre tão prestativo e solidário.

À Adelaide e ao Batista por todo o auxílio com os experimentos em animais.

A todos do LTF - Ana, Sávia, Aina, Marina, Mariana, Délia, Gabriel, Marjorie, Livia, Fernanda, Flávia, Mayara, Marcela, Lucas – pela receptividade e convivência diária.

A todos do laboratório de Radioisótopos – Leo, Isabella, Livia, Patrícia, Maria Emília, Raquel, Sued, Fernanda – pela convivência, que já são de anos, pelas conversas, cafés e momentos compartilhados.

Aos meus amigos da faculdade e da vida – Laylla, Marcella, Dé, Yuri, Mini, Alex, Fabi, Roberta, Gabriel, Denyr, Flávia, Luiz - por ouvirem minhas reclamações, pelo apoio, por todos os encontros nos fins de semana, por todas as gordices, que, com certeza, tornaram essa caminhada mais leve.

A todos que de alguma forma foram importantes para a minha chegada até aqui!

“Se procurar bem, você acaba encontrando
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de tumor mais frequente entre as mulheres, representando cerca de 20% dos novos casos relatados anualmente. As taxas de mortalidade também são elevadas, podendo chegar a 19 mortes por 100 mil mulheres. Dentre os fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama, destaca-se a doxorrubicina. No entanto, a elevada toxicidade, notadamente a cardiotoxicidade, e a baixa penetração em tumores sólidos são as principais limitações do seu uso. Por isso, a utilização da terapia combinada e sistemas carreadores de fármacos constituem alternativas inovadoras para elevar o índice terapêutico, reduzir a toxicidade, e, conseqüentemente, aumentar a eficácia do fármaco. Ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido docosahexaenoico (DHA), têm um papel importante na inibição e prevenção de cânceres. Nesse contexto, a combinação da doxorrubicina com o DHA, constitui uma alternativa para potencializar a eficácia antitumoral. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são uma alternativa interessante para a entrega de fármacos, uma vez que os tumores apresentam fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular aumentados, que permitem o extravasamento dessas estruturas para a região tumoral. Para o desenvolvimento de um novo medicamento, estudos farmacocinéticos e de biodistribuição são essenciais. O uso de isótopos radioativos tem se mostrado promissores neste contexto. Essa técnica apresenta alta sensibilidade, é um método de mais fácil acompanhamento e é possível a aquisição de imagens quantitativas. O tecnécio-99m é o principal radionuclídeo utilizado para obtenção de imagens cintilográficas, devido as suas propriedades físicas e químicas ideais para um radiofármaco. Nesse trabalho, realizou-se a marcação de CLN, carregados com doxorrubicina e DHA, com átomos de tecnécio-99m, para posterior avaliação do perfil farmacocinético e biodistribuição. Além disso, foi avaliada a atividade antitumoral dos CLN, carregados com doxorrubicina e DHA, em modelo experimental de tumor de mama murino. Os resultados mostraram aumento do tempo de meia vida e área sob a curva para os CLN radiomarcados, quando comparado ao fármaco livre. Os estudos de biodistribuição mostraram acúmulo hepático para os CLN, além de maior acúmulo na região tumoral, quando comparado ao músculo contralateral. As razões alvo/não alvo demonstraram maior afinidade dos CLN pela região tumoral, principalmente em tempos mais longos, em

comparação à doxorrubicina livre. A formulação foi capaz de inibir o crescimento do tumor primário em 90%. A avaliação da variação do peso dos animais, a análise da sobrevida, bem como a avaliação da histologia renal e cardíaca, demonstraram que esse sistema apresenta menor toxicidade sistêmica que o fármaco livre. Dessa forma, a formulação CLN carregada com doxorrubicina e DHA constitui em uma alternativa promissora para o tratamento combinado de câncer de mama.

Palavras- chave: carreadores lipídicos nanoestruturados, doxorrubicina, ácido docosahexaenoico, tumor, câncer de mama, tecnécio-99m.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of tumor in women, representing about 20% of the new annual cases. The mortality rate is also high, reaching 19 deaths per 100 thousand women. Doxorubicin is one of the most widely used chemotherapeutic agent in the treatment of breast cancer. However, high toxicity, especially cardiotoxicity, and low penetration into solid tumors are the mainly limitations for its use. Therefore, combined therapy and nanoscaled drug delivery systems, such as nanostructured lipid carriers (NLC), are innovative options for improving the therapeutic index, decreasing systemic toxicity, and, thereby, increasing the effectiveness of the drug. Polyunsaturated fatty acids, such as docosahexanoic acid (DHA), play an important role in cancer inhibition and prevention. In this context, combining both, doxorubicin and DHA, into a single nanoparticle might be a promising alternative to increase the antitumor efficacy. As the blood flow is increased in the tumor and the vasculature is more permeable, NLC can be useful to passively deliver the drug inside the tumor site. For the development of a new medicine, pharmacokinetics and biodistribution studies are fundamental. The use of radioactive isotopes are an interesting technique for this purpose, due to high sensibility and possibility to acquire quantitative images. Technetium-99m (^{99m}Tc) is the most common radionuclide used for scintigraphic imaging, due to its physical and chemical properties suitable for a radiopharmaceutical. In this work, the NLC, loaded with doxorubicin and DHA, were labeled with ^{99m}Tc , in order to evaluate pharmacokinetics and biodistribution profile. In addition, the antitumoral activity was performed in an experimental model of murine breast cancer. The results showed an increase in blood circulation time and area under the curve for the radiolabeled NLC when compared to free drug. In biodistribution studies it was observed high uptake in the liver and spleen. Besides, tumor showed higher uptake compared to non-targeted tissues, i.e. muscle. Target-non target ratios showed that the formulation has higher affinity for tumor region than free doxorubicin. The NLC was able to inhibit primary tumor growth by 90%. The evaluation of animals weight variation, the survival analysis and renal and heart histology demonstrated that this system has less systemic toxicity than free drug. Thus, the NLC formulation loaded with doxorubicin and DHA constitutes a promising alternative to the combined treatment of breast cancer.

Key-words: nanostructured lipid carrier, doxorubicin, docosaheanoic acid, tumor, breast cancer, technetium-99m.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese.....	24
Figura 2. Representação esquemática do sistema vascular. A – Tecido normal B – Tumor sólido	26
Figura 3. Fórmula estrutural da doxorubicina	29
Figura 4. Fórmula estrutural do DHA (C22).....	32
Figura 5. Acúmulo espontâneo de nanopartículas na região tumoral pelo efeito EPR.....	33
Figura 6. Representação esquemática dos diferentes tipos de nanocarreadores	34
Figura 7. Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos, (A) nanoemulsões e (B) NLS.....	36
Figura 8. Representação esquemática das diferentes estruturas de (A) NLS (B) CLN.....	37
Figura 9. Representação esquemática da preparação dos CLN pelo método de homogeneização a quente com ultrassom	48
Figura 10. Esquema de um CLN carregado com doxorubicina como par iônico com ácido oleico e DHA como lipídio líquido.....	56
Figura 11. Curva da pureza radioquímica em função do tempo para o complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em salina e em plasma de camundongo.....	58
Figura 12. Curva da pureza radioquímica em função do tempo para o complexo ^{99m}Tc -DOX em salina e em plasma de camundongo.....	59
Figura 13. Curva da depuração sanguínea para os complexos ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e ^{99m}Tc -DOX em animais BALB/c.....	60
Figura 14. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -DOX em camundongos BALB/c sadios.....	64
Figura 15. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em camundongos BALB/c sadios.....	64
Figura 16. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -DOX, após administração intravenosa, em animais BALB/c acometidos pelo tumor 4T1	65

LISTA DE FIGURAS (CONTINUAÇÃO)

Figura 17. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX, após administração intravenosa, em animais BALB/c acometidos pelo tumor de mama murino 4T1.....	65
Figura 18. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em camundongos BALB/c com tumor 4T1.....	66
Figura 19. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -DOX em camundongos BALB/c com tumor 4T1.....	67
Figura 20. Relações tumor/músculo (A) e tumor/sangue (B) para os complexos radiomarcados 1, 4, 8 e 24h após a administração.....	68
Figura 21. Relações alvo/não alvo, obtidas através da quantificação das imagens cintilográficas 1, 4 e 8 horas após a administração dos complexos radiomarcados	69
Figura 22. Esquema representativo do protocolo experimental para o estudo de atividade antitumoral	77
Figura 23. Variação do volume tumoral em função do tempo, para CLN-branca, DOX, CLN-DOX e CLN-DHA-DOX, administrados em camundongos BALB/c portadores do tumor 4T1	80
Figura 24. Variação do peso dos animais em função do tempo para CLN-branca, DOX, CLN-DOX e CLN-DHA-DOX	85
Figura 25. Variação do peso dos animais em relação ao primeiro e último dia de experimento para CLN-branca, CLN-DHA-DOX, CLN-DOX e DOX.....	86
Figura 26. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c tratados com CLN-branca, doxorubicina livre e CLN-DHA-DOX, na dose de 4,0 mg/kg	86
Figura 27. Fotomicrografia dos tumores dos animais tratados com (A – B) CLN-branca; (C – D) DOX; (E – F) CLN-DHA-DOX; (G – H) CLN-DOX	88
Figura 28. Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongos tratados com (A) CLN-branca, (B) CLN-DOX e (C) CLN-DHA-DOX	89
Figura 29. Fotomicrografias de tecido renal de animais tratados com (A) CLN-branca e (B) CLN-DHA-DOX. Coloração com hematoxilina-eosina, aumento original de 40x	91
Figura 30. Fotomicrografia de tecido cardíaco de animais tratados com (A) CLN-branca, (B) DOX, (C) CLN-DOX, (D) CLN-DHA-DOX.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos CLN.....	48
Tabela 2. Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação da formulação CLN-DHA-DOX.....	55
Tabela 3. Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX.....	57
Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos para ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e ^{99m}Tc -DOX	60
Tabela 5. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em animais sadios 1, 4 e 8h após a administração.....	62
Tabela 6. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -DOX em animais sadios 1, 4 e 8h após a administração.....	62
Tabela 7. Valores de diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação das formulações CLN-branca, CLN-DHA-DOX e CLN-DOX	79
Tabela 8. Análise de regressão da atividade antitumoral.....	81
Tabela 9. Valores de Volume Relativo Tumoral (VRT) e Inibição do Crescimento (IC) dos grupos em função do tratamento	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
μ	Micro
^{99m} Tc	Tecnécio-99m
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
d.p	Desvio padrão
DHA	Ácido docosahexaenoico
<i>DMEN</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DOX	Doxorrubicina
EE	Teor de encapsulação
<i>EPR</i>	<i>Efeito de permeabilidade e retenção aumentada</i>
eV	Elétrons-volt
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
gpP	Glicoproteína P
IC	Índice de inibição de crescimento
IP	Índice de polidispersividade
MeOH	Metanol
NE	Nanoemulsão
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetros
NPL	Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato salina
PEG	Poli(etil)enoglicol
r	Coefficiente de determinação
ROI	Região de interesse
ROS	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (CONTINUAÇÃO)

SC	Sub-cutânea
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
<i>SPECT</i>	<i>Tomografia por emissão de fóton único</i>
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
THF	Tetrahidrofurano
UV-VIS	Ultravioleta-visível
VRT	Volume relativo tumoral
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1. CÂNCER.....	23
1.1. CÂNCER DE MAMA	26
1.2. QUIMIOTERAPIA.....	27
2. DOXORRUBICINA.....	28
2.1. DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO.....	32
3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA TERAPIA DO CÂNCER	33
3.1. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS.....	36
4. NANOPARTÍCULAS RADIOMARCADAS.....	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6. OBJETIVO GERAL.....	43

CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DE CLN CARREGADOS COM DOXORRUBICINA E DHA

1. INTRODUÇÃO.....	45
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. MATERIAL.....	47
3.2. MÉTODOS.....	47
3.2.1. Preparo dos CLN	47
3.2.2. Caracterização da formulação.....	48
3.2.3. Formação do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$	50
3.2.4. Formação do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$	50
3.2.5. Quantificação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$	50
3.2.6. Quantificação de $^{99m}\text{TcO}_2$ e purificação dos complexos formados.....	51

3.2.7.	Eficiência da marcação	51
3.2.8.	Caracterização do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$	51
3.2.10.	Depuração plasmática em animais sadios	52
3.2.11.	Biodistribuição dos complexos em animais sadios	52
3.2.12.	Imagens cintilográficas dos complexos em animais sadios	53
3.2.13.	Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos	53
3.2.14.	Biodistribuição dos complexos em animais acometidos pelo tumor ...	53
3.2.15.	Imagens cintilográficas dos complexos em animais acometidos pelo tumor.....	54
3.2.16.	Análise estatística	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1.	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLN	55
4.2.	PUREZA RADIOQUÍMICA E ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$	56
4.3.	PUREZA RADIOQUÍMICA E ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA $^{99m}\text{Tc-DOX}$...	58
4.4.	DEPURAÇÃO PLASMÁTICA EM ANIMAIS SADIOS	60
4.5.	ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS SADIOS	61
4.6.	ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS COM TUMOR DE MAMA MURINO 4T1	64
5.	CONCLUSÕES.....	71

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CLN CARREGADOS COM DOXORRUBICINA E DHA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER DE MAMA

1.	INTRODUÇÃO.....	73
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
3.	MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1.	MATERIAL.....	75

3.2. MÉTODOS.....	75
3.2.1. Preparo das formulações e solução de doxorubicina	75
3.2.2. Caracterização das formulações	75
3.2.3. Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos	76
3.2.4. Tratamento.....	76
3.2.5. Volume Tumoral.....	77
3.2.6. Avaliação histopatológica dos órgãos	78
3.2.7. Análise estatística	78
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	79
4.2. VOLUME TUMORAL.....	79
4.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	87
5. CONCLUSÕES.....	95
CONCLUSÕES GERAIS.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS	110
ANEXO 1	111
ANEXO 2	112
APÊNDICE	113

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de tumor mais frequente entre as mulheres, representando cerca de 20 % dos novos casos relatados anualmente. Essa doença apresenta elevada incidência em todo o mundo, acometendo mulheres em regiões desenvolvidas, bem como aquelas de países em desenvolvimento. Devido a essa elevada morbidade, as taxas de mortalidade para o câncer de mama ainda são bastante altas podendo chegar a 19 mortes por 100 mil mulheres, dependendo da região analisada (BOYLE & LEVIN, 2008).

Dentre os agentes antineoplásicos, a doxorrubicina, da classe das antraciclina, é utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, isoladamente ou em combinação com outros fármacos. Entretanto, esse fármaco apresenta baixo índice terapêutico, o que pode limitar seu uso devido à mielossupressão e cardiotoxicidade. Além disso, a baixa penetração e a distribuição limitada em tumores sólidos são as principais causas de ineficiência no tratamento antitumoral com a doxorrubicina (TREDAN *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009). Por isso, sistemas carreadores de fármacos como lipossomas, sistemas poliméricos e nanopartículas lipídicas sólidas constituem alternativas inovadoras para elevar o índice terapêutico, reduzir a toxicidade, e, conseqüentemente, aumentar a eficácia do fármaco (MAMOT *et al.*, 2003).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) surgem como uma estratégia interessante para a entrega de fármacos devido aos benefícios e vantagens frente às outras plataformas disponíveis, tais como fácil escalonamento, ausência de solventes orgânicos em sua composição, além da baixa toxicidade (MÜLLER *et al.*, 2000; MEHNERT e MADER, 2001; WISSING *et al.*, 2004; BRIOSCHI *et al.* 2007). Recentemente, MUSSI e colaboradores mostraram que CLN carregados com doxorrubicina e triglicerídeos do óleo de peixe apresentaram atividade citotóxica maior, em modelo de tumor tridimensional, tanto para aquela observada para o fármaco livre quanto para uma formulação lipossomal (MUSSI *et al.*, 2014).

Para o desenvolvimento de um novo medicamento, estudos farmacocinéticos e de biodistribuição são essenciais. O uso de isótopos radioativos tem se mostrado promissor neste contexto. Esta técnica apresenta alta sensibilidade, é

um método de mais fácil acompanhamento e é possível a aquisição de imagens quantitativas (de BARROS *et al.*, 2012). O tecnécio-99m é o principal radionuclídeo utilizado para obtenção de imagens cintilográficas, devido as suas propriedades físicas e químicas ideais para um radiofármaco (MARQUES *et al.*, 2001).

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de marcação, pelo tecnécio-99m, para os CLN e para a doxorrubicina livre, com o intuito de comparar parâmetros farmacocinéticos, biodistribuição e imagens cintilográficas entre o fármaco livre e encapsulado. Além disso, a atividade antitumoral do CLN carregado com doxorrubicina e do fármaco livre foi avaliada contra o tumor de mama murino (4T1) em camundongos BALB/c.

REVISÃO DA LITERATURA

1. CÂNCER

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em 2012, foram relatados 14,1 milhões de novos casos e 8,6 milhões de pessoas morreram em todo o mundo. Os tipos mais frequentes e de maior mortalidade são os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama (WHO, 2013). No Brasil, são esperados aproximadamente 600 mil novos casos para 2016, sendo 61 mil novos casos de câncer de próstata e 58 mil novos casos de câncer de mama. (INCA, 2015). A projeção é que as mortes por câncer, no mundo, continuem a aumentar, com estimativa de 13,1 milhões de mortes em 2030 (FERLAY, 2010).

O termo neoplasia ou tumor indica uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é descontrolado e ultrapassa o do tecido normal, persistindo da mesma maneira excessiva após o término dos estímulos que provocaram a alteração (ROBBINS; COTRAN, 2006). Um tumor pode ser classificado como benigno ou maligno. Tumores benignos geralmente têm crescimento lento e bem delimitado e reproduzem o aspecto do tecido de origem. Os malignos, também denominado cânceres, têm crescimento rápido, delimitação imprecisa, apresentam características distintas do tecido de origem e, frequentemente, se disseminam para locais distantes (metástases) causando, muitas vezes, a morte do paciente (INCA, 2013).

O surgimento do câncer se dá quando células normais perdem seus mecanismos regulatórios que controlam a multiplicação e diferenciação celular (PATRICK *et al.*, 2005). Normalmente, o desenvolvimento de um tecido é regulado pelo equilíbrio entre células em estado de proliferação e células em repouso. A perda dessa regulação é determinante para o desenvolvimento do câncer. Durante o crescimento da massa tumoral, grande parte das células tumorais encontra-se na fase S do ciclo celular e, portanto, em alta atividade metabólica (BELKACÉMI *et al.*, 2007).

A carcinogênese (Figura 1) pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas ou epigenéticas nas células, que gera

modificações nas suas funções ocasionando alterações nas propriedades de membrana, nas interações célula-célula e no metabolismo celular, propiciando a formação de tumores (PAUWELS *et al.*, 1998)



Figura 1. Etapas da carcinogênese (INCA, 2013)

Os genes envolvidos na formação dos cânceres normalmente apresentam funções relacionadas ao controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Duas classes de genes tem maior função na carcinogênese: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os primeiros influenciam na divisão e crescimento celular, enquanto os segundos podem inibir essa proliferação (PAUWELS *et al.*, 1998). No entanto, ainda não se sabe quais mudanças carcinogênicas são limitantes na manutenção ou na progressão de lesões pré-neoplásicas. Essas mudanças são distintas para cada tipo de tecido ou cada agente carcinogênico (DRAGNEV *et al.*, 2000).

Os tumores sólidos são estruturas semelhantes a órgãos, porém heterogêneos e complexos estruturalmente. Englobam células cancerosas e do estroma (fibroblastos e células inflamatórias), que estão embutidas numa matriz extracelular, e são nutridas por uma rede vascular. A predominância de cada um destes componentes pode variar de um local para outro no mesmo tumor (TRÉDAN *et al.*, 2007).

Tumores com diâmetro inferior a 1-2 mm recebem nutrientes dos vasos sanguíneos por difusão passiva. À medida que a massa de células neoplásicas atinge diâmetro superior, esse tipo de suprimento já não é mais efetivo, sendo necessária a formação de novos vasos para a completa nutrição. A neovascularização ocorre a partir dos vasos pré-existentes e/ou de células tronco endoteliais circulantes. Esse processo, fundamental para o crescimento tumoral e metástase, é denominado angiogênese (CHUA *et al.*, 2010; JUN *et al.*, 2010; VIREY *et al.*, 2008).

No entanto, os vasos sanguíneos tumorais são estrutural e funcionalmente diferentes. Em comparação com vasos sanguíneos normais, a vasculatura tumoral é altamente desorganizada, os vasos são tortuosos e dilatados, com diâmetro desigual e ramificações e desvios excessivos (Figura 2). Conseqüentemente, o fluxo sanguíneo é variável, o que leva à hipóxia em regiões do tumor. Adicionalmente, devido ao grande número de células, a alta pressão no interior de um tumor sólido gera um stress mecânico suficiente para colapsar os vasos linfáticos, prejudicando a eliminação de macromoléculas do interstício (LEU *et al.*, 2000; MAEDA *et al.*, 2000; CARMELIET & JAIN, 2000).

Em termos de estrutura, os vasos tumorais apresentam inúmeras “aberturas” (fenestrações endoteliais, vesículas e aberturas transcelulares), junções interendoteliais alargadas e membrana basal descontínua ou ausente, o que leva a formação de poros que variam de 100 a 800 nm, permitindo a penetração de macromoléculas no interstício. Além disso, as células endoteliais apresentam tamanho e forma atípicas, crescem por cima uma das outras e se projetam para o lúmen (YUAN *et al.*, 1995; CARMELIET & JAIN, 2000; MAEDA *et al.*, 2000; MUNN *et al.*, 2003; GOSH *et al.*, 2008; TORCHILIN, 2011). Esses fatores justificam a hiperpermeabilidade apresentada pelos vasos tumorais, que pode ser relevante na quimioterapia.

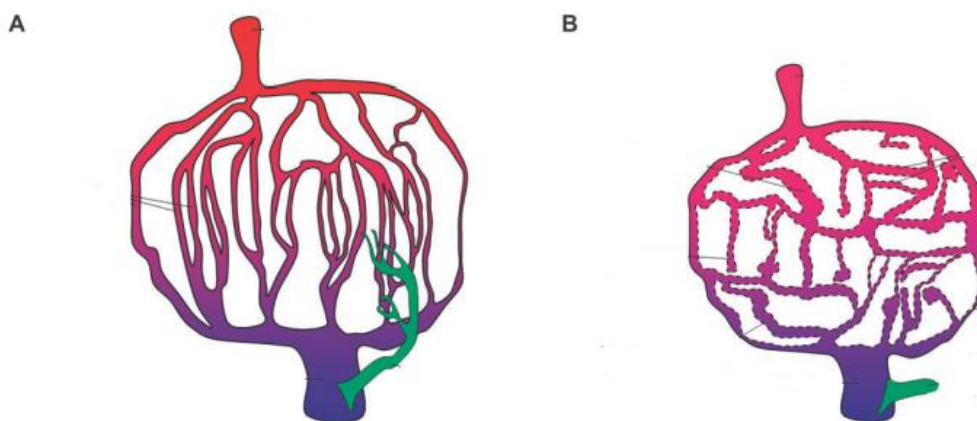


Figura 2. Representação esquemática do sistema vascular. A – Tecido normal B – Tumor sólido. (Adaptado de TRÉDAN,2007).

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama, uma doença do epitélio mamário, pode acometer tanto homens como mulheres, porém na população feminina apresenta elevada importância devido a sua alta incidência. É o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, respondendo por 23% dos casos novos a cada ano. Se diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico é relativamente bom. Porém, no Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2014).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença já são conhecidos, como histórico familiar, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, alta densidade do tecido mamário, além de fatores reprodutivos e hormonais. No entanto, a idade continua sendo o fator preponderante no surgimento de novos casos de câncer de mama. Em linhas gerais, as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos de idade, no entanto, em mulheres mais velhas esse aumento é menos pronunciado. Este fato reforça a hipótese de participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (INCA, 2014; AMIR *et al.*, 2010).

O câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada por uma grande variação na apresentação clínica, na agressividade e na resposta ao

tratamento. Essa variedade conduz a identificação de subtipos desse tumor com comportamentos biológicos potencialmente diferentes (LEE *et al.*, 2010).

Os métodos rotineiramente utilizados para a identificação de possíveis focos de tumores de mama são o auto-exame, exame clínico e a mamografia (INCA, 2014). Pacientes com carcinoma mamário são avaliadas quanto ao tamanho do tumor e extensão da propagação dentro da mama (T), ao grau de disseminação para os gânglios linfáticos (N), e a presença ou ausência de metástases distantes (M). Com base nas informações de TNM, as opções de tratamento são consideradas. Podem ser realizadas cirurgias, terapias adjuvantes de radiação, quimioterapia e terapia hormonal (HOWLADER *et al.*, 2014).

1.2. QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia permanece como uma das maiores alternativas terapêuticas na oncologia e é usada para tratamento primário, terapia adjuvante e/ou paliativa. Apresenta ainda um benefício particular na doença disseminada que é, normalmente, difícil de ser tratada com radiação e cirurgia. Nos últimos 50 anos, numerosos avanços nas propriedades dos agentes quimioterápicos têm sido alcançados, permitindo o surgimento de novos agentes terapêuticos (MELLOR & CALLAGHAN, 2008).

O grande desafio no desenvolvimento de fármacos antitumorais não reside na capacidade desses agentes em destruir as células neoplásicas, mas sim na dificuldade de conferir seletividade a esses fármacos a fim de produzir alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras. Muitos dos agentes quimioterápicos usados têm índices terapêuticos baixos e janela terapêutica estreita. Esses fármacos, quando administrados ao paciente, podem atuar, de maneira indiscriminada, em células normais que apresentem acelerada replicação, como precursores hematopoiéticos e células epiteliais da mucosa gastrintestinal. Além disso, alguns fármacos podem apresentar toxicidade para células de replicação lenta ou nula, como a doxorrubicina (cardiotóxica) a bleomicina (tóxica ao pulmão) e a citarabina (tóxica ao cerebelo), podendo levar a danos irreversíveis nestes tecidos (KAELIN JUNIOR, 2005).

Em resumo, podemos citar como fatores limitantes para utilização de fármacos antitumorais a pobre especificidade, que contribui para a elevada toxicidade e incidência de reações adversas, além da susceptibilidade para induzir resistência. Devido à baixa especificidade, esses fármacos se distribuem indiscriminadamente pelos tecidos corporais e somente uma fração é capaz de atingir o tumor (WONG *et al.*, 2007a).

Dentre os agentes antineoplásicos, a doxorubicina é um fármaco com grande utilização no tratamento de leucemias e tumores sólidos, seja isoladamente ou em combinação com outros fármacos (WEISS, 1992).

2. DOXORRUBICINA

Doxorrubicina (Figura 3) e daunorrubicina foram as primeiras antraciclinas isoladas, no início da década de 60, da espécie de fungo *Streptomyces peucetius* (CARVALHO *et al.*, 2009). Inicialmente foram desenvolvidas como antibióticos, no entanto, sua elevada toxicidade impediu sua utilização nesse contexto clínico (MELLOR *et al.*, 2008).

A daunorrubicina e doxorubicina podem ser consideradas protótipos para as demais antraciclinas. Atualmente, estima-se que existam mais de 2000 análogos da doxorubicina. Entretanto, a doxorubicina é considerada a molécula mais eficaz no tratamento do câncer dentre as outras do grupo, apesar da elevada cardiotoxicidade (WEISS, 1992).

A doxorubicina é um agente quimioterápico com amplo espectro de atividade, atuando contra diversos tipos de tumores, como leucemia, linfomas, carcinoma mamário, carcinoma esofágico, osteosarcomas, sarcoma de Kaposi, carcinomas do tecido mole, carcinoma endometrial, carcinoma de pulmão, cancro testicular, tumores gástrico, ovariano, hepático e pancreático (SINGAL *et al.*, 1998).

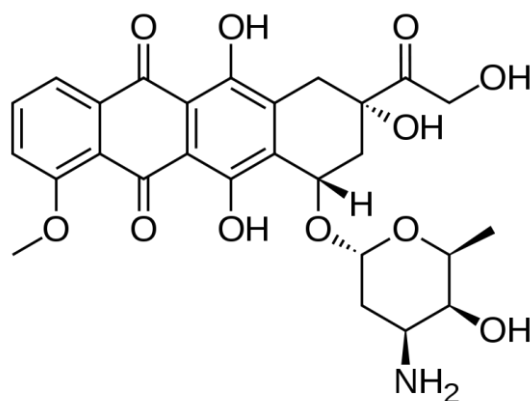


Figura 3. Fórmula estrutural da doxorubicina.

O mecanismo de ação da doxorubicina é complexo e ainda não está bem esclarecido. Entretanto, sabe-se que essa molécula pode atuar na intercalação com o DNA (FORNARI *et al.*, 1994), inibição da biossíntese de macromoléculas (MOMPALER *et al.*, 1976), geração de estresse oxidativo (SINHA *et al.*, 1990) e inibição da topoisomerase II (DARPA *et al.*, 1989). O principal mecanismo é a formação de um complexo triplo com a topoisomerase II e o DNA. A doxorubicina estabiliza esse complexo, depois de ter quebrado a cadeia de replicação do DNA, impedindo a dupla hélice de ser liberada e, assim, bloqueia o processo de replicação. A porção planar aromática da molécula intercala entre dois pares de bases do DNA, enquanto os seis membros da nosamina-açúcar interagem imediatamente com o pareamento das bases nitrogenadas adjacentes ao sítio de intercalação (FREDERICK *et al.*, 1990; BINASCHI *et al.*, 2001).

A doxorubicina é um fármaco hidrofílico administrado na forma de cloridrato por via endovenosa, pois possui baixa absorção por via oral (WEISS, 1992). A biodisponibilidade da doxorubicina por via oral é comprometida porque, além da baixa permeabilidade, há eliminação do fármaco pelo metabolismo de primeira passagem devido ao citocromo P450 e à bomba de efluxo da glicoproteína-P (P-gp), presente em grandes quantidades no intestino, fígado e rim (BELLAMY *et al.*, 1996).

A posologia da doxorubicina varia de 1,2 a 2,4 mg/kg, geralmente em intervalos de 21 dias, e deve ser individualizada de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente. O fármaco apresenta farmacocinética linear

após administração intravenosa, com 50 a 85% do fármaco ligado a proteínas plasmáticas sendo largamente distribuído no plasma e tecidos. A curva de depuração sanguínea da doxorubicina é bifásica, com tempos de meia vida de 4,8 minutos e 20 a 48 horas. Doxorubicina apresenta tanto eliminação renal quanto hepato-biliar. Aproximadamente 12% da dose total é eliminada inalterada na urina, enquanto a maior parte da dose é eliminada pelas fezes. No fígado, a doxorubicina é metabolizada para seu metabólito 13-OH-doxorubicinol. Ocorre a redução enzimática da posição 7 e a clivagem do açúcar daunosamina, resultando em agliconas que são acompanhadas da formação de radical livre. A produção local desse metabólito pode contribuir para a atividade cardiotoxicidade da doxorubicina (DANESI *et al.*, 2002; DOXORRUBICINA, 2014).

Esse fármaco apresenta baixo índice terapêutico e seu uso pode ser limitado devido às reações adversas. As mais comuns são náusea, vômito, estomatite, distúrbios gastrointestinais, alopecia, cardiotoxicidade e mielossupressão (CARVALHO *et al.*, 2009). A mielossupressão constitui uma importante complicação que limita a dose administrada. A miocardiopatia, toxicidade mais importante em longo prazo, pode ocorrer em mais de 20% dos pacientes. Essa reação apresenta-se sob dois tipos: forma aguda ou cumulativa crônica. A forma crônica pode conduzir à insuficiência cardíaca congestiva potencialmente fatal (PAI *et al.*, 2000; CHABNER *et al.*, 2010).

A forma mais comum de cardiotoxicidade, devido ao uso de doxorubicina, é a cardiomiopatia irreversível, que acontece tardiamente durante a quimioterapia, ou anos após o fim do tratamento. O mecanismo da cardiotoxicidade ainda não é completamente estabelecido, mas se sabe que é mediado pela geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), seguida da redução de um elétron na estrutura química da antraciclina. ROS levam ao estresse oxidativo e depleção energética em miócitos. A redução, no entanto, também pode ocorrer em dois elétrons, o que converte a doxorubicina ao seu metabólito doxorubicinol, um álcool secundário, que se acumula nos cardiomiócitos, se tornando um reservatório intracelular do fármaco (LEONARD *et al.*, 2009).

Outra limitação é o desenvolvimento de multirresistência (MDR), principalmente no câncer de mama, ovário e colón (ARORA *et al.*, 2011). A MDR pode ser natural ou adquirida durante o tratamento quimioterápico. É um processo complexo e multifatorial, que possibilita a evasão de células neoplásicas das rotas quimioterápicas. As causas mais frequentes de MDR incluem a superregulação de membranas de efluxo dependentes de ATP, como a glicoproteína-P, resistência associada à proteína (MRP1). Esses transportadores aumentam a habilidade das células em expulsar ativamente os agentes anticâncer contra um gradiente de concentração, impedindo que o fármaco atinja o seu alvo de ação em concentrações adequadas para gerar o efeito citotóxico desejado (PRASAD *et al.*, 2012).

A baixa penetração e distribuição limitada de doxorubicina em tumores sólidos são as principais causas de sua insuficiência como agente terapêutico. A sensibilidade dos tumores à doxorubicina depende tanto da sua sensibilidade intrínseca quanto da distribuição do fármaco dentro da região tumoral. O microambiente tumoral influencia na resposta à quimioterapia, fatores como densidade vascular, fluxo sanguíneo, acidez, regiões de hipóxia – crônica ou aguda – podem alterar a distribuição e atividade do fármaco (PRIMEAU *et al.*, 2005; TREDAN *et al.*, 2007).

Dentre as estratégias descritas para aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade da doxorubicina estão a terapia combinada e o desenvolvimento de nanocarreadores. A associação do fármaco com outras classes de substâncias tem demonstrado melhoria na eficácia do tratamento de tumores malignos comparado aos respectivos agentes isolados. Para o tratamento do câncer de mama, a doxorubicina é geralmente associada a agentes alquilantes, antimetabólicos e taxanos (MELLOR&CALLAGHAN, 2008). No entanto, os efeitos adversos inerentes aos fármacos ainda constituem um limitador mesmo em terapias combinadas. Alternativamente, nanossistemas podem ampliar a segurança dos fármacos, devido a mudanças significativas na farmacocinética em comparação com o fármaco livre. Podemos citar como exemplo para esta estratégia os lipossomas de circulação prolongada carreando doxorubicina disponíveis comercialmente (Doxil®) (PARK *et al.*, 2009).

Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado benefícios para a combinação de doxorubicina e ácidos graxos poliinsaturados, com destaque para o ácido docosahexaenóico (COLAS *et al.*, 2006; BOUGNOUX *et al.*, 2009; SIDDIQUI *et al.*, 2011).

2.1. DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO

Ácido docosahexaenóico (DHA) é o ácido graxo poliinsaturado mais longo e com mais insaturações encontrado em sistemas biológicos (Figura 4). Ácidos graxos poliinsaturados tem um papel importante na inibição e prevenção de cânceres. Evidências epidemiológicas correlacionam fortemente ingestão de óleos de peixe, ricos em ácidos graxos poliinsaturados, com baixa incidência de vários tipos de tumores (SIDDIQUI *et al.*, 2012b).

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que o DHA é o ácido graxo mais eficaz em potencializar o efeito da doxorubicina contra células de câncer de mama (GERMAIN *et al.*, 1998; COLAS *et al.*, 2006). Além disso, um importante estudo clínico de fase II demonstrou que a associação com o DHA melhorou os resultados da quimioterapia com antraciclinas em pacientes com câncer mamário metastático (BOUGNOUX *et al.*, 2009).

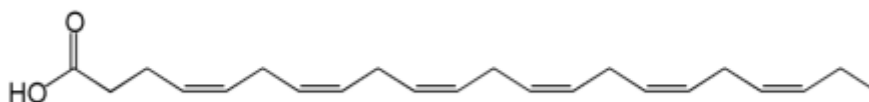


Figura 4. Fórmula estrutural do DHA (C₂₂)

O mecanismo sinérgico ocorre, provavelmente, devido à incorporação do DHA nas membranas celulares. Isso leva ao aumento da entrega celular dos fármacos, além de facilitar a ocorrência da lipoperoxidação da membrana. A lipoperoxidação é a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), nesse caso as espécies de peróxido, sobre os componentes lipídicos celulares. Isso acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando na morte celular. A lipoperoxidação é uma reação radicalar, portanto, lipídeos altamente

insaturados, tais como o DHA, são susceptíveis a essa reação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SIDDIQUI *et al.*, 2012b).

Entretanto, as diferentes posologias dos fármacos usados na terapia de combinação dificultam o controle dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico dos agentes combinados. Além disso, obter uma coentrega temporal e local desses fármacos é um grande desafio. Nesse contexto, a coencapsulação de fármacos em sistemas de liberação de fármacos constitui uma alternativa promissora (PARHI *et al.*, 2012).

3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA TERAPIA DO CÂNCER

Sistemas nanoestruturados, propositalmente planejados e produzidos com tamanho em escala nanométrica, constituem uma alternativa promissora para aumento da especificidade ao tecido tumoral, proporcionando maior concentração do fármaco no sítio alvo (MAMOT *et al.*, 2003) e redução da toxicidade (O'BRIEN *et al.*, 2004).

Os tumores sólidos possuem características patofisiológicas únicas que favorecem o uso de partículas em escala nanométrica para o seu tratamento. Os vasos tumorais apresentam inúmeras “aberturas” (fenestrações endoteliais, aberturas transcelulares e membrana basal descontínua ou ausente) que leva a formação de poros que variam de 100 a 800 nm, permitindo a penetração de macromoléculas no interstício (YUAN *et al.*, 1995; CARMELIET & JAIN, 2000; MAEDA *et al.*, 2000; MUNN *et al.*, 2003; GOSH *et al.*, 2008; HALEY *et al.*, 2008; SHIN *et al.*, 2012).

Esse acúmulo espontâneo ou *targeting* passivo, que funciona especialmente bem no ambiente tumoral devido, adicionalmente, ao sistema linfático deficiente, é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Ou seja, a permeabilidade aumentada da vasculatura permite o acúmulo de macromoléculas e nanopartículas no interstício tumoral, enquanto a falta de drenagem linfática permite a retenção dessas partículas no ambiente tumoral (Figura 5) (TORCHILIN, 2011).

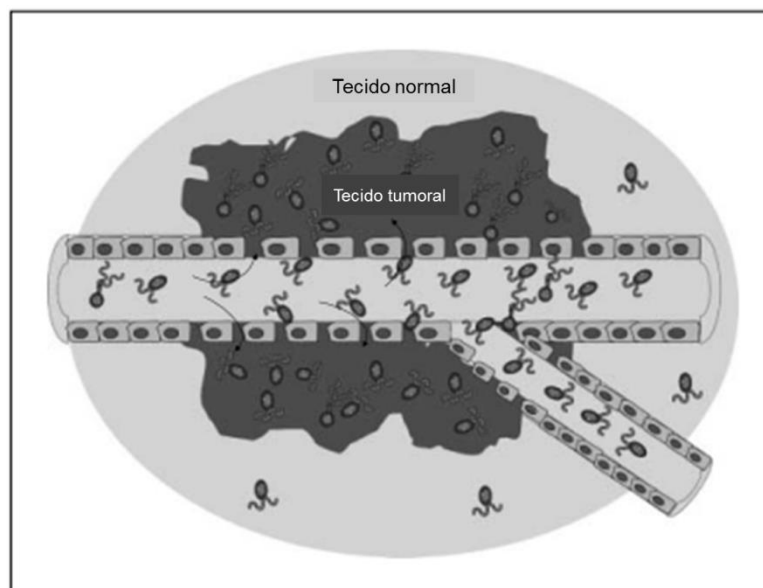


Figura 5. Acúmulo espontâneo de nanopartículas na região tumoral pelo efeito EPR (adaptado de CHO *et al.*, 2008)

Além disso, as nanopartículas podem ser modificadas, para controlar as propriedades *in vivo*. Um carreador de fármaco ideal é capaz de prolongar a circulação sanguínea, atingir especificamente o local da doença, liberar o fármaco em resposta a um estímulo local (como pH, temperatura, calor, campo magnético ou ultrassom), aumentar a entrega intracelular do fármaco, carregar um componente que possa fornecer informações sobre biodistribuição e acúmulo na região alvo (TORCHILIN, 2009).

Inúmeros tipos de nanopartículas são utilizados como sistemas de liberação de fármacos, e diferem entre si em termos de tamanho, forma e materiais (Figura 6), além de apresentarem diferentes características quanto à capacidade de carga do fármaco, estabilidade, taxa de liberação e capacidade de entrega (HALEY *et al.*, 2008).

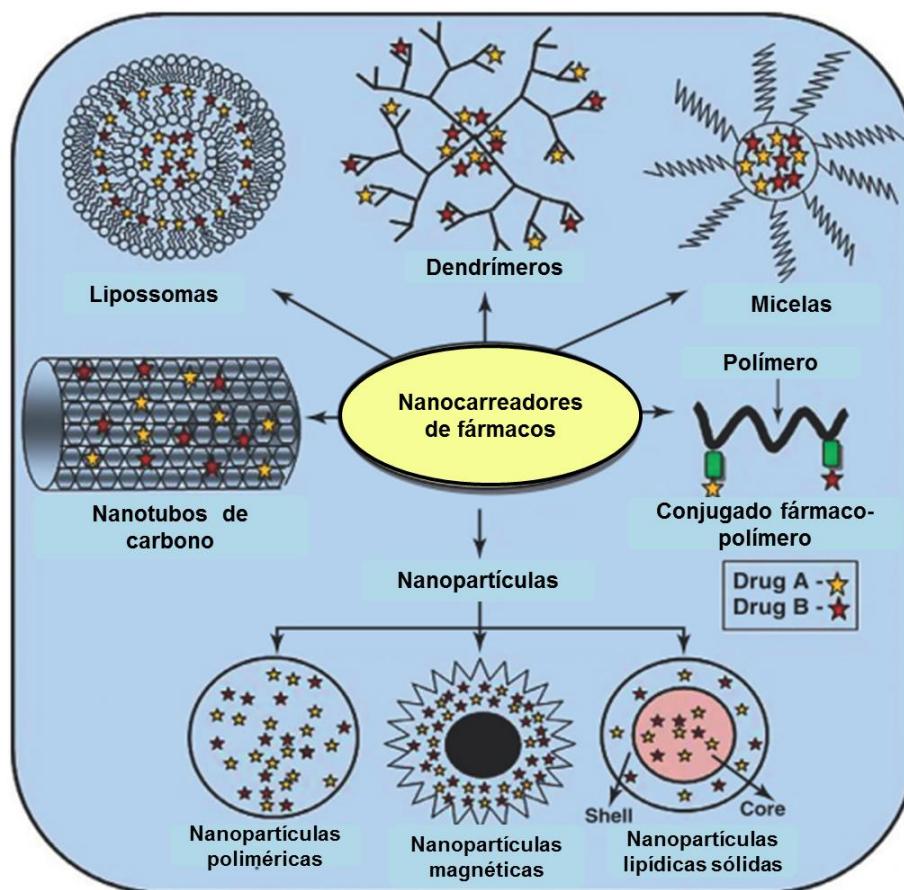


Figura 6. Representação esquemática dos diferentes tipos de nanocarreadores (adaptado de PARHI, 2012).

Algumas nanoformulações já são aprovadas para o uso clínico. O desenvolvimento de um nanossistema carreador de paclitaxel possibilitou uma alternativa de tratamento para pacientes com tumores resistentes ao fármaco livre ou aqueles que apresentam hipersensibilidade aos componentes da fórmula. A nanopartícula é preparada através da conjugação com uma albumina não modificada à molécula de paclitaxel. A formulação aumenta a concentração intratumoral do fármaco e diminui a toxicidade associada ao paclitaxel. O FDA aprovou o uso da nanopartícula conjugada albumina-paclitaxel para câncer de mama metastático resistente (HALEY *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de lipossomas de circulação prolongada (revestidos com polietilenoglicol - PEG) carreando doxorrubicina possibilitou a obtenção de um produto comercial, denominado Doxil® (Janssen Biotech, Inc; Johnson & Johnson, EUA). Esse foi um dos primeiros produtos lipossomais disponibilizado comercialmente e muitos benefícios clínicos foram observados

como a redução significativa da cardiotoxicidade, mielossupressão, vômitos e alopecia (HARRIS *et al.*, 2002; O'BRIEN *et al.*, 2004).

O Doxil® é aprovado para tratamento clínico de sarcoma de Kaposi relacionado à SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), câncer ovariano recorrente, câncer de mama metastático e mieloma múltiplo. Estudos clínicos vêm sendo conduzidos para avaliação no tratamento de outros tipos de câncer (GABIZON, 2001; LYASS *et al.*, 2000; JUDSON *et al.*, 2001).

Apesar das grandes vantagens clínicas observadas para essas nanopartículas, o elevado custo de produção desses sistemas e os problemas tecnológicos, como o uso de solventes orgânicos, por exemplo, tem motivado a busca por sistemas carreadores alternativos. Nesse contexto, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são alternativas promissoras (MÜLLER *et al.*, 2000; MEHNERT & MADER, 2001).

3.1. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas coloidais constituídas por uma matriz lipídica sólida a temperatura corporal (37°C). Este nanossistema foi primeiramente descrito por Muller e colaboradores em 1991 e, desde então, vem atraindo interesse como sistema carreador para aplicações terapêuticas e cosméticas (WONG *et al.*, 2006b). Seu diâmetro médio varia entre 50 a 1000 nm e pode ser preparada utilizando-se uma grande variedade de lipídeos, incluindo ácidos graxos, mono, di ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos complexos ou ceras, que são estabilizados por surfactantes biocompatíveis (WONG *et al.*, 2007).

As NLS são derivadas das nanoemulsões (NE) pela simples substituição do lipídeo líquido (óleo) por um lipídeo sólido (Figura 7). Essa matriz lipídica sólida confere menor mobilidade aos fármacos incorporados, podendo sustentar, ou até controlar a velocidade de liberação dessas substâncias, mantendo-se a baixa toxicidade apresentadas pelas NE. Além disso, essas nanopartículas podem ser produzidas em um homogeneizador de alta pressão, similar àqueles utilizados na produção em larga escala de emulsões para nutrição parenteral, o

que representa uma vantagem quando comparado à produção de sistemas poliméricos e lipossomais (MEHNERT e MADER, 2001).

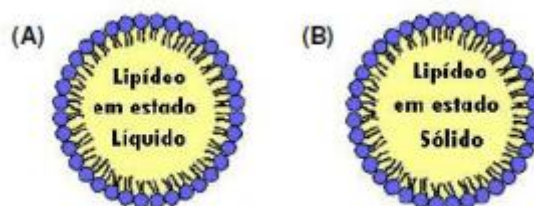


Fig. 7. Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos, (A) nanoemulsões e (B) NLS (Adaptado de Muller *et al.*, 2000).

O encapsulamento de fármacos lipofílicos em NLS é geralmente favorecido devido à maior afinidade pela matriz lipídica. No entanto, também é possível a incorporação de fármacos hidrofílicos. A formação de um par iônico com um grupo lipofílico tem sido proposta como uma alternativa para aumentar a taxa de encapsulação (WONG *et al.*, 2007b).

A capacidade de encapsulação pelas NLS é limitada (geralmente até 25% em relação ao conteúdo lipídico da matriz) pela estrutura e o estado polimórfico da matriz lipídica, uma vez que é necessário que o fármaco seja incorporado entre as cadeias de ácidos graxos e entre as imperfeições dos cristais formados. As matrizes lipídicas podem ser constituídas por moléculas que contêm cadeias carbônicas similares (triestearina ou tripalmitina, por exemplo) ou por lipídeos mais complexos (mono, di e triglicerídeos, com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas). O uso de lipídeos complexos é preferido, já que forma um cristal com mais imperfeições, capaz de acomodar uma quantidade maior de fármaco. Lipídeos com cadeias carbônicas similares tendem a formar uma rede cristalina altamente organizada, que pode não acomodar grandes quantidades de fármaco, comprometendo a taxa de encapsulação do sistema (MÜLLER *et al.*, 2000; WISSING *et al.*, 2004).

Com o intuito de aumentar a carga de fármaco nas NLS, uma nova geração de nanopartículas lipídicas tem sido descrita. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são compostos por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos, o que resulta em uma matriz lipídica menos organizada, com

imperfeições na estrutura cristalina o que pode levar a maior acomodação das moléculas dos fármacos (Figura 8). Essas nanopartículas compartilham as vantagens das tradicionais NLS e o perfil de liberação de fármaco pode ser facilmente modulado através da variação da composição da matriz lipídica. Apesar da presença de lipídeo líquido, a matriz dos CLN é sólida em temperatura ambiente e corporal (JOSHI e MULLER, 2009).

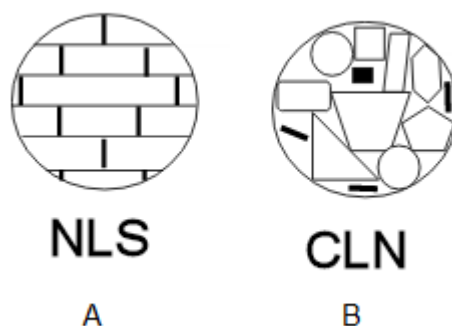


Figura 8. Representação esquemática das diferentes estruturas de (A) NLS (B) CLN.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados apresentam os benefícios dos demais sistemas carreadores, como estabilidade física, proteção contra a degradação e liberação controlada de fármacos incorporados. Adicionalmente, esse sistema, em particular, apresenta vantagens frente a outras nanoplataformas disponíveis para o carregamento de fármacos como seu fácil escalonamento, ausência de solventes orgânicos em sua composição, constituintes compatíveis para administração parental, além da baixa toxicidade (MÜLLER *et al.*, 2000; MEHNERT e MADER, 2001; WISSING *et al.*, 2004; BRIOSCHI *et al.* 2007).

3.1.1. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM DOXORRUBICINA

Diversos estudos mostrando o potencial das NLS como sistemas carreadores de fármacos antitumorais têm sido descritos, principalmente devido ao acúmulo preferencial na região do tumor, proporcionado pelo efeito EPR. A utilização de nanoestruturas para o tratamento de tumores vem se mostrando promissora por ser capaz de superar as limitações comumente apresentadas na terapia convencional, como a baixa especificidade, alta toxicidade e quimiorresistência.

Dessa forma, diversos fármacos antitumorais, incluindo doxorubicina, têm sido incorporados em NLS como alternativa para tratamento do câncer (WONG *et al.*, 2007b).

ZARA *et al.* (1999) e FUNDARÓ *et al.* (2000) administraram, por via endovenosa, NLS carreando doxorubicina em ratos e compararam sua biodistribuição com o fármaco livre em solução. As NLS modificaram o perfil farmacocinético e de biodistribuição da doxorubicina, aumentando a área sob a curva (ASC) da concentração plasmática e reduzindo a concentração no coração em comparação com a solução. Este fato se mostrou relevante visto que esse órgão é alvo de toxicidade da doxorubicina.

Posteriormente, estudos mostraram aumento da eficácia no tratamento de tumores cerebrais, com a utilização de NLS contendo doxorubicina, demonstrando seu potencial em atravessar barreira hematoencefálica (ZARA *et al.*, 2001; STEINIGER *et al.*, 2004; BRIOSCHI *et al.*, 2007).

ZHANG *et al.* (2008), reportaram um aumento da citotoxicidade de CLN carregados com doxorubicina contra células de câncer de mama humanos (MCF-7) e células multirresistentes (MCF-7/ADR). WONG *et al.* (2006 e 2007b) desenvolveram um sistema de nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPL) contendo o complexo polímero-doxorubicina e avaliaram a eficácia no tratamento de câncer de mama murino, da linhagem celular EMT6/WT. Os autores observaram que esse sistema possibilitou o aumento da internalização e retenção do fármaco pelo tumor, causando maior citotoxicidade na célula alvo quando comparado com a doxorubicina livre.

NLS carreando doxorubicina, ceramida e um oligonucleotídeo regulador da expressão de glucosilceramidasintase (MBO-asGCS), enzima relacionada à multirresistência, foram propostas por SIDIQQUI *et al.* (2012). Esse sistema mostrou-se mais eficaz do que a doxorubicina livre em avaliações *in vitro* e a combinação desses agentes em NLS demonstrou maior citotoxicidade em células tumorais resistentes NCI/ADR-RES. Essas NLS resultaram em maior apoptose devido à sensibilização e co-entrega intracelular de MBO-asGCS, ceramida e doxorubicina.

WANG *et al.* (2015) desenvolveram um CLN carreando doxorrubicina e paclitaxel para o tratamento de câncer de pulmão. Resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram aumento da citotoxicidade do nanocarreador em relação aos fármacos livres. CHEN *et al.* (2015) desenvolveram uma NLS pH sensível, revestida com PEG, carregadas com doxorrubicina capazes de contornar a resistência em células MCF-7/Adr.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa conduziram ao desenvolvimento de um CLN carreando doxorrubicina e DHA para a terapia do câncer (MUSSI *et al.* 2013). O tamanho, potencial zeta e estabilidade no plasma foram considerados adequados para administração parenteral e liberação controlada da doxorrubicina foi obtida. A atividade antitumoral *in vitro* em modelo de células em monocamada foi significativamente maior para células MCF-7/Adr quando comparada com os fármacos livres e CLN contendo apenas doxorrubicina. Estudos com esferoides também mostraram penetração aumentada, da CLN, na estrutura do tumor. Portanto, a associação da doxorrubicina com o DHA e sua co-encapsulação em um CLN aumentou a citotoxicidade e foi capaz de contornar a resistência associada à atividade da glicoproteína P em células MCF-7/Adr. Estes achados indicaram a CLN carreando doxorrubicina e DHA como um promissor agente para a terapia antitumoral *in vivo*.

4. NANOPARTÍCULAS RADIOMARCADAS

Nanopartículas radiomarcadas representam uma nova classe de agentes com grande potencial clínico. Além das vantagens inerentes ao uso de nanoestruturas, como maior tempo na circulação sanguínea e estabilidade plasmática, estes sistemas apresentam, ainda, a capacidade de gerarem imagens cintilográficas de alta qualidade devido à presença de um radionuclídeo (de BARROS *et al.*, 2012). Quando comparados com outras técnicas de imagens, a cintilografia apresenta vantagens como maior sensibilidade e capacidade de fornecer imagens quantitativas (HONG, *et al.*, 2004). Esses fatores são promissores para obtenção de uma partícula teranóstica, ou seja, a combinação de agentes terapêuticos e diagnósticos, que

pode, simultaneamente, tratar e monitorar a evolução da doença (JANIB *et al.*, 2010).

Os radionuclídeos mais utilizados são o galio-67 (^{67}Ga), o índio-111 (^{111}In) e o tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Dentre estes isótopos o tecnécio-99m é, sem dúvida, o mais empregado em medicina nuclear devido a suas características ideais para um radiofármaco, como meia-vida física de 6,01 horas; decaimento por emissão de radiação gama, com fótons de 140 keV; a praticidade da obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$); a possibilidade do metal atingir vários estados de oxidação e de coordenação, dando origem a diferentes radiofármacos, a partir da simples reconstituição de conjuntos de reativos liofilizados (“kits”) (MARQUES *et al.*, 2001).

Na forma de pertecnetato, tal como é obtido do gerador, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é quimicamente estável. Contudo, como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um metal de transição (pertence ao grupo 7 da tabela periódica) pode existir em 9 estados de oxidação (-1 a +7), o que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. A coordenação de agentes quelantes ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é feita quando o metal se encontra em estados de oxidação inferiores ao +7. A redução do metal, do estado de oxidação +7 para outros estados reativos, é realizada por agentes redutores, como o cloreto estanoso (SAHA, 2010).

Lipossomas radiomarcados para imagens tumorais vêm sendo pesquisados desde a década de 1970. Os lipossomas são geralmente marcados pela conjugação a moléculas-âncoras presentes tanto na cavidade aquosa (por exemplo, deferoxamina DF) quanto na membrana lipídica (por exemplo, Ácido DietilenoTriamino Pentacético - DTPA) (HAMOUDEH *et al.*, 2008). OYEN *et al.* (1996) avaliaram lipossomas de circulação prolongada radiomarcados com tecnécio na detecção de infecção e inflamação. De BARROS *et al.* (2013) avaliaram lipossomas de longa circulação radiomarcados na identificação de tumores.

ZHANG *et al.* (2011) desenvolveram uma nanopartícula micelar polimérica peptídeo-conjugado que foi utilizada para identificar receptores EphB4 em

modelo de câncer de próstata por Tomografia por Emissão de Foton Único (SPECT). PEREIRA *et al.* (2009) desenvolveram uma nanocápsula de superfície modificada marcada com ^{99m}Tc para detecção de inflamação. Outras nanopartículas radiomarcadas também têm sido empregadas para identificação de diversos processos patológicos, dentre elas podemos destacar os nanocristais, quantum dots, dendrímeros e nanopartículas magnéticas (KOO *et al.*, 2005).

Em adição aos estudos para o diagnóstico de doenças, o emprego de nanopartículas radiomarcadas permite a obtenção de dados farmacocinéticos e de biodistribuição, uma vez que se torna possível acompanhar o comportamento *in vivo* dessas nanoestruturas. No contexto de estudos pré-clínicos, vários outros métodos analíticos também têm sido descritos, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), fluorescência, espectrometria de massas, entre outros (REN *et al.*, 2014; DAEIHAMED *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015). No entanto, esses métodos apresentam alto custo e difícil preparo de amostra. Dessa forma, a análise baseada na utilização de isótopos radioativos apresenta vantagens frente aos métodos acima descritos, devido à alta sensibilidade e fácil execução.

Já existem trabalhos reportando o uso de NLS em estudos de biodistribuição. ANDREOZZI *et al.* (2011), publicaram um novo método de marcação de NLS com ^{64}Cu . BELOQUI *et al.* (2013) utilizaram carreadores lipídicos nanoestruturados radiomarcados com tecnécio para estudos *in vivo* de biodistribuição. REDDY *et al.* (2005) investigaram a influência da via de administração na captação do tumor e biodistribuição de ^{99m}Tc -NLS carregadas com etoposídeo em modelos experimentais de linfoma da Dalton.

Nesse contexto, a radiomarcção de NLS é um campo promissor, devido às suas características favoráveis como um sistema carreador de fármacos e possibilidade de aquisição simultânea de imagens.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doxorubicina apresenta um índice terapêutico baixo e seu uso é limitado devido aos seus efeitos adversos, principalmente mielossupressão e cardiotoxicidade. A baixa penetração e distribuição limitada da doxorubicina em tumores sólidos são as principais causas de sua ineficiência como agente terapêutico. Adicionalmente, tem sido sugerido que a combinação de agentes citotóxicos e ácidos graxos poliinsaturados, como o DHA, poderia aumentar sua eficácia contra as células do câncer. Nanocarreadores de fármacos, tais como os CLN, constituem também uma alternativa para melhorar o índice terapêutico, reduzir a toxicidade, aumentar a eficácia da doxorubicina, além de proporcionar a coentrega do DHA na região do tumor. Neste contexto, nosso grupo desenvolveu um CLN carreador de doxorubicina e DHA que apresentou resultados *in vitro* promissores.

Portanto, devido ao potencial dos CLN em facilitar a entrega controlada de fármaco a um tecido alvo, existe grande interesse na compreensão do seu comportamento *in vivo* e da sua eficácia da atividade antitumoral em modelo animal. Neste interim, estudos de atividade antitumoral, farmacocinética e de biodistribuição são fundamentais para compreender o real potencial deste nanossistema no tratamento de tumores sólidos.

6. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil farmacocinético, a biodistribuição e a atividade antitumoral de CLN carregados com doxorubicina e DHA em modelo experimental de tumor de mama murino.

CAPÍTULO 1

**Avaliação da farmacocinética e biodistribuição de CLN carregados com
doxorubicina e DHA**

1. INTRODUÇÃO

As alternativas terapêuticas em oncologia incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento quimioterápico permanece como uma das principais condutas terapêutica, podendo ser utilizado de forma primária, terapia adjuvante ou paliativa. O grande desafio no desenvolvimento de fármacos antitumorais não reside na capacidade destes agentes em destruir as células neoplásicas, mas sim na dificuldade de conferir seletividade a estes fármacos a fim de produzir alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras (KAELIN JUNIOR, 2005).

Para o desenvolvimento de um novo medicamento, estudos farmacocinéticos e de biodistribuição são essenciais. São descritos diferentes métodos para este fim, como HPLC (ZHANG *et al.*, 2010) e fluorescência (WHEI *et al.*, 2012). Entretanto, essas técnicas apresentam alto custo e difícil preparo de amostras. Por esta razão, o uso de isótopos radioativos tem se mostrado uma alternativa interessante, pois apresenta alta sensibilidade, e fácil manuseio. Adicionalmente, por este método é, ainda, possível a aquisição de imagens quantitativas (de BARROS *et al.*, 2012)

O principal radionuclídeo utilizado nos processos de medicina nuclear é o tecnécio-99m, pois esse isótopo apresenta propriedades físicas e químicas ideais para um radiofármaco, tais como: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON *et al.*, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003).

Esse capítulo, portanto, relata a marcação com tecnécio-99m e estudos de estabilidade dos CLN e da doxorubicina livre, além de estudos *in vivo* de depuração sanguínea, biodistribuição e imagens cintilográficas, dos dois complexos radiomarcados, em animais sadios e acometidos com tumor murinho da linhagem 4T1.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar a formulação de CLN carregadas com doxorrubicina e DHA (CLN-DHA-DOX);
- Caracterizar a formulação quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, teor de encapsulação;
- Estabelecer um protocolo de marcação dos CLN com ^{99m}Tc ;
- Determinar o rendimento e estabilidade de marcação dos CLN pelo ^{99m}Tc ;
- Caracterizar a ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, teor de encapsulação;
- Estabelecer um protocolo de marcação da doxorrubicina livre com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -DOX);
- Determinar o rendimento e estabilidade de marcação da doxorrubicina livre pelo ^{99m}Tc ;
- Realizar estudos de depuração sanguínea da ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e da ^{99m}Tc -DOX em animais saudáveis;
- Realizar estudos de biodistribuição dos ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e de ^{99m}Tc -DOX em animais saudáveis e acometidos pelo tumor de mama murino 4T1;
- Realizar imagens cintilográficas da ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e de ^{99m}Tc -DOX em animais saudáveis e acometidos pelo tumor de mama murino 4T1;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Cloridrato de doxorubicina (DOX), ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), trietanolamina (TEA), behenato de glicerila (Compritol 888 ATO®), monooleato de sorbitanoetoxilado (*SuperRefined™ Polysorbate™ 80; Tween 80™*), óleo de sésamo, ácido oleico e cloreto estanoso foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e Roswell Park Memorial Institute (RPMI), soro fetal bovino (SFB), gentamicina, penicilina e estreptomicina foram comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil). A solução de xilazina (Dopaser® 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%) foi fornecida pela Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

Os camundongos BALB/c foram adquiridos do Biotério Central da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração, na sala de experimentação animal do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 307/2014 (ANEXO 1).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo dos CLN

Os CLN foram preparados pelo método de homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 e ultrassom com sonda de titânio de alta potência (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA). A composição da formulação está representada na tabela 1. A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas e aquecidas, separadamente, a 85°C. A FA foi lentamente vertida sobre a FO, sob agitação, em Ultra Turrax T-25, a 8.000 rpm, por dois minutos. Posteriormente, as partículas foram calibradas, em relação ao diâmetro, em ultrassom, por 10 minutos (Figura 9).

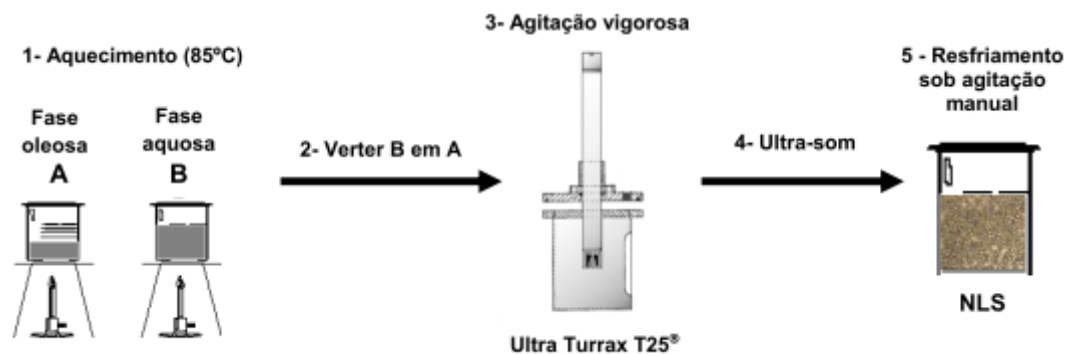


Figura 9. Representação esquemática da preparação dos CLN pelo método de homogeneização a quente com ultrassom.

Tabela 1. Composição dos CLN

Fase Oleosa (FO)	% p/v	Fase Aquosa (FA)	% p/v
Docosahexaenoico triglicerídeo	0,4	EDTA	0,04
Cloridrato de doxorrubicina	0,05	Água purificada q.s.p	100,0
Trietanolamina	0,06		
Compritol 888 ATO®	1,10		
Tween 80	1,00		
Ácido Oleico	0,10		

3.2.2. Caracterização dos CLN-DHA-DOX

3.2.2.1. Diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta

O diâmetro médio, a distribuição do tamanho e IP dos CLN foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25°C e a um ângulo de 90°. O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz associado à análise da mobilidade eletroforética das partículas a um ângulo de 90° e a temperatura de 25°C. As medidas foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra). As amostras foram diluídas em água MiliQ®, na proporção 1:3, e as medidas foram realizadas em triplicata.

3.2.2.2. Teor de encapsulação

O teor de encapsulação foi determinado através do método de ultrafiltração, sendo calculada pela seguinte fórmula:

$$TE(\%) = \frac{(\text{DOX total} - \text{DOX do ultrafiltrado})}{\text{DOX total}} \times 100$$

DOX pode ser encontrada na formulação como DOX encapsulada (retida na matriz lipídica) e não encapsulada (solúvel ao meio aquoso).

DOX total:

200 µL dos CLN foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 4 mL de tetrahidrofurano (THF), para solubilização dos lípides da matriz. O volume foi completado com metanol (MeOH). Essa dispersão foi centrifugada por 5 min a 2400 x g e o sobrenadante analisado por espectrofotometria no UV-VIS, avaliando a absorbância em comprimento de onda $\lambda = 480$ nm.

DOX do ultrafiltrado:

A concentração da doxorrubicina não encapsulada foi avaliada após a ultrafiltração, realizada com dispositivo Amicon® 100 k (Milipore, USA) e centrifugação a 2400 x g por 10 min. A alíquota do ultrafiltrado, contendo a DOX solúvel, foi diluída em THF/MeOH 40:60 v/v e analisada por espectrofotometria no UV-Vis, avaliando a absorbância em comprimento de onda $\lambda = 480$ nm.

A fim de eliminar a adsorção da doxorrubicina nos dispositivos de ultrafiltração, foi realizado o procedimento denominado “Passivação da membrana”:

3.2.2.3. Passivação das membranas

Todos os dispositivos de ultrafiltração utilizados foram mantidos por aproximadamente 12 h em contato com uma solução aquosa de Tween 20 a 5% p/v (solução de passivação). Após esse período, foram realizadas diversas lavagens com água destilada para eliminar o excesso dessa solução e as membranas ou dispositivos foram utilizados imediatamente.

3.2.3. Formação do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX

Os CLN foram marcadas pelo tecnécio-99m (^{99m}Tc) por método direto, utilizando cloreto estanoso di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como agente redutor. Em um frasco de penicilina, contendo 1 mL da formulação, foram adicionados 100 μL de uma solução de cloreto estanoso em HCl 0,25M (10 mg/ml). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1M. O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo. Em seguida, 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco, que foi mantido sob agitação, em vórtex, por 2 minutos e em temperatura ambiente, por 10 minutos.

3.2.4. Formação do complexo ^{99m}Tc -DOX

A DOX foi marcada pelo ^{99m}Tc por método direto, utilizando $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agente redutor. Preparou-se uma solução de doxorubicina em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 (1,0 mg/ml). Em um frasco de penicilina, contendo 1mL dessa solução, foram adicionados 50 μL de uma solução de cloreto estanoso em HCl 0,25M (2 mg/ml). O pH foi mantido em 7,4 com solução de NaOH 0,1M. O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo. Em seguida, 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco, que foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos.

3.2.5. Quantificação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$

A eficiência da marcação foi realizada, para ambos complexos, por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se fitas de sílica gel e acetona como fase móvel, para determinação de tecnécio livre. 5 μL das soluções marcadas foram aplicados na base das fitas que, após eluição, foram cortadas ao meio e analisadas em um contador de radiação gama (Perkin Elmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, Perkin Elmer Inc., Waltham, EUA) - para determinação da radioatividade. O tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) migra com a acetona, enquanto os complexos radiomarcados permanecem no ponto de aplicação.

3.2.6. Quantificação de $^{99m}\text{TcO}_2$ e purificação dos complexos formados

As suspensões contendo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ e $^{99m}\text{Tc-DOX}$ foram purificadas através de um filtro de seringa 0,22 μm . O tecnécio coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$) fica retido no filtro e pode ser quantificado pela medida da radioatividade, através de contador gama (SHIN *et al.*, 2013).

3.2.7. Eficiência da marcação

Após quantificação das impurezas inerentes ao processo de radiomarkação com tecnécio-99m foi possível determinar o percentual de doxorubicina e de formulação marcados. O rendimento de marcação foi considerado segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_2 + \%^{99m}\text{TcO}_4^-)$$

3.2.8. Caracterização do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$

O complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ foi caracterizado quanto ao diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação, conforme descrito no item 3.2.2.

3.2.9. . Estudos de estabilidade *in vitro*

Foram realizados testes de estabilidade de marcação *in vitro*, para os dois complexos, em presença de solução de NaCl 0,9% (p/v) e plasma de camundongo.

3.2.9.1. Solução de NaCl 0,9% (p/v)

Após a marcação, os frascos contendo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ e $^{99m}\text{Tc-DOX}$ foram mantidos a temperatura ambiente e após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas através de CCD.

3.2.9.2. Plasma de camundongo

Após a marcação, uma alíquota de 0,09 mL da solução de $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$ foi retirada e incubada em 1 mL de plasma de camundongo a 37°C sob agitação. Após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas através de CCD.

3.2.10. Depuração plasmática em animais sadios

Alíquotas de 0,1 mL da solução contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$ foram injetadas pela veia caudal de seis camundongos BALB/c fêmeas, para cada complexo radiomarcado. Foi realizada uma incisão na cauda dos animais e o sangue foi coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480 e 1440 minutos após a administração dos complexos marcados. Os tubos foram pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade. Uma atividade padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (% DI/g).

3.2.11. Biodistribuição dos complexos em animais sadios

Foram utilizados 18 camundongos BALB/c sadios, pesando 18-22g, para cada complexo radiomarcado. Os animais foram divididos em três grupos, nos quais cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da solução contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$. Após os tempos de 1, 4 e 8 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, intestinos, músculo, tireoide, foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (% DI/g).

3.2.12. Imagens cintilográficas dos complexos em animais sadios

Em seis animais BALB/c sadios foram administrados, por via endovenosa, 37 MBq da solução de $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração dos complexos radiomarcados. Os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide TM TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

3.2.13. Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos

O câncer mamário murinho 4T1 foi desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas de vida. Os camundongos foram mantidos em área com controle de luminosidade, com livre acesso a água e ração. As células 4T1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, em câmara com 5% de CO_2 , 95% de umidade e 37°C. Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com o Trypan Blue. A concentração da suspensão de 4T1 foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células em 50µL e injetada (SC) na coxa direita dos animais.

3.2.14. Biodistribuição dos complexos em animais acometidos pelo tumor

Foram utilizados 24 camundongos BALB/c, pesando 18-22g, com tumor da linhagem de tumor de mama murino 4T1 implantado na coxa direita, para cada complexo. Os animais foram divididos em quatro grupos, nos quais cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da solução contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$. Após os intervalos de tempo de 1, 4, 8 e 24 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue,

intestinos, tumor, músculo, tireoide, foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (% ID/g).

3.2.15. Imagens cintilográficas dos complexos em animais acometidos pelo tumor

Em seis animais BALB/c acometidos pelo tumor, foram administrados, por via endovenosa, 37 MBq da solução de $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ ou $^{99m}\text{Tc-DOX}$. As imagens foram adquiridas nos intervalos de tempo de 1, 4, 8 e 24 horas após a administração dos complexos radiomarcados. Os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide TM TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROI) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

3.2.16. Análise estatística

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos descritos acima. A análise estatística foi feita por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLN

Os valores de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e teor de encapsulação para os CLN carregados com doxorrubicina e DHA (CLN-DHA-DOX) estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação da formulação CLN-DHA-DOX*

Diâmetro médio (nm)	64 ± 4
IP	0,174 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-31,6 ± 1,38
%TE	96,92 ± 0,65

* Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n =3).

Os CLN apresentaram diâmetro de aproximadamente 65 nm. Diâmetros na faixa de 50 a 200 nm são preferíveis. Partículas menores que 10 nm são rapidamente filtradas pelos rins e partículas maiores que 300 nm são facilmente reconhecidas pelo sistema imune, opsonizadas e removidas da circulação pelas células do fagocitário mononuclear (LI *et al.*, 2012; MAEDA *et al.* 2009; TORCHILIN, 2011) O IP reflete a distribuição do tamanho das vesículas na dispersão coloidal e pode variar de 0,0 (para sistemas totalmente monodispersos) a 1,0 (para sistemas totalmente polidispersos). Os CLN apresentaram valores de IP menores que 0,3, o que indica boa homogeneidade do sistema, sendo assim compatível para administração endovenosa (YOON *et al.*, 2013).

O potencial zeta da nanoformulação apresentou valor negativo e elevado (em módulo). Este valor elevado pode ser atribuído à ionização do ácido oleico, que está em excesso na composição. Potencial zeta acima de 25 mV, em módulo, confere maior estabilidade à formulação, pois a repulsão eletrostática entre as partículas evita a agregação entre elas (MULLER & MADER, 2000).

O alto teor de encapsulação se deve à formação de um par iônico entre a doxorrubicina e o ácido oleico (Figura 10), que é capaz de aumentar a lipofilicidade da doxorrubicina, fármaco hidrofílico, fazendo com que fique retida na matriz lipídica. Nessa formulação, o DHA age como o lipídio líquido,

conferindo imperfeições na estrutura cristalina o que pode levar a maior acomodação das moléculas dos fármacos, além do controle da sua liberação (MUSSI, 2013).

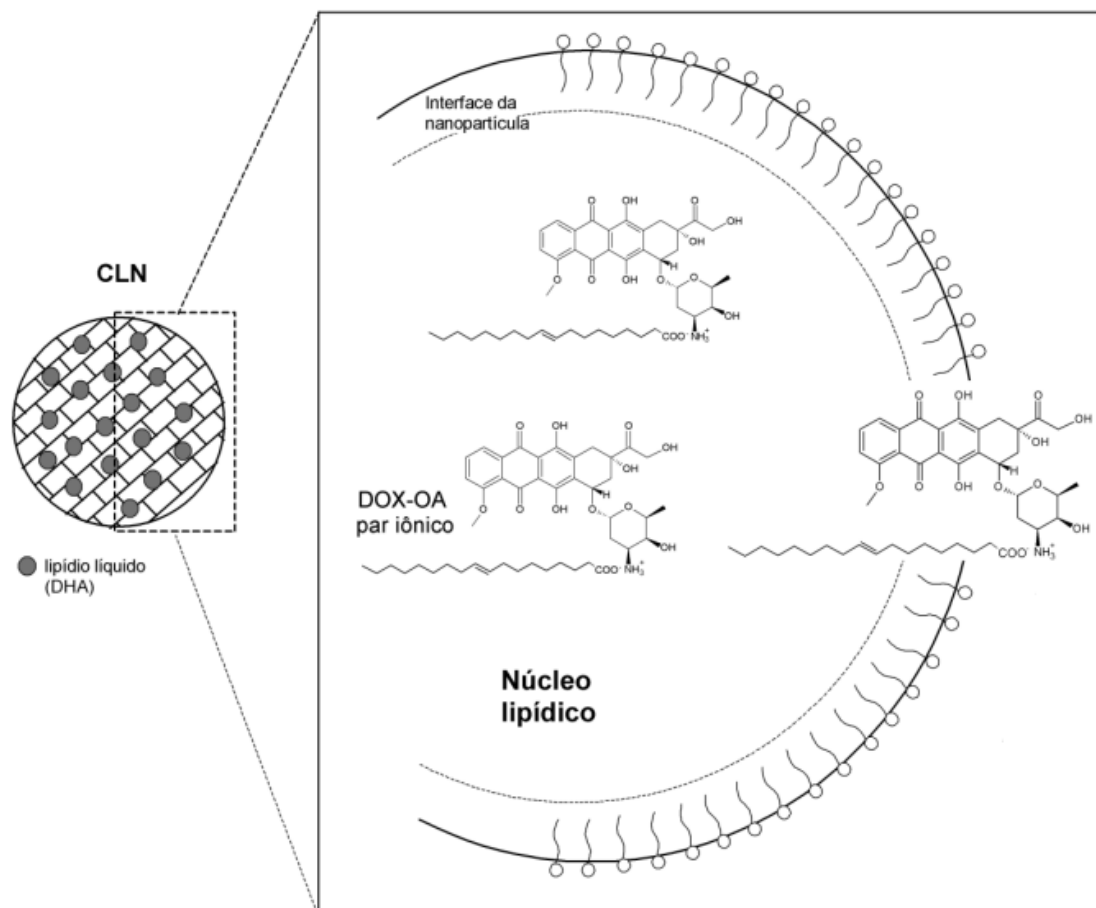


Figura 10. Esquema de um CLN carregado com doxorrubicina como par iônico com ácido oleico e DHA como lipídio líquido (círculos cinzas) (MUSSI, 2013).

4.2. PUREZA RADIOQUÍMICA E ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX

O complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX apresentou pureza radioquímica igual a $95,31\% \pm 0,92$ ($n = 5$). Esses resultados foram altamente reprodutíveis durante todo o período de experimentos.

A presença de impurezas radioquímicas resulta em imagens de baixa qualidade devido à alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e no sangue, além de expor o paciente a uma dose desnecessária de radiação (THEOBALD, 1990). Por isso, é preconizado na literatura que o rendimento de marcação de um produto para estudos de biodistribuição seja superior a 90% (TRHALL &

ZIESSMAN, 2003; SAHA, 2010; USP, 2012). Desta forma, o complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX apresentou resultados satisfatórios para os estudos subsequentes.

O complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX foi caracterizado quanto ao diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação e os valores estão apresentados na tabela 3. Pode-se observar um aumento significativo no diâmetro da formulação, bem como uma diminuição do potencial zeta em comparação com os CLN não marcados. Isso provavelmente se deve à complexação com os átomos de tecnécio, que têm caráter positivo. A diminuição significativa do IP provavelmente se deve à etapa de filtração em filtro 0,22 μm , no qual populações maiores que 200 nm ficam retidas no filtro. O teor de encapsulação não foi afetado significativamente, o que indica que a marcação não interfere na liberação do fármaco. Esses dados sugerem que o processo de radiomarcagem não interfere na integridade da partícula, e, muito provavelmente, ocorre na superfície da nanoestrutura.

Tabela 3. Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX*

Tamanho (nm)	72,5 \pm 2,6
IP	0,139 \pm 0,006
Potencial zeta (mV)	-21,7 \pm 2,2
%TE	95,73 \pm 3,27

* Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n =3).

A figura 11 mostra a estabilidade do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX, em função do tempo, em salina e em plasma de camundongo a 37°C.

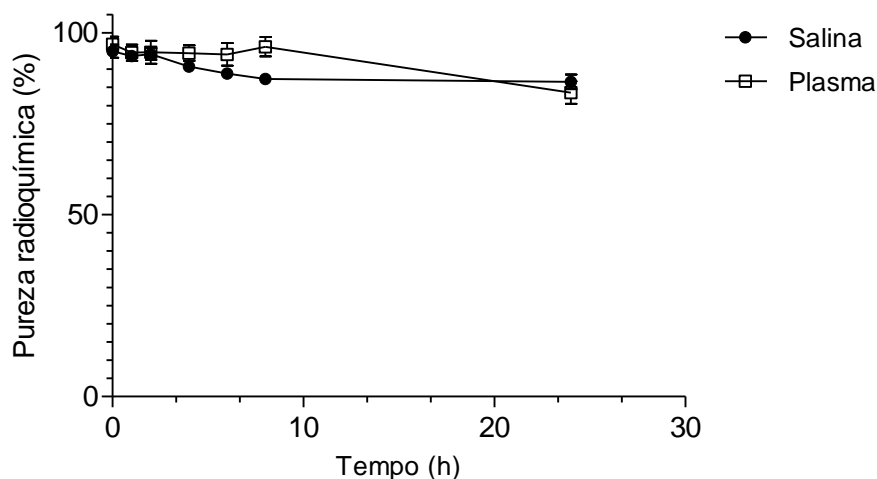


Figura 11. Curva da pureza radioquímica em função do tempo para o complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em salina e em plasma de camundongo.

O complexo apresentou alta estabilidade nos intervalos de tempos avaliados, mantendo-se pureza radioquímica próxima a 90% mesmo após 24 horas. Esses achados estão em consonância com aqueles descritos por REDDY *et al.* (2005), os quais descreveram alta estabilidade para NLS marcadas com tecnécio-99m e carregadas com etoposídeo.

É de extrema importância que a ligação entre o radioisótopo e o agente de interesse seja estável ao longo do tempo. Caso contrário, pode haver erros de interpretação dos dados farmacocinéticos e de biodistribuição, uma vez que o destino do tecnécio livre não reflete a distribuição do nanocarreador e o objeto de acompanhamento passa a ser o radionuclídeo livre no organismo (de BARROS *et al.*, 2012). Portanto, esses resultados credenciam a formulação CLN-DHA-DOX marcada com tecnécio-99m aos estudos em animais, como determinação do perfil de depuração sanguínea, biodistribuição e imagem.

4.3. PUREZA RADIOQUÍMICA E ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA ^{99m}Tc -DOX

O complexo ^{99m}Tc -DOX apresentou pureza radioquímica igual a $98,62 \pm 0,44$ (n=5). Esses resultados foram altamente reprodutíveis durante todo o período de experimentos, além de adequados para experimentos *in vivo*, por apresentarem rendimento de marcação superior a 90%.

A figura 12 mostra a estabilidade do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$, em função do tempo, em salina e em plasma de camundongo a 37°C . Pode-se observar que o complexo apresentou alta estabilidade nos intervalos de tempos avaliados, mantendo-se pureza radioquímica próxima a 90% mesmo após 24 horas. Esse achado encontra-se de acordo com estudos anteriores, os quais mostraram alta estabilidade da doxorubicina marcada pelo tecnécio-99m até 24 horas (KUMAR *et al.*, 2011; DATIR *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2004). Assim como relatado para a partícula CLN-DHA-DOX a alta estabilidade do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ possibilita o seu estudo em animais para determinação do perfil de depuração sanguínea, biodistribuição, além da aquisição de imagens cintilográficas.

A encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ nos CLN não foi possível, uma vez que ocorre uma competição pelo grupo amino da doxorubicina. Esse grupo químico é responsável tanto pela complexação da doxorubicina com o tecnécio, quanto pela formação do par iônico com o ácido oleico. Além disso, o processo do preparo da formulação também foi prejudicial para a complexação da doxorubicina com o tecnécio.

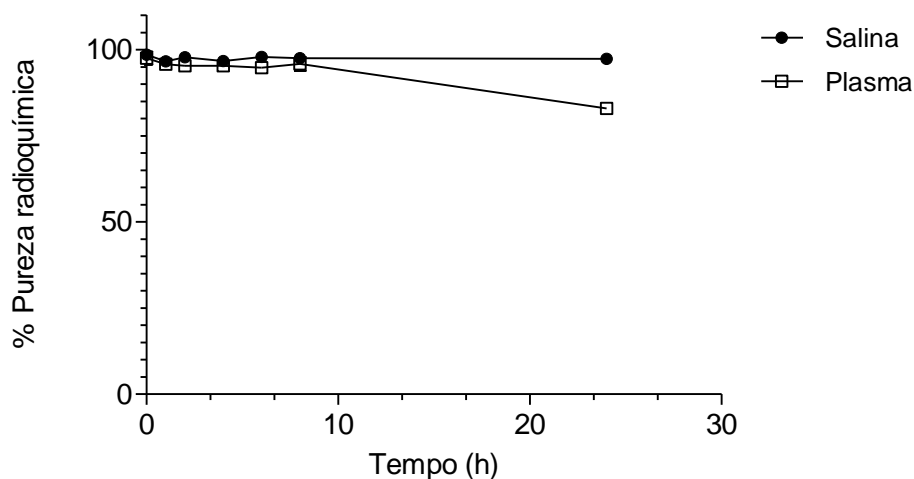


Figura 12. Curva da pureza radioquímica em função do tempo para o complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ em salina e em plasma de camundongo.

4.4. DEPURAÇÃO PLASMÁTICA EM ANIMAIS SADIOS

As curvas de depuração sanguínea, para ambos complexos radiomarcados, estão representadas na figura 13. Os parâmetros farmacocinéticos estão representados na tabela 4.

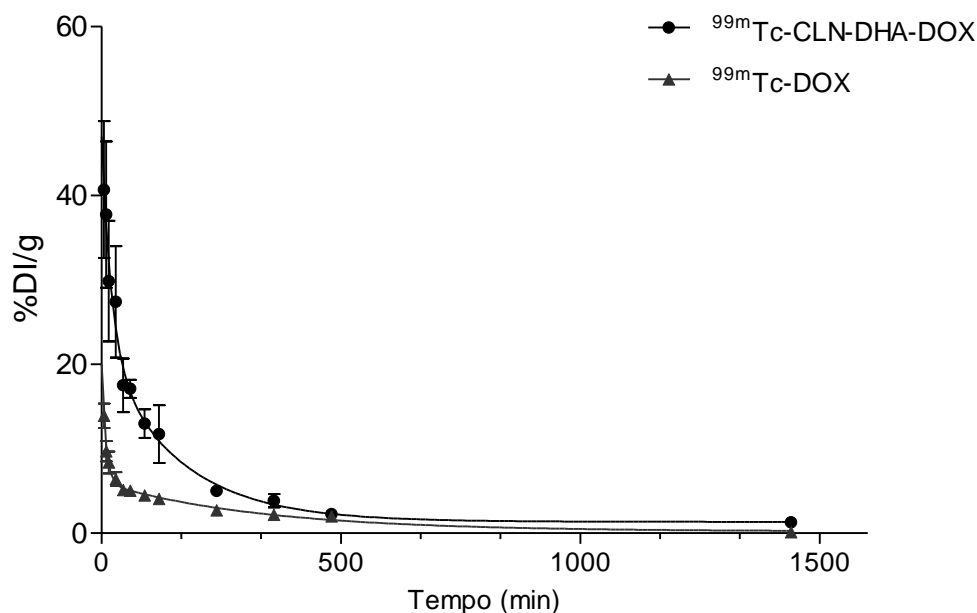


Figura 13. Curva da depuração sanguínea para os complexos $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ e $^{99m}\text{Tc-DOX}$ em animais BALB/c (n=5).

Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos para $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ e $^{99m}\text{Tc-DOX}$

	$^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$	$^{99m}\text{Tc-DOX}$
$T_{1/2\ \alpha}$ (min)	38,69	4,45
$T_{1/2\ \beta}$ (min)	516,5	277,2
ASC (%ID·min ⁻¹)	5796	2633

$T_{1/2\ \alpha}$ = tempo de meia vida de distribuição; $T_{1/2\ \beta}$ tempo de meia vida de eliminação;

ASC=área sob a curva

Observa-se um decaimento bifásico para os dois complexos, com tempos de circulação relativamente longos. O $T_{1/2\ \alpha}$ do CLN é 8,6 vezes maior que aquele observado para a doxorrubicina livre, ou seja, a nanopartícula circula por um tempo maior até que comece a ser eliminada pelo organismo. Há um aumento de quase duas vezes para o $T_{1/2\ \beta}$ e área sob a curva da formulação (ASC), ou

seja, o tempo necessário para a eliminação da formulação também é maior quando comparada à doxorubicina livre.

BELOQUI *et al.* (2013), também encontraram longo tempo de circulação para CLN, uma vez que o complexo radiomarcado se mostrou estável por mais de 24 horas, e a radioatividade pode ser detectada no sangue 24 horas após a administração nos animais.

LU *et al.* (2014), avaliaram o potencial de um carreador micelar PEGlado carregado com doxorubicina. Nesse estudo, realizado em camundongos BALB/c, foi encontrado um tempo de meia vida de 4,41 horas para a doxorubicina livre, além do aumento significativo do tempo de meia vida para as micelas PEGladas.

O diâmetro reduzido da ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX, combinado com a presença de um tensoativo hidrofílico (Tween 80) podem justificar o tempo de circulação prolongado da formulação. O Tween 80 apresenta cadeias de polietilenoglicol (PEG), as quais apresentam potencial para promover propriedades furtivas para as nanopartículas. Modificação da superfície por adição de PEG é uma estratégia já bem estabelecida para prolongar o tempo de meia vida de nanocarreadores (BELOQUI *et al.*, 2013).

O uso de PEG para aumentar o tempo de circulação de nanossistemas foi descrito primeiramente para lipossomas. O revestimento de nanopartículas com PEG resulta na formação de uma camada polimérica na superfície da partícula, que é impermeável a outros solutos e impede, estericamente, a interação e ligação dos componentes sanguíneos com a sua superfície, impedindo assim a opsonização do carreador e captura pelo SFM (TORCHILIN, 2009).

4.5. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS SADIOS

O perfil de biodistribuição 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX e ^{99m}Tc -DOX estão representados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ em animais sadios 1, 4 e 8h após a administração. (n = 6)

Órgãos	1 hora*	4 horas*	8 horas*
Fígado	44,55 ± 5,99	41,26 ± 1,59	43,10 ± 3,14
Baço	18,20 ± 2,51	15,01 ± 1,16	16,23 ± 2,55
Rins	11,82 ± 1,00	6,08 ± 0,43	6,84 ± 2,61
Estômago	1,66 ± 0,96	0,21 ± 0,08	1,39 ± 1,00
Tireoide	1,08 ± 0,13	0,61 ± 0,10	0,90 ± 0,34
Coração	1,76 ± 0,22	0,99 ± 0,06	0,97 ± 0,25
Pulmões	2,38 ± 0,20	1,06 ± 0,05	1,42 ± 0,55
Intestino delgado	10,21 ± 1,51	2,39 ± 0,51	2,77 ± 0,74
Intestino grosso	0,38 ± 0,14	7,01 ± 1,01	0,25 ± 0,08
Músculo	0,59 ± 0,18	0,41 ± 0,19	0,56 ± 0,66

*Todos os dados foram expressos como média da dose injetada do $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ por grama de tecido, ± desvio padrão.

Tabela 6. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ em animais sadios 1, 4 e 8h após a administração. (n = 6)

Órgãos	1 hora*	4 horas*	8 horas*
Fígado	5,86 ± 0,37	4,90 ± 0,49	4,81 ± 0,40
Baço	5,17 ± 0,72	4,61 ± 0,59	3,85 ± 0,70
Rins	22,28 ± 2,08	21,29 ± 1,53	15,24 ± 0,49
Estômago	1,22 ± 0,36	1,45 ± 0,18	1,78 ± 0,56
Tireoide	1,12 ± 0,09	1,10 ± 0,16	0,80 ± 0,11
Coração	0,74 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,46 ± 0,06
Pulmões	1,47 ± 0,14	0,86 ± 0,07	1,08 ± 0,11
Intestino delgado	7,19 ± 0,27	2,66 ± 0,23	4,52 ± 0,38
Intestino grosso	0,63 ± 0,08	10,56 ± 1,23	0,48 ± 0,08
Músculo	0,42 ± 0,11	0,25 ± 0,09	0,25 ± 0,07

*Todos os dados foram expressos como média da dose injetada do $^{99m}\text{Tc-DOX}$ por grama de tecido, ± desvio padrão.

Para a doxorrubicina livre, pode-se observar um maior acúmulo nos rins, seguido pelo fígado e intestinos, o que indica as vias de excreção, tanto renal, quanto hepática-biliar, do fármaco. Esses resultados também podem ser confirmados pelas imagens cintilográficas (Figura 14). KUMAR et al (2011),

REDDY et al (2004) e ARAUJO et al (2015) encontraram um perfil de biodistribuição similar para a doxorubicina marcada com o tecnécio-99m. WEI et al (2012), encontraram, em um estudo utilizando a técnica de fluorescência para quantificação, um perfil similar de distribuição, o que indica que a presença do átomo de tecnécio não altera a farmacocinética do fármaco.

Os estudos de biodistribuição, bem como as imagens cintilográficas (figura 15), mostraram que o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ apresenta maior captação em órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), como fígado e baço, quando comparado com os dados obtidos nos estudos com o complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ livre. Esses achados estão em consonância com a literatura, uma vez que já é amplamente descrito que nanopartículas são rapidamente opsonizadas e retiradas da circulação por macrófagos do SFM (SNEHALATHA et al., 2008; HALEY et al., 2008). Além disso, também houve captação nos rins e intestino, indicando a metabolização e eliminação das nanopartículas do organismo.

Pode-se observar que a captação do coração é maior para a formulação em comparação com o fármaco livre, em todos os tempos analisados. No entanto, essa captação, provavelmente, não reflete em maior acúmulo pelo órgão em si, mas sim, ao maior tempo de circulação sanguínea da formulação. Ou seja, a maior concentração dos CLN no sangue, que circula pelo coração, reflete a uma captação aparentemente maior para o órgão.

Pode-se observar também que, para ambos complexos, os demais órgãos avaliados, principalmente estômago e tireoide, apresentaram baixa captação durante todo o experimento. Esse dado é de extrema relevância, pois sugere que o teor de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, uma das impurezas radioquímicas decorrente do processo de marcação, e o tecnécio em sua forma livre, decorrente de baixa estabilidade do sistema, estão dentro dos limites preconizados, uma vez que é sabido que sua captação ocorre, preferencialmente, por tireoide e estômago. (THRALL & ZIESSMAN, 2003).

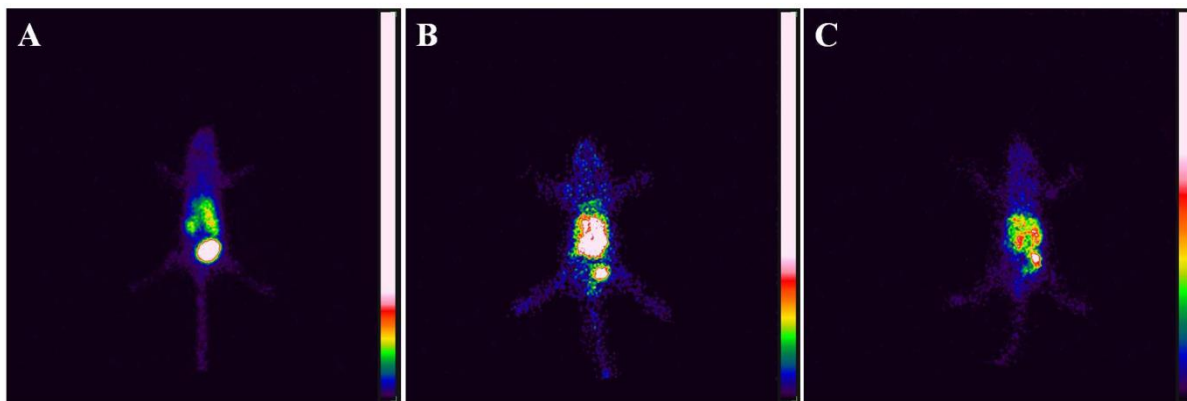


Figura 14. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -DOX em camundongos BALB/c sadios. A-1 hora; B- 4 horas, C-8 horas.

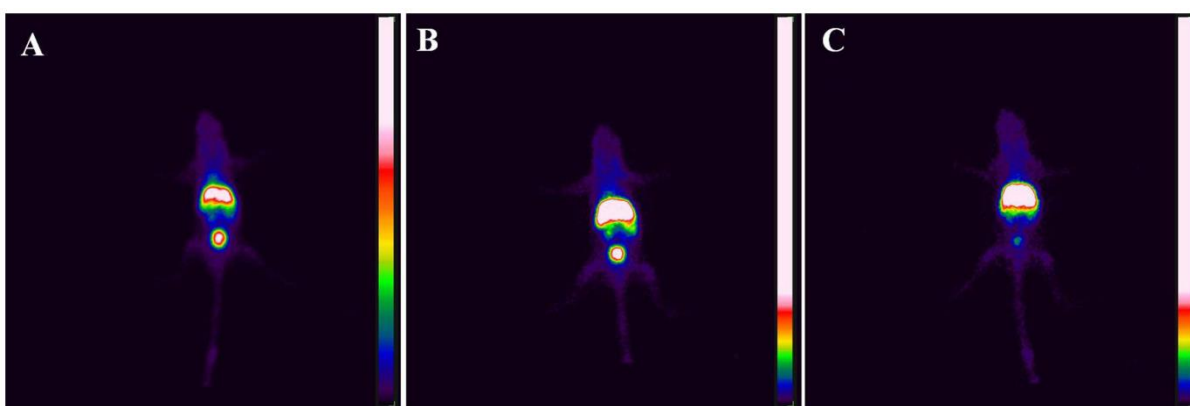


Figura 15. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em camundongos BALB/c sadios. A-1 hora; B- 4 horas, C-8 horas.

4.6. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS COM TUMOR DE MAMA MURINO 4T1

As figuras 16 e 17 representam o perfil de biodistribuição em animais acometidos com tumor de mama murino 4T1, para ^{99m}Tc -DOX e ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX, respectivamente.

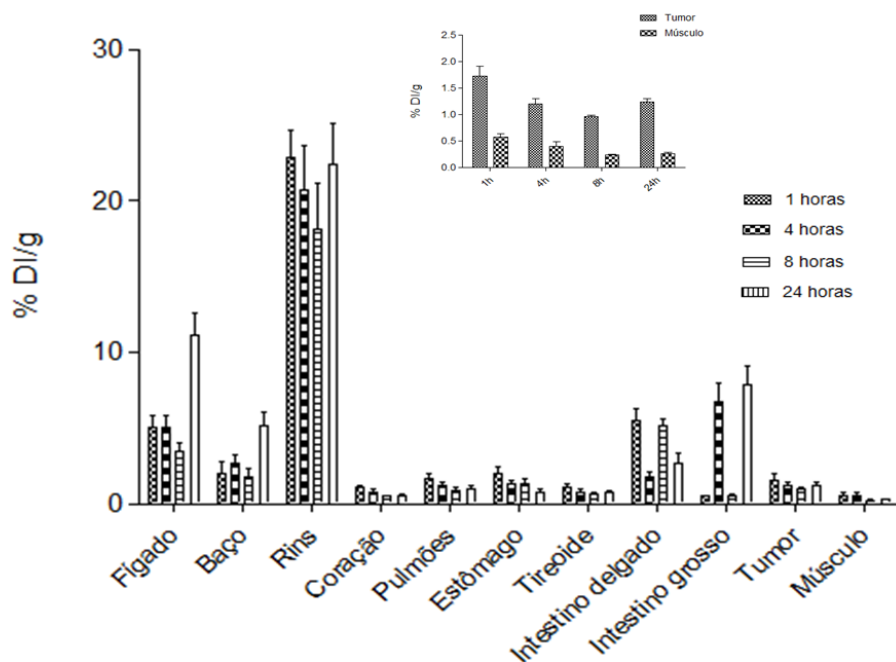


Figura 16. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$, após administração intravenosa, em animais BALB/c acometidos pelo tumor de mama murino 4T1 ($n = 6$) (Inset: captação pelo tumor e músculo 1, 4, 8 e 24 h após a injeção). Todos os dados foram expressos como média da dose injetada de $^{99m}\text{Tc-DOX}$ por grama de tecido, \pm desvio padrão.

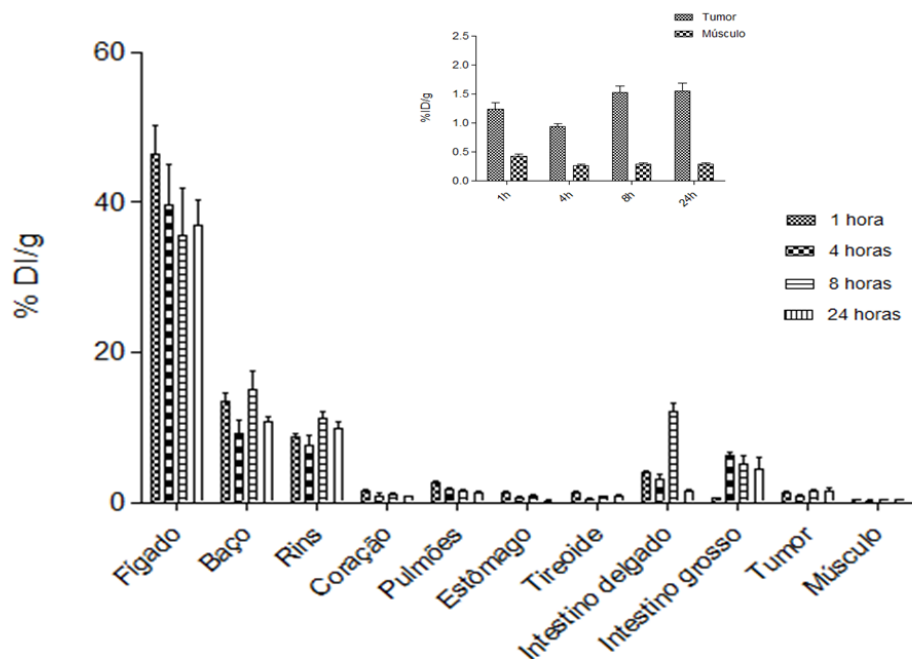


Figura 17. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$, após administração intravenosa, em animais BALB/c acometidos pelo tumor de mama murino 4T1 ($n = 6$) (Inset: captação pelo tumor e músculo 1, 4, 8 e 24 h após a injeção). Todos os dados foram expressos como média da dose injetada de $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ por grama de tecido, \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas no perfil de excreção, quando comparados com aqueles obtidos em animais saudáveis, ou seja, observou-se elevada captação renal e hepática para a doxorubicina livre e alta captação hepática para o CLN. Pode-se observar também que houve maior captação pelo tumor, quando comparado com o músculo contralateral, em todos os tempos observados, para os dois complexos estudados.

As imagens cintilográficas obtidas (Figuras 18 e 19) também apresentaram maior captação pelo tumor quando comparado ao músculo controle (pata contra lateral) para os dois complexos em todos os tempos observados.

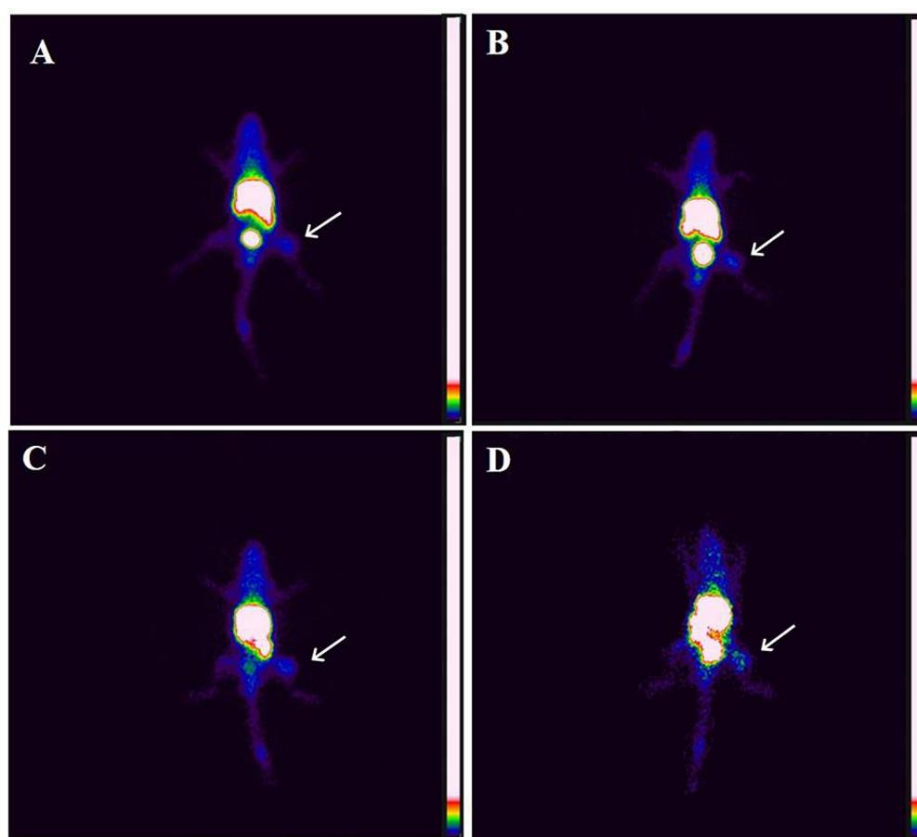


Figura 18. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -CLN-DHA-DOX em camundongos BALB/c com tumor de mama murino 4T1. A-1 hora; B- 4 horas, C- 8 horas, D-24 horas.

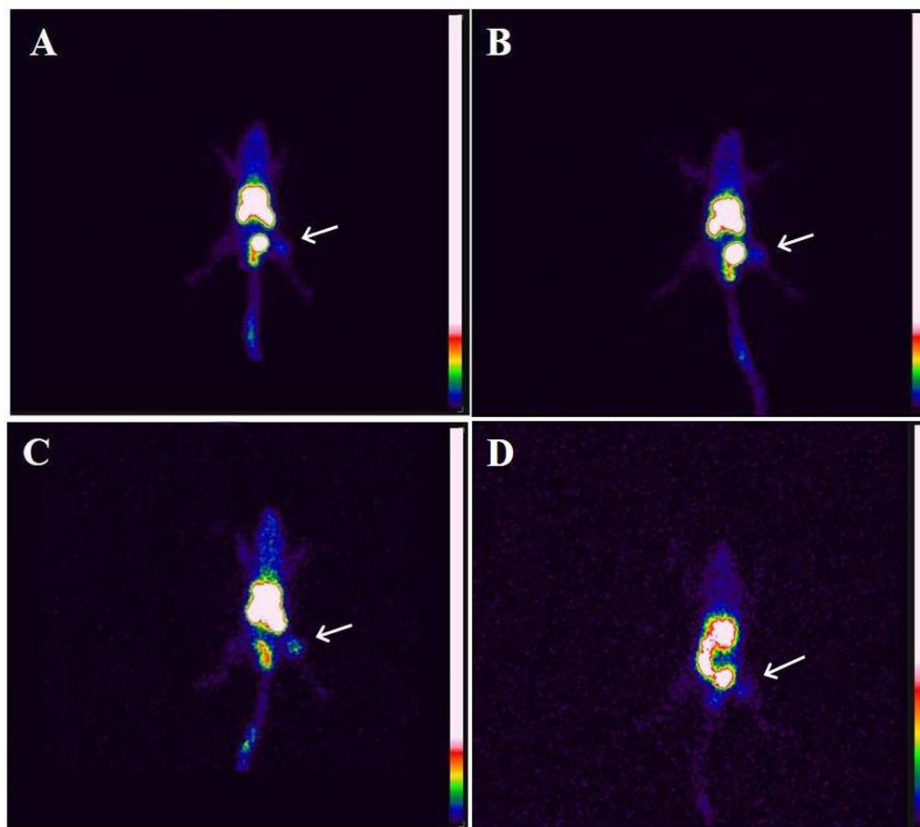


Figura 19. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -DOX em camundongos BALB/c com tumor de mama murino 4T1. A-1 hora; B- 4 horas, C-8 horas, D- 24 horas.

Analisando as relações tumor/músculo e tumor/sangue (figura 20), bem como a relação alvo/não alvo, obtida a partir da quantificação das imagens cintilográficas (figura 21), pode-se sugerir maior especificidade da formulação pelo tecido tumoral quando comparado com a doxorrubicina livre.

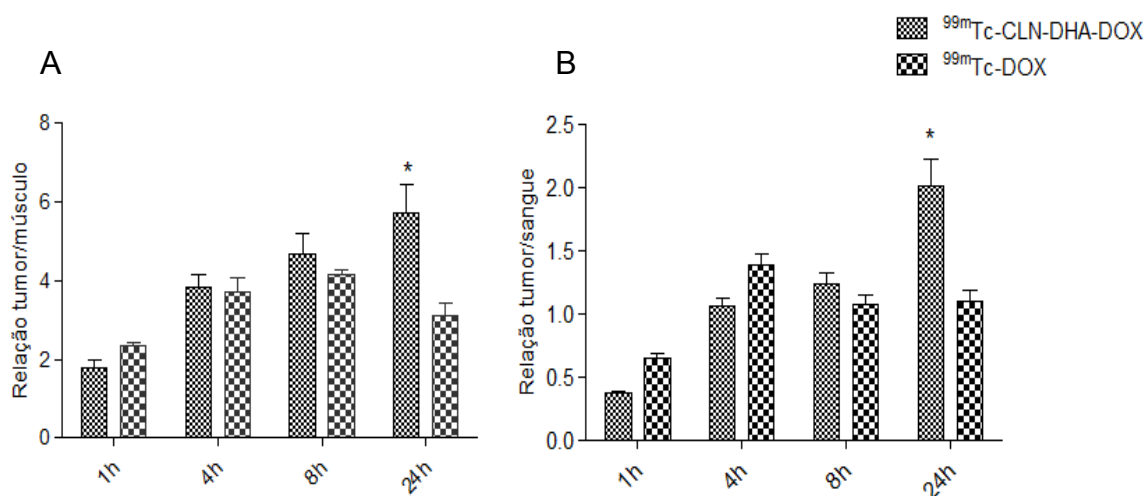


Figura 20. Relações tumor/músculo (A) e tumor/sangue (B) para os complexos radiomarcados 1, 4, 8 e 24 h após a administração. Asterisco significa diferença significativa entre os grupos no tempo investigado ($p < 0,05$).

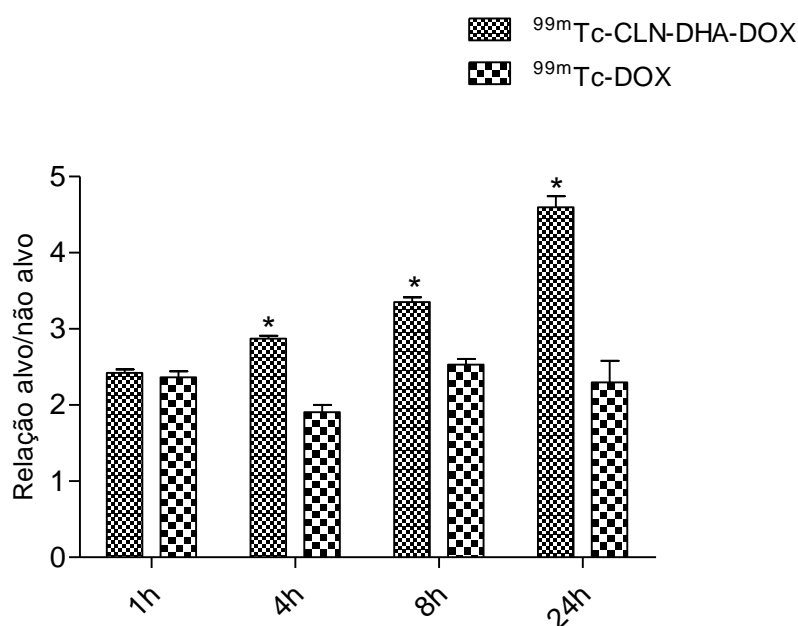


Figura 21. Relações alvo/não alvo, obtidas através da quantificação das imagens cintilográficas 1, 4, 8 e 24 horas após a administração dos complexos radiomarcados. Asterisco indica diferença significativa entre os grupos no tempo investigado ($p < 0,05$).

Pode-se observar um aumento gradual e significativo nas relações para a $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ em função do tempo. As altas relações tumor/músculo indicam maior afinidade do complexo pelo tecido tumoral. No tempo de 24 horas a captação do complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ pelo tumor foi

aproximadamente 6 vezes maior que a captação pelo músculo, enquanto para o complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$ essa relação foi aproximadamente 3 no mesmo tempo analisado. Estes achados sugerem que a nanopartícula acumula cerca de duas vezes mais no tumor que o fármaco livre após 24 horas da administração. Esse acúmulo se deve, além do longo tempo de circulação apresentado pela formulação, provavelmente, ao efeito EPR, uma vez que permite o acúmulo de nanopartículas ao tecido tumoral, devido às fenestrações dos vasos sanguíneos, e dificulta sua eliminação, devido ao colapso dos vasos linfáticos (YUAN *et al.*, 1995; LEU *et al.*, 2000; MAEDA *et al.*, 2000; CARMELIET & JAIN, 2000; MUNN *et al.*, 2003; GOSH *et al.*, 2008).

Os valores da relação tumor/sangue, principalmente em 24 horas, podem confirmar essa hipótese. No tempo de 24 horas, a relação tumor/sangue para o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ foi igual a 2, ou seja, a captação do tumor foi o dobro da captação do sangue. Isso sugere que o acúmulo no tecido tumoral não se deve apenas à vascularização na região.

Os estudos de biodistribuição são uma importante ferramenta para ensaios pré-clínicos com o intuito de avaliar novas formulações com direcionamento ao tecido tumoral. No entanto, para uma efetiva translação para a clínica se faz necessário o uso de técnicas menos invasivas que viabilizem o estudo em humanos. Neste contexto, a obtenção de imagens cintilográficas é uma poderosa alternativa para obter dados quantitativos, reprodutíveis e por um método praticamente não invasivo.

Por meio da análise das imagens é possível obter as relações alvo (tumor)/ não alvo (músculo contra lateral), assim como foi realizado para os estudos de biodistribuição. Como esperado, nas imagens também foi possível observar um acúmulo preferencial no tumor pela formulação em tempos mais longos. Diferentemente do encontrado na biodistribuição, a partir de 4 horas já foi possível observar diferença estatística nas relações alvo/não alvo para o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ em comparação com as relações obtidas após administração do complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$. Essa discrepância pode ser devido às diferenças de sensibilidade apresentadas pelas técnicas. No entanto, cabe ressaltar que no tempo de 24 horas após a administração, a relação para o

CLN foi aproximadamente o dobro daquela encontrada para $^{99m}\text{Tc-DOX}$. Essa proporção segue o perfil encontrado nos estudos de biodistribuição.

REDDY et al (2005) também obtiveram maior acúmulo no tumor principalmente 24 horas após a administração, em um estudo avaliando a biodistribuição de NLS carregadas com etoposídeo em camundongos portadores de linfoma de Dalton.

ELBAYOUMI E TORCHILIN (2009) marcaram com índio-111, lipossomas de circulação prolongada, carregados com doxorubicina, modificados com anticorpos monoclonais, para estudos de biodistribuição. Também houve um maior acúmulo da formulação pelo tumor 24 h e até 48 h após a administração em camundongos portadores do tumor de mama murino 4T1.

5. CONCLUSÕES

Foi possível obter os complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ e $^{99m}\text{Tc-DOX}$ com alta pureza radioquímica com estabilidade satisfatória até 24 horas. Para o complexo $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ observou-se aumento do tamanho e diminuição do potencial zeta em comparação com o CLN não marcado, mas sem comprometimento da nanoestrutura

Os estudos em animais sadios demonstraram o ganho no tempo de meia vida e área sob a curva para $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ comparado ao complexo $^{99m}\text{Tc-DOX}$.

Os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas para $^{99m}\text{Tc-DOX}$ demonstraram acúmulo renal e hepático, o que indica as vias de eliminação do fármaco, além de baixo acúmulo em tireoide e estômago, indicando estabilidade do complexo radiomarcado.

Os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas para $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ demonstraram acúmulo hepático, esperado para nanopartículas devido à captação pelo SFM, além de baixo acúmulo em tireoide e estômago, indicando estabilidade do complexo radiomarcado.

Os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais acometidos pelo tumor de mama murino 4T1 demonstraram que ambos complexos radiomarcados apresentam maior acúmulo no tumor quando comparado com o músculo contra-lateral. No entanto, pode-se sugerir que $^{99m}\text{Tc-CLN-DHA-DOX}$ apresenta maior afinidade pelo tecido tumoral, devido as altas razões tumor/sangue e tumor/músculo no tempo de 24 horas.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade antitumoral de CLN carregados com doxorubicina e DHA em modelo experimental de câncer de mama

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos mostrando o potencial das NLS e dos CLN como sistemas carreadores de fármacos antitumorais têm sido descritos. No entanto, ainda existem poucos trabalhos descrevendo a atividade antitumoral desses sistemas em modelos animais.

MUSSI *et al.* (2015) demonstraram, através do estudo em animais portadores do tumor de mama murino 4T1, que CLN carregadas com doxorubicina e modificadas com PEG foram capazes de melhorar a farmacocinética do fármaco livre levando ao maior acúmulo no tumor resultando na inibição do crescimento tumoral.

O modelo experimental 4T1 é uma linhagem celular altamente tumorigênica, pouco imunogênica, com características de crescimento e metástases semelhantes a um tumor de mama humano em estágio IV (GARCIA, 2014). Estudos anteriores já demonstraram seu uso como um modelo na terapia experimental do câncer. Além disso, esse modelo vem sendo usado para explorar o potencial de novas terapias anti-angiogênicas e tratamento com múltiplos quimioterápicos (GARCIA, 2014; PULASKI, 2000).

Os resultados *in vitro* obtidos por MUSSI *et al.* (2013) sugerem os CLN carregados com doxorubicina e DHA como uma ferramenta promissora para o tratamento de tumores. Desta forma, torna-se evidente o interesse em investigar o potencial antitumoral *in vivo* dessa formulação.

Nesse capítulo, portanto, está descrito o estudo da atividade antitumoral da formulação carregada com doxorubicina e DHA em modelo experimental de tumor de mama, da linhagem 4T1. Além disso, estudos preliminares de toxicidade foram conduzidos para avaliar a segurança dessa formulação.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os diferentes CLN para os diferentes tratamentos (CLN-branca, CLN-DOX, CLN-DHA-DOX);
- Caracterizar os CLN quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, teor de encapsulação;
- Avaliar, comparativamente, a atividade antitumoral das formulações CLN-DHA-DOX, CLN-DOX, CLN-branca, e da doxorubicina livre, por meio da medida do volume do tumor, cálculo da inibição de crescimento do tumor e análises histopatológicas dos tumores;
- Avaliar o potencial das formulações em inibir o aparecimento de metástases por meio da análise histológica do pulmão;
- Avaliar a sobrevivência dos animais tratados com as formulações CLN-DHA-DOX, CLN-branca e com a doxorubicina livre;
- Avaliar a toxicidade dos tratamentos por meio da variação do peso dos animais e análises histopatológicas de órgãos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Os meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, e *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*, soro fetal bovino (SFB), gentamicina, penicilina e estreptomicina foram comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). A solução de xilazina (Dopaser® 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%) foi fornecida pela Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

Os camundongos BALB/c foram adquiridos do Biotério Central da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração, na sala de experimentação animal do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 293/2014 (ANEXO 2).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo das formulações e solução de doxorrubicina

As formulações foram preparadas conforme descrito no item 3.2.1 do capítulo 1. Foram utilizadas: formulação CLN-DHA-DOX (0,5 mg/ml), uma formulação em que o DHA foi substituído pelo óleo de sésamo, lipídeo líquido sem atividade, (CLN-DOX), também na concentração de 0,5 mg/ml e uma formulação sem a incorporação da doxorrubicina (CLN-branca), na qual o DHA também foi substituído. Para a veiculação do fármaco livre, foi preparada uma solução aquosa de cloridrato de doxorrubicina, com concentração de 0,72 mg/ml.

3.2.2. Caracterização das formulações

As formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação, conforme descrito no item 3.2.2 do capítulo 1.

3.2.3. Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos

O câncer mamário murino 4T1 foi desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas com 7-8 semanas de vida. Os camundongos foram mantidos em área com controle de luminosidade, com livre acesso a água e ração. As células 4T1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina 100UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml, em câmara com 5% de CO₂, 95% de umidade e 37°C. Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com o Trypan Blue. A concentração da suspensão de 4T1 foi ajustada para 2,5 x 10⁶ células em 50 µL e injetada (SC) na coxa direita dos animais.

3.2.4. Tratamento

No sétimo dia após o inóculo, quando os tumores se apresentaram palpáveis, com cerca de 100 mm³, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, os quais receberam solução de DOX, CLN-DHA-DOX, CLN-DOX e CLN-branca. A administração dos diferentes tratamentos foi realizada por via intravenosa, perfazendo um total de 4 administrações com intervalo de 2 dias entre as mesmas. A dose de DOX administrada foi igual a 4,0 mg/kg/dia. O primeiro dia de administração foi considerado o dia 0 do estudo e, as formulações foram administradas nos dias 0 (D0), 2 (D2), 4 (D4) e 6 (D6) - (Figura 22). O acompanhamento dos animais foi feito até o dia 10 (D10) a partir do início do tratamento, correspondente ao 17º dia após o inóculo. Nesse dia, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/kg), eutanasiados e os tumores, coração, rins e pulmões foram removidos e armazenados em solução tamponada de formol 10% para posterior análise histopatológica.

Adicionalmente, foi avaliada a sobrevivência dos animais após o mesmo esquema de tratamento descrito. Os animais, mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica da UFMG, sem restrição de água e ração, foram tratados com CLN-branca, CLN-DHA-DOX e DOX livre. Os animais foram acompanhados diariamente e parâmetros como peso e volume tumoral foram avaliados. Animais que atingissem perda de peso superior a 20% ou volume tumoral superior a 1000 mm³ foram eutanasiados.

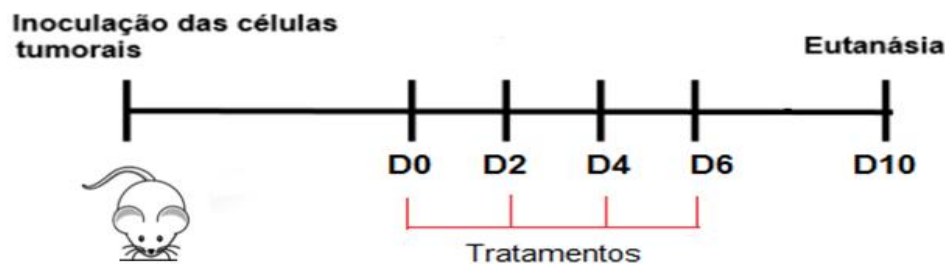


Figura 22. Esquema representativo do protocolo experimental para o estudo de atividade antitumoral

3.2.5. Volume Tumoral

As medidas foram realizadas a partir do início do tratamento, a cada dois dias. O volume do tumor foi determinado pela medida do menor e maior diâmetro tumoral, que representam, respectivamente, d_1 e d_2 . As medidas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, MIP/E-103). O volume tumoral foi calculado utilizando a seguinte equação (ROLLAND, 2009):

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

No final do período experimental, o volume relativo do tumor (VRT) em relação ao dia inicial (D0) foi mensurado, considerando-se o volume inicial como 100% e calculando-se a porcentagem de aumento ou redução do volume de acordo com esse volume inicial, de acordo com a seguinte equação (LEITE, 2012):

$$\text{VRT} = \text{volume tumoral em D10} / \text{volume tumoral em D0}$$

A porcentagem de inibição do crescimento do tumor (IC) também foi determinada mediante o emprego da seguinte fórmula (LEITE, 2012):

$$\text{IC} = 1 - (\text{VRT do grupo tratado} / \text{VRT do grupo controle}) \times 100$$

Foi realizado o controle de peso dos animais e calculada a variação conforme a equação:

$$\text{Variação de peso (g)} = \text{Peso em D10} - \text{Peso em D0}$$

3.2.6. Avaliação histopatológica dos órgãos

Para análise histopatológica, os tumores, os rins, o coração e os pulmões foram removidos, lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e fixados em formol tamponado a 10% (v/v) por um período de 24 horas. Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μ m de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico conectado a uma câmera digital Spot Insight Color adaptado a um microscópio Olympus BX-40 e o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5.

3.2.7. Análise estatística

Os valores médios e desvio-padrão (d.p) foram calculados para os experimentos. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey. Para variação do volume tumoral foi utilizado o modelo de regressão. Um nível de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Os valores de diâmetro médio das partículas, IP, potencial zeta e teor de encapsulação para as formulações utilizadas para o tratamento dos animais estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Valores de diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação das formulações CLN-branca, CLN-DHA-DOX e CLN-DOX

	CLN-branca	CLN-DHA-DOX	CLN-DOX
Diâmetro médio (nm)	60	69	65
IP	0,204	0,177	0,204
Potencial zeta (mV)	-31,9	-30,7	-26,30
TE (%)	-	95,41	96,30

As três formulações apresentaram características desejáveis para administração intravenosa. As diferenças observadas para o diâmetro e potencial zeta se devem, provavelmente, às diferenças na composição das formulações. A incorporação da doxorubicina, e/ou DHA, leva a um ligeiro aumento do tamanho do CLN. As três formulações apresentaram IP menor que 0,3, o que indica boa homogeneidade do sistema. O potencial zeta é negativo para as três formulações devido a ionização do ácido oleico, que é adicionado em excesso ao meio. O alto teor de encapsulação se deve ao par iônico formado entre a doxorubicina e ácido oléico.

4.2. VOLUME TUMORAL

Na figura 23 estão representadas as variações do volume tumoral em função do tempo para os diferentes tratamentos. Pode-se observar um aumento contínuo do volume do tumor para o grupo tratado com a CLN-branca (grupo controle). Para os animais tratados com solução de doxorubicina livre foi observado um menor crescimento do tumor em comparação ao grupo controle. No entanto, os animais que receberam o fármaco livre morreram até o dia 8 do experimento, sugerindo que a doxorubicina na dose avaliada apresenta

elevada toxicidade. Em contraste, quando o fármaco foi administrado em CLN (CLN-DOX e CLN-DHA-DOX) nenhuma morte foi observada, indicando a menor toxicidade das formulações empregadas. Adicionalmente, observou-se controle do crescimento tumoral para os animais tratados com as duas formulações.

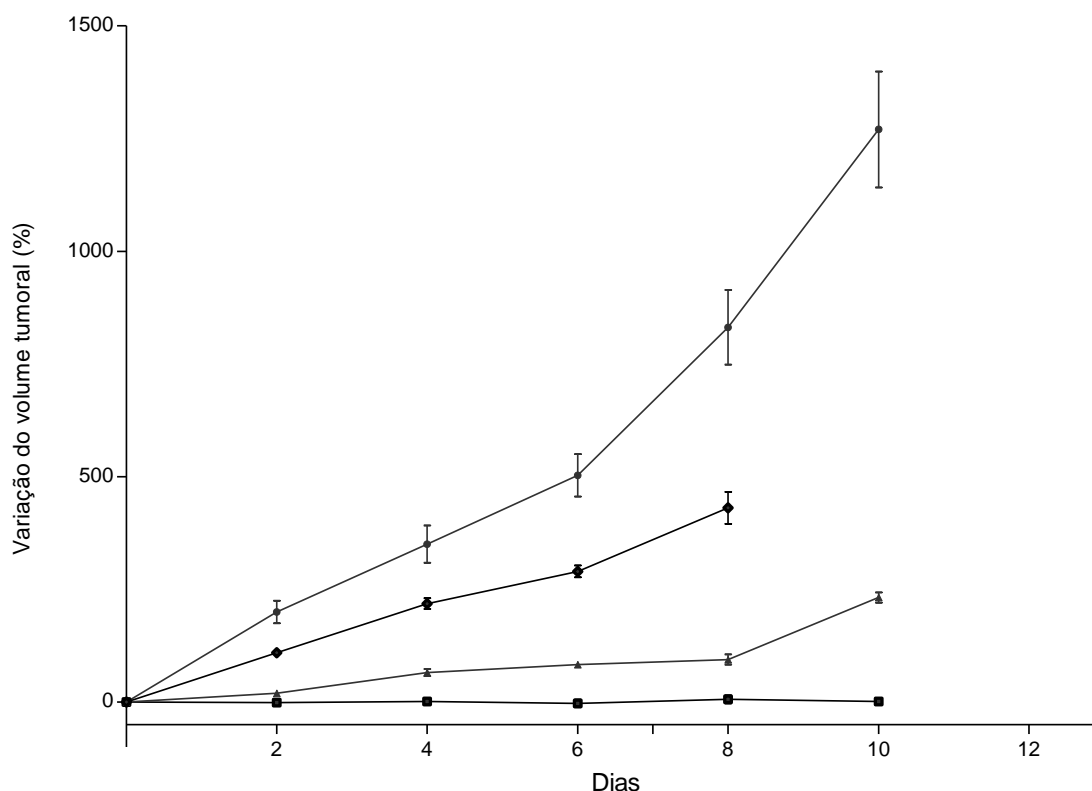


Figura 23. Variação do volume tumoral em função do tempo, para CLN-branca (○), DOX (◇), CLN-DOX (△) e CLN-DHA-DOX (□), na dose total de 16,0 mg/kg de doxorubicina (em forma de 4 doses de 4,0 mg/kg), administrados em camundongos BALB/c portadores do tumor de mama murino 4T1.

Os dados foram posteriormente avaliados por análise de regressão e, os diferentes modelos matemáticos utilizados, bem como os coeficientes de determinação, estão apresentados na tabela 8. Para o grupo tratado com CLN-DHA-DOX a análise de regressão permitiu definir um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,0075. No entanto, alguns estudos descrevem que para ensaios *in vivo* a regressão é aceita quando o valor de r^2 é igual ou maior que 0,8 (TAVARES, 2004). Por esse motivo, nenhum modelo de regressão foi aplicado a esse grupo experimental. Pode-se observar que a administração dessa formulação inibiu de maneira significativa o crescimento tumoral, como pode

ser evidenciado pela ausência de alteração do volume tumoral durante todo o período experimental (Figura 23). Esse fato justifica a ausência de equação a partir da análise de regressão para esse grupo.

Tabela 8. Análise de regressão da atividade antitumoral

Tratamento	Modelo de regressão	r²
CLN-branca	$y = 8,52x^2 + 34,85x + 39,37$	0,9899
DOX	$y = 52,1x + 1,26$	0,9250
CLN-DOX	$y = 2,03x^2 - 0,196x + 8,91$	0,9100
CLN-DHA-DOX	N.A	N.A

N.A não aplicável

No grupo de camundongos tratados com CLN-DOX também foi observada maior inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo tratado com DOX. A análise de regressão demonstrou diferença estatística significativa entre CLN-DOX e DOX livre, já que apresentaram modelos matemáticos diferentes, porém o CLN-DOX se mostrou menos efetivo no controle do crescimento tumoral quando comparado com o CLN-DHA-DOX. Esses dados sugerem que o DHA pode contribuir para potencializar o efeito antitumoral da formulação.

Os dados referentes ao volume relativo tumoral (VRT) e índice de inibição do crescimento (IC), que estão representados na tabela 9, confirmam a análise de regressão. Todos os grupos de tratamento apresentaram diferença significativa entre eles. Cabe ressaltar que o VRT do grupo CLN-DHA-DOX foi 10 vezes menor que aquele calculado para o grupo controle e aproximadamente 4 vezes menor que o VRT para grupo tratado com o fármaco livre. Mais uma vez é possível observar o efeito positivo do DHA na atividade antitumoral quando comparamos os valores de VRT para CLN-DHA-DOX e CLN-DOX. O grupo tratado com CLN contendo o DHA apresentou VRT 3 vezes menor que aquele tratado com a formulação sem DHA.

Similarmente ao VRT, a avaliação do percentual de inibição do crescimento (IC) permite comparar a eficácia do tratamento em comparação ao grupo não tratado. O grupo que recebeu o fármaco livre apresentou um IC igual a 56,2%. Esse valor foi inferior ao apresentado pelo grupo que recebeu a formulação

CLN-DOX (68,4%) e pelo grupo tratado com CLN-DHA-DOX (90,3%). Salienta-se que os dados de IC corroboram aqueles encontrados para o VRT.

Tabela 9. Valores de Volume Relativo Tumoral (VRT) e Inibição do Crescimento (IC) dos grupos em função do tratamento

Tratamento	VRT (média ± dp)	IC (%)
CLN-branca	10,57 ± 2,71 ^a	-
CLN-DHA-DOX	1,03 ± 0,43 ^b	90,3
CLN-DOX	3,34 ± 0,28 ^c	68,4
DOX¹	4,63 ± 0,43 ^d	56,2

¹Foi avaliado em D8, em função da morte dos animais antes do término do experimento. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Resultados expressos com média ± d.p (n = 6).

O nanocarreador constitui numa alternativa promissora para carrear fármacos ao local de ação o que pode favorecer o aumento da sua atividade antitumoral. A permeabilidade aumentada da vasculatura tumoral leva ao extravasamento de estruturas de tamanho nanométrico preferencialmente nessa região. Esse fato, associado à ausência de um sistema linfático, permitem um acúmulo e retenção das formulações, pelo já relatado efeito EPR. Em contrapartida, moléculas como a doxorubicina, apresentam trânsito livre no tumor levando ao menor acúmulo (WONG *et al.*, 2007a; TORCHILIN, 2011). Esse fato foi evidenciado pelos dados de biodistribuição e imagem cintilográficas apresentados no capítulo 1.

Há inúmeros estudos que demonstram o aumento da atividade antitumoral da doxorubicina incorporadas em diversos tipos de nanocarreadores. MASTRIA *et al.* (2015) utilizaram nanopartículas polipeptídicas carregadas com doxorubicina. Os autores relataram aumento da concentração do fármaco no tumor primário e aumento da taxa de sobrevivência em camundongos acometidos com tumor de mama murino 4T1 e Lewis Lung Carcinoma (LLC). Além disso, as nanopartículas foram capazes de inibir a formação de metástases.

Estudos demonstraram redução do volume tumoral e inibição de metástases pulmonares quando micelas poliméricas carregadas com doxorubicina e

curcumina foram administradas em modelo experimental 4T1 (SUN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

No entanto, existem poucos trabalhos descrevendo avaliações de atividade antitumoral de NLS ou CLN carregas com doxorrubicina em modelos animais. WONG *et al.* (2007b) observaram a diminuição do crescimento tumoral, após administração intratumoral de nanopartículas híbridas polímero-lipídicas carregas com doxorrubicina, em camundongos BALB/c com modelo tumoral murino EMT6/WT.

Adicionalmente pode-se observar uma potencialização do efeito da doxorrubicina pelo DHA na atividade antitumoral. SIDDIQUI *et al.* (2011) descreveram que a interação do DHA com agentes quimioterápicos pode ocorrer em vários níveis, incluindo sensibilização das células aos fármacos, aumento da captação celular, superação da resistência e redução dos efeitos adversos causados pelo fármaco. GUFFY *et al.* (1984) sugeriram que as células enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados podem ser mais susceptíveis à lipoperoxidação, o que resulta em danos à membrana plasmática.

Estudos mostraram aumento da atividade citotóxica da doxorrubicina contra células L1210 (leucemia), GLC4 (carcinoma de pulmão) e GLC4/Adr (carcinoma de pulmão resistente à doxorrubicina) suplementadas com DHA (SIDDIQUI *et al.*, 2011).

Outros estudos em animais também mostraram redução do volume tumoral em grupos suplementados com DHA durante o tratamento. COLAS *et al.* (2006) observaram a diminuição do crescimento do tumor, em ratos, durante o tratamento com epirrubicina. Surpreendentemente, autores relatam a superação da resistência do tumor ao fármaco. A quimiossensibilização do tumor pode ser explicada pela mudança da composição lipídica, após o contato com o DHA, uma vez que foi constatada alta quantidade do ácido graxo no tecido tumoral.

BOUGNOUX *et al.* (2009) realizaram um estudo clínico de fase II, com mulheres portadoras de câncer de mama metastático, suplementadas com

DHA por via oral. Os resultados indicaram que a incorporação de DHA é relevante para a eficácia da quimioterapia e seu potencial pode ser proporcional ao grau de incorporação pelas células. Observou-se, ainda, aumento na sobrevida das pacientes.

Em todos esses estudos a suplementação com DHA foi realizada por via oral, o que representa, portanto, limitações quanto à padronização da dose de DHA capaz de atingir, de fato, a região tumoral. Nesse contexto, a co-encapsulação em CLN surge como uma alternativa para superar essa limitação, devido ao acúmulo preferencial no tumor.

A busca por novas alternativas terapêuticas para o câncer visa desenvolver fármacos ou formulações potencialmente eficazes, mas, sobretudo, com baixa toxicidade. Peso corporal é um parâmetro utilizado como indicativo de efeitos tóxicos, uma vez que animais debilitados teriam menor apetite resultando em redução no peso.

A variação do peso dos animais em função do tempo de tratamento está representada na figura 24. É possível perceber que apenas no grupo controle houve ganho de peso ao longo do tratamento, o que indica uma baixa toxicidade inerente da formulação branca. Os componentes dos CLN não apresentam toxicidade, uma vez que são utilizados lipídeos biocompatíveis, já utilizados em administração endovenosa, em emulsões para nutrição parenteral, por exemplo. Além disso, são utilizados surfactantes já padronizados para administração parenteral, como, por exemplo, lecitina, polisorbato 80 ou 60 (Tween 80 ou 60), poloxamer 188. Portanto, não eram esperados sinais de toxicidade decorrentes do metabolismo das nanoformulações (MULLER & MADER, 2000; WISSING *et al.*, 2004).

O grupo tratado com a doxorrubicina livre apresentou acentuada perda de peso até o 8º dia, atingindo 25%, resultando na morte dos animais deste grupo. Para os grupos tratados com os CLN uma discreta perda de peso foi observada (inferior a 10%), não havendo diferença estatística para as duas nanoformulações testadas. Ressalta-se que a perda máxima de peso nos grupos tratados com as formulações ocorreu no dia 8, seguida de manutenção do peso até o dia 10, sugerindo uma recuperação dos animais. Esses dados

indicam a menor toxicidade apresentada pelos CLN quando comparados ao fármaco na forma livre.

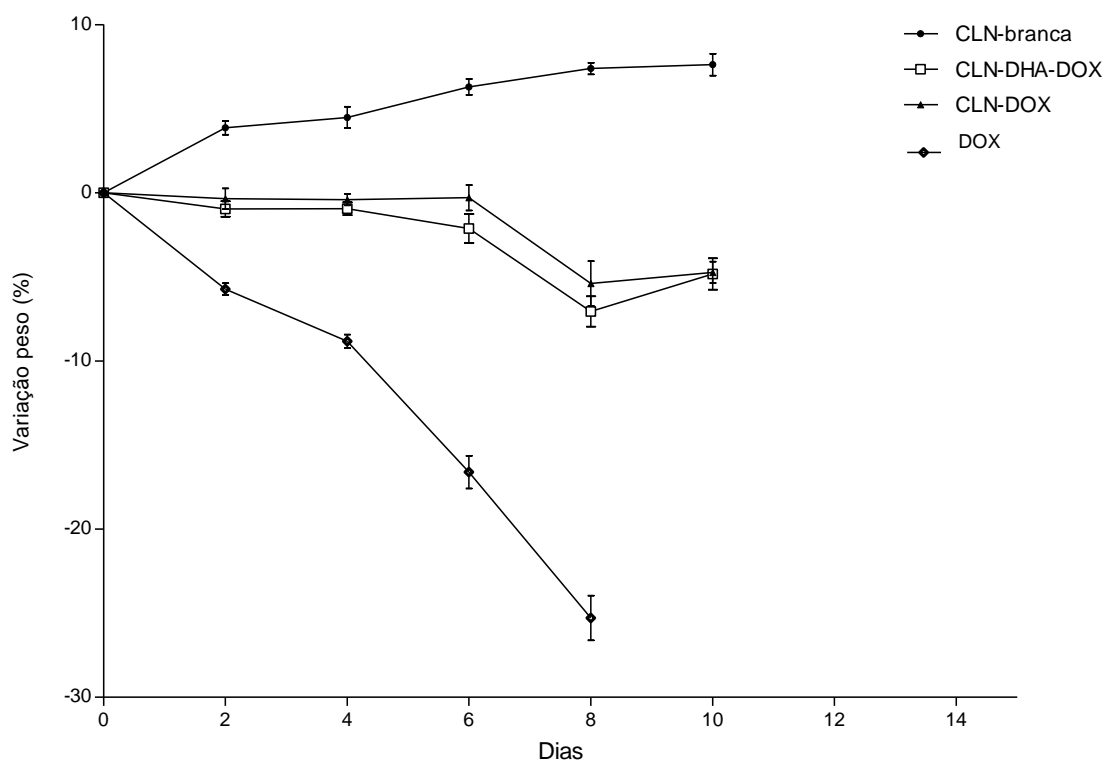


Figura 24. Variação do peso dos animais em função do tempo para CLN-branca, DOX, CLN-DOX e CLN-DHA-DOX.

Comparando o peso inicial (primeiro dia) e o final (último dia de tratamento), pode-se obter uma visão global da variação do peso dos animais (figura 25). Observa-se uma perda de peso exacerbada do grupo tratado com a doxorrubicina livre, com média de - 4,5 g. Para os CLN carregados com doxorrubicina, houve uma perda mais discreta, de menos de 1,0 g.

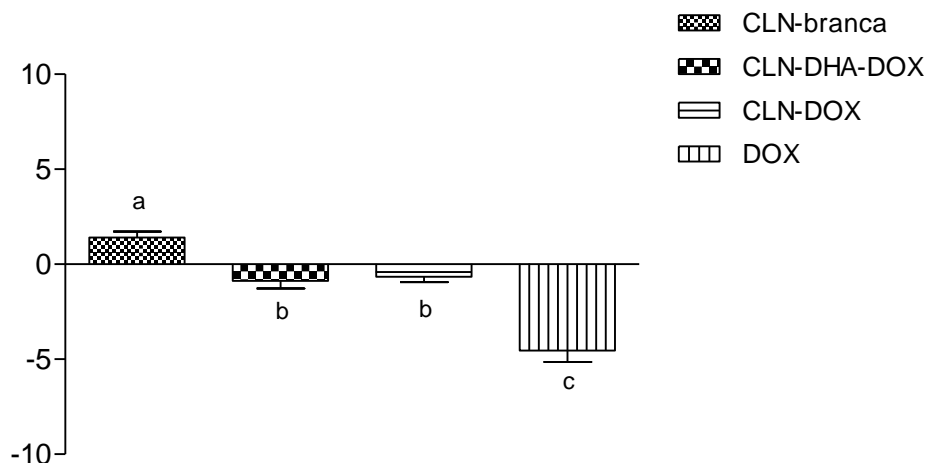


Figura 25. Variação do peso dos animais em relação ao primeiro e último dia de experimento para CLN-branca, CLN-DHA-DOX, CLN-DOX e DOX. Para DOX foi analisado o dia 8, em função da morte dos animais no dia 10. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

O estudo de sobrevivência dos animais tratados com CLN-branca, doxorubicina livre e CLN-DHA-DOX foi realizado e os resultados estão resumidos na figura 26. Corroborando as análises de variação de peso corporal, houve um ganho significativo na sobrevivência dos animais tratados com a formulação contendo doxorubicina e DHA quando comparado ao grupo que recebeu o fármaco livre. A mediana de vida do grupo DOX foi de 15,5 dias, enquanto para CLN-DHA-DOX foi de 32,5 dias. No entanto, o tratamento com CLN-DHA-DOX não se mostrou eficaz em aumentar a sobrevivência quando comparado com o grupo controle, uma vez que a mediana de vida dos animais foi de 32 dias.

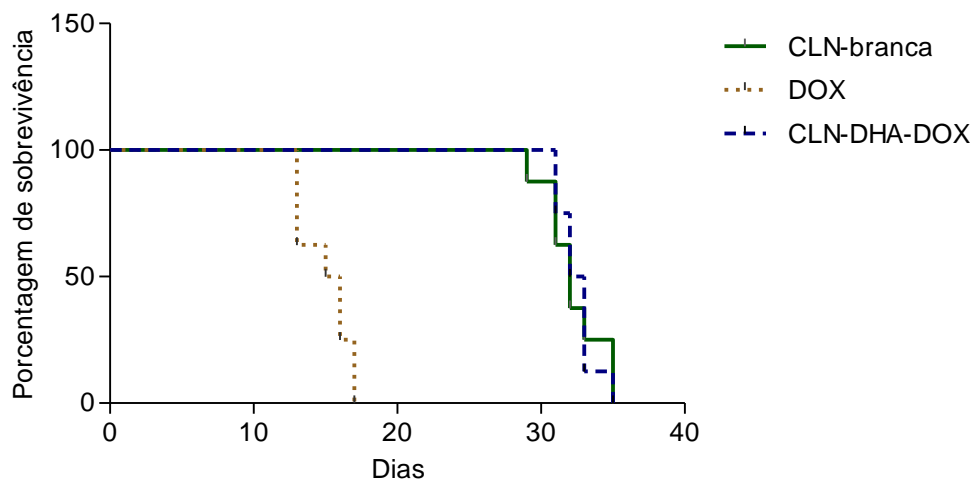


Figura 26. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c tratados com CLN branca, doxorrubicina livre e CLN-DHA-DOX, na dose total de 16,0 mg/kg de doxorrubicina (em forma de 4 doses de 4,0 mg/kg) (n=6).

Os dados de variação de peso e sobrevivência sugerem uma menor toxicidade sistêmica para os grupos nos quais a doxorrubicina foi veiculada em nanocarreadores. A encapsulação tem por objetivo aumentar a concentração do fármaco no seu local de ação (tumor) e conseqüentemente, reduzir seus níveis em tecidos saudáveis (O'BRIEN *et al.*, 2004). Essa alteração na cinética do fármaco contribuiu para a drástica redução da toxicidade observada. Além disso, o perfil de liberação controlada encontrado para essa formulação, de aproximadamente 30% em até 48 horas (MUSSI, 2013), é um fator determinante para garantir baixas concentrações do fármaco livre na circulação, assegurando a segurança da formulação.

4.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

4.3.1. Histologia do tumor

Na figura 27 estão representados os cortes histológicos dos tumores de animais submetidos aos diferentes tratamentos. Para o grupo controle é possível observar uma massa sólida, com presença de células epiteliais características do modelo tumoral 4T1 (figura 27 A-B). As células apresentam pleomorfismo, nucléolo evidente, figuras de metástase, além de figuras de mitose. Para os grupos tratados (figura 27 C-H), pode-se observar, além das células tumorais características, áreas de necrose central, caracterizada por

núcleos picnóticos e região composta por material amorfo eosinofílico (restos celulares). É interessante ressaltar que os tumores dos animais tratados com doxorubicina livre (figura 27 C-D) apresentaram uma área de necrose menos intensa quando comparada aos grupos tratados com formulações. Essas informações corroboram os dados obtidos para a variação do volume tumoral e índice de inibição de crescimento, que mostraram uma maior eficiência das formulações quando comparada ao fármaco livre.

Similarmente, WONG *et al.* (2007b) avaliando a atividade de nanopartículas híbridas (lipídicas-poliméricas) carregadas com doxorubicina contra um modelo tumoral murino (EMT6/WT) observaram significativo controle do crescimento tumoral, com intensa área de necrose, especialmente no grupo tratado com o nanocarreador. Esta maior eficácia antitumoral foi atribuída a maior entrega do fármaco proporcionada pelo nanossistema.

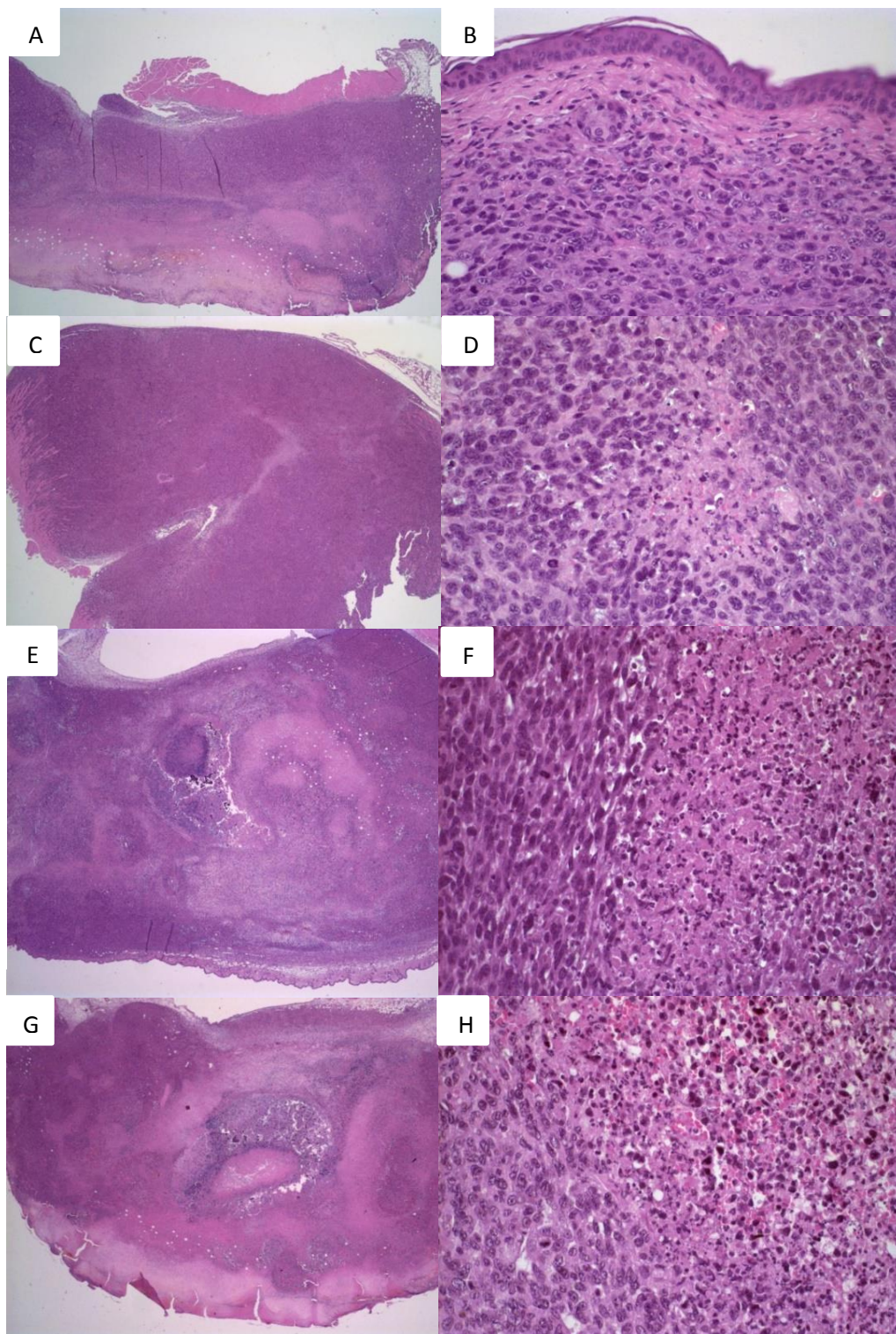


Figura 27. Fotomicrografia dos tumores dos animais tratados com(A – B) CLN-branca; (C – D) DOX; (E – F) CLN-DHA-DOX; (G – H) CLN-DOX. Coloração com hematoxilina-eosina, aumento original de (A, C, E, G) 2x e (B, D, F, H) 40x.

4.3.2. Histopatologia pulmonar

Sabe-se que o modelo experimental 4T1 é altamente metastático, apresentando metástase pulmonar aproximadamente 14 dias após o inóculo celular (SOUZA, 2013). Desta forma, este modelo permite avaliar não apenas a atividade antitumoral contra o tumor primário, mas também o controle da disseminação de células tumorais e consequentemente instalação em outros órgãos e tecidos. Os cortes histológicos do tecido pulmonar estão representados na figura 28. Pode-se observar presença de metástase para os grupos tratados com CLN-branca, CLN-DHA-DOX e CLN-DOX.

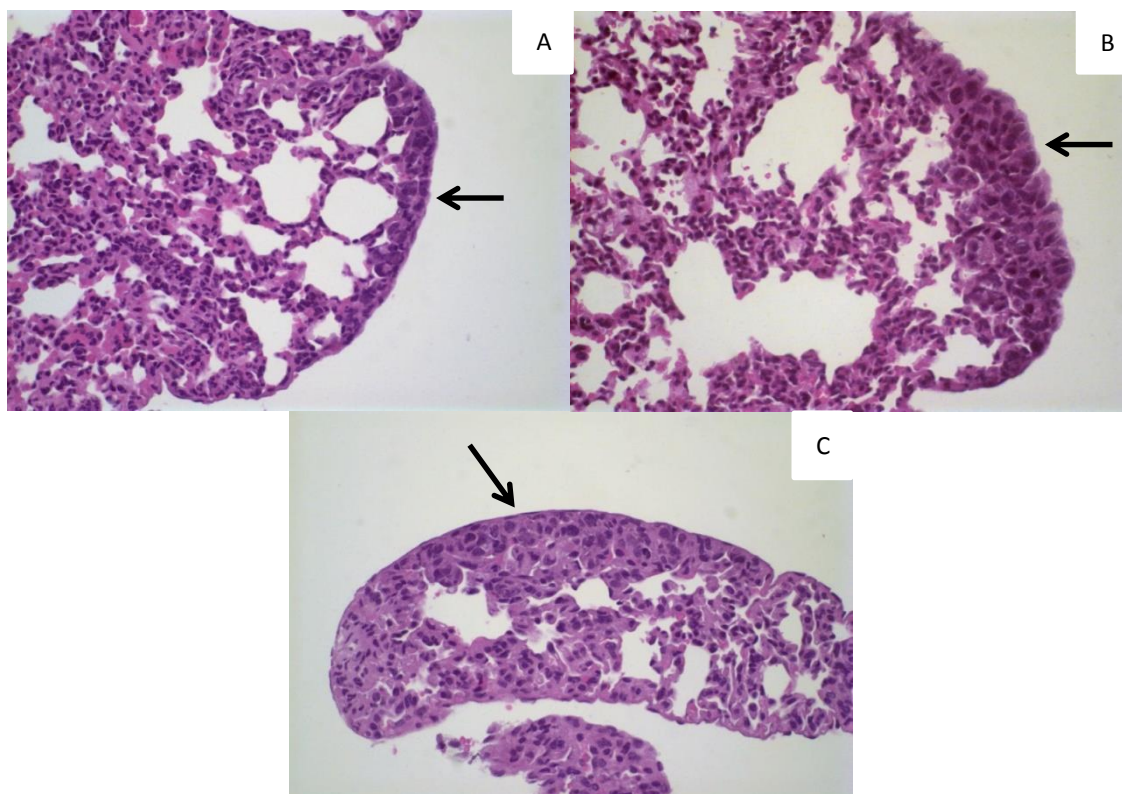


Figura 28. Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongos tratados com (A) CLN-branca, (B) CLN-DOX e (C) CLN-DHA-DOX. Seta indica local da metástase. Coloração com hematoxilina-eosina, aumento original de 40x.

GAO *et al.* (2011) avaliaram a capacidade de micelas poliméricas pH-sensíveis, carregadas com doxorubicina e funcionalizadas com folato, em prevenir metástases em modelo experimental 4T1. Os autores relatam bloqueio da proliferação celular e das rotas de disseminação com diminuição significativa

das metástases. Estes achados foram atribuídos à habilidade de entrega celular pelas micelas e a citotoxicidade do fármaco liberado na região tumoral. Cabe ressaltar que nesse estudo o regime de tratamento seguido por GAO *et al.* foi iniciado no dia seguinte ao início do inóculo das células tumorais. Além disso, foi utilizada uma dose 2,5 vezes maior de doxorubicina (10 mg/kg, por administração, em um total de 4 administrações) que aquela administrada no presente trabalho. Essas discrepâncias no protocolo podem ter sido determinantes para a capacidade do controle da proliferação celular.

A partir dos dados obtidos, analisando a taxa de sobrevivência, combinada ao padrão metastático similar entre os grupos, pode-se sugerir que a morte dos animais tratados com a CLN-branca e com a CLN-DHA-DOX foi decorrente das metástases pulmonares.

4.3.3. Histopatologia renal

Foi avaliada a toxicidade renal dos tratamentos, que pode ser observada na figura 29. Nenhuma alteração histológica foi observada para os grupos, podendo-se observar preservação do tecido renal, com presença de glomérulos e túbulos renais íntegros. Esse resultado corrobora os dados de sobrevivência e variação de peso, indicando a baixa toxicidade sistêmica da formulação. Os nanocarreadores diminuem a rota de eliminação renal, devido ao reconhecimento pelo SFM e mudança do perfil farmacocinético para fígado e baço, além do maior direcionamento para a área tumoral (HALEY *et al.*, 2008; TORCHILIN, 2011).

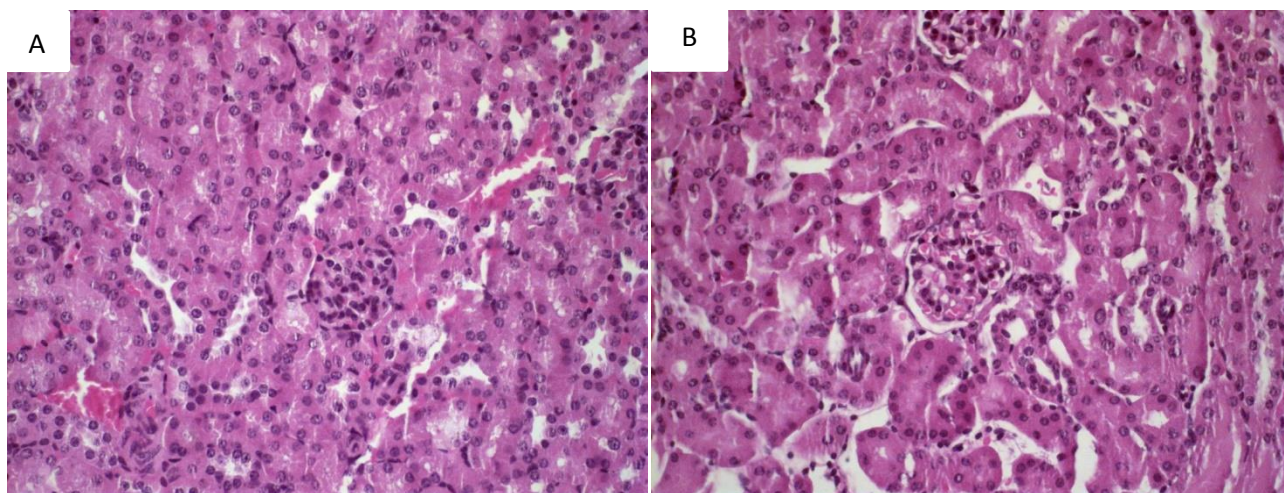


Figura 29. Fotomicrografias de tecido renal de animais tratados com (A) CLN-branca e (B) CLN-DHA-DOX. Coloração com hematoxilina-eosina, aumento original de 40x.

4.3.4. Histopatologia cardíaca

As antraciclina são amplamente conhecidas pela sua cardiotoxicidade, que pode limitar seu uso. Por isso, foi avaliada a toxicidade cardíaca dos tratamentos, por meio da análise histológica dos corações dos animais dos grupos tratados e controle. As fotomicrografias representativas dos quatro grupos testados estão representadas na figura 30. Nenhuma alteração histológica foi observada para o grupo controle, podendo-se observar preservação do tecido cardíaco. No entanto, para todos os grupos tratados, áreas focais de degeneração hialina foram constatadas, caracterizadas por fibras cardíacas espessas e fortemente eosinofílicas.

Embora fossem observados sinais de toxicidade em todos os grupos avaliados, foi possível identificar potencial efeito cardioprotetor para a formulação CLN-DHA-DOX. As degenerações cardíacas foram observadas em 100% dos animais tratados com a doxorrubicina livre avaliados. Além disso, as áreas se apresentaram em maior extensão. Para CLN-DOX 37,5% dos animais apresentaram degeneração, enquanto para a formulação CLN-DHA-DOX foram observadas alterações em apenas 25% dos animais.

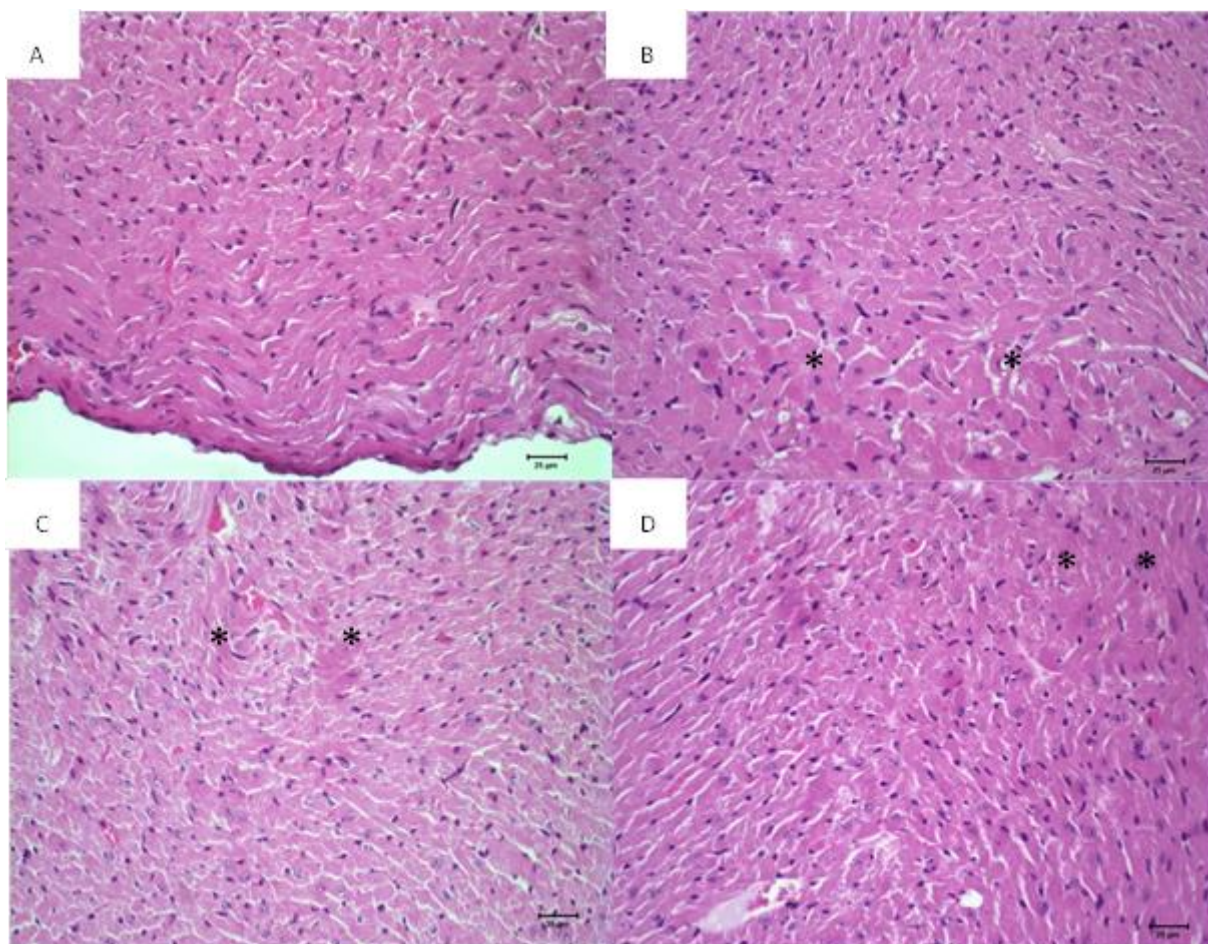


Figura 30. Fotomicrografia de tecido cardíaco de animais tratados com (A) CLN-branca, (B) DOX, (C) CLN-DOX, (D) CLN-DHA-DOX. Asterisco indica área de degeneração hialina. Coloração com hematoxilina-eosina, aumento original de 40x.

A forma mais comum de cardiotoxicidade, devido ao uso de doxorubicina, é a cardiomiopatia irreversível, que acontece tardiamente durante a quimioterapia, ou anos após o fim do tratamento. Parece haver uma relação linear entre a dose cumulativa do fármaco e as alterações histopatológicas e uma relação exponencial entre a dose e o comprometimento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. A cardiotoxicidade tardia pode se manifestar como insuficiência cardíaca congestiva (ICC), arritmias ou disfunção condutividade (LEONARD et al, 2009).

O mecanismo da cardiotoxicidade ainda não é completamente estabelecido, mas se sabe que é mediado pela geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), seguida da redução de um elétron na estrutura química da antraciclina. ROS levam ao estresse oxidativo e depleção energética em

miócitos. A redução, no entanto, também pode ocorrer em dois elétrons, o que converte a doxorubicina ao seu metabólito doxorubicinol, um álcool secundário, que se acumula nos cardiomiócitos, se tornando um reservatório intracelular do fármaco. Isso pode explicar a relação entre a dose cumulativa e a cardiotoxicidade (LEONARD *et al.*, 2009).

O uso de nanocarreadores, como por exemplo, lipossomas PEGlados, reduz os níveis plasmáticos da doxorubicina livre, diminuindo a distribuição para tecidos saudáveis, o que pode diminuir a toxicidade. OBRIEN *et al.* (2004), demonstraram em um estudo clínico, que o risco de desenvolvimento de cardiotoxicidade com lipossomas PEGlados é menor quando comparado ao fármaco livre.

SHUHENDLER *et al.* (2014), avaliaram a cardiotoxicidade de nanopartículas híbridas polímero-lipídica, carregadas com doxorubicina em BALB/c acometidos com tumor de mama murino EMT6/WT. Foi observado um potencial efeito cardioprotetor da formulação, após a administração de uma dose única do fármaco. No entanto, foram observadas alterações histológicas no grupo que receberam quatro doses da formulação. O tecido cardíaco apresentou estruturas vacuolares na sua composição, o que sugere o efeito cardiotóxico dose-dependente da doxorubicina.

5. CONCLUSÕES

A avaliação do volume tumoral, volume relativo do tumor e índice de inibição de crescimento demonstraram maior eficácia do tratamento para os grupos nos quais a doxorrubicina foi veiculada em CLN.

A formulação CLN-DHA-DOX foi capaz de inibir o crescimento do tumor em mais de 90%, se mostrando significativamente mais eficaz quando comparada a CLN-DOX. Isso se deve, provavelmente, ao efeito sinérgico com o DHA.

A análise histológica do tumor confirmou os dados da variação do volume tumoral, volume relativo do tumor e índice de inibição de crescimento, devido à presença de maior área de necrose nos grupos CLN-DHA-DOX, CLN-DOX, necrose discreta no grupo DOX e ausência de necrose no grupo CLN-branca.

A avaliação da variação do peso dos animais, a análise da sobrevivência, bem como a avaliação da histologia renal, demonstrou que esse sistema apresenta baixa toxicidade sistêmica.

A avaliação da histologia cardíaca demonstrou um potencial efeito cardioprotetor das formulações, principalmente a formulação CLN-DHA-DOX, quando comparado ao fármaco livre.

A formulação CLN-DHA-DOX não foi capaz de inibir o aparecimento de metástases pulmonares, nesse regime de tratamento e dose utilizados. No entanto, constitui em uma alternativa promissora para o tratamento combinado de câncer de mama, devido a sua capacidade de controlar o volume tumoral do foco primário.

CONCLUSÕES GERAIS

A formulação apresentada demonstrou grande potencial para aplicação no tratamento de câncer de mama. A co-encapsulação resultou em uma formulação com características físico-químicas adequadas, capaz de se acumular na região tumoral.

A partir da marcação da superfície do nanocarreador com tecnécio-99m, foi possível avaliar a biodistribuição e parâmetros farmacocinéticos da formulação. Houve um ganho no tempo de meia vida e área sob a curva do CLN quando comparado ao fármaco livre.

O aumento do tempo de circulação, associado ao efeito EPR, levou ao maior acúmulo dos CLN na região tumoral, principalmente nos tempos mais longos observados.

O maior acúmulo na região tumoral, associada também ao maior tempo de circulação e à liberação prolongada da formulação, proporcionou uma maior atividade antitumoral das formulações quando comparado ao fármaco livre. Esse fato foi evidenciado pela avaliação do volume tumoral, índice de inibição de crescimento e análise histológica do tumor.

Além disso, pode-se observar que a adição do DHA leva a um aumento da eficácia antitumoral. Isso se deve, provavelmente, a incorporação do DHA às membranas celulares e a ocorrência de lipoperoxidação. No entanto, a formulação não se mostrou capaz de inibir o aparecimento de metástases pulmonares no esquema posológico utilizado.

Apesar de ser uma alternativa promissora para o tratamento do tumor primário, outros esquemas de tratamento, com início precoce e/ou alteração do esquema posológico e linhagens celulares resistentes, também podem ser aplicados para a avaliação da capacidade de inibição de aparecimento de metástases e reversão da resistência.

A formulação apresentou menor toxicidade sistêmica quando comparado ao fármaco livre. Foram avaliados parâmetros preliminares avaliados, como a variação de peso, taxa de sobrevivência e análise histológica dos rins e coração. A

encapsulação do fármaco leva a maior entrega à região tumoral, diminuindo a concentração nos tecidos saudáveis, o que leva à diminuição da toxicidade.

No entanto, outras análises para avaliação de toxicidade, como análises bioquímicas e histológicas de outros órgãos, também podem ser aplicadas para o melhor entendimento da toxicidade da formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-CEDRÓN, L., SAYALERO, M.L., LANA O, J.M. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, v. 721, p. 271-281, 1999.

AMIR, E.; FREEDMAN, O. C.; SERUGA, B.; EVANS, D. G. Assessing Women at High Risk of Breast Cancer: A Review of Risk Assessment Models. *Journal of National Cancer Institute*, v. 102, p. 680-691, 2010.

ANDREOZZI, E.; SEO, J.W.; FERRARA, K.; LOUIE, A. Novel Method to Label Solid Lipid Nanoparticles with ^{64}Cu for Positron Emission Tomography Imaging. *Bioconjugate chem.* v. 22. p. 808 – 818, 2011.

ARAUJO, F.I., PROENÇA, F.P.P., FERREIRA, C.G., VENTILARI, S.C., ROSADO DE CASTRO, P.H., MOREIRA, R.D, *et al.* Use of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -doxorubicin scintigraphy in females with breast cancer: a pilot study. *Br J Radiol* 2015; 88.

BELKACÉMI, Y.; TSOUTSOU, P.; MAGNÉ, N.; CASTADOT, P.; AZRIA, D. Metabolic functional imaging for tumor radiosensitivity monitoring. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 62, p.227-239, 2007.

BELLAMY, W. T. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 36, p. 161-183, 1996.

BELOQUI, A.; SOLINIS, M.A.; DELGADO, A.; ÉVORA, C.; DEL POZO-RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ-GASCON, A. Biodistribution of nanostructured lipid carriers (NLCs) after intravenous administration to rats: influence of technological factors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 84. p. 309-314, 2013.

BINASCHI, M.; BIGIONI, M.; CIPOLLONE, A.; ROSSI, C.; GOSO, C.; MAGGI, C.A.; CAPRANICO, G.; ANIMATI, F. Anthracyclines: selected new developments. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, v. 1, p. 113 - 130, 2001.

BOUGNOUX, P., HAJJAJI, N., FERRASSON, M.N., GIRAUDEAU, B., COUET, C., LE FLOCH, O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *British Journal of Cancer*, v. 101, p. 78-85, 2009.

BOYLE, P.; LEVIN, B. *World Cancer Report 2008*. World Health Organization, 2008.

BRIOSCHI, A.; ZENGA, F.; ZARA, G.P.; GASCO, M.R.; DUCATI, A.; MAURO, A. Solid lipid nanoparticles: could they help to improve the efficacy of pharmacologic treatments for brain tumors? *Neurological Research*, v. 29, p. 324-330, 2007.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. v. 407, p. 246-257, 2000.

CARVALHO, C.; SANTOS, R.X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P.J.; SANTOS, M.S.; MOREIRA, P.I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*. v. 16. p. 3267 – 3285, 2009.

CHABNER, B.A.; AMREIN, P.C.; DRUKER, B.J.; *et al.* Agentes Antineoplásicos. In: GOODMAN E GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. São Paulo: AMGH Editora Ltda, 2010. p.1185 – 1264.

CHEN, H.H., HUANG, W.C., CHIANG, W.H., LIU, T.I., SHEN, M.Y., HSU, Y.H., LIN, S.C, CHIU, H.C. pH-responsive therapeutic solid lipid nanoparticles for reducing P-glycoprotein mediated drug efflux of multidrug resistant cancer cells. *Int J Nanomedicine*. v.5, n. 10, p. 5035-48, 2015.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D.M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res*. v.14. p. 1310 - 1316, 2008.

CHUA, T. C., YAO, P.; AKTHER, J.; MORRIS, D. L. Impact of Tumor Angiogenesis in Peritoneal Mesothelioma after Radical Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy, *Pathology & Oncology Research*, v. 16, p. 217-222, 2010.

COLAS, S. MAHÉO, K., DENIS, F., GOUPILLE, C., HOINARD, C., CHAMPEROUX P., TRANQUART, F., BOUGNOUX, P. Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clinical Cancer Research*, v. 12, p. 5879-5886, 2006.

DAEIHAMED, M., HAERI, A., DADASHZADEH, S. A simple and sensitive HPLC method for fluorescence quantitation of doxorubicin in micro-volume plasma: applications to pharmacokinetic studies in rats. *Iran J Pharm Res*. v.14, p.33-42, 2015.

DANESI, R.; FOGLI, S.; GENNARI, A.; CONTE, P.D.E.L.; TACCA, M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, p. 431-44, 2002.

DARPA, P.; LIU, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 989, p. 163-177, 1989.

DATIR, S. R, DAS, M., SINGH, R. P., JAIN, S. Hyaluronate Tethered, “Smart” Multiwalled Carbon Nanotubes for Tumor-Targeted Delivery of Doxorubicin. *Bioconjugate Chem* 2012; 23: 2201-2213

de BARROS, A. L. B.; TSOURKAS, A.; SABOURY, B.; CARDOSO, V.N.; ALAVI, A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI Research*. v.2, 2012.

de BARROS, A.L.; MOTA, L.G.; SOARES, D.C., de SOUZA, C.M.; CASSALI, G.D.; OLIVEIRA, M.C.; CARDOSO, V.N. Long-circulating, pH-sensitive liposomes versus long-circulating, non-pH-sensitive liposomes as a delivery system for tumor identification. *J. Biomed Nanotechnol*. v. 9. p. 1636-1643, 2013.

DOXORRUBICINA, CLORIDRATO. Valéria Medeiros Miqueloti. Buenos Aires: Laboratórios IMA S.A.I.C. [2014]. Bula de medicamento.

DRAGNEV, K.H.; RIGAS, J.R.; DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*, v. 5, p. 361-368, 2000.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. v.43, n.1. p.61-8, 1997.

FORNARI, F.A.; RANDOLPH, J.K.; YALOWICH, J.C.; RITKE, M.K.; GEWIRTZ, D.A. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, v. 45, p. 649-656, 1994.

FREDERICK, C.A.; WILLIAMS, L.D.; UGHETTO, G.; VAN DER MAREL, G.A.; VAN BOOM, J.H.; RICH, A.; WANG, A.H. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, v. 29, p. 2538-2549, 1990.

FUNDARÒ, A., CAVALLI, R., BARGONI, A., VIGHETTO, D., ZARA, G.P., GASCO, M.R. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacological Research*, v. 42, p. 337-343, 2000.

GABIZON, A.A. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. *Cancer Investigation*, v. 19, p. 424-436, 2001.

GAO, Z.G., TIAN, L., HU, J., PARK, I.S., BAE, Y.H. Prevention of Metastasis in a 4T1 Murine Breast Cancer Model by Doxorubicin Carried by Folate Conjugated pH Sensitive Polymeric Micelles. *J Control Release*. v. 152. p. 84-89, 2011.

GARCIA, C.M.S., ARAUJO, M.R., LOPES, M.T.P *et al.* Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Braz J Vet Pathol.* v.7, p.158–165, 2014.

GERMAIN, E., CHAJÈS, V., COGNAULT, S., LHUILLERY, C., BOUGNOUX, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *International Journal of Cancer*, v. 75, p. 578-583, 1998.

GHOSH, K.; THODETI, C. K.; DUDLEY, A. C.; MAMMOTO, A.; KLAGSBRUN, M.; INGBER, D. E. Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* v. 105, p. 11305-11310, 2008.

GUFFY, M. M., NORTH, J. A., AND BURNS, C. P. Effect of cellular fatty acid alteration on adriamycin sensitivity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.* v. 44. p. 1863–1866, 1984.

HALEY, B. e FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urology Oncology*, v. 26, p. 57-64, 2008.

HAMOUDEH, M.; KAMLEH, M.A.; DIAB, R.; FESSI, H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 60. p. 1329 – 1346, 2008.

HARRIS, L.; BATIST, G.; BELT, R.; ROVIRA, D.; NAVARI, R.; AZARNIA, N.; WELLES, L.; WINER, E. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, v. 94, p. 25-36, 2002.

HONG, H.; ZHANG, Y.; SUN, J.; CAI, W.; Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano today.* v. 4. p. 399-413, 2009.

HOWLADER, N., CHEN, V.W., RIES, L.A, LOCH, M.M, LEE, R, DESANTIS, C, LIN, C.C, RUHL, J, CRONIN, K.A. Overview of breast cancer collaborative stage data items—their definitions, quality, usage and clinical implications: a review of SEER data for 2004-2010. *Cancer.* v.1 n.120 p. 3771-80, 2014.

INCA – Instituto Nacional do Câncer – Fisiopatologia do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br/enfermagem

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br/vigilancia

JANIB, S.M.; MOSES, A.S.; MACKAY, J.A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 62. p. 1052-1063, 2010.

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

JOSHI, M D, MÜLLER R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 161-172, 2009.

JUDSON, I.; RADFORD, J.A.; HARRIS, M.; BLAY, J.Y.; VAN, H. Q, LE CESNE, A.; VAN, O.A.T.; CLEMONS, M.J., KAMBY, C.; HERMANS, C.; WHITTAKER, J.; DONATO, D.E.; VERWEIJ, J.; NIELSEN, S. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL/CAELYX) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 870-877, 2001.

JUN, H. Y.; YIN, H. H.; KIM, S. H.; PARK, S. H.; KIM, H. S.; YOON, K. H. Visualization of Tumor Angiogenesis Using MR Imaging Contrast Agent Gd-DTPA-anti-VEGF Receptor Antibody Conjugate in a Mouse Tumor Model. *Korean Journal of Radiology*, v. 11, n. 4, p. 449-456, 2010.

JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.

KAELIN JUNIOR, W. G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, p. 689-698, 2005.

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

KUMAR, P., SINGH, B., SHARMA, S., GHAI, A., CHUTTANI, K., MISHRA, A. K. *et al.* Preclinical evaluation of [99mTc]-labeled doxorubicin as a potential scintigraphic probe for tumor imaging. *Cancer Biother Radiopharm* 2011; 27: 221-25

LEE, J. A.; KIM, K.; BAE, J. W.; JUNG, J. H.; AN, H.; LEE, U. S. Triple negative breast cancer in Korea-distinct biology with different impact of prognostic factors on survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 123, p.177–187, 2010.

LEITE, E.A., SOUZA, C.M., CARVALHO-JÚNIOR, A.D., COELHO, L.G., LANA, A.M., CASSALI, G.D., OLIVEIRA, M.C. Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. *International Journal of Nanomedicine*. v. 7, p. 5259-5269, 2012.

- LEONARD, R.C.F., WILLIAMS, S., TULPULÉ, A., LEVINE, A.M, OLIVEROS, S. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *The Breast*. v. 18. p. 218–224, 2009.
- LEU, A. J.; BERK, D. A.; LYMBOUSSAKI, A.; ALITALO, K., JAIN, R.K. Absence of functional lymphatics within murine sarcoma: molecular and functional evaluation. *Cancer Res*. v.60, n.16, p. 4324-7, 2000.
- LU, J., ZHAO, W., HUANG, Y., LIU, H., MARQUEZ, R., GIBBS, R. B *et al*. Targeted Delivery of Doxorubicin by Folic Acid-Decorated Dual Functional Nanocarrier. *Mol Pharmaceutics*. v. 11, p. 4164 – 4178, 2014.
- LYASS, O.; UZIELY, B.; BEN-YOSEF, R.; TZEMACH, D.; HESHING, N.I.; LOTEM, M.; BRUFMAN, G.; GABIZON, A. Correlation of Toxicity with Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) in Metastatic Breast Carcinoma. *Cancer*, v. 89, p. 1037-1047, 2000.
- MA, W., WANG, J., GUO, Q., TU, P. Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by L-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. v.10, n.111, p.215-21, 2015.
- MAEDA, H., WU, J., SAWA, T., MATSUMURA, Y., HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 271-284, 2000.
- MAMOT, C.; DRUMMOND, D.C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J.W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resistance Update*, v. 6, p. 271- 279, 2003.
- MARQUES, F. L. N. *et al*. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol. Bras*. v. 34, p.233-239, 2001.
- MASTRIA, E.M., CHEN, M., McDANIEL, J.R. *et al*. Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma. *Journal of Controlled Release*. v. 208. p. 52–58, 2015.
- MEHNERT, W., MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.
- MELLOR, H. R. e CALLAGHAN, R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology*, v. 81, p. 275-300, 2008.
- MOMPARLER, R.L.; KARON, M.; SIEGEL, S.E.; AVILA, F. Effect of Adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, v. 36, p. 2891-2895, 1976.

MÜLLER, R.H., MÄDER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 161-177, 2000.

MUNN, I. I. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. *Drug Discovery today*. v. 8, p. 396-403, 2003.

MUSSI, S. V. Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas lipídicas carregadas com doxorubicina e ácido docosahexaenoico para o tratamento do câncer. 2013. 119p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MUSSI, S.V, PAREKH, G., PATTEKARI, P., LEVCHENKO, T., LVOV, Y., FERREIRA, L.A.M, TORCHILIN, V.P. Improved pharmacokinetics and enhanced tumor growth inhibition using a 2 nanostructured lipid carrier loaded with doxorubicin and modified with a 3 layer-by-layer polyelectrolyte coating. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015.

MUSSI, S.V.; SAWANT, R.; PERCHE, F.; OLIVEIRA, M.C.; AZEVEDO, R.; FERREIRA, L.A.M.; TORCHILIN, V.P. Novel Nanostructured Lipid Carrier Co-Loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid demonstrates Enhanced in Vitro Activity and Overcomes Drug Resistance in MCF-7/Adr Cells. *Pharmaceutical Research*, 2013.

O'BRIEN, M.E.; WIGLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; *et al.* Breast Cancer Study Group. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/ Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 440-449, 2004.

OYEN, W.J.G.; BOERMAN, O.C.; STORM, G.; BLOOIS, L.V.; *et al.* Detecting Infection and Inflammation with Technetium-99m-Labeled Stealth®Liposomes. *The Journal of Nuclear Medicine*. v. 37. p. 1392 – 1397, 1996.

PAI, V.B.; NAHATA, M.C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety*, v. 22, p. 263-302, 2000.

PARHI, P., MOHANTY, C., SAHOO, S.K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, v. 17, p. 1044-1052, 2012.

PARK,J.; FONG, P.M.; LU, J.; RUSSEL, K.S.; *et al.* PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. v. 5. p. 410 – 418, 2009.

PATRICK, G. L. Anti Cancer Agents. In: An introduction to medicinal chemistry. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2005. Cap. 21, p. 514-577.

PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, J. H.; MCCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIERE, B. FDG accumulation and tumor biology. Nuclear Medicine and Biology. v. 25, p. 317-322, 1998.

PEREIRA, M.A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; CARMO, V.A.; FERRARI, C.S.; REIS, E.C.O.; RAMALDES, G.A.; CARDOSO, V.N. Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with ^{99m}Tc-HMPAO. Nucl Med Commun. v. 30. p. 749 – 755, 2009.

PRASAD, P., SHUHENDLER, A., CAI, P., RAUTH, A.M., WU, X.Y. Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. Cancer Letters, v. 334, p. 267-273, 2012.

PRIMEAU, A.J., RENDON, A., HEDLEY, D., LILGE, L., TANNOCK, I.F., The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. Clinical Cancer Research. 11, 8782-8788, 2005.

PULASKI, B.A., ROSENBERG, S.O. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. Current Protocols in Immunology. v.20, p. 2.1-20.2.16, 2000.

REDDY, L. H., SHARMA, R. K., MURTHY, R. S. R. Enhanced tumour uptake of doxorubicin loaded poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in mice bearing Dalton's Lymphoma tumour. *J Drug Target* 2004; 12: 443-451

REDDY, L.H.; SHARMA, R.K.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A.K.; MURTHY, R.S.R. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *Journal of Controlled Release*. v.105. p. 185–198, 2005.

REN, S., LI, C., DAI, Y., LI, N., WANG, X., TIAN, F., ZHOU, S., QIU, Z., LU, Y., ZHAO, D., CHEN, X., CHEN, D. Comparison of pharmacokinetics tissue distribution and pharmacodynamics of liposomes and free doxorubicin tumor-bearing mice following intratumoral injection. *J Pharm Pharmacol*. v. 66, n.9, p.1231-9, 2014.

ROBBINS; COTRAN. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Filadélfia: Elsevier, 848p, 2006.

SAHA, G. B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 6. Ed. United States: Springer, 2010. 427p.

SHIN, S. J., BEECH, J. R., KELLY, K. A. Targeted nanoparticles in imaging: paving the way for personalized medicine in the battle against cancer. *Integr Biol.* v. 5, p. 29-42, 2013.

SHUHENDLER, A.J., PRASAD, P., ZHANG, R.X., AMINI, M.A *et al.* Synergistic Nanoparticulate Drug Combination Overcomes Multidrug Resistance, Increases Efficacy, and Reduces Cardiotoxicity in a Nonimmunocompromised Breast Tumor Model. *Mol. Pharmaceutics.* v. 11. p. 2659 – 2674, 2014.

SIDDIQUI, A., GUPTA, V., LIU, Y., NAZZAL, S. Doxorubicin and MBO-asGCS oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES). *International Journal of Pharmaceutics,* v. 431, p. 222-229, 2012.

SIDDIQUI, R.A., HARVEY, K.A., XU, Z., BAMMERLIN, E.M., WALKER, C., ALTENBURG, J.D. Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors,* v. 37, p. 399-412, 2011.

SINGAL, P.K. ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine,* v. 339, p. 900-905, 1998.

SINHA, B,K.; MIMNAUGH, E.G. Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Radical Biology & Medicine,* v. 8, p. 567-881, 1990.

SNEHALATHA, M., KOLACHINA, V., SAHA, R.N. Etoposide Loaded PLGA and PCL Nanoparticles II: Biodistribution and Pharmacokinetics after Radiolabeling with Tc-99m. *Drug Delivery.* v. 15. p. 277–287, 2008.

STEINIGER, S.C.; KREUTER, J.; KHALANSKY, A.S.; SKIDAN, I.N.; BOBRUSKIN, A.I.; SMIRNOVA, Z.S.; SEVERIN, S.E.; UHL, R.; KOCK, M.; GEIGER, K.D.; GELPERINA, S.E. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *International Journal of Cancer,* v. 109, p. 759-767, 2004.

SUN, L., DENG, X., YANG, X., LI, Z. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and curcumin by polymeric micelles for improving antitumor efficacy on breast carcinoma. *RSC Adv.* v. 4. p. 46737–46750, 2014.

TAVARES, L. B. QSAR: A Abordagem de Hansch. *Quim. Nova,* v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. *Medicina Nuclear.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 408p.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.71, p.431–444, 2009.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 63. p.131–135, 2011.

TRÉDAN, O., GALMARINI, C.M., PATEL, K., TANNOCK, I.F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 1441-1454, 2007.

USP 34. The United States Pharmacopoeia National Formulary, 34. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2012.

VIRREY, J. J.; DONG, D.; STILES, C.; PATTERSON, J. B.; PEN, L.; NI, M.; SCHONTHAL, A. H.; CHEN, T. C.;HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. *Molecular Cancer Research*, v. 6, n. 8 , p.1268- 1275, 2008.

WANG Y, ZHANG H, HAO J, LI B, LI M, XIUWEN W. Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. *Drug Deliv*. v. 24, p.1-6, 2015.

WANG, J., MA, W., TU, P. Synergistically Improved Anti-tumor Efficacy by Co-delivery Doxorubicin and Curcumin Polymeric Micelles. *Macromol. Biosci*. 2015

WEI, X, WANG, Y, ZENG, W, HUANG, F, QIN, L, ZHANG, C *et al*. Stability influences the biodistribution, toxicity, and anti-tumor activity of doxorubicin encapsulated in PEG-PE micelles in mice. *Pharm Res*. v.29, p.1977–1989, 2012.

WEISS, R. B. The Anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*, v. 19, p. 670-686, 1992.

WHO - World Health Organization, World Cancer Report, International Agency of Research on Cancer. Lyon, 2009.

WISSING, S.A., KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WONG, H.L., RAUTH, A.M., BENDAYAN, R., MANIAS, J.L., RAMASWAMY, M., LIU, Z., ERHAN, S.Z., WU, X.Y. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1574-1585, 2006.

WONG, H.L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 491-504, 2007a.

WONG, H.L., RAUTH, A.M., BENDAYAN, R., WU, X.Y. In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 300-308, 2007b.

YANG, D.; ZHU, J.; ZHENG, Y.; GE, L. Preparation, characterization, pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 32, p. 219-227, 2006.

YOON, G., PARK, J.W., YOON, I.S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. v. 43. p. 353–362, 2013.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Research*. v. 55, p. 3752-3756, 1995.

ZARA, G.P., CAVALLI, R., FUNDARÒ, A., BARGONI, A., CAPUTO, O., GASCO, M.R. Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharmaceutical Research*, v. 40, p. 281-286, 1999.

ZARA, G.P, CAVALLI, R., BARGONI, A., FUNDARÓ, A., VIGHETTO, D., GASCO, M.R. Intravenous Administration to Rabbits of Non-stealth and Stealth Doxorubicin-loaded Solid Lipid Nanoparticles at Increasing Concentrations of Stealth Agent: Pharmacokinetics and Distribution of Doxorubicin in Brain and Other Tissues. *Journal of Drug Targeting*, v.10 n.4, p. 327–335, 2001.

ZHANG, X.-G., MIAO J., DAI, Y.-Q., DU, Y.-Z., YUAN, H., HU, F.-Q., Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p. 239-244, 2008.

ZHANG, R.; XIONG, C.; HUANG, M.; ZHOU, M.; HUANG, Q.; WEN, X.; LIANG, D. Peptide-conjugated polymeric micellar nanoparticles for dual SPECT and optical imaging of EphB4 receptors in prostate cancer xenografts. *Biomaterials*. v. 32. p. 5872 – 5879, 2011.

ZHANG, X., SUN, X., LI, J., ZHANG, X., GONG, T., ZHANG, Z. Lipid nanoemulsions loaded with doxorubicin-oleic acid ionic complex: characterization, in vitro and in vivo studies. *Pharmazie*. v. 66. p. 496–505, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 293 / 2014, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EM ANIMAIS”, 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 29/09/2015. Este certificado espira-se em 29/09/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 293 / 2014, related to the Project entitled “Evaluation of antitumoral activity of solid lipid nanoparticles loading doxorubicin and docosahexaenoic acid in animals”, under the supervision of André Luís 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 29/09/2015. This certificate expires in 29/09/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 29/09/2015.

Atenciosamente.
Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 307 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Avaliação da farmacocinética e biodistribuição de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com doxorrubicina e ácido docosaexaenoico”, 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 01/12/2014. Este certificado espira-se em 01/12/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 307 / 2014, related to the Project entitled “Evaluation of pharmacokinetic and biodistribution of solid lipid nanoparticles loading doxorubicin and docosahexaenoic acid”, under the supervision of André Luís 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 01/12/2014. This certificate expires in 01/12/2019.

Graciela Kunrath Lima
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 01/12/2014.

Atenciosamente.
Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

APÊNDICE

Original article

Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification

Renata S. Fernandes^{a,*}, Juliana de Oliveira Silva^{a,*}, Savia C.A. Lopes^b,
Sotirios Chondrogiannis^c, Domenico Rubello^c, Valbert N. Cardoso^a,
Mônica C. Oliveira^b, Lucas A.M. Ferreira^b and André L.B. de Barros^a

Objective Early diagnosis of malignant tumors is essential to successfully plan a radical and curative approach. In this study we describe the direct radiolabeling of doxorubicin (DOX) at physiological pH to identify murine breast tumor (4T1 cells)-bearing BALB/c mice.

Materials and methods Technetium-99m (^{99m}Tc) DOX was prepared by adding ^{99m}Tc-pertechnetate to a PBS (pH 7.4) solution containing DOX in the presence of stannous chloride. Radiochemical purity and in-vitro stability were determined. The circulation time of ^{99m}Tc-DOX was determined by measuring blood radioactivity in healthy animals. Scintigraphic images and biodistribution studies were carried out in tumor-bearing mice at 1, 4, and 8 h after injection.

Results The ^{99m}Tc-DOX complex showed high radiochemical purity (99.27 ± 0.34%) and in-vitro stability until 8 h. ^{99m}Tc-DOX levels in blood declined in a biphasic manner, with an α half-life of 4.5 min and a β half-life of 277.2 min. High uptake was achieved in kidneys, liver, and spleen, because of the drug elimination routes. Moreover, tumor uptake was higher than that of control tissue, resulting in high tumor-to-muscle ratios.

Conclusion DOX was successfully labeled with ^{99m}Tc-pertechnetate and showed high stability.

Biodistribution and scintigraphic studies indicated high tumor-to-muscle ratios in breast tumor-bearing BALB/c mice. These results suggested the feasibility of ^{99m}Tc-DOX as a functional agent in tumor diagnosis. *Nucl Med Commun* 00:000–000 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Nuclear Medicine Communications 2015, 00:000–000

Keywords: breast cancer, early diagnosis, scintigraphic imaging, 4T1 murine tumor, technetium-99m doxorubicin

^aDepartments of Clinical and Toxicological Analyses, ^bPharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and ^cDepartment of Nuclear Medicine, Radiology, NeuroRadiology, Medical Physics, Clinical Laboratory, Microbiology, Pathology, Santa Maria della Misericordia Hospital, Rovigo, Italy

Correspondence to André L.B. de Barros, PhD, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Tel: +55 31 3409 6840; fax: +55 31 3409 6985;
e-mail: brancodebarros@yahoo.com.br

*Renata S. Fernandes and Juliana de Oliveira Silva contributed equally to the writing of this article.

Received 23 October 2015 Revised 23 October 2015
Accepted 23 October 2015

Introduction

Cancer is a major health issue worldwide. In 2012 alone there were 14.1 million new cases and 8.6 million people died as a consequence of this disease. The most common types with higher mortality are lungs, stomach, liver, colon, and breast cancer [1]. Because of the increasing incidence and mortality associated with these diseases, the development and improvement of more sensitive and specific diagnostic methods are of great importance, as an early diagnosis is essential to successfully treat tumors [2].

The field of nuclear medicine can provide noninvasive techniques for early diagnosis, for biological characterization of various malignancies, and for assessing response to therapy determining prognosis and outcome. These imaging modalities are based on physiological and biochemical changes instead of on structural alterations as provided by computed tomography and MRI. The major

advantages of these approaches over others include high sensitivity, quantitative measurements, and the absence of a tissue penetration limit [3].

With regard to tumor tissues, specific characteristics related to metabolic activity, increased angiogenesis, blood flow, vascular permeability, cell composition, and formation of tumor-associated antigens allow to develop even more specific and accurate diagnostic images [4].

Technetium-99m (^{99m}Tc) has mostly been used to label radiopharmaceuticals, because of its suitable physical and chemical characteristics, large availability in nuclear medicine laboratories, and low isotope cost [5–7]. Specific radio-compounds labeled with ^{99m}Tc-pertechnetate, including peptides, nanoparticles, carbohydrates, and anticancer drugs – that is, doxorubicin (DOX), daunorubicin, cyclophosphamide, paclitaxel, and bleomycin – have been developed to investigate tumors [8–17].

With particular regard to DOX, it is a broad-spectrum amphiphilic anticancer drug used for treating many types of tumors, such as leukemia, lymphomas, breast cancer, osteosarcomas, Kaposi sarcoma, as well as lung, gastric, ovarian, pancreatic, and liver cancers [18,19]. After intravenous administration, DOX is rapidly distributed in tissues, including the liver, lungs, heart, kidneys, and spleen. About 80% of the drug remaining in the blood binds to plasma proteins [20], which confers a prolonged blood circulation time. In tissues, this agent binds strongly to the DNA and generates free radicals [21,22].

DOX has several functional groups, such as $-NH_2$, $-OH$, $-O-$ (Fig. 1), that are able to form complexes with ^{99m}Tc [23]. Therefore, radiolabeled DOX could be a useful tool for tumor identification by scintigraphic imaging.

The aim of this study was to label DOX with ^{99m}Tc and demonstrate the ability of ^{99m}Tc -DOX to identify murine breast tumors (4T1 cell line) in BALB/c mice. To achieve this purpose, in-vitro assays and biodistribution studies were performed, and scintigraphic images were acquired.

Materials and methods

Materials

Doxorubicin hydrochloride (DOX) was purchased from 141 ACIC Chemicals (Brantford, Ontario, Canada). ^{99m}Tc was obtained from an alumina-based $^{99}Mo/^{99m}Tc$ generator. All solvents (high-performance liquid chromatography analytical grade) and other reagents, including $SnCl_2 \cdot 0.2H_2O$, were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The subcutaneous tumor model was established in 6–8-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).

Radiolabeling procedure

A solution containing DOX in PBS (pH 7.4) was prepared (1.0 mg/ml). To a sealed vial containing 1.0 ml of this

solution was added 100 μg of $SnCl_2 \cdot 0.2H_2O$ solution in 0.1 mol/l HCl (2.0 mg/ml). Then, an aliquot of 0.1 ml of $Na^{99m}TcO_4$ (37 MBq) was added to the vial. The solution was kept at room temperature for 30 min.

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 $^{99m}TcO_4^-$. 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 $^{99m}TcO_2$ using a 0.22 μm syringe filter.

In-vitro stability

Tests in saline 0.9% (w/v) and in mouse plasma were performed to evaluate the stability of the radiolabeled complex.

Saline stability

TLC-SG was used to estimate the stability of ^{99m}Tc -DOX. The labeled solution was kept at room temperature. Radiochemical stability was determined from samples taken at 1, 2, 4, 6, and 8 h after incubation.

Plasma stability

TLC-SG was used to estimate the plasma stability of ^{99m}Tc -DOX. A volume of 90 μl of the ^{99m}Tc -DOX solution was incubated, under agitation, at 37°C with 1.0 ml of fresh mouse plasma. Radiochemical stability was determined from samples taken at 1, 2, 4, 6, and 8 h after incubation [8].

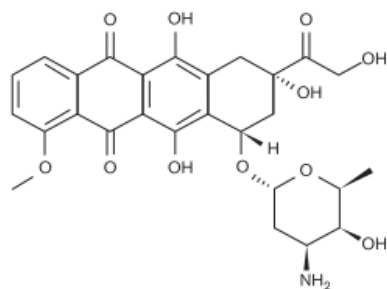
In-vivo studies: blood clearance

The ^{99m}Tc -DOX complex was administrated to each mouse ($n=6$) through the tail vein, and blood samples ($\sim 20 \mu l$ each) were collected at 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, and 480 min after administration. A small incision was made in the distal tail to facilitate rapid and reliable blood collection. Each sample was weighed, and the radioactivity was measured with an automatic scintillation counter. The percentage of injected activity per gram (%ID/g) and its mean \pm SD in each sample were determined, and the data were plotted as a function of time. Blood clearance analysis was performed using GraphPad PRISM, version 5.00 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA).

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 μg /ml). Cells were kept in humidified air containing 5% CO_2 at 37°C. The cells were grown to confluence and later

Fig. 1



Chemical structure of doxorubicin.

harvested by trypsinization. After centrifugation (5 min at 330g), the cells were resuspended in PBS for inoculating into the BALB/c mice.

Tumor cell inoculation

Aliquots (100 μ l) with 5×10^5 4T1 cells were injected subcutaneously into the right thigh of female BALB/c mice (17–23 g). Tumor cells were allowed to grow *in vivo* for 7–10 days, leading to tumors with a diameter of no more than 10 mm. Breast tumor-bearing BALB/c mice were used for biodistribution studies and scintigraphic images.

Biodistribution studies

Aliquots of 3.7 MBq of ^{99m}Tc-DOX were injected intravenously into tumor-bearing BALB/c mice ($n=6$). At 1, 4, and 8 h after injection, mice were anesthetized with a mixture of xylazine (15 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg). Liver, spleen, kidneys, stomach, heart, lungs, blood, muscle, thyroid, intestine, and tumor were removed, and placed in preweighed plastic test tubes. The radioactivity was measured using an automatic scintillation counter. A standard dose containing the same injected amount was counted simultaneously in a separate tube, which was defined as 100% radioactivity. The results were expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g).

Scintigraphic images

Aliquots of 18 MBq of ^{99m}Tc-DOX were injected intravenously into tumor-bearing BALB/c mice ($n=6$). Anesthetized mice were horizontally placed under the collimator of a gamma camera (Mediso, Budapest, Hungary) coupled with a low-energy high-resolution collimator. Images were acquired at 1, 4, and 8 h after injection using a $256 \times 256 \times 16$ matrix size, with a 20% energy window set at 140 keV for a period of 300 s each.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Means between the various groups were compared for differences with analysis of variance. In case of multiple comparisons, a post-hoc Bonferroni correction was applied. A *P*-value less than 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. All data were analyzed by GraphPad PRISM, version 5.00 software (GraphPad Software Inc.).

Results

Radiochemical purity

Radiochemical purity of ^{99m}Tc-DOX, analyzed by thin-layer chromatography, was $99.47 \pm 0.34\%$. Radiocolloids were removed from the complex by passing the preparation through sterile filters (pore diameter = 0.22 μ m): in this way, radiocolloids are retained in the pores of the filter, whereas ^{99m}Tc-DOX and free ^{99m}TcO₄⁻ freely passed through the filter [4]. It is well-known that radiochemical yields higher than 90% are recommended

for in-vivo application of radiopharmaceuticals [24]. Therefore, the ^{99m}Tc-DOX complex presented suitable radiochemical characteristics, which encouraged further in-vivo studies.

In-vitro stability

Figure 2 shows the radiochemical stability curve for the ^{99m}Tc-DOX. The stability was evaluated at 1, 2, 4, and 8 h of incubation in saline, at room temperature, and in fresh mouse plasma, at 37°C. An excellent stability, even over long periods of time (>95%), was observed.

Blood clearance

Figure 3 shows blood clearance of ^{99m}Tc-DOX. The complex after injection into healthy BALB/c female mice presented a relatively long clearance, with a biphasic plasma half-life, which was composed of a fast half-life of 4.5 min and a slow half-life of 277.2 min, and an area under the curve of 2633%ID/min.

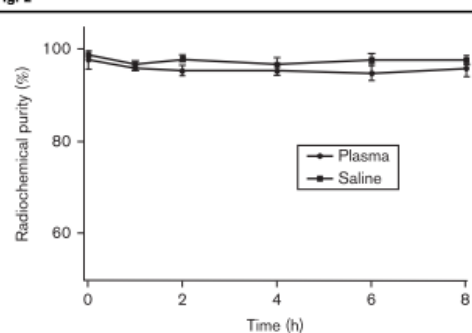
Scintigraphic images

Figure 4 shows the scintigraphic images obtained at 1, 4, and 8 h after administration of ^{99m}Tc-DOX into 4T1 tumor-bearing mice. The images show a higher uptake in the tumor compared with muscles. This higher uptake is even more evident 4 and 8 h after injection. Moreover, maximum uptake could be observed in the kidneys, indicating a main renal excretion; however, hepatobiliary clearance is also present.

Biodistribution studies

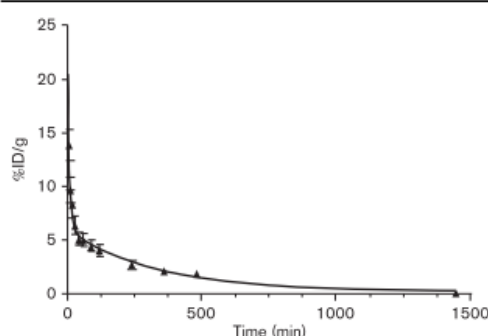
Biodistribution of ^{99m}Tc-DOX administered intravenously in tumor-bearing mice is shown in Fig. 5. These data are similar to those obtained by scintigraphic imaging. High uptake was observed in organs such as the liver, kidneys, and intestine, as expected because of the

Fig. 2



In-vitro stability of ^{99m}Tc-DOX as a function of time in the presence of saline, at room temperature, and in the presence of mouse plasma, at 37°C. ^{99m}Tc-DOX, technetium-99m doxorubicin.

Fig. 3



Blood clearance of ^{99m}Tc -DOX in healthy female BALB/c mice. All data are the mean percentage ($n = 6$) of the injected dose of ^{99m}Tc -DOX per gram of blood, \pm SD of the mean. ^{99m}Tc -DOX, technetium-99m doxorubicin.

drug elimination routes. Moreover, the tumor showed higher uptake compared with nontargeted tissues, such as the muscle. In addition, no significant uptake was observed in other organs.

Tumor-to-muscle ratios are shown in Fig. 6. Ratios were higher than 2.0 for the three investigated time points. High tumor-to-muscle ratios were reached at 4 (3.70) and 8 h (4.24) after administration of ^{99m}Tc -DOX. This finding suggests that ^{99m}Tc -DOX specifically accumulates in the tumor tissue.

Discussion

Cancer is a major public health issue worldwide; however, many cancer-related deaths could have been avoided or reduced through early diagnosis and treatment [1]. Hence, many efforts have been spent to develop

diagnostic modalities that can accurately detect tumors at an early stage [25].

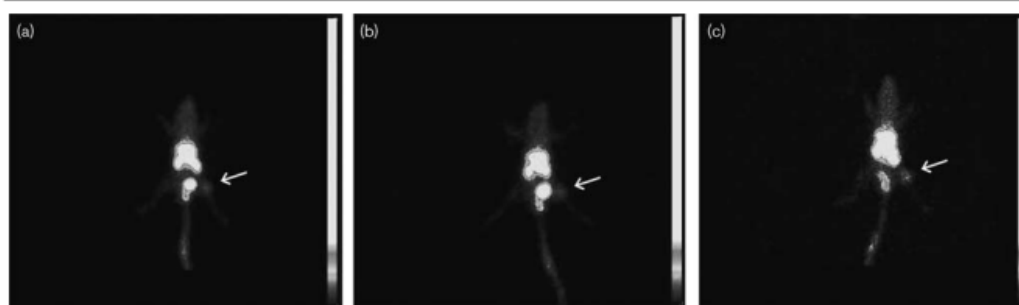
In this regard, there are some studies in the literature on DOX labeled with ^{99m}Tc that have focused on ^{99m}Tc -DOX biodistribution and its usefulness in detecting tumors [14,17,23,26–29]. In particular, it has been reported that DOX can be successfully labeled with ^{99m}Tc using SnCl_2 as the reducing agent; moreover, DOX has several molecules as $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{O}-$ that form a stable complex with ^{99m}Tc [23].

The radiolabeling mechanism we used acts through a bond between amine and hydroxyl molecules, which are present in both DOX and ^{99m}Tc [17,25]. The use of PBS buffer, with a $\text{pH} = 7.4$, contributes to the stability of these molecules during the labeling process. Besides, the labeled solution at physiological pH is optimal for intravenous injection, avoiding discomfort to the patient. Moreover, we confirmed that the amount of $100\ \mu\text{g}$ of stannous chloride was the optimum amount to act as reducing agent, resulting in high labeling efficiency and low amount of radiocolloid formations [25–27].

The complex ^{99m}Tc -DOX showed excellent and prolonged stability in both saline and plasma. After 8 h $\sim 95\%$ of the ^{99m}Tc remained bound with DOX. These data are in agreement with the previously published studies [25–28].

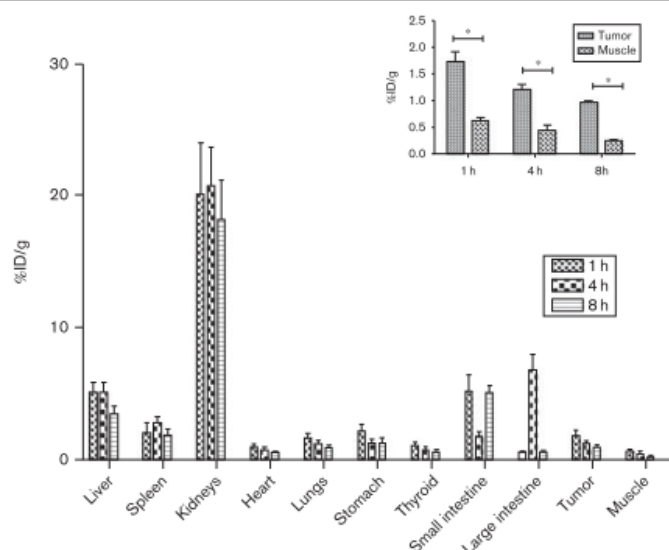
In our feasibility in-vitro study, the results suggested that ^{99m}Tc -DOX could be used as a radiotracer. We also performed blood clearance analysis. We observed that ^{99m}Tc -DOX levels in blood declines in a biphasic manner, one characterized by a fast half-life of 4.5 min and the other by a slow half-life of 277.2 min. This information is important for deciding the optimal timing for imaging ^{99m}Tc -DOX.

Fig. 4



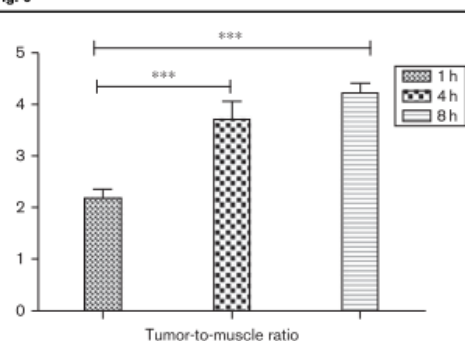
Scintigraphic images obtained at 1 (a), 4 (b), and 8 h (c) after intravenous injection of ^{99m}Tc -DOX in tumor-bearing mice ($n = 6$). Arrows indicate tumor area. ^{99m}Tc -DOX, technetium-99m doxorubicin.

Fig. 5



Biodistribution profile of ^{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 8 h after injection). All data are the mean percentage ($n=6$) of the injected dose of ^{99m}Tc-DOX per gram of blood, \pm SD of the mean. ^{99m}Tc-DOX, technetium-99m doxorubicin. Asterisks indicate statistically significant differences between tumor and muscle uptake at the same time point ($P < 0.05$).

Fig. 6



Quantitative analysis of the scintigraphic images obtained at 1, 4, and 8 h after ^{99m}Tc-DOX intravenous administration in tumor-bearing mice ($n=6$). Asterisks indicate statistically significant differences between 1, 4, and 8 h ($P < 0.001$). ^{99m}Tc-DOX, technetium-99m doxorubicin.

Scintigraphic images and biodistribution studies carried out in mice indicated that maximum uptake of the radiotracer was seen in kidneys, followed by the spleen and liver, and some uptake by the intestine. The biodistribution data support the clearance of the radioligand

by dual (renal and hepatic) pathways. These data are also in agreement with previous studies [14,17,26,27].

With regard to the potential role of ^{99m}Tc-DOX in tumor staging and restaging, it is noteworthy that ^{99m}Tc-DOX showed higher uptake in tumor than in muscles at all time points after injection (1, 4, and 8 h). The particularly higher radiotracer uptake observed at 1 h after administration is likely related, at least in part, to the high levels of ^{99m}Tc-DOX that still remain in the bloodstream. In the late images, acquired 8 h after the radio-compound injection, tumor uptake is slightly reduced but ^{99m}Tc-DOX disappears from the bloodstream and the specific binding with tumor is likely to significantly increase. This condition is also confirmed by the increase in the tumor to background ratios, with further demonstration of the high specific affinity of ^{99m}Tc-DOX for tumor cells.

The experimental model 4T1 is a highly tumorigenic cell line, characterized by a tumoral growth and metastatic spread similar to human advanced breast cancer (typically, stage IV). In addition, this model has been used to explore the potential of novel antiangiogenic therapies and multiple chemotherapy treatments to evaluate their antitumoral effect [29–32].

The results of our study are very promising, as to the best of our knowledge it is the first work reporting the use of ^{99m}Tc -DOX in 4T1 breast tumor identification. Data presented in this study open a new avenue to use this radiolabeled drug as a tool, in preclinical studies, to monitor the effectiveness of therapy.

Conclusion

Our feasibility study demonstrated that DOX can be successfully labeled with ^{99m}Tc and shows a high and prolonged stability. Furthermore, biodistribution and scintigraphic studies showed high tumor-to-muscle ratios in 4T1 breast tumor-bearing BALB/c mice, suggesting that ^{99m}Tc -DOX can be used in preclinical animal studies to diagnose and monitor the efficacy of tumors sensitive to DOX.

Acknowledgements

The authors 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-Brazil) for their financial support and fellowships.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014 Latest World Cancer Statistics*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
- Abreu E, Koifman S. Prognostic factors in woman breast cancer. *Rev Bras Cancerol* 2002; **48**:113–131.
- de Barros AB, Tsourkas A, Saboury B, Cardoso VN, Alavi A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI Res* 2012; **2**:39–54.
- Shin SJ, Beech JR, Kelly KA. Targeted nanoparticles in imaging: paving the way for personalized medicine in the battle against cancer. *Integr Biol* 2013; **5**:29–42.
- de Barros ALB, Cardoso VN, Mota LG, Alves RJ. Synthesis and biodistribution studies of carbohydrate derivative radiolabeled with technetium-99m. *Bioorg Med Chem* 2010; **20**:315–317.
- Yang DJ, Kim C, Schechter NR, Azhdarinia A, Yu D, Oh C, et al. Imaging with ^{99m}Tc -ECDG targeted at the multifunctional glucose system: feasibility studies with rodents. *Radiology* 2003; **226**:465–473.
- Saha GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York: Springer; 2010.
- de Barros ALB, Mota LG, Ferreira CA, Corrêa NCR, Góes AM, Oliveira MC, et al. ^{99m}Tc -labeled bombesin analog for breast cancer identification. *J Radioanal Nucl Chem* 2013; **295**:2083–2090.
- Froidevaux S, Eberle AN, Christe M, Sumanovski L, Heppeler A, Schmitt JS, et al. Neuroendocrine tumor targeting: study of novel gallium-labeled somatostatin radiolabeled peptides in a rat pancreatic tumor model. *Int J Cancer* 2002; **98**:930–937.
- Fernandes RS, Mota LG, Moghbel M, Werner TJ, Alavi A, et al. ^{99m}Tc -phytate as a diagnostic probe for assessing inflammatory reaction in malignant tumors. *Nucl Med Commun* 2015; **36**:1042–1048.
- Andreozzi E, Seo JW, Ferrara K, Louie A. Novel method to label solid lipid nanoparticles with ^{64}Cu for positron emission tomography imaging. *Bioconjugate Chem* 2011; **22**:808–818.
- Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today* 2009; **4**:399–413.
- Daputo R, Aguiar RB, Moreno M, Machado CM, Marques FL, Gambini JP, et al. Technetium glucose complexes as potential cancer imaging agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; **25**:4254–4259.
- Araujo FI, Proença FPP, Ferreira CG, Venturini SC, Rosado de Castro PH, Moreira RD, et al. Use of ^{99m}Tc -doxorubicin scintigraphy in females with breast cancer: a pilot study. *Br J Radiol* 2015; **88**:1–7.
- Faheem AR, Bokhari TH, Roohi S, Mushtaq A, Sohaib M. ^{99m}Tc -Daunorubicin a potential brain imaging and theranostic agent: synthesis, quality control, characterization, biodistribution and scintigraphy. *Nucl Med Biol* 2013; **40**:148–152.
- Kesner AL, Hsueh W, Htet NL, Pio BS, Czernin J, Pegram MD. Biodistribution and predictive value of ^{18}F -fluorocyclophosphamide in mice bearing human breast cancer xenografts. *J Nucl Med* 2007; **48**:2021–2027.
- Kumar P, Singh B, Ghai A, Hazari PP, Mittal BR, Mishra AK. Development of a single vial kit formulation of [^{99m}Tc]-labeled doxorubicin for tumor imaging and treatment response assessment-preclinical evaluation and preliminary human results. *J Labelled Comp Radiopharm* 2015; **58**:242–249.
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijs HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012; **52**:1213–1225.
- Singal PK, Iiskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; **339**:900–905.
- Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, James Speyer L, Myers CE. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res* 1983; **43**:3417–3421.
- Lown JM. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol Ther* 1993; **60**:185–214.
- Terasaki T, Iga T, Sugiyama Y, Hanano M. Experimental evidence of characteristic tissue distribution of adriamycin. Tissue DNA concentration as a determinant. *J Pharm Pharmacol* 1982; **34**:597–600.
- Rizvi FA, Bokhari TH, Roohi S, Mushtaq A. Direct labeling of doxorubicin with technetium-99m: its optimization, characterization and quality control. *J Radioanal Nucl Chem* 2012; **293**:303–307.
- USP 34. *The United States Pharmacopoeia National Formulary*. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention Inc.; 2012.
- Kumar P, Singh B, Sharma S, Ghai A, Chuttani K, Mishra AK, et al. Preclinical evaluation of [^{99m}Tc]-labeled doxorubicin as a potential scintigraphic probe for tumor imaging. *Cancer Biother Radiopharm* 2011; **27**:221–225.
- Reddy LH, Sharma RK, Murthy RSR. Enhanced tumour uptake of doxorubicin loaded poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in mice bearing Dalton's lymphoma tumour. *J Drug Target* 2004; **12**:443–451.
- Datir SR, Das M, Singh RP, Jain S. Hyaluronate tethered, 'smart' multiwalled carbon nanotubes for tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Bioconjugate Chem* 2012; **23**:2201–2213.
- Upadhyay KK, Mishra AK, Chuttani K, Kaul A, Schatz C, Le Meins JF, et al. The in vivo behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly (γ-benzyl L-glutamate)-block-hyaluronan polymerosomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BALB/c mice. *Nanomed Nanotech Biol Med* 2012; **8**:71–80.
- Garcia CMS, Araujo MR, Lopes MTP. Morphological and Immunophenotypical characterization of murine mammary carcinoma 4t1. *Braz J Vet Pathol* 2014; **7**:158–165.
- Israyelyan A, Shannon EJ, Baghian A, Kearney MT, Kousoulas KG. Thalidomide suppressed the growth of 4T1 cells into solid tumors in BALB/c mice in a combination therapy with the oncolytic fusogenic HSV-1 OncdSyn. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; **6**:1201–1210.
- Souza CM, Carvalho LF, Vieira TS, Silva ACA, Lopes MTP, et al. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. *Biomed Pharmacother* 2012; **66**:491–498.
- Pulaski BA, Rosenberg SO. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2000; **20**:20.2.