

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ÁLVARO DUTRA DE CARVALHO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE
LONGA CIRCULAÇÃO CONTENDO CISPLATINA**

**Belo Horizonte
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Álvaro Dutra de Carvalho Júnior

**Avaliação pré clínica de lipossomas pH-sensíveis de longa
circulação contendo cisplatina**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial à obtenção do título de grau de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora

Profa. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte

2008

C331a Carvalho Júnior, Álvaro Dutra de
Avaliação pré-clínica de lipossomas pH-sensíveis de longa
circulação contendo cisplatina . – 2008.
148 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Mônica Cristina de Oliveira

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Lipossomas – Teses. 2. Câncer – Tratamento - Teses. 3.
Tecnologia de liberação prolongada – Teses. Medicamentos
– Formas farmacêuticas I. Oliveira, Mônica Cristina.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Farmácia.

CDD 615.4



FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação pré-clínica de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina".

Álvaro Dutra de Carvalho Júnior

Tese aprovada em 19/12/2008 pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava
Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UnB

Prof. Dr. Giovanni Dantas Cassali
Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Prof. Dr. Jorge Luiz Pasquero
Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira (Orientadora)
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

AGRADECIMENTOS

A mente humana é capaz de transcender a simples racionalidade da lógica e, quando isso acontece, criamos, cultuamos e agradecemos a **Deus**.

Em nossa jornada não caminhamos sozinhos. Pessoas fazem parte da nossa jornada e contribuem para alcançarmos nossos objetivos. Algumas vezes apenas um simples gesto já é suficiente para mudar nosso rumo e contribuir para o nosso sucesso.

Devo agradecer á Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira pela oportunidade de desempenhar um trabalho gratificante sob sua constante orientação, pelo incentivo e, companheirismo;

Quero fazer uma menção especial aos colaboradores deste empreendimento: Prof. Gilson Andrade Ramaldes, Prof. Valbert Nascimento Cardoso, Profa. Simone Odília Fernandes Diniz, Profa. Josianne Nicácio da Silveira, Profa. Elene Cristina Pereira Maia, Dr. Alberto Julius Wainstein, Dra. Ana Paula Wainstein, Dr. Gustavo Guerra Jacob, Dr. Alexandre Soares Leal, Profa. Ângela Maria Quintão Lana, Dr. Whocely Victor de Castro, Profa. Elzília Nunan.

Agradeço, também, aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Biotério (Adelaide e Batista), e ao Departamento de Farmácia-Bioquímica da UFVJM que muito fizeram para o andamento deste trabalho;

De forma especial às amigas: Luciene, Cristiane Giuberti e Elaine pela imensa dedicação demonstrada;

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine quem, primeiro, demonstrou acreditar no meu potencial dando-me a oportunidade para que começasse a iniciação científica.

À minha família:

João Gabriel, Luciene, Zélia, Álvaro, Ciro, Virgínia, Sarah, Vítor e Samuel
obrigado pelo apoio incondicional, carinho e suporte nos momentos difíceis.

“Nulla tenaci in via est via”
(Spyker)

“Para os persistentes nenhum caminho é impossível”

RESUMO

cis-Diaminodicloroplatina (II) ou cisplatina (CDDP) é um dos agentes antineoplásicos mais utilizados no tratamento de uma variedade de tumores sólidos. Entretanto, a efetividade do seu uso clínico é dificultada pela indução de severos efeitos colaterais e sua tendência de promover quimiorresistência. Para resolver estes inconvenientes, sistemas de liberação de drogas têm sido desenvolvidos como os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo CDDP (SpHL-CDDP). Este trabalho apresenta a avaliação pré-clínica de formulações contendo CDDP encapsulada em SpHL-CDDP, envolvendo estudo de biodistribuição, eficácia antitumoral e avaliação toxicológica preliminar após administração em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Inicialmente, para que o estudo de biodistribuição fosse realizado foi investigado o preparo de CDDP radiomarcada (CDDP*). A irradiação da CDDP no reator de pesquisa TRIGA MARK I IPR R-1 com o recobrimento da amostra com a cápsula de cádmio se mostrou mais adequado em termos de maior atividade específica ($57,0 \text{ Bq.mg}^{-1}$) em relação à amostra desprotegida ($40,0 \text{ Bq.mg}^{-1}$), sem ocorrer a degradação da CDDP. A avaliação da biodistribuição de SpHL-CDDP em camundongos Swiss portadores de tumor de Ehrlich mostrou uma maior permanência da formulação lipossomal no sangue em comparação à CDDP livre. Os valores de volume de distribuição foram iguais a 1807,91 e 651,60 mL/kg e de área sob a curva (ASC), iguais a 64,70 e 141,51 h.µg/mL para os tratamentos com CDDP e SpHL-CDDP, respectivamente. A circulação sanguínea prolongada de SpHL-CDDP contribuiu para a obtenção de valor de ASC duas vezes superior na região tumoral em comparação ao tratamento com CDDP livre. Além disso, a partir da determinação do coeficiente de partição tecido/sangue (K_p) observou-se que o tratamento com SpHL-CDDP conduziu a uma distribuição extensiva maior na região tumoral do que após injeção de CDDP livre (K_p igual a 1,51 e 1,23, respectivamente), o que pode contribuir para uma maior eficácia antitumoral de SpHL-CDDP. O tratamento dos camundongos com SpHL-CDDP revelou também uma menor afinidade pelo tecido renal do que aquele observado para CDDP livre. Esse resultado é relevante, pois pode significar uma menor ou ausência de nefrotoxicidade após a administração de CDDP sob a forma

encapsulada em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação. Os órgãos do sistema fagocitário mononuclear, fígado e baço, também apresentaram a captação de SpHL-CDDP de forma extensiva. Na última etapa, foram investigadas a atividade citotóxica e antitumoral assim como a toxicidade de SpHL-CDDP em comparação à CDDP livre. A citotoxicidade e o acúmulo intracelular de CDDP foram avaliados em linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano sensíveis (GLC4) ou resistentes a CDDP (GLC4/CDDP). A CDDP livre apresentou maior atividade citotóxica em comparação com SpHL-CDDP para as células sensíveis, o qual pode ser devido ao mecanismo de captura celular da formulação de SpHL-CDDP. Entretanto, na linhagem GLC4/CDDP, os SpHL-CDDP mostraram-se mais citotóxicos e os valores de IC_{50} obtidos com esse tratamento para as linhagens celulares GLC4 e GLC4/CDDP foram similares ($1,32 \pm 0,10$ e $1,45 \pm 0,15$, respectivamente). Isso revela que os SpHL-CDDP foram capazes de contornar a resistência *in vitro*. Após a administração intravenosa das formulações de SpHL-CDDP e CDDP livre, o volume tumoral, a taxa de sobrevida e a variação do peso corporal dos animais foram avaliadas. Após 32 dias, a velocidade de crescimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss foi similar para os tratamentos com SpHL-CDDP e CDDP livre. No entanto, a mediana de sobrevida obtida para SpHL-CDDP foi maior do que aquela observada para o tratamento com a CDDP livre (66 e 52 dias, respectivamente). Os animais tratados com a CDDP livre apresentaram uma acentuada perda de peso corporal, fato não observado para os animais tratados com SpHL-CDDP. Estes resultados mostram que SpHL-CDDP foram capazes de manter o efeito antitumoral da CDDP sem induzir toxicidade aparente. Portanto, SpHL-CDDP mostrou ser uma estratégia interessante para o uso de CDDP no tratamento de tumores.

ABSTRACT

cis-Diamminedichloroplatinum (II) or cisplatin (CDDP) is one of the anticancer agents most widely used in the treatment of solid tumors. However, the effectiveness of its clinical use is hampered by the induction of severe side effects and its tendency to provoke chemoresistance. To circumvent these inconveniences, drug delivery systems, such as long-circulating and pH-sensitive liposomes containing CDDP (SpHL-CDDP) have been developed. This work presents the pre-clinical evaluation of SpHL-CDDP, involving biodistribution study, antitumoral efficacy and preliminary evaluation of toxicity after administration in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice. Initially, it was investigated the preparation of radiolabelled CDDP (CDDP*). The irradiation of CDDP using the TRIGA MARK I IPR R-1 and with the covering of cadmium capsule showed to be more appropriate in terms of higher specific activity (57.0 kBq.mg⁻¹) than that bare samples (40.0 kBq.mg⁻¹). In addition, the CDDP* did not suffer any degradation. The biodistribution study of SpHL-CDDP in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice revealed a higher residence time into bloodstream than that observed with free CDDP treatment. The values of distribution volume were equal to 1807.91 and 651.60 mL/kg and those of area under the curve (AUC) were equivalent to 64.70 and 141.51 h.µg/mL for free CDDP and SpHL-CDDP treatments, respectively. The prolonged circulation of SpHL-CDDP into bloodstream allowed to get value of AUC that were two times superior in the tumor region than that obtained after free CDDP administration. In addition, the determination of tissue blood partition coefficient (K_p) showed that a higher extensive distribution in the tumor after SpHL-CDDP administration than that after free CDDP injection (K_p was equal to 1.51 and 1.23, respectively). This finding can contribute to a better antitumoral efficacy of SpHL-CDDP treatment. The treatment of mice with SpHL-CDDP also demonstrated a lower affinity for renal tissue than that observed with free CDDP treatment. This relevant result may signify a reduction or absence of nephrotoxicity after SpHL-CDDP administration. The extensive uptake of CDDP by organs of the mononuclear phagocytic system (liver and spleen) was occurred after SpHL-CDDP administration. Finally, it was investigated the cytotoxicity, antitumoral effect and toxicity of SpHL-CDDP in comparison with

free CDDP. The cytotoxicity and intracellular accumulation of CDDP were evaluated in the human lung cancer cell line (GLC4) and its resistant subline to CDDP (GLC4/CDDP). The free CDDP showed higher cytotoxic activity than that observed to SpHL-CDDP for sensitive cells line. This fact is probably related to different uptake mechanisms of the free and the encapsulated CDDP. However, it is worth noting that the liposomal formulation exhibited the same efficacy against CDDP-sensitive and CDDP-resistant cells. This finding indicates that these liposomes were able to overcome the resistance mechanisms *in vitro*. After the intravenous administration of SpHL-CDDP and free CDDP formulations, the tumor volume, survival rate, and body weight variation were evaluated. After 32 days, the growth of the Ehrlich solid tumor in Swiss mice was similar for both treatments. However, the median of survival obtained with SpHL-CDDP treatment was higher than that observed for free CDDP treatment (66 and 52 days, respectively). The animals treated with free CDDP presented a significant body weight loss. This fact was not observed for SpHL-CDDP treatment. These findings show that SpHL-CDDP treatment was able to maintain the antitumoral effect of CDDP without to induce the appearance of toxicity. Thus, the SpHL-CDDP proved to be a relevant strategy for the use of CDDP in the treatment of tumors.

Key words: long-circulating and pH-sensitive liposomes, cisplatin, tissue distribution, antitumoral effect, toxicity, drug delivery.

Lista de Figuras

Figura 1	CDDP e seus produtos de hidrólise.....	Pág. 07
Figura 2	Formação de adutos CDDP-DNA. CDDP é capaz de reagir com o DNA para formar monoadutos, ligações cruzadas intracadeia (1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpXpGp), ligações cruzadas intercadeia (G-G) e ligações cruzadas DNA-Proteína. Adaptado de (RABIK & DOLAN, 2007).....	Pág. 08
Figura 3	Estrutura química dos complexos de platina.....	Pág. 11
Figura 4	Representação esquemática dos lipossomas (Adaptado de FRÉZARD <i>et al</i> , 2005).....	Pág. 14
Figura 5	Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).....	Pág. 15
Figura 6	Estruturas químicas de DOPE (A), DOPC(B) e DSPE-PEG ₂₀₀₀ (C).....	Pág. 17
Figura 7	Estrutura química de CHEMS.....	Pág. 18
Figura 8	Espectro da CDDP*. Superior: CDDP* obtida após 2 horas de irradiação na ausência de cápsula de cádmio. A, B e C indicam os fotopicos de 359,0; 409,5 e 538,9 keV da ¹⁹¹ Pt, respectivamente. Inferior: CDDP* obtida com o uso da cápsula de cádmio após 2 horas de irradiação.....	Pág. 33
Figura 9	Determinação da pureza química da CDDP usando CLAE. A – Solução de CDDP não radiomarcada. B – Solução de CDDP radiomarcada obtida após 8 horas de irradiação.....	Pág. 34
Figura 10	Biodistribuição da CDDP* após 24 horas de sua administração em camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich e detectada a □ 70-210 keV e ■ 50-150 keV. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). * e # indicam resultados estatisticamente diferentes em relação ao fígado, baço e sangue nas janelas de 70-210 keV e 50-150 keV, respectivamente.....	Pág. 35
Figura 11	Perfil de concentração de CDDP no sangue (A), fígado (B), rins (C), baço (D), coração (E) e tumor (F) após administração intravenosa de CDDP (▪▲▪) ou SpHL-CDDP (—■—) em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativa (p< 0.05).....	Pág. 45

- Figura 12 Curva dose-resposta de células GLC4 e GLC4/CDDP para SpHL-CDDP obtida após três dias de incubação. Os dados referem-se às médias e desvio padrão de ensaio realizado em triplicata..... Pág. 57
- Figura 13 Figura 13. Perfil da sobrevivência das linhagens celulares GLC4 e GLC4/CDDP em função da concentração intracelular de platina após a exposição de dose equitóxica de SpHL-CDDP por 3 dias..... Pág. 58
- Figura 14 Perfil da velocidade de crescimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss fêmeas submetidas aos seguintes tratamentos: • SpHL-CDDP; ◆ NSpHL-CDDP; ■ CDDP livre; ○ SpHL; ◇ NSpHL; □ Solução de NaCl 0,9% (p/v)..... Pág. 60
- Figura 15 Efeito antitumoral após a administração intravenosa de CDDP (▼), SpHL-CDDP (■) ou NSpHL-CDDP (▲) em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. A dose de CDDP em cada formulação foi de 8 mg/kg. Também são mostrados nesta figura os seguintes grupos controle: SpHL (□), NSpHL (△) ou solução de NaCl 0.9% (w/v) (▽). Os valores do volume tumoral foram calculados usando as equações da análise por regressão linear obtida para cada tratamento. Os valores de r^2 das curvas CDDP, SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, SpHL, NSpHL e solução de NaCl 0.9 % (p/v) são: 97,85; 95,22; 95,98; 94,08; 94,46 e 95,98, respectivamente..... Pág. 61
- Figura 16 Perfil da variação de peso dos camundongos Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich e submetidos a diferentes tratamentos. Os gráficos A, B, C e D correspondem à variação de peso observada nos dias 7, 14, 22 e 29 dias, respectivamente, após o início dos tratamentos. SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e NaCl 0,9% (p/v) apresentam diferença estatística em relação à CDDP livre ao nível de $p < 0,001$ (ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison Test)..... Pág. 63
- Figura 17 Sobrevida dos camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich tratados com CDDP (A, ▼), SpHL-CDDP (A, ■) ou NSpHL-CDDP (A, ▲). A dose de CDDP em cada formulação foi de 8 mg/kg. A sobrevida dos grupos submetidos aos tratamentos seguintes também foi avaliada: SpHL (B, □), NSpHL (B, △) ou solução de NaCl 0.9% (p/v) (B, ▽)..... Pág. 65

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tabela 1. Principais radionuclídeos produzidos pela irradiação da CDDP. Adaptado de Sykes e colaboradores, 1986.....	Pág. 32
Tabela 2	Coefficiente de partição tecido/sangue (K_p) para diferentes órgãos de camundongos após tratamento com injeção intravenosa de CDDP livre (A) ou de SpHL-CDDP (B).....	Pág. 46
Tabela 3	Parâmetros farmacocinéticos para a distribuição de CDDP* e SpHL-CDDP* após administração endovenosa em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Os valores foram calculados utilizando o programa WinNonlin para um modelo não-compartimental.....	Pág. 47
Tabela 4	IC_{50} , fator de resistência e concentração intracelular de platina após três dias de incubação com as formulações de CDDP e SpHL-CDDP. Os dados são expressos como média e desvio padrão, sendo obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata.....	Pág. 59

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ANOVA	Análise de variância
ϕ_{cpi}	Fluxo de nêutrons epitérmicos
ϕ_{th}	Fluxo de nêutrons térmicos
σ_{th}	Sessão de choque
$^{195\text{m}}\text{Pt}$	Platina-195 metaestável
ASC	Área sob a curva da concentração plasmática da formulação
CCRT	Quimioterapia concomitante à radioterapia
CDDP	Cisplatina [cis-diamino-dicloroplatina (II)]
CDDP*	Cisplatina radiomarcada
CHEMS	Hemisuccinato de coleslerila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Dioleoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
GLC4	Linhagem celular de carcinoma de pulmão de pequenas células sensíveis à cisplatina
GLC4/CDDP	Linhagem celular de carcinoma de pulmão de pequenas células resistentes à cisplatina
GSH	Glutathiona
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%
k_p	Coeficiente de partição tecido-sangue
LUV	Lipossomas unilamelares grandes
MLV	Lipossomas multilamelares
NSpHL-CDDP	Lipossomas não-pH sensíveis de longa circulação contendo cisplatina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
pH _e	pH extracelular
pH _i	pH intracelular
RNA	Ácido ribonucléico

SCCHN	Câncer escamoso de cabeça e de pescoço
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL-CDDP	Lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo CDDP
SUV	Lipossomas unilamelares pequenos

Lista de anexos – artigos publicados

ANEXO I

CARVALHO JÚNIOR, A.D.; LEITE, E.A.; MOTA, L.G.; COELHO, L.G.V.; LNA, A.M.Q.; NASCIMENTO, V.C.; NUNAN, E.A.; CASTRO, W.V.; DE OLIVEIRA, M.C. Antitumoral Effect of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Against Ehrlich Solid Tumor. **Life Sciences**. 2008 (submetido).

ANEXO II

JUNIOR, A.D.; MOTA, L.G.; NUNAN, E.A.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; LEAL, A.S.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. **Life Sciences**. v. 80, p. 659-664, 2007.

ANEXO III

CARVALHO JÚNIOR, A.D.; VIEIRA, F.P.; DE MELO, V.J.; LOPES, M.T.P.; SILVEIRA, J.N.; RAMALDES, G.A., GARNEIR-SUILLEROT, A.; PEREIRA-MAIA, E.C.; DE OLIVEIRA, M.C. Preparation and citototoxicity of cisplatin-containing liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, p. 1-9, 2007.

ANEXO IV

LEAL, A.S.; CARVALHO JÚNIOR, A.D.; ABRANTES, F. M.; MENEZES, M.A.B.C.; FERRAZ, V.; CRUZ, T.S.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Production of the radioactive antitumoral cisplatin. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 64, p. 178-181, 2006.

ANEXO V

CARVALHO JUNIOR, A.D.; ABRANTES, F.M.; LEAL, A.S.; MENEZES, M.A.B.C.; FERRAZ, V.; CRUZ, T.S.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Use of labelled cisplatin obtained by direct irradiation in a preliminary biodistribution study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 85-88, 2005.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos	xv
Lista de anexos – artigos publicados	xvii
Introdução	01
1 Câncer	02
2. Tratamento do Câncer	04
2.1 Cisplatina.....	04
2.1.1 Inconvenientes da utilização de CDDP.....	08
2.2 Novas propostas para a quimioterapia com os compostos de platina.....	10
2.2.1 Sistemas nanoestruturados para a vetorização de fármacos.....	13
2.2.2 O uso potencial dos lipossomas na quimioterapia.....	13
2.2.3 Lipossomas de CDDP.....	19
3. Objetivos	23
3.1 Objetivos Específicos.....	24
Trabalho Experimental	25
Capítulo 1 – Preparação da cisplatina radiomarcada e estudo de sua biodistribuição em camundongos	26
1. Introdução.....	27
2. Material e Métodos.....	28
2.1 Obtenção da CDDP*.....	29
2.2 Determinação da pureza química.....	29
2.3 Modelo de tumor sólido de Ehrlich.....	30
2.4 Estudo de biodistribuição.....	30

3. Resultados e Discussão.....	31
3.1 Irradiação da CDDP.....	31
3.2 Determinação da pureza química.....	33
3.3 Estudo de biodistribuição.....	34

Capítulo 2 – Avaliação da biodistribuição e da farmacocinética dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich.....

1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1 Encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação.....	38
2.1.1 Método de evaporação em fase reversa.....	38
2.2 Caracterização dos SpHL-CDDP.....	38
2.3 Estudo de estabilidade dos SpHL-CDDP.....	39
2.4 Modelo experimental de camundongos Swiss portadores de tumor de Ehrlich.....	40
2.5 Estudo de biodistribuição e farmacocinética dos SpHL-CDDP.....	40
3. Resultados.....	41
3.1 Caracterização dos SpHL-CDDP.....	41
3.2 Estabilidade dos SpHL-CDDP.....	42
3.3 Distribuição tecidual das formulações de CDDP.....	42
3.4 Estudo farmacocinético das formulações de CDDP.....	46
4. Discussão e Conclusão.....	47

Capítulo 3 – Avaliação da atividade antitumoral e da resistência *in vitro* de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina.....

1. Introdução.....	51
2. Material e Métodos.....	52
2.1 Encapsulação da cisplatina em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação.....	52
2.1.1 Método da evaporação em fase reversa	52
2.2 Caracterização dos SpHL-CDDP.....	53

2.3 Avaliação da resistência celular aos SpHL-CDDP.....	54
2.4 Determinação da concentração intracelular de CDDPP.....	54
2.5 Avaliação da atividade antitumoral de SpHL-CDDP.....	55
2.6 Avaliação do peso e da sobrevida.....	55
2.7 Análise Estatística.....	56
3. Resultados.....	56
3.1 Caracterização dos lipossomas.....	56
3.2 Avaliação da resistência celular aos SpHL-CDDP.....	56
3.3 Avaliação da atividade antitumoral de SpHL-CDDP.....	59
3.4 Avaliação do peso dos animais.....	61
3.5 Análise de Sobrevida.....	63
4. Discussão.....	65
5. Conclusão.....	67
Discussão Geral e Perspectivas.....	68
Referências Bibliográficas.....	71
Anexos – Trabalhos submetido/publicados	
Anexo I: Antitumoral Effect of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Against Ehrlich Solid Tumor.	80
Anexo II: Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice.	103
Anexo III: Preparation and citototoxicity of cisplatin-containing liposomes.	110
Anexo IV: Production of the radioactive antitumoral cisplatin.	120
Anexo V: Use of labelled cisplatin obtained by direct irradiation in a preliminary biodistribution study.	125

1. INTRODUÇÃO

Avaliação Pré-Clínica de Lipossomas pH-Sensíveis de Longa Circulação Contendo Cisplatina

INTRODUÇÃO

1. Câncer

O câncer é uma doença que pode acometer diversos órgãos e tecidos de diferentes origens histológicas, podendo se manifestar com diferentes comportamentos biológicos que têm em comum o crescimento desordenado das células do organismo. As características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si variam de acordo com o tipo de célula acometida, sua velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecido e órgãos distantes, originando as metástases (ABCancer, 2008).

As neoplasias constituem a segunda maior causa de morte nos países industrializados depois das doenças cardiovasculares, onde uma em cada quatro pessoas adquire a patologia e uma em cada cinco evolui para o óbito. As neoplasias são responsáveis por 12% das mortes no mundo, cerca de seis milhões de pessoas a cada ano (FONTES *et al.*, 2005). No Brasil, a frequência da doença aumenta à medida que se desloca para o sul do país, cerca de 500.000 novos casos de câncer são diagnosticados por ano (INCA, 2006).

O surgimento do câncer ocorre por meio da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido à alteração do seu DNA. As causas do câncer são variadas e estão associadas com a participação de vírus, com ação de substâncias químicas do meio ambiente ou da alimentação e com a influência de agentes físicos, como a radiação. A célula cancerosa prolifera-se desordenadamente, perde a capacidade de aderência, invade os tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos e se espalha pelo

organismo, estabelecendo-se em locais distantes de sua origem, onde produz os tumores secundários (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Os genes que participam na formação de tumores são principalmente os que, nas células normais, estão envolvidos com o controle do ciclo celular, o reparo do DNA danificado ou a apoptose. O ciclo celular é o processo básico de gênese de novas células e compreende os fenômenos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas. A intérfase representa o período compreendido entre duas divisões e ocorre em três fases consecutivas denominadas G1, S e G2: (i) em G1 as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA e de proteínas, com marcante aumento do citoplasma; (ii) no período S a célula duplica o seu conteúdo de DNA e (iii) em G2 ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas que são essenciais para mitose. Tendo passado pelas fases da intérfase, o núcleo entra em processo de divisão ou mitose. O período onde não ocorre a proliferação das células é denominado G0.

Não se conhece o mecanismo de ação de todos os genes supressores de tumores, porém alguns codificam proteínas que mantêm as células em G0, portanto fora do ciclo mitótico. Um gene supressor muito estudado é o p53, e aproximadamente 50% de todos os tumores malignos humanos apresentam mutação ou deleção deste gene. O gene p53 normal suprime a formação do câncer através de diversos mecanismos, impedindo que as células com DNA danificado entrem na fase S do ciclo mitótico, até que o DNA seja reparado, ou desencadeado o mecanismo de apoptose da célula danificada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Uma característica marcante dos tecidos tumorais é o fato do pH extracelular (pH_e) ser mais ácido que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular (pH_i) de

ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o pH_e substancialmente reduzido no tumor quando comparado com o tecido normal promove um gradiente de pH celular diferente nestes dois tecidos. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar o baixo pH_e nos tecidos tumorais é o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da célula cancerosa (STUBBS *et al.*, 1999).

2. Tratamento do Câncer

Existem três principais formas de tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar a remoção de tumores com eficácia, nos casos em que não apresentam metástase. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficácia do tratamento. Entretanto, na ocorrência de metástase, faz-se necessária uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos, com quimioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.1 Cisplatina

Atualmente, a cisplatina (CDDP) é um dos fármacos mais amplamente utilizados na quimioterapia, apresentando espectro de ação contra vários tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão (ARRIAGADA *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2008), cabeça e pescoço (PAIVA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2008), carcinoma de ovário (ARAVANTINOS *et al.*, 2006; BOVEN *et al.*, 2002; GUASTALLA *et al.*, 1998; SHIRAZI *et al.*, 1996; Van de VAART *et al.*, 1988) e câncer testicular (STRUMBERG *et al.*, 2002).

O câncer de pulmão não constituído por pequenas células engloba as seguintes histopatologias: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, apresentando acometimento pulmonar e disseminação linfática e hematológica (FILHO, 2002). No Brasil, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer em homens e a segunda causa em mulheres. Menos de 25 % dos casos diagnosticados apresenta-se nos estágios I ou II, e têm uma chance razoável de intervenção cirúrgica. Além disto, apenas cerca de metade dos pacientes submetidos à cirurgia permanecem livres da doença. A maioria das recidivas ocorre à distância, de forma que tratamentos sistêmicos são necessários para melhorar a taxa de cura. Outro problema freqüente com os pacientes operados é o aparecimento de um segundo tumor primário, sugerindo a necessidade de tratamentos de “quimioprevenção”. A baixa taxa de cura, de apenas 14%, pode ser atribuída à rápida disseminação da doença, à falha no diagnóstico precoce e à impossibilidade da quimioterapia atual em curar os casos da doença sistêmica (SKARE, 2002). A quimioterapia do câncer de pulmão não constituído por células pequenas tem sido investigada por várias décadas. Atualmente, a combinação da cisplatina com um fármaco de 3ª geração, podendo ser um antimetabólito (gencitabina), um inibidor da topoisomerase (irinotecano), um alcalóide da vinca (vinorelbina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) é o procedimento padrão adotado. A dose de cisplatina nestes esquemas varia de 50 a 100 mg/m². Entretanto, os resultados ainda insatisfatórios obtidos no tratamento do câncer de pulmão não constituído por células pequenas demonstram a importância da descoberta de uma nova estratégia terapêutica para o prolongamento da sobrevida dos pacientes (LIMA & ALVES, 2002).

A utilização de CDDP como primeira escolha no tratamento de câncer de cabeça e pescoço apresenta resposta variando entre 75% e 85%, sendo que 25% a 35% dos pacientes apresentam completa remissão do tumor. O uso da CDDP como adjuvante no tratamento do câncer de cabeça e pescoço avançado tem mostrado respostas promissoras (SCHRIJVERS *et al.*, 2003). Entretanto, apesar da resposta ao tratamento com a CDDP e outros agentes

quimioterápicos, se faz necessário uma melhora da taxa de cura com menor toxicidade e efeitos colaterais (YANG *et al.*, 2008).

O câncer de ovário é responsável por aproximadamente 2% dos óbitos por câncer no Brasil e cerca de 4% dos óbitos por neoplasia em mulheres, correspondendo à sexta causa de internação hospitalar por câncer no Brasil (Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 2000). Atualmente, a combinação de um composto platinado com um taxano é adotada como procedimento padrão na quimioterapia dos pacientes com câncer de ovário avançado, substituindo o antigo esquema de tratamento conhecido como CAP (ciclofosfamida 500 mg/m², adriamicina 50 mg/m² e cisplatina 50 mg/m²). Os carcinomas avançados de ovário são inicialmente muito sensíveis a múltiplos agentes quimioterápicos. Entretanto, apenas cerca de 25% das pacientes sobrevivem até 5 anos, devido à resistência adquirida aos fármacos (LAGO & ROSSARI, 2002).

O câncer testicular é mais comum em homens na faixa etária compreendida entre 20 e 35 anos. A maioria destes pacientes necessita de tratamento sistêmico mesmo após a dissecação do tumor ou a orquidectomia, além da remoção dos linfonodos retroperitoneal para a garantia de completa remissão (STRUMBERG *et al.*, 2002). Entretanto, em regimes de quimioterapia as alterações hormonais, a morbidez cardiovascular e a mortalidade têm sido relacionadas aos pacientes que sobrevivem ao câncer testicular, com risco aumentado para o desenvolvimento de síndrome metabólica (HAUGNES *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação da cisplatina [cis-diamino-dicloroplatina (II)], CDDP, ocorre da seguinte forma: após a entrada na célula, os íons cloreto são substituídos por moléculas de água, de forma que a CDDP adquire carga

positiva e interage com moléculas nucleofílicas dentro da célula, tais como DNA, RNA e proteínas (Fig. 1).

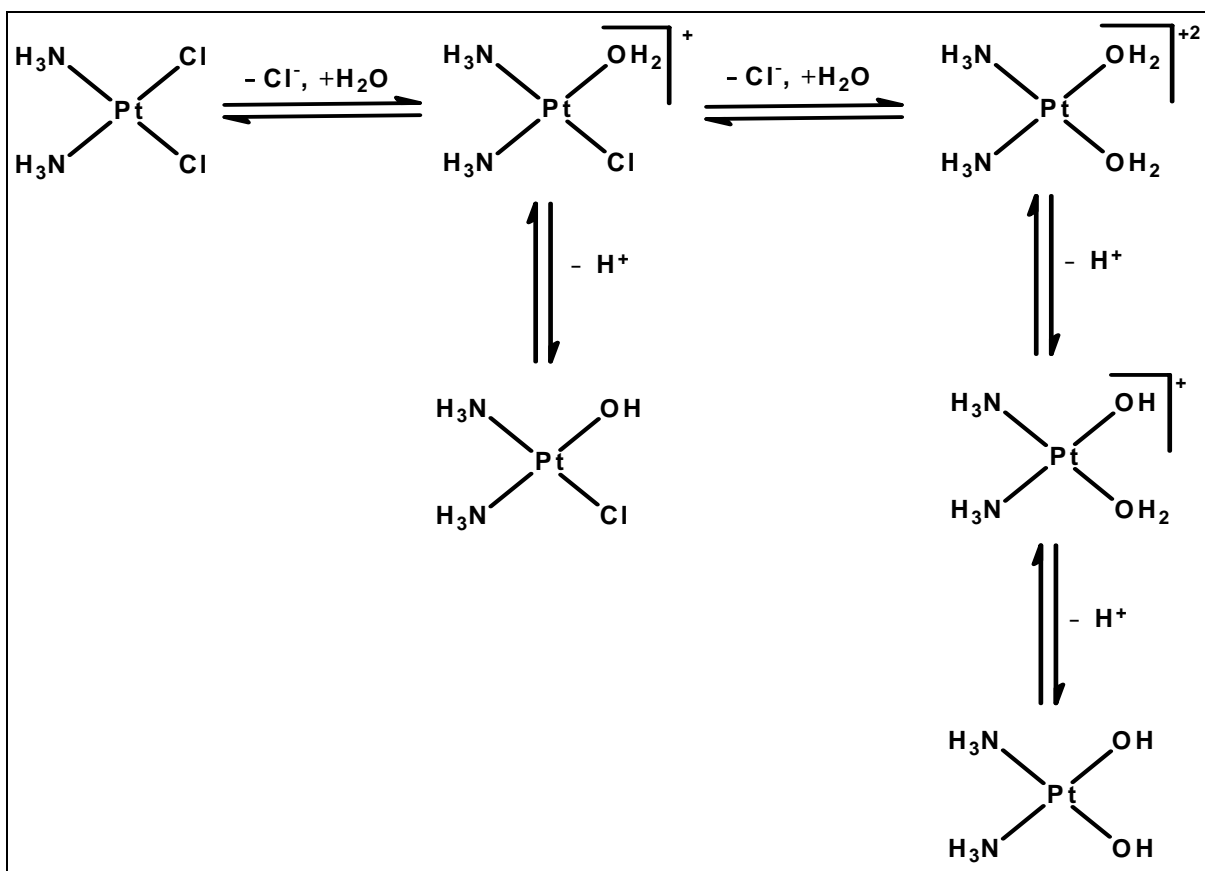


Figura 1 – CDDP e seus produtos de hidrólise.

A interação da CDDP com o DNA é através da ligação aos átomos N7 dos anéis imidazólicos de guanosina e adenosina. Três diferentes tipos de ligações podem ser formadas com as bases púricas do DNA: monoaddutos, ligações cruzadas intracadeia e ligações cruzadas intercadeia (Fig. 2). Os monoaddutos são os primeiros a serem formados pela perda de uma molécula de água da espécie, entretanto, 90% dos monoaddutos reagem para formar ligações cruzadas, sendo quase todas do tipo intracadeia. As ligações cruzadas promovem a contorção da estrutura do DNA, o que pode ser responsável pela citotoxicidade por bloquear mecanismos de reparação, transcrição e replicação do DNA e favorecer a iniciação do processo de apoptose. A CDDP também é capaz de promover a ativação das caspases apoptóticas pela ativação da via do estresse do retículo endoplasmático. (RABIK & DOLAN, 2007).

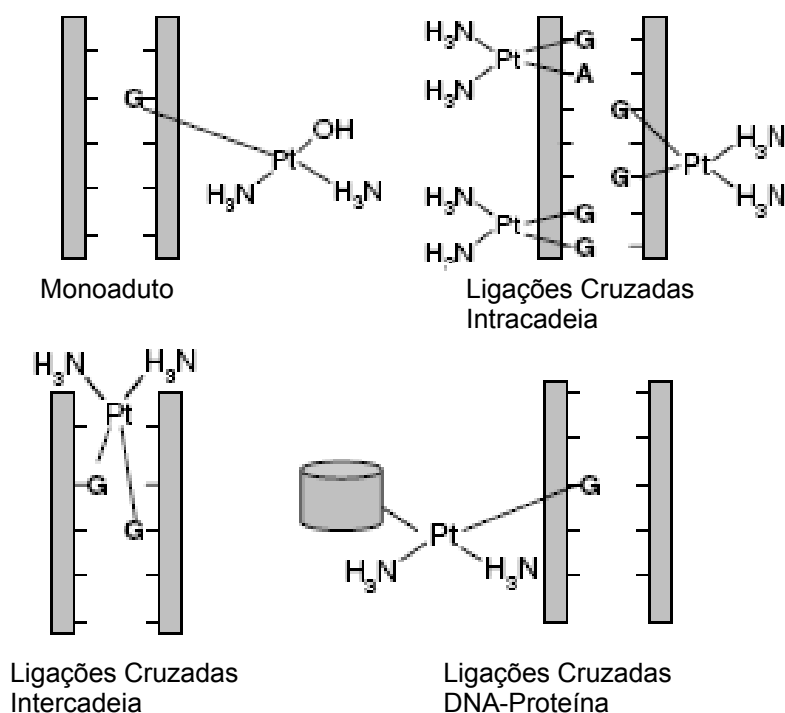


Figura 2- Formação de adutos CDDP-DNA. CDDP é capaz de reagir com o DNA para formar monoaddutos, ligações cruzadas intracadeia (1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpXpGp), ligações cruzadas intercadeia (G-G) e ligações cruzadas DNA-Proteína. Adaptado de (RABIK & DOLAN, 2007).

2.1.1 Inconvenientes da utilização de CDDP

A utilização da CDDP apresenta alguns inconvenientes, podendo-se destacar: efeitos adversos, desenvolvimento de resistência clínica, e possibilidade de interagir com outros fármacos administrados concomitantemente na terapia antineoplásica.

Os efeitos adversos comumente manifestados são: anemia secundária à mielossupressão, leucopenia, trombocitopenia, neurotoxicidade, ototoxicidade, e, sobretudo, nefrotoxicidade (RABIK & DOLAN, 2007).

Os fatores responsáveis pela resistência adquirida à CDDP têm sido atribuídos a quatro alterações bioquímicas: (i) aumento do nível de glutathiona (GSH); (ii) níveis aumentados de metalotioneína (MT); (iii) aumento da capacidade de reparo de DNA e (iv) alterações no influxo ou efluxo da CDDP nas células (STORDAL *et al.*, 2007; MAYER *et al.*, 2003; RABIK & DOLAN, 2007).

O GSH é um tiol tripeptídico, δ -glutamilcisteinilglicina, um nucleófilo potente capaz de reagir com os agentes alquilantes e com a CDDP antes que os mesmos possam se ligar ao DNA. A reação entre a CDDP e o GSH forma um complexo de platina que é posteriormente eliminado pelas células. Entretanto, o aumento do nível de glutathiona pode ser observado apenas em algumas linhagens de células resistentes à CDDP.

A MT é uma pequena proteína de 61-62 aminoácidos constituída por 20 resíduos de cisteína que age presumivelmente na desintoxicação do organismo na presença de íons de metais pesados. A CDDP se liga a MT produzindo um composto com 10 átomos de platina por molécula e a constante da ligação é bem mais elevada do que a obtida na reação com a glutathiona. Estudos utilizando determinadas linhagens celulares demonstraram que, após a sensibilização com metais pesados, as células tiveram um aumento no nível de MT e se tornaram resistentes à CDDP.

O aumento no reparo do DNA é outro fator responsável pelo decréscimo da citotoxicidade dos adutos de Pt-DNA observado nas células resistentes à CDDP e pode ser determinado por uma competição dinâmica entre as proteínas responsáveis pelo reparo do DNA e o sinal de apoptose (CHU, 1994).

Apesar da importância de cada um destes mecanismos não estar rigorosamente definida, vários estudos têm demonstrado a correlação entre o acúmulo do fármaco e a sensibilidade a sua ação. Na maioria dos casos, sublinhagens tumorais resistentes acumulam menos CDDP que a linhagem sensível da qual foi derivada (LANZI *et al.*, 1988; ANDREWS & HOWELL, 1990).

Como exemplos de incompatibilidades da CDDP com outros fármacos ou constituintes da formulação podem ser citados: (i) sua precipitação em presença de etoposídeo dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v); (ii) precipitação em presença de tiotepa dissolvida em solução de glicose a 5%; (iii) degradação da CDDP decorrente de sua interação com trometamol, um excipiente utilizado na formulação de 5-Fluoruracila (STEWART *et al.*, 1989; TRISSEL *et al.*, 1996; FOURNIER *et al.*, 1992). Diversas estratégias têm sido desenvolvidas visando minimizar estes inconvenientes como a síntese de análogos da CDDP ou a sua encapsulação em lipossomas (FOX *et al.*, 1999; PEREZ-SOLER *et al.*, 1997).

2.2 Novas propostas para a quimioterapia com os compostos de platina

Inúmeras pesquisas científicas estão direcionadas para a síntese de análogos da CDDP visando à descoberta de compostos menos tóxicos e mais efetivos (PASSINI & ZUNINO, 1987; PÉREZ *et al.*, 2000) (Fig. 3). A CDDP se tornou o protótipo de uma classe de agentes antineoplásicos, muitos dos quais foram abandonados em estudos pré-clínicos ou em estágios clínicos de desenvolvimento, enquanto poucos foram inseridos na rotina clínica (JAKUPEC *et al.*, 2003). Apenas dois compostos de platina de segunda geração vêm sendo utilizados com sucesso na clínica (O'DWYER *et al.*, 2000) que são a carboplatina e a oxaliplatina.

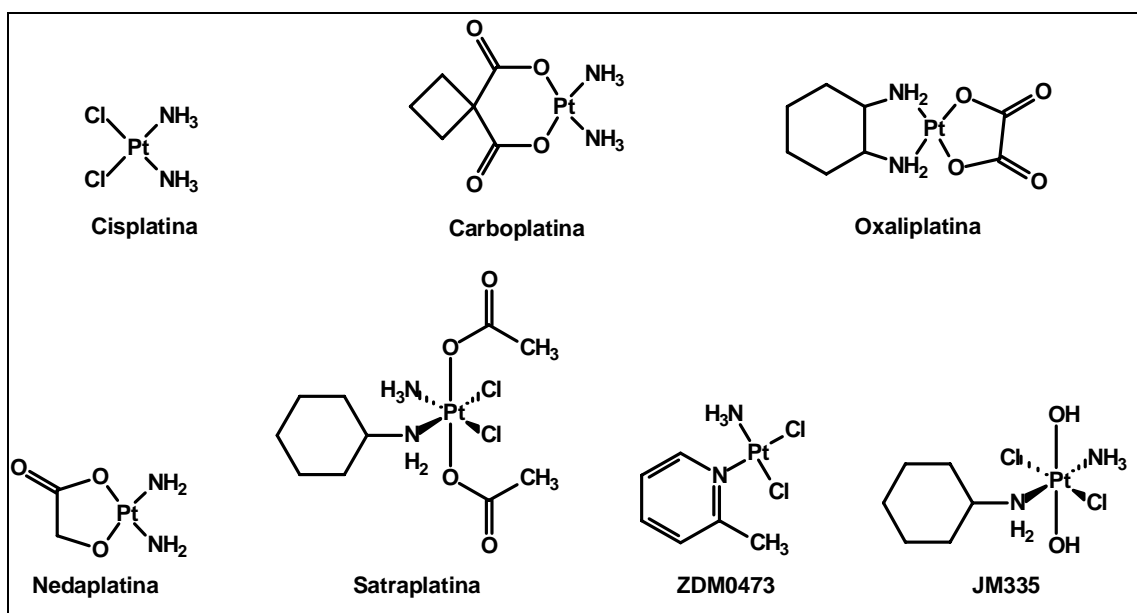


Figura 3 – Estrutura química dos complexos de platina.

A [cis-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato) platina (II)] (carboplatina) possui nefrotoxicidade e êmese reduzida, quando comparado com a CDDP, sendo que sua menor toxicidade tem sido associada a uma maior estabilidade do ligante 1,1-ciclobutanodicarboxilato em solução, em relação à estabilidade do ligante cloreto da CDDP. Entretanto, a toxicidade limitante para a administração da carboplatina é a mielossupressão produzida. Estudos de fase III demonstraram a equivalência farmacológica da carboplatina e da CDDP no tratamento do câncer de ovário (ALBERTS *et al.*, 1992), enquanto que a CDDP se mostrou superior no tratamento do câncer de testículo, cabeça e pescoço (BAJORIN *et al.*, 1993; DE ANDRES *et al.*, 1995). Além disso, a carboplatina também causa desenvolvimento de resistência durante o tratamento clínico (CALVERT *et al.*, 1982; EGORIN *et al.*, 1985).

O composto de platina mais recentemente liberado para o uso clínico é o [1,2-diamino-ciclohexano-oxalato platina (II)] (oxaliplatina). O uso desse composto não tem levado ao aparecimento de nefrotoxicidade ou ototoxicidade e a mielossupressão é pouco comum. Entretanto, esse fármaco causa neuropatia

sensorial, efeito limitante da dose, que se torna mais pronunciado com a duração prolongada do tratamento em ciclos sucessivos (O'DWYER *et al.*, 2000). Sua ação antineoplásica é otimizada quando administrada em combinação com outros fármacos, como o 5-fluorouracil e gencitabina (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2003).

A satraplatina é um complexo de coordenação da platina administrado por via oral, que tem demonstrado aumento da sobrevida dos pacientes apresentando elementos indicativos de benefícios clínicos como controle da dor, além de exibir menor resistência cruzada a outros agentes quimioterápicos platinados (ARMSTRONG & GEORGE, 2007). Outro fármaco de segunda geração, a nedaplatina (cis-diaminoglicolatoplatina II), desenvolvida e utilizada no Japão, apresenta propriedades toxicológicas melhores que a CDDP. A mielossupressão é dose-limitante e a toxicidade hematológica é geralmente leve. Em estudos mais recentes, o principal foco é o desenvolvimento de complexos que superem os principais mecanismos de resistência do tumor à CDDP, como aqueles denominados cis-aminodicloro(2-metilpiridina)platina (II) (ZD0473) e trans-amino(diclorociclohexilamina dihidroxiplatina (IV) (JM335) (JAKUPEC *et al.*, 2003). A ocorrência de resistência cruzada entre a CDDP, carboplatina e nedaplatina torna os dois últimos fármacos ineficazes no tratamento de pacientes que não responderam ao tratamento prévio com CDDP.

A encapsulação da CDDP em sistemas nanoestruturados para a vetorização de fármacos constitui uma outra proposta promissora para o aprimoramento da terapia antitumoral.

2.2.1 – Sistemas nanoestruturados para a vetorização de fármacos

A associação de fármacos, já em uso, a um sistema transportador, visando direcionar o fármaco para a célula-alvo e evitar os locais indesejáveis onde o fármaco exerce toxicidade, oferece um ganho de tempo na fase de desenvolvimento de um produto porque usa um fármaco já caracterizado do ponto de vista farmacológico (FRÉZARD *et al.*, 2005). O direcionamento de fármacos por meio de sistemas carreadores tem sido amplamente estudado. As vantagens do uso de sistemas carreadores de drogas estão associadas à redução ou eliminação de efeitos colaterais, ao aumento da solubilidade da droga, maior tempo de permanência da droga no organismo, maior concentração da droga no local acometido pela patologia, assim como a possibilidade de redução e/ou reversão da resistência cruzada entre os agentes antineoplásicos em terapia combinada (ZAMBONI, 2008).

2.2.2 O uso potencial dos lipossomas na quimioterapia

Os lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos freqüentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso. Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade aquosa interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípides. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar. (Fig. 4)

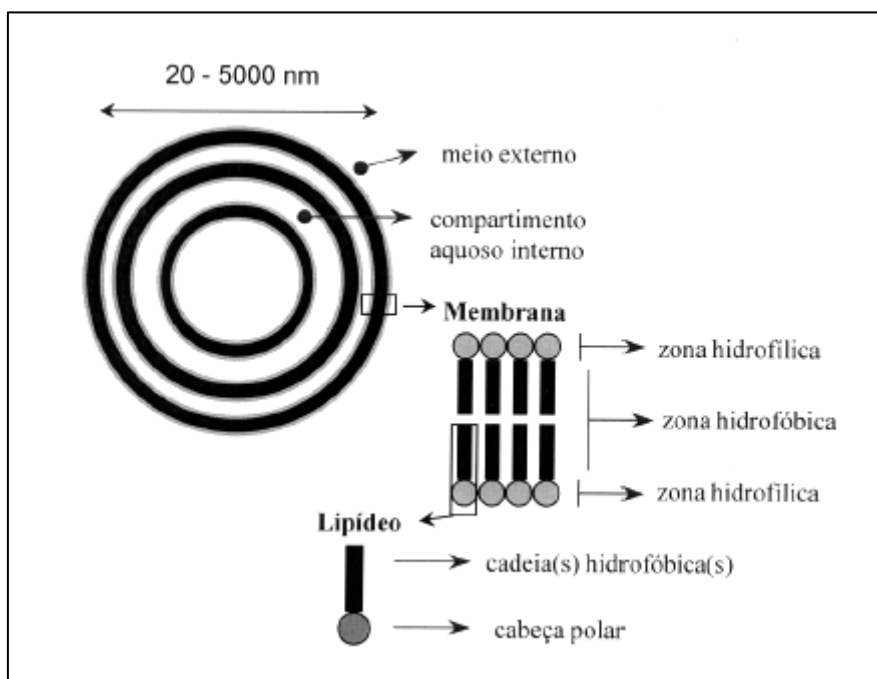


Figura 4 – Representação esquemática dos lipossomas (Adaptado de FRÉZARD *et al*, 2005).

Esses sistemas lipídicos foram descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas. A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70. Entretanto, as primeiras formulações de lipossomas estudadas não produziram os resultados esperados, devido à instabilidade das vesículas, ao baixo teor de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração (LASIC, 1998).

Os lipossomas são classificados de acordo com o número de bicamadas e tamanho em lipossomas unilamelares pequenos (SUV) - 20 a 100 nm – e lipossomas unilamelares grandes (LUV) - > 100 nm – quando constituídos de uma única bicamada lipídica. Quando as vesículas são formadas por bicamadas sucessivas separadas por compartimentos aquosos, os lipossomas são denominados multilamelares (MLV) – 0,1 a 1 μ m. (Fig. 5)

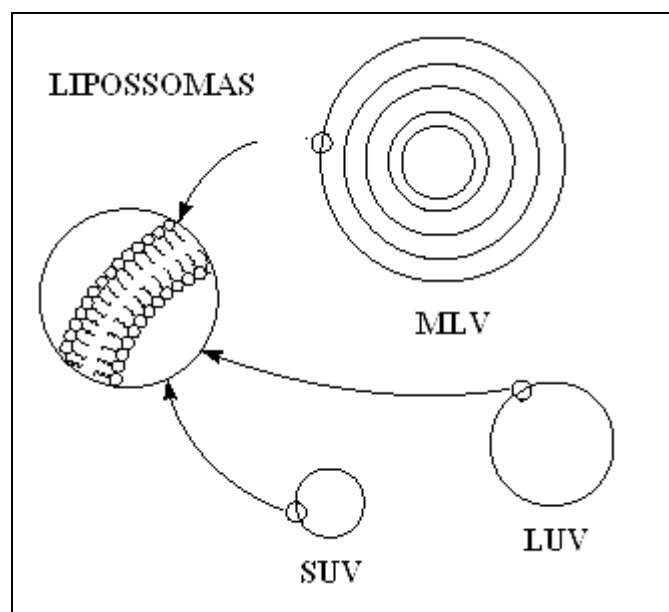


Figura 5 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para a garantia da estabilidade desta forma farmacêutica. Muitos estudos utilizam lipossomas unilamelares homogêneos com diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm. Essa faixa é um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro), a estabilidade do lipossoma (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200nm) e a capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro) (LASIC, 1988).

Em relação às características de interação com os sistemas biológicos, os lipossomas se classificam em convencionais e de longa circulação. As interações que ocorrem entre os lipossomas e os constituintes dos fluidos biológicos, após sua administração *in vivo*, são características da composição

da membrana e do tamanho das vesículas, determinando a velocidade do *clearance* sanguíneo e a extensão da captação tecidual (NEW, 1990)

Os lipossomas convencionais são constituídos por fosfolípides, como por exemplo, lípides naturais (fosfatidilcolina de ovo ou soja) ou sintéticos como a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e a dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) (Fig. 6). Esse sistema pode também apresentar outros constituintes como o colesterol que confere maior ou menor rigidez à membrana, quando esta é constituída por lípidos de reduzida ou elevada temperatura de transição de fase, respectivamente. No primeiro caso, a adição de colesterol reduz a permeabilidade da membrana e, portanto, a difusão do material encapsulado para o meio externo. No segundo caso, a presença do colesterol facilita a hidratação dos lípidos, e conseqüentemente, a formação das vesículas lipossomais. Fosfolípidos apresentando carga, como o fosfatidilglicerol, podem também fazer parte da bicamada, com o objetivo de evitar fenômenos de fusão e/ou agregação das vesículas em decorrência do aparecimento de repulsões eletrostáticas entre as mesmas. Estes lipossomas quando administrados por via endovenosa sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo as células de Kupffer, presentes no fígado, e os macrófagos esplênicos (DELATTRE *et al.*, 1993).

Os lipossomas de longa circulação também contêm fosfolípidos, como constituinte principal, mas apresentam na bicamada outro composto que torna a superfície das vesículas mais hidrofílica, como por exemplo, os fosfolípidos acoplados à cadeia de polietilenoglicol (PEG), podendo-se citar o diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) (Fig. 6). Esses derivados hidrofílicos evitam a adsorção de proteínas séricas na superfície dos lipossomas, reduzindo a sua captação pelo SFM, e conseqüentemente, prolongando seu tempo de circulação na corrente

sangüínea permitindo assim uma maior distribuição do fármaco encapsulado (DU *et al*, 1997).

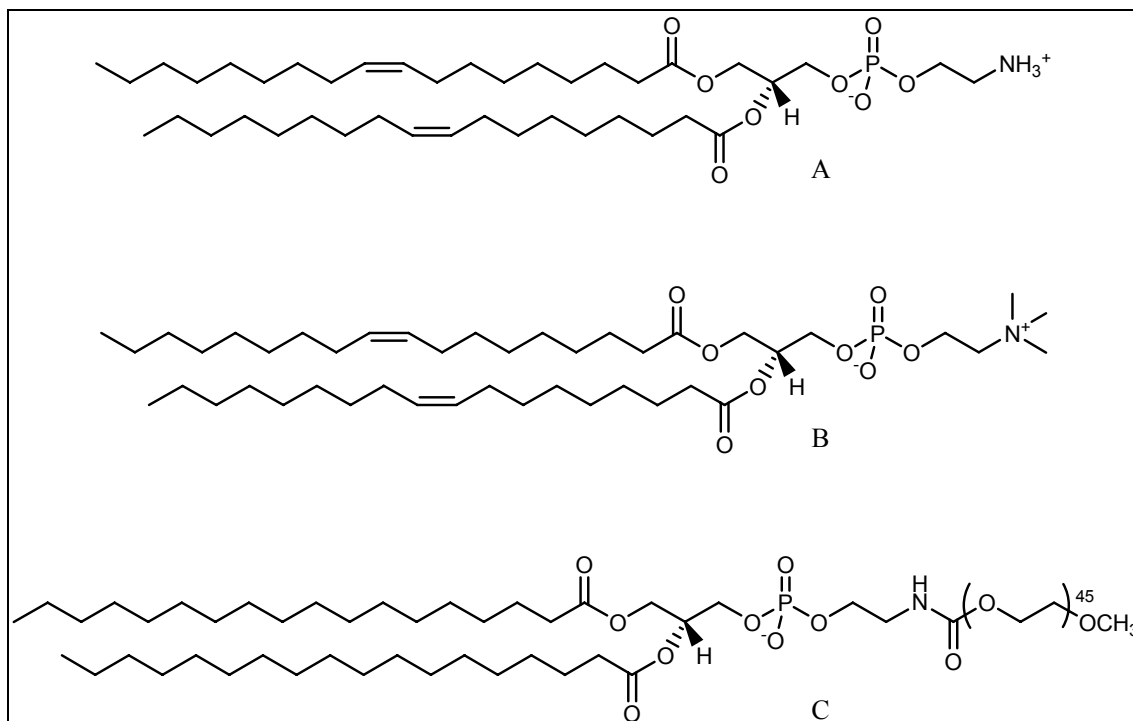


Figura 6 – Estruturas químicas de DOPE (A), DOPC(B) e DSPE-PEG₂₀₀₀ (C).

As diferentes composições da membrana dos lipossomas além de influenciarem a sua biodistribuição, podem alterar a forma de liberação do conteúdo encapsulado. Em particular, a composição pode ser desenvolvida de forma que a liberação seja sítio-específica, em resposta a condições ambientais, nos níveis anatômico, celular ou subcelular. Uma das estratégias para permitir esse tipo de liberação é o desenvolvimento de lipossomas convencionais ou de longa circulação pH-sensíveis (ÖZER *et al.*, 1993).

O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos patológicos (tumores, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967). Esses lipossomas exibem transições de fases,

características dos seus constituintes fosfolipídicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido e são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4).

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleoifosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentarem na forma de vesículas (SIEGEL, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS) (Fig. 7), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Estes estabilizantes são capazes de se inserir entre as moléculas de fosfolípides, sendo que o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um pH ácido, como é o caso da região tumoral, resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente, desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000; TACHIBANA *et al.*, 1998).

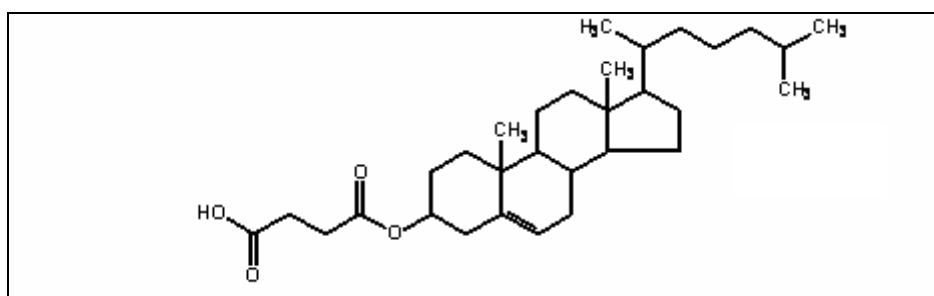


Figura 7 - Estrutura química do CHEMS

Dependendo da composição lipídica dos lipossomas podemos utilizá-los em diferentes terapias antineoplásicas (SADZUKA *et al.*, 2000). A administração dos quimioterápicos utilizados no tratamento dos tumores ocorre principalmente por via parenteral. Portanto, os lipossomas pH-sensíveis convencionais serão capturados pelo SFM, sendo interessantes, por exemplo, para tratamento do câncer do fígado e do baço (TARDI *et al.*, 2000). O câncer que afeta outros órgãos pode ser tratado mediante o uso de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação.

2.2.3 Lipossomas de CDDP

Lipossomas de CDDP constituídos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, DSPE-PEG₂₀₀₀ e colesterol, na razão molar de 51:5:44, apresentando um diâmetro igual a 100 nm foram avaliados por NEWMAN e colaboradores (1999) em camundongos portadores de tumor de cólon (C26) ou pulmão. Os resultados deste estudo demonstraram haver um aumento da concentração da CDDP na região tumoral, a partir da formulação encapsulada, com melhora da eficácia terapêutica e redução da toxicidade. O estudo de distribuição tecidual, dentro da primeira hora após o tratamento, para os animais tratados com os lipossomas mostrou um nível de platina nos rins inferior a $\frac{1}{4}$ do nível de platina nos rins dos animais tratados com a CDDP livre (NEWMAN *et al.*, 1999).

Outro estudo realizado por VAAGE e colaboradores (1999), utilizando um modelo de carcinoma de cólon humano em camundongos, mostrou que a encapsulação da CDDP em lipossomas constituídos de colesterol, fosfatidilcolina hidrogenada de soja, diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 1900 (DSPE-PEG₁₉₀₀) na razão molar de 39:56:5, reduziu a dose do fármaco necessária para a eficiência do tratamento, sendo que a mesma dose de CDDP livre não produziu nenhum efeito farmacológico

desejado. O aumento do efeito, a partir da formulação encapsulada, foi atribuído a um provável aumento da penetração do fármaco nos tumores e a liberação lenta e prolongada da substância encapsulada.

HARRINGTON e colaboradores (2000) estudaram a utilização dos lipossomas de longa circulação de CDDP compostos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja (56,2%), colesterol (38,3%) e DSPE-PEG₂₀₀₀ (5,3%) na quimioterapia associada concomitantemente com a radioterapia (CCRT), utilizando camundongos implantados com tumores de cabeça e pescoço. Os resultados deste estudo demonstraram que os lipossomas de CDDP aumentam o efeito da radioterapia, não sendo possível, entretanto, concluir sobre a natureza da interação entre o fármaco encapsulado e a radiação. Os autores sugeriram a hipótese de um aumento da ação citotóxica do fármaco pela radioterapia, mas não excluíram a possibilidade do efeito de radio sensibilização (HARRINGTON *et al.*, 2000). Com base nestes resultados, esta equipe de pesquisadores conduziu um estudo clínico de fase I e II administrando os lipossomas de CDDP em pacientes com câncer escamoso de cabeça e de pescoço (SCCHN) localmente avançado. Porém, este estudo demonstrou que os lipossomas de CDDP foram inesperadamente inativos contra o SCCHN. Os autores atribuem como causa possível para a ineficácia do tratamento a baixa biodisponibilidade desta formulação e sugerem um estudo da composição fosfolipídica de forma a aumentar a razão fármaco/lípide e a biodisponibilidade desta formulação (HARRINGTON *et al.*, 2001).

Uma formulação de lipossomas contendo CDDP, Lipoplatin®, foi desenvolvida com a finalidade de reduzir a toxicidade sistêmica da CDDP e direcioná-la aos sítios tumorais. Esta formulação é constituída por dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina de soja, colesterol e DSPE-PEG₂₀₀₀, com diâmetro vesicular médio de 110 nm. Lipoplatin®, administrado pelas vias intraperitoneal e intravenosa, mostrou-se menos tóxico que a CDDP livre em ratos Wistar fêmeas previamente implantadas com tumor de mama humano (MCF-7). Os animais tratados com Lipoplatin pela via endovenosa apresentaram maior

toxicidade quando comparado com a via intraperitoneal (BOULIKAS, 2004). Em estudos clínicos de fase I-II foram associados gencitabina com CDDP lipossomal, Lipoplatin. O tratamento foi administrado em pacientes portadores de câncer pancreático, pré-tratados, porém refratários à prévia quimioterapia que incluiu a gencitabina no esquema de tratamento. O objetivo deste estudo foi a avaliação de eficácia e toxicidade nos pacientes refratários. O avanço detectado foi a menor toxicidade observada, atribuída ao uso de Lipoplatin® (STATHOPOULOS *et al.*, 2006).

Outra formulação lipossomal, denominada SPI-077, foi delineada a fim de direcionar a CDDP às células tumorais mediante o retardo da excreção renal e aumento do tempo de circulação, para reduzir a toxicidade ocasionada pela CDDP na sua forma livre e evitar os procedimentos profiláticos como hidratação e utilização de antieméticos. Entretanto, devido a reações graves de hipersensibilidade aos componentes da formulação fez-se necessária a profilaxia com corticosteróides e anti-histamínicos. (JAKUPEC *et al.*, 2003). Resultados dos estudos pré-clínicos são conflitantes já que enquanto um estudo indica que SPI-077 exibiu atividade superior à CDDP livre em modelos tumorais de camundongos (NEWMAN *et al.*, 1999), outro sugere que a CDDP não é liberada a partir dos lipossomas de maneira suficiente para induzir resposta farmacológica (ZAMBONI *et al.*, 2000 apud JAKUPEC *et al.*, 2003).

Portanto, visando melhorar a biodisponibilidade dos lipossomas de CDDP a nossa proposta é o desenvolvimento de formulações de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação que possam liberar o fármaco, preferencialmente, na região tumoral apresentando um pH relativamente reduzido.

Baseando-se nestas informações, a encapsulação da CDDP em sistemas coloidais, como os lipossomas pH-sensíveis, podem constituir uma estratégia para melhoria de sua biodisponibilidade, a redução ou eliminação de seus efeitos adversos e do aparecimento de resistência, a promoção de uma maior

seletividade farmacológica e a eliminação de incompatibilidades entre excipientes da formulação e/ou outros antineoplásicos, nos casos de uso de quimioterapia combinada.

2. Objetivos

2. Objetivos

Os objetivos da presente tese de doutorado são o estudo de parâmetros biológicos pré-clínicos como a avaliação da resistência *in vitro*, a biodistribuição e a atividade antitumoral de uma nova formulação de CDDP, os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina (SpHL-CDDP).

2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos da presente tese de doutorado são:

- Marcar a CDDP por meio de radiação.
- Preparar e caracterizar (química e físico-química) os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo CDDP (SpHL-CDDP).
- Avaliar a estabilidade de SpHL-CDDP em meio biológico.
- Avaliar a atividade citotóxica de SpHL-CDDP após sua incubação em células sensíveis e resistentes à CDDP.
- Estudar a biodistribuição e dos parâmetros farmacocinéticos dos SpHL-CDDP após sua administração endovenosa em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich.
- Estudar a atividade antitumoral de SpHL-CDDP administrados por via endovenosa em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich.

CAPÍTULO 1
Preparação da cisplatina radiomarcada e estudo de sua
biodistribuição em camundongos

Preparação da cisplatina radiomarcada e estudo de sua biodistribuição em camundongos

1. INTRODUÇÃO

Como mencionado anteriormente, a terapia com CDDP é particularmente restrita por sua severa nefrotoxicidade, pois o fármaco induz necrose marcante nos túbulos proximal e distal (SINGH, 1989). Para que seja monitorada a eficácia terapêutica e segurança de novas formas farmacêuticas de CDDP é importante determinar a sua concentração em vários órgãos. Por esta razão, é essencial ter um método analítico adequado à quantificação da CDDP em estudos *in vivo*. A espectroscopia por absorção atômica é frequentemente empregada neste tipo de ensaio. Porém, este método requer um laborioso tratamento da amostra (digestão da amostra e avaliação da influência da matriz de todos os tecidos sobre o método de análise), e conseqüentemente, longo tempo para análise. O emprego de compostos marcados com isótopos radioativos é uma alternativa para a quantificação de CDDP em meios biológicos (SYKES *et al*, 1986).

A utilização de marcadores radioativos tem mostrado ser uma alternativa para a quantificação de compostos platinados em meio biológico. A CDDP radiomarcada (CDDP*) pode ser obtida pela radiação do tetracloroplatinato de potássio, K_2PtCl_4 , ou da própria platina metálica, os quais são utilizados no processo de síntese de CDDP* (HOESCHELLE *et al.*, 1982; KAWAI *et al.*, 1989; SYKES *et al.*, 1986). Estes procedimentos podem levar a uma alta atividade específica e pureza radioquímica, mas envolvem longo tempo para síntese, além do custo dos isótopos platinados. Outra estratégia é a irradiação direta da CDDP para obter a CDDP*. Sykes e colaboradores (1986) obtiveram CDDP* com uma atividade específica menor que $38,0 \text{ kBq.mg}^{-1}$ ao irradiar a

CDDP durante 2 horas, no reator nuclear Slowpoke II, com o emprego de um fluxo de nêutrons térmicos de 5×10^{11} nêutrons.cm².s⁻¹.

A fim de se aumentar a atividade específica de CDDP*, maiores tempos de irradiação da CDDP (4 e 8 horas) foram avaliados. No entanto, em tempos maiores que 2 horas de irradiação direta foi observada a degradação da molécula de CDDP. Portanto, nesta primeira parte do trabalho experimental foi investigada a obtenção de CDDP*, a partir da irradiação direta de CDDP, em colaboração com o Dr. Alexandre Soares Leal, do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear-CDTN. A irradiação de CDDP foi realizada no reator de pesquisa TRIGA MARK I IPR R-1, sendo estudado o uso de cápsula de cádmio como estratégia para se obter maior atividade específica da CDDP* sem a ocorrência de sua degradação. Além disso, foi avaliada a potencialidade do uso da CDDP* obtida como radiotraçador em estudo de biodistribuição em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A CDDP foi gentilmente cedida pela Quiral do Brasil S/A (Juiz de Fora, MG, Brasil) e o cloreto de sódio foi adquirido da Merck S.A. Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os solventes empregados apresentavam grau analítico. Camundongos Swiss fêmeas oriundos do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais foram mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação, submetidos a padrões éticos de tratamento, tendo água e ração *ad libitum*. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentos Animais da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.1 Obtenção da CDDP*

Amostras de CDDP 99,3% p/p (2mg), protegidas ou não por cápsula de cádmio de espessura igual a 1 mm, foram submetidas a um fluxo térmico e epitérmico médio de $6,4 \times 10^{11}$ e $4,4 \times 10^{10}$ nêutrons.cm⁻².s⁻¹, respectivamente, a 100kW. O tempo de irradiação de CDDP no reator nuclear de pesquisa TRIGA MARK I IPR-R1 foi de 2 e 4 horas na ausência da cápsula de cádmio e 8 horas com o uso da mesma. Após a irradiação de CDDP foram avaliadas a atividade específica e a pureza química de CDDP*. O espectro gama foi obtido usando um detector do tipo HPGe com 15% de eficiência nominal e 1,85 keV, referente à largura média a meia altura para o pico de 1332 keV de cobalto⁶⁰. O software usado para aquisição de dados e análise de espectros foi o GENIE 2000 (Camberra, Austrália).

2.2 Determinação da pureza química

A pureza química da CDDP foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O aparato consiste de bomba modelo 515, um auto injetor modelo 717 e um detector de ultravioleta variável modelo 2487 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA), usando o software Millenium. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma pré coluna 4 x 4 mm, 5µm e coluna Lichrospher® 100 NH₂ 25 cm x 4 mm, 10 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente foi composto por metanol/acetato de etila/N,N, dimetilforfamida/água 4:4:1:1, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Amostras de 20 µL foram injetadas e a absorbância do eluato foi medida a 310 nm.

2.3 Modelo de tumor sólido de Ehrlich

A linhagem tumoral de células de Ehrlich foi gentilmente fornecida pelo Prof. Jorge Luiz Pesquero (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais). 1,0 mL de uma suspensão de células de tumor Ehrlich ($5,0 \times 10^6$ células/mL) foi inoculado, por via intraperitoneal, em camundongos Swiss fêmeas. Após 8 dias, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e ketamina (60mg/kg), sendo coletado o líquido ascítico contendo as células do tumor de Ehrlich. Em seguida, uma suspensão de células viáveis foi preparada com uma densidade média de $1,08 \times 10^6$ células/mL. O volume de 1,0 mL da suspensão de células tumorais foi implantada no flanco direito de camundongos Swiss fêmeas (20 - 25g). Após 20 dias de implantação, o tumor sólido de Ehrlich apresentava-se palpável e os animais foram submetidos à administração de CDDP* por via endovenosa.

2.4 Estudo de biodistribuição

Solução de CDDP*, na dose de 4mg/Kg, foi injetada por via endovenosa em camundongos Swiss fêmeas acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich (n=3). Após 24 horas, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina e ketamina, nas doses de 7,5 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente. Em seguida, amostras de sangue e órgãos como o fígado, baço e rins foram coletados. Os órgãos foram lavados com água destilada, secos em papel de filtro e pesados. A radioatividade presente no sangue e nestes órgãos foi determinada com o emprego de um equipamento de cintilação automática (ANSR-Abott, EUA). As leituras foram realizadas nas janelas de energia iguais a 70-210 e 50-150 keV durante 2 e 4 minutos, respectivamente. Os resultados

foram expressos em cpm/g de tecido. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA-Prism 4.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Irradiação da CDDP

A atividade específica da CDDP* foi de aproximadamente 40,0 e 57,0 Bq.mg⁻¹ para amostras sem e com a respectiva proteção da cápsula de cádmio, após 24 horas de decaimento. Estes resultados podem ser considerados similares àqueles obtidos por Sykes *et al.* (1986). De acordo com estes autores, esta é a maior atividade específica obtida sem a conseqüente decomposição da amostra, devido ao efeito Szillard-Chalmers que ocorre durante longos tempos de irradiação ou quando submetida a altos fluxos térmicos e epitérmicos. A proteção de CDDP por cápsula de cádmio mostrou que é possível obter maior atividade específica irradiando-se a amostra por 8 horas, sem a ocorrência de sua degradação. A alta atividade específica obtida usando a CDDP protegida por cápsula de cádmio pode ser explicada em termos dos parâmetros nucleares mostrados na Tabela 1, referentes às condições de irradiação e às energias envolvidas nas interações nêutrons-molécula. A probabilidade da degradação da molécula de CDDP depende principalmente da energia que retorna do núcleo ativado emissor de raios gama e, de forma secundária, da colisão com nêutrons rápidos e epitérmicos (FRIEDLANDER *et al.*, 1981). As energias de retorno do núcleo de átomos de ³⁸Cl emissores de raios gama são 1,64 e 2,17 MeV quando submetido a fluxo com energias equivalentes a 38 e 67MeV, respectivamente, que são suficientes para romper as ligações Pt-NH₃ (1,82MeV) e Pt-Cl (3,73MeV) (FERREIRA, 2004). A contribuição para a dissociação da molécula de CDDP, para todos os isótopos de platina, não tem relevância devida a baixa energia dos fótons gama (<0,6MeV), correspondente a uma energia de retorno de aproximadamente 1,0 MeV, que não é suficiente para romper as ligações Pt-NH₃ e Pt-Cl.

Tabela 1 - Principais radionuclídeos produzidos pela irradiação da CDDP. Adaptado de Sykes e colaboradores, 1986.

Nuclídeo Estável	Abundância natural (%)	Nuclídeo Produzido	σ_{th} (barns)	Meia-vida	γ energia em keV (% de abundância)
^{190}Pt	0,01	^{191}Pt	150	2,96d	359,93 (6); 409,48 (8); 538,9 (13,7)
^{192}Pt	0,79	^{193m}Pt	2,2	4,33d	-----
^{194}Pt	32,9	^{195m}Pt	0,09	4,02d	30,8 (2,3); 98,8(11,4); 129,7 (2,8)
^{196}Pt	25,3	^{197}Pt	0,74	18,3h	279,11 (2,3); 191,36 (3,7)
^{198}Pt	7,2	^{199}Pt	3,58	30,8m	317,06 (4,87); 493,74 (5,7); 542,9 (14,8)
^{37}Cl	24,2	^{38}Cl	0,423	37,24m	1642,69 (31,0); 2167,68 (42,0)

A Figura 8 mostra os espectros gama para as amostras submetidas à irradiação sem e na presença da cápsula de cádmio. Pode-se observar que ambos os espectros são similares até 300 keV, mas acima deste limite, fotopicos de ^{191}Pt a 359,6; 409,4 e 538,9 keV foram detectados na amostra desprotegida, mas não na amostra protegida por cápsula de cádmio. A maior ativação da amostra protegida por cápsula de cádmio é devida ao maior valor do produto $\phi_{th}\sigma_{th}$ (fluxo de nêutrons térmicos x sessão de choque) comparado ao ϕ_{cpi} (fluxo de nêutrons epitérmicos) como pode ser verificado pelos valores mostrados na Tabela 1.

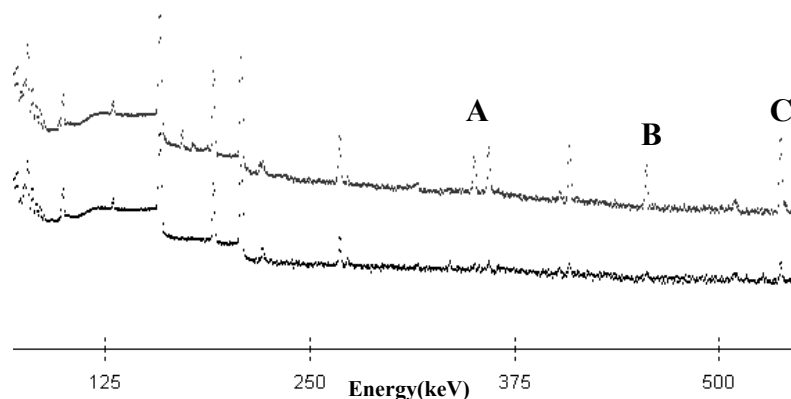


Figura 8 - Espectro da CDDP*. Superior: CDDP* obtida após 2 horas de irradiação na ausência de cápsula de cádmio. A, B e C indicam os fotopicos de 359,0; 409,5 e 538,9 keV da ^{191}Pt , respectivamente. Inferior: CDDP* obtida com o uso da cápsula de cádmio após 2 horas de irradiação.

3.2 Determinação da pureza química

A irradiação da CDDP sem o uso da cápsula de cádmio por 2 horas não resultou em degradação da molécula (99,0 % da molécula intacta). Entretanto, no caso do tempo de irradiação de 4 horas, houve escurecimento da amostra. A porcentagem de CDDP intacta observada por CLAE foi de 65%. A proteção da CDDP com cápsula de cádmio permitiu a irradiação por período de 8 horas sem a decomposição da molécula. Na Figura 9, estão os perfis cromatográficos da CDDP irradiada e não irradiada. O tempo de retenção (3,5 minutos) e a concentração de ambas as soluções foram similares indicando que a cápsula de cádmio é útil para prevenir a degradação da molécula.

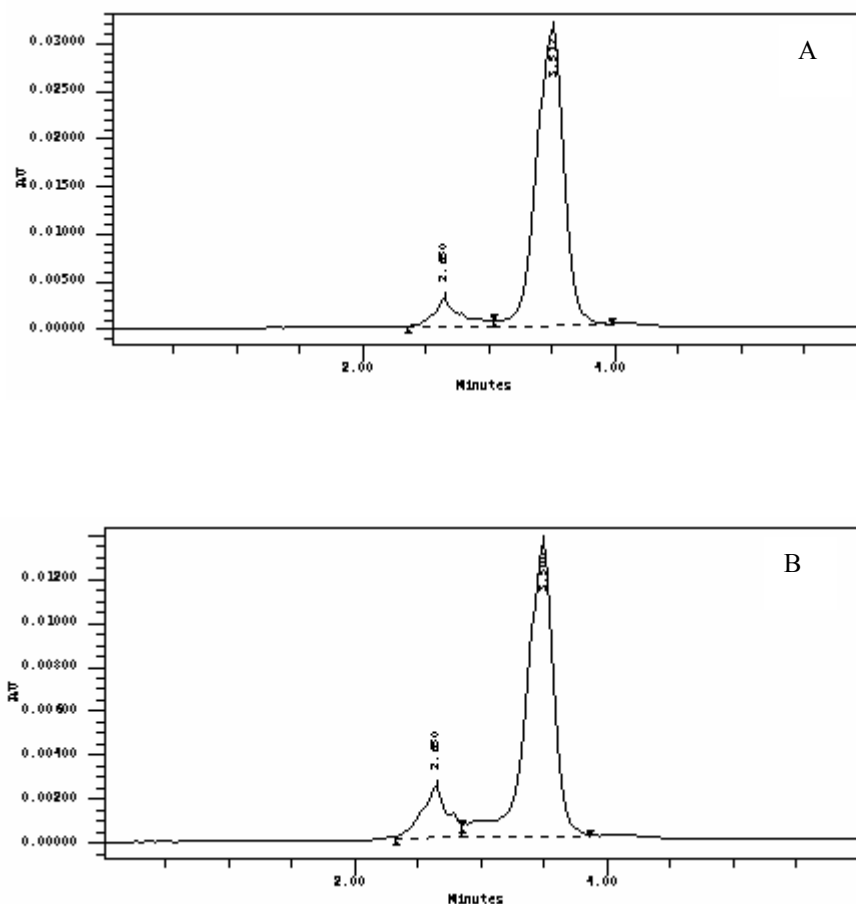


Figura 9 - Determinação da pureza química da CDDP usando CLAE. A – Solução de CDDP não radiomarcada. B – Solução de CDDP radiomarcada obtida após 8 horas de irradiação.

3.3 Estudo de biodistribuição

Faz-se necessário investigar se a atividade específica da CDDP* alcançada com o uso da cápsula de cádmio é suficiente para permitir o estudo de sua distribuição *in vivo*. Os resultados da distribuição da CDDP* estão mostrados na Figura 10. A radioatividade foi medida usando janelas de energia de 70-210 keV e 50-150 keV, incluindo ou não os fotopicos de ^{199}Au , respectivamente. Em ambos os casos, foram observados que a CDDP* foi captada principalmente pelo baço, fígado e rins. Os resultados não mostram diferença estatística entre a captação de CDDP* pelo fígado e baço quando a radioatividade foi determinada por meio da janela de energia de 70-210 keV ($p > 0,05$). Os mesmos resultados foram observados a 50-150 keV ($p > 0,05$). Os rins

mostraram captação de CDDP* menor que o fígado para ambas as janelas de energia. Estes resultados sugerem que a quantificação da radioatividade nos órgãos incluindo a contagem de ^{199}Au não afeta a biodistribuição da CDDP, portanto, não sendo necessária a remoção deste nuclídeo. A detecção da radiação com a inclusão de ^{199}Au pode contribuir com a redução do tempo de contagem de cada amostra, e conseqüentemente, dispensar as correções dos dados de meia-vida da $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Este perfil de distribuição está de acordo com os resultados encontrados por Newman e colaboradores (1999) que utilizaram a espectroscopia por absorção atômica com forno de grafite para a quantificação da CDDP. Estes resultados sugerem que a pureza radioquímica de CDDP* é satisfatória como a encontrada por Sykes e colaboradores (1986). Portanto, vale destacar que a atividade específica de CDDP* obtida com o uso da cápsula de cádmio nos permite obter um nível de detecção para a realização de estudos de biodistribuição.

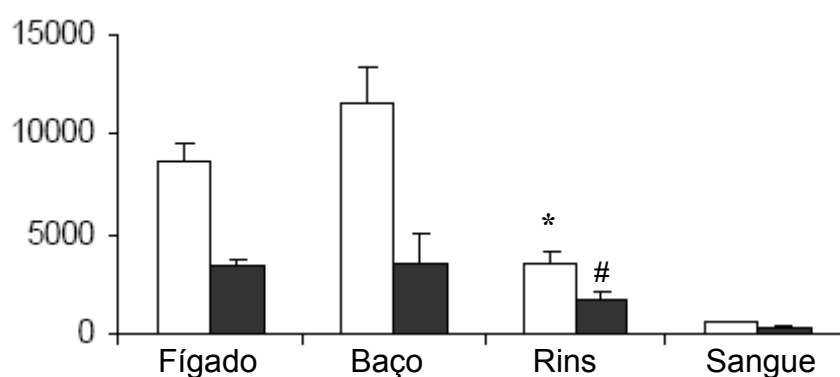


Figura 10 - Biodistribuição da CDDP* após 24 horas de sua administração em camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich e detectada a □ 70-210 keV e ■ 50-150 keV. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). * e # indicam resultados estatisticamente diferentes em relação ao fígado, baço e sangue nas janelas de 70-210 keV e 50-150 keV, respectivamente.

CAPÍTULO 2
Avaliação da biodistribuição e da farmacocinética dos
lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo
cisplatina em camundongos Swiss portadores de tumor sólido
de Ehrlich

Avaliação da biodistribuição e da farmacocinética dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich

1. INTRODUÇÃO

A cinética plasmática e distribuição tecidual de uma droga encapsulada em lipossomas é uma característica que depende da membrana lipídica e não do conteúdo encapsulado. Este fato pode levar a redução ou eliminação da toxicidade dessa droga assim como a uma melhora da eficácia terapêutica.

Bandak e colaboradores (1999) e Harrington e colaboradores (2001) atribuíram a menor eficácia da CDDP encapsulada em lipossomas constituídos por 51% de fosfatidilcolina de soja (HSPC), 44% de colesterol e 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀ à lenta cinética de liberação da CDDP, resultando na sua reduzida biodisponibilidade, e conseqüentemente, em baixa concentração da droga no alvo para o efeito terapêutico.

Os SpHL-CDDP possuem o potencial de apresentarem um prolongado tempo de circulação sanguínea e uma desestabilização na região tumoral, de forma que a captação da CDDP pelo órgão acometido pelo tumor pode ser facilitada. Portanto, o uso desse tipo de sistema liberação da CDDP poderá contribuir com a redução e/ou eliminação de toxicidade assim como aumentar a eficácia antitumoral.

Esta parte do trabalho experimental descreve e compara a distribuição tecidual e a farmacocinética de SpHL-CDDP e da CDDP livre após a administração intravenosa em camundongos Swiss portadores do tumor sólido de Ehrlich.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação

2.1.1 Método de evaporação em fase reversa

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀ (concentração lipídica de 40 mM, razão molar igual 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação. O filme lipídico obtido foi dissolvido em éter etílico e foi adicionada uma solução de CDDP* 2mg/mL preparada em solução de NaCl 0,9% (p/v). A razão entre as fases aquosa e etílica foi de 1:3, respectivamente. A mistura resultante foi submetida à rápida agitação produzindo, então, uma emulsão água/óleo (A/O). Em seguida, o éter etílico foi evaporado num rotaevaporador, com a conseqüente formação dos lipossomas. Estes lipossomas formados foram submetidos a calibração por membranas de policarbonato de 0,4 μ , 0,2 μ e 0,1 μ (5 ciclos em cada membrana). Após a extrusão, a CDDP não encapsulada foi eliminada por ultracentrifugação (ultracentrífuga SORVALL ultra 80, Albertville, Minnesota, EUA) a 150.000 x g, a 10 °C, por 80 minutos.

2.2 Caracterização dos SpHL-CDDP

Os lipossomas foram caracterizados pela sua porcentagem de encapsulação, diâmetro e potencial zeta. A porcentagem de encapsulação foi determinada

pela quantificação da radiação gama no sobrenadante, nos SpHL-CDDP não purificados e purificados após ultracentrifugação.

A porcentagem de encapsulação (PE) foi calculada com o emprego da seguinte equação:

$$PE = \frac{\text{cpm de CDDP* presente SpHL-CDDP purificados}}{\text{cpm de CDDP* presente nos SpHL-CDDP não purificados}} \times 100$$

A análise do diâmetro dos SpHL-CDDP foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons a 25°C e ângulo de 90°. O potencial zeta dos SpHL-CDDP foi avaliado por determinação do espalhamento dinâmico de luz e da mobilidade eletroforética a um ângulo de 90°. As medidas foram realizadas em triplicata utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). As amostras foram diluídas em solução de NaCl a 0,9% (p/v).

2.3 Estudo de estabilidade dos SpHL-CDDP

Amostras de SpHL-CDDP foram diluídas, 10 vezes, em solução de NaCl a 0,9% (p/v) ou em plasma de camundongo 1:4 e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. A CDDP liberada a partir dos SpHL-CDDP foi separada por ultracentrifugação a 150000 x g, a 10 °C, por 80 minutos. A CDDP liberada foi quantificada com o emprego da espectroscopia por absorção atômica em forno de grafite (Springvale, Victoria, Austrália).

2.4 Modelo experimental de camundongos Swiss portadores de tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido em camundongos Swiss fêmeas. Os camundongos foram mantidos em área com controle de luminosidade e tiveram livre acesso a água e ração. As células do tumor de Ehrlich foram gentilmente cedidas pelo Prof. Jorge Luiz Pesquero (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). As células tumorais foram inoculadas pela via intraperitoneal nos camundongos, e o líquido ascítico foi coletado após oito dias. Em seguida, a suspensão de células tumorais viáveis foi preparada a uma densidade de $1,08 \times 10^6$ células/mL e transplantadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos pesando entre 20 e 25g (Biotério da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O desenvolvimento do tumor se fez durante 15 dias até que o mesmo pudesse ser palpável em todos os animais, com medidas de aproximadamente 9 a 10 mm. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais e cumprem com os requisitos do guia para cuidados e utilização de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.5 Estudo de biodistribuição e farmacocinética dos SpHL-CDDP

A CDDP* livre ou encapsulada em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação (SpHL-CDDP*) foram injetados, por via intravenosa, em camundongos Swiss fêmeas portadoras de tumor de Ehrlich (n = 5), com dose de 6mg/kg. Nos intervalos de tempo de 10, 30 e 60 minutos e 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina

(7,5mg/kg) e ketamina (60mg/kg). O sangue foi coletado e os órgãos fígado, baço, rins, coração e tumor foram removidos, lavados com água destilada, secos em papel de filtro e devidamente pesados. A radioatividade dos órgãos e do sangue foi medida por um cintilador automático na janela de energia de 50-150 keV (ANSR-Abott, EUA). O tempo de contagem foi de 4 minutos. A correção do tempo de meia-vida da ^{195m}Pt foi realizada pela contagem simultânea de CDDP* livre e de SpHL-CDDP* injetados nos camundongos. Os resultados foram expressos como % de dose injetada/g de tecido. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA-Prism 4.0 ($p < 0,05$). O coeficiente de partição tecido-sangue foi determinado dividindo-se a área sob a curva da concentração de CDDP* no tecido pela área sob a curva da concentração de CDDP* no sangue. Parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o programa WinNonlin software versão 3.1 (Pharsight, Mountain View, CA, EUA). A análise foi do tipo não-compartimental, modelo 201, administração intravenosa por bolus, regra trapezoidal log/linear. Os parâmetros analisados foram tempo de meia-vida ($T_{1/2\lambda z}$), tempo máximo (T_{max}), concentração máxima (C_{max}), *clearance* corporal total (CL), volume de distribuição (V_z) e área sob a curva (ASC). O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos levou em consideração os últimos três pontos para a estimativa da meia-vida terminal.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos SpHL-CDDP

A porcentagem de encapsulação de CDDP* nos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação foi igual a $26,3 \pm 1,1\%$. O diâmetro médio e o potencial zeta da dispersão das vesículas foram de 110 nm e 0,6mV, respectivamente, mostrando uma boa homogeneidade na distribuição de tamanho das vesículas (índice de polidispersão igual a 0,07).

3.2 Estabilidade dos SpHL-CDDP

Em meio rico em proteínas, como o plasma de camundongo, os SpHL-CDDP mostraram boa estabilidade. Aproximadamente 70% da CDDP permaneceram dentro das vesículas após a incubação nesse meio. A liberação da CDDP a partir dos SpHL-CDDP expostos ao meio contendo NaCl 0,9% (p/v) foi similar, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Provavelmente, esta liberação da CDDP foi devida ao aquecimento (37 °C) e não à desestabilização provocada pelas interações com as proteínas plasmáticas.

3.3 Distribuição tecidual das formulações de CDDP*

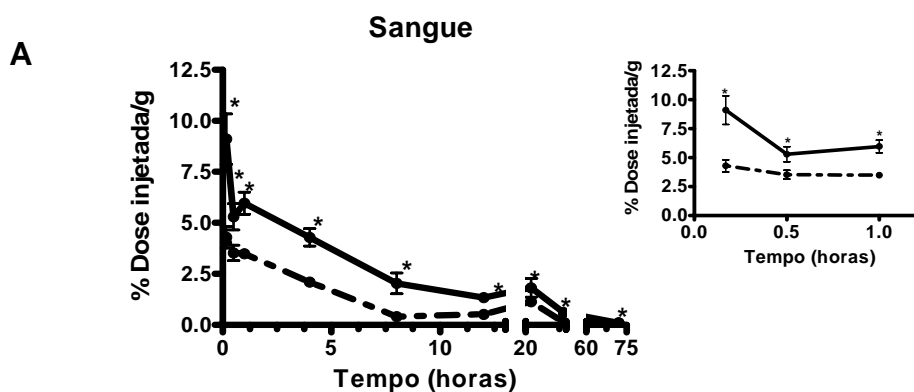
A Figura 11A mostra que após 72 horas da administração de uma dose única de SpHL-CDDP, o sangue apresentou concentração três vezes maior de CDDP quando comparada com a administração de CDDP livre. O valor de ASC foi 2,1 vezes maior para o tratamento com SpHL-CDDP do que com CDDP livre (96,55 e 45,79 % dose injetada/g, respectivamente). No fígado, o pico da concentração máxima de CDDP foi alcançado 1 hora após a administração de SpHL-CDDP e CDDP livre (Figura 11B). Após este tempo, a concentração de CDDP começou a decrescer no grupo tratado com SpHL-CDDP, mostrando uma eliminação lenta durante o tempo do experimento. Para o grupo tratado com CDDP livre, a concentração de CDDP no fígado mostrou flutuação durante todo o experimento.

No baço, a concentração máxima de CDDP foi alcançada 12 h e 1h após a administração de SpHL-CDDP e CDDP livre, respectivamente (Figura 11C). A concentração máxima de CDDP encontrada no tratamento com SpHL-CDDP foi 4 vezes maior que a obtida após a injeção de sua forma livre. No tempo de 24 horas foi observada uma redução da concentração de CDDP para ambos os tratamentos, seguida pelo seu aumento nos tempos de 48 e 72 horas.

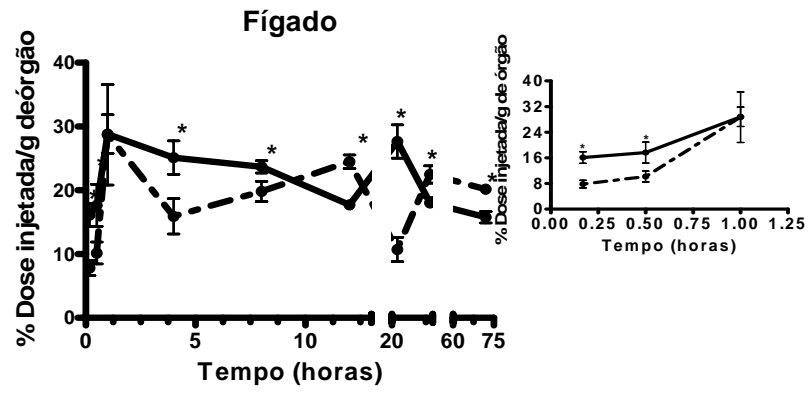
Nos rins, a captação de CDDP até 1 hora, a partir de sua forma livre, foi maior que a captação de CDDP a partir dos SpHL-CDDP. Com a administração de SpHL-CDDP, a concentração máxima de CDDP foi alcançada no tempo de 1 hora (Figura 11D). Entretanto, após 4 horas foi observado um declínio da concentração renal de CDDP tanto nos animais tratados com a forma livre quanto naqueles tratados com a forma encapsulada. No tempo de 24 horas, a concentração de CDDP mostrou novo pico seguido de declínio da concentração nos tempos posteriores.

No coração, o perfil de distribuição foi similar para os dois tratamentos. A captação máxima ocorreu no tempo de 1 hora (Figura 11E). Os níveis de CDDP foram equivalentes em todos os intervalos de tempo, exceto em 48 horas quando a concentração de CDDP foi maior após a administração de SpHL-CDDP.

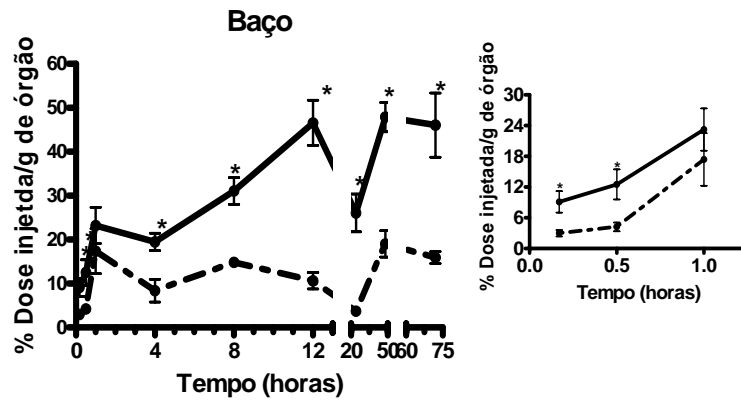
No tumor, a concentração de CDDP atingiu um ponto máximo em 24 horas após a administração de SpHL-CDDP, sendo cerca de 2 vezes maior que aquela obtida a partir da administração de CDDP livre. Além disso, a área sob a curva para o tratamento com SpHL-CDDP foi 2,6 vezes maior que para o tratamento com a CDDP livre (145,70 e 56,30 % dose injetada/g, respectivamente) (Figura 11F).



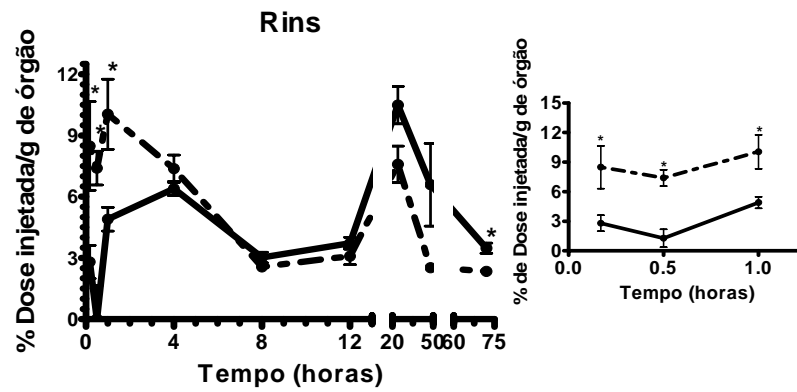
B



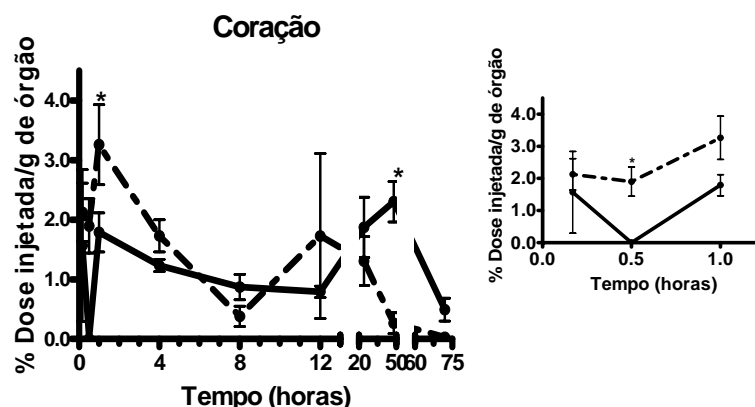
C



D



E



F

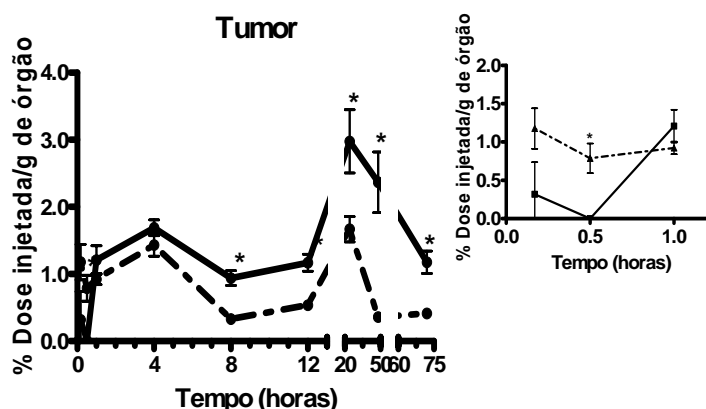


Figura 11 - Perfil de concentração de CDDP no sangue (A), fígado (B), rins (C), baço (D), coração (E) e tumor (F) após administração intravenosa de CDDP (•••) ou SpHL-CDDP (—●—) em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

O coeficiente de partição tecido-sangue (k_p) para os tratamentos com a CDDP livre e com SpHL-CDDP está mostrado na Tabela 2. Ambas as formulações de CDDP mostraram uma maior perfusão para o tecido hepático, renal e esplênico após a sua administração intravenosa. No entanto, níveis mais altos de distribuição tecidual extensiva no fígado e rim foram encontrados para o tratamento com a CDDP livre. Os valores de k_p para o fígado e rim foram, respectivamente, 2,7 e 1,7 vezes maiores para o tratamento com CDDP livre do que com SpHL-CDDP, indicando um maior acúmulo de CDDP nestes tecidos após a administração na sua forma livre. A retenção de CDDP no coração foi baixa para ambos os tratamentos, fato que é refletido pelo seu

baixo valor de k_p comparado a outros órgãos. O acúmulo de CDDP no tumor foi maior quando os animais foram tratados com SpHL-CDDP que quando foram submetidos ao tratamento com a CDDP livre. A razão entre os valores de k_p (K_p SpHL-CDDP/ K_p CDDP livre) foi igual a 1,23, demonstrando uma maior retenção de CDDP no tumor para os animais tratados com SpHL-CDDP.

Tabela 2 - Coeficiente de partição tecido/sangue (K_p) para diferentes órgãos de camundongos após tratamento com injeção intravenosa de CDDP livre (A) ou de SpHL-CDDP (B)

Órgão	K_p (A)	K_p (B)	K_p (B)/ K_p (A)
Fígado	29,72	15,59	0,52
Rins	6,73	4,79	0,71
Baço	20,11	28,83	1,43
Coração	1,28	1,16	0,91
Tumor	1,23	1,51	1,23

* K_p calculado a partir da razão ASC_{0-72} tecido/ ASC_{0-72} sangue.

3.4 Estudo farmacocinético das formulações de CDDP

Os parâmetros farmacocinéticos estão sumarizados na Tabela 3. A concentração máxima (C_{max}) de CDDP no sangue foi igual a 6,76 $\mu\text{g/mL}$ e 17,15 $\mu\text{g/mL}$ após a administração intravenosa de CDDP* e SpHL-CDDP*, respectivamente. O $t_{1/2}$ foi de 13,51 e 10,65 h após os tratamentos com CDDP* e SpHL-CDDP*, respectivamente. Os valores de $ASC_{(0 \rightarrow \infty)}$ foram iguais a 64,70 e 141,51 $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ após a injeção de CDDP* e SpHL-CDDP*, respectivamente. A $ASC_{(0 \rightarrow \infty)}$ para o tratamento com SpHL-CDDP* foi 2,19 vezes maior que aquela observada para o tratamento com CDDP*. O volume de distribuição durante a fase terminal (V_z) apresentou valores de 1807,91 mL/Kg para o tratamento com CDDP* e 651,60 mL/Kg para o tratamento com SpHL-CDDP*. O maior valor de V_z após a administração de CDDP* em relação ao observado para o tratamento com SpHL-CDDP* (2,77 vezes superior) revela a característica de longa circulação desse último. O clearance da CDDP*

(92,73 mL/h/Kg) também se mostrou maior em relação ao clearance da forma encapsulada em lipossomas (42,40 mL/h/Kg).

Tabela 3 – Parâmetros farmacocinéticos de CDDP* e SpHL-CDDP* após administração endovenosa em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Os valores foram calculados utilizando o programa WinNonlin para um modelo não-compartimental.

Parâmetro	Unidade	CDDP*	SpHL-CDDP*
		Valor	Valor
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	6,76	17,15
$T_{1/2\lambda Z}$	h	13,51	10,65
$ASC_{(0 \rightarrow t)}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	62,04	139,75
$ASC_{(0 \rightarrow \infty)}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	64,70	141,51
V_z	mL/kg	1.807,91	651,60
CL	mL/h/kg	92,73	42,40

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os lipossomas são sistemas de liberação de drogas com capacidade de modificar a distribuição tecidual, metabolismo, eliminação e reduzir ou eliminar a toxicidade da droga livre. Neste trabalho, investigou-se a distribuição tecidual de uma nova formulação de lipossomas contendo CDDP, formulados com DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀, sendo conhecidos como lipossomas pH-sensíveis de longa circulação. Estes lipossomas constituem uma estratégia para a terapia do câncer, devido ao fato do pH no sítio tumoral ser menor do que nos tecidos normais. O CHEMS neste ambiente é protonado, ocasionando a desestabilização da bicamada das vesículas lipídicas, e conseqüente, liberação da CDDP. Estes lipossomas podem ser uma alternativa para melhorar a biodisponibilidade e a eficácia da CDDP lipossomal desenvolvida por Harrington e colaboradores (2001). Neste estudo, a concentração de CDDP na corrente sanguínea obtida após o tratamento com SpHL-CDDP foi maior que aquela alcançada pela CDDP na sua forma livre, como pode ser observado

pelos valores de ASC no sangue para os dois tratamentos. SpHL-CDDP foram removidos pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear como ocorrido com os lipossomas de longa circulação (SPI-077) avaliados por Newman e colaboradores (1999). O baço foi o responsável pela maior *clearance* e também mostrou um maior valor de Kp (28,83), indicando a alta afinidade do tecido esplênico pelos SpHL-CDDP.

A alta concentração de CDDP no fígado obtida após a administração de SpHL-CDDP é também resultante de uma captação extensiva, que é observada pelo alto valor de Kp (15,59). A CDDP livre foi também retirada do sangue pelo baço e fígado. Este fato pode ser explicado pela função metabólica destes órgãos e pela afinidade de ligação da CDDP às proteínas teciduais. O alto valor de Kp no baço e no fígado mostrou a grande captação de CDDP nestes órgãos. A CDDP possui a capacidade de formar complexos com as proteínas plasmáticas, principalmente albumina, e o complexo formado pode explicar a elevada remoção de CDDP pelo baço e fígado na primeira hora após sua administração. Ao contrário, a captação de SpHL-CDDP pelo fígado permaneceu alta até 8 horas. A redução da captação de SpHL-CDDP pelo fígado e baço em 12 horas e em 4 horas, respectivamente, pode ser devida à saturação do sistema fagocitário mononuclear. Após este tempo, ocorreu uma captação adicional de SpHL-CDDP pelo fígado, seguida de uma lenta eliminação durante todo o experimento. Estes resultados são similares àqueles obtidos por Wang e colaboradores (2003). O tecido renal, principal sítio de toxicidade da CDDP, mostrou alta concentração de CDDP em 1 hora e, novamente, em 24 horas após a administração de SpHL-CDDP. Este aumento em 24 horas pode ser resultante da degradação de SpHL-CDDP no fígado e no baço, liberando a CDDP e/ou derivados de CDDP no sangue, seguida de sua eliminação renal. O tratamento com SpHL-CDDP levou a uma maior ASC no tecido renal que o tratamento com a CDDP livre, porém, o coeficiente de partição tecido renal/sangue de CDDP livre foi superior, indicando seu maior extravasamento para o tecido renal. Este acúmulo nos rins pode levar a um severo efeito tóxico. Portanto, a administração de SpHL-CDDP contribuiu com uma menor passagem de CDDP para o tecido renal, podendo reduzir ou

eliminar a toxicidade neste órgão durante o tratamento quimioterápico com esta formulação de CDDP. No coração, o perfil de distribuição foi similar após ambos os tratamentos nos intervalos de tempo investigados. Embora o valor de ASC para o grupo tratado com SpHL-CDDP foi maior que para o grupo tratado com CDDP livre, o nível de extravasamento para o tecido cardíaco foi pequeno em ambos os tratamentos (K_p próximo à unidade). A maior retenção de SpHL-CDDP na corrente sanguínea em comparação com a CDDP livre, como demonstrado pelos valores de área sob a curva, levou maior concentração de CDDP no tumor. O valor de K_p para o tratamento com SpHL-CDDP indicou que a distribuição no tumor é extensiva e a razão K_p SpHL-CDDP/ K_p CDDP livre foi igual a 1,23, indicando uma maior retenção de SpHL-CDDP pelo tumor do que de CDDP livre. Esta maior retenção de CDDP pelo tumor a partir da administração de SpHL-CDDP e a maior ASC obtida podem conduzir a uma maior concentração de CDDP no tecido tumoral, e conseqüentemente, a uma maior eficácia antitumoral.

Diante do exposto, os SpHL-CDDP mostraram ser um sistema de liberação de CDDP capaz de aumentar a biodisponibilidade de CDDP na região tumoral e diminuir sua concentração no tecido renal, podendo, portanto, contribuir com a redução de sua toxicidade.

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade antitumoral e da resistência *in vitro* de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina=

Avaliação da atividade antitumoral e da resistência *in vitro* de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina

1. INTRODUÇÃO

Como já mencionado anteriormente a CDDP é um agente quimioterápico utilizado amplamente no tratamento de uma variedade de tumores. Entretanto, a resistência clínica intrínseca ou adquirida durante o tratamento assim como a toxicidade são fatores limitantes para a sua utilização. O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos como os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação pode ser uma estratégia para contornar estes inconvenientes. A resistência a CDDP pode ser eliminada com o emprego dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação por proporcionarem uma nova via de transporte da CDDP através da membrana celular, a endocitose, aumentando desta forma sua concentração intracelular. Além disso, a toxicidade pode ser reduzida em decorrência de uma maior seletividade farmacológica resultante da liberação preferencial de CDDP na região tumoral, contribuindo, portanto, para uma maior eficácia antitumoral. Nesta tese de doutorado, avaliamos a capacidade dos SpHL-CDDP de eliminar a resistência adquirida empregando-se linhagem celular resistente de carcinoma de pulmão de células pequenas (GLC4/CDDP). A eficácia antitumoral foi avaliada utilizando-se modelo experimental de camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Sava (2001) relata que muitos modelos experimentais de tumor são utilizados para avaliação da atividade antitumoral de CDDP e seus análogos, dentre eles destaca-se o tumor de Ehrlich. A CDDP exerce efeito inibitório sobre o tumor de Ehrlich tanto na sua forma ascítica quanto em sua forma sólida. Um dos mecanismos envolvidos na atividade antitumoral é a indução de apoptose (GHOSH *et al.*, 2006).

2 . MATERIAL E MÉTODOS

A CDDP foi gentilmente cedida pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). DSPE-PEG₂₀₀₀, DOPE e dioleoilfosfatidilcolina DOPC foram fornecidos por Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). CHEMS foi adquirido de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de sódio foi adquirido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os solventes empregados apresentavam grau analítico. Camundongos Swiss fêmeas oriundos do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais foram mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação, tendo livre acesso à ração e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentos Animais da Universidade Federal de Minas Gerais. A linhagem tumoral de células de Ehrlich foi fornecida pelo Prof. Jorge Luiz Pesquero (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais).

2.1 Encapsulação da cisplatina em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação

2.1.1 Método de evaporação em fase reversa

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS, DSPE-PEG₂₀₀₀ ou DOPC, CHEMS, DSPE-PEG₂₀₀₀ (concentração lipídica de 40 mM, razão molar igual 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação. O filme lipídico obtido foi dissolvido em éter etílico e adicionado de solução de CDDP 2mg/mL preparada em solução de NaCl 0,9% (p/v). A razão entre as fases aquosa e etílica foi de 1:3, respectivamente. A mistura resultante foi submetida à rápida agitação produzindo uma emulsão A/O. Em seguida, o éter etílico foi evaporado, com a conseqüente formação dos lipossomas. Estes lipossomas formados foram

submetidos à calibração por membranas de policarbonato de 0,4 μ , 0,2 μ e 0,1 μ (5 ciclos em cada membrana). Após a extrusão, a CDDP não encapsulada foi eliminada por ultracentrifugação (ultracentrífuga SORVALL ultra 80, Albertville, Minnesota, EUA) a 150000 x g, a 10 °C, por 80 minutos.

2.2 Caracterização dos SpHL-CDDP

Os lipossomas foram caracterizados pela sua porcentagem de encapsulação, diâmetro e potencial zeta. A determinação da porcentagem de encapsulação dos SpHL-CDDP foi realizada por meio de CLAE. O aparato consiste de bomba modelo 515, um auto injetor modelo 717 e um detector de ultra-violeta variável modelo 2487 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA) usando o software Millennium. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma pré coluna 4 x 4 mm, 5 μ m e coluna Lichrospher® 100 NH₂ 25 cm x 4 mm, 10 μ m (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente foi composto por metanol/acetato de etila/N,N, dimetilformamida/água 4:4:1:1, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Amostras de 20 μ L foram injetadas e a absorbância do eluato foi medida a 310 nm. A análise do diâmetro dos SpHL-CDDP foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons à 25°C e ângulo de 90°. O potencial zeta dos SpHL-CDDP foi avaliado por determinação do espalhamento dinâmico de luz e da mobilidade eletroforética a um ângulo de 90 °. As medidas foram realizadas em triplicata utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). As amostras foram diluídas em solução de NaCl a 0,9% p/v.

A quantidade de CDDP foi determinada nas soluções estoque empregadas na preparação dos SpHL-CDDP e no sobrenadante após purificação dos SpHL-CDDP. A porcentagem de encapsulação foi calculada como:

$$PE = \frac{[CDDP]_{\text{Solução estoque}} - [CDDP]_{\text{sobrenadante}} \times 100}{[CDDP]_{\text{Solução estoque}}}$$

2.3 Avaliação da resistência celular aos SpHL-CDDP

A avaliação da capacidade dos SpHL-CDDP em contornar ou não a resistência à CDDP foi investigada empregando-se duas linhagens celulares, a saber: GLC4 (sensível à CDDP) e GLC4/CDDP (resistente à CDDP). A linhagem celular GLC4 foi obtida a partir da efusão pleural de paciente acometido por carcinoma de pulmão de células pequenas pelo Prof. E. G. E. de Vries (Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitário, Groningen, Holanda). A linhagem celular GLC4/CDDP foi obtida a partir da exposição contínua à CDDP. Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O número de células inicial para cultura foi igual a 10⁵ células/mL, atingindo 10⁶ células/mL em intervalo de três dias. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão do trypan blue e a contagem celular determinada com o emprego de Coulter Counter. 10⁵ células/mL de GLC4 ou GLC4/CDDP foram incubadas com CDDP livre e SpHL-CDDP durante 72 horas em diferentes concentrações. A sensibilidade de ambas as linhagens celulares às formulações de CDDP livre ou SpHL-CDDP foi avaliada pela determinação da IC₅₀, concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, e do fator de resistência (RF), definido pela razão entre a IC₅₀ de células resistentes e a IC₅₀ de células sensíveis.

2.4 Determinação da concentração intracelular de CDDP

Após a incubação de células GLC4 ou GLC4/CDDP por 3 dias com diferentes concentrações de CDDP livre ou SpHL-CDDP, as mesmas foram submetidas à centrifugação, lavadas duas vezes com tampão fosfato refrigerado e redispersas em HNO₃ a 65%. A concentração de CDDP foi determinada por

espectroscopia de absorção atômica (Varian, Zeeman 220, Mulgrave, Victoria, Austrália).

2.5 Avaliação da atividade antitumoral SpHL-CDDP

Inicialmente, $1,08 \times 10^6$ células do tumor de Ehrlich foram implantadas em camundongos Swiss fêmeas, apresentando um peso entre 18 e 22g, por via subcutânea, dorso-lateralmente. Após 15 dias da inoculação, SpHL-CDDP, lipossomas não-pH sensíveis de longa circulação contendo cisplatina (NSpHL-CDDP), CDDP livre, SpHL brancos, NSpHL brancos bem como solução de NaCl 0,9% (p/V) foram injetados nos camundongos ($n = 15$ para cada grupo, dose de CDDP igual a 8 mg/Kg). A administração destas diferentes formulações farmacêuticas foi realizada por via endovenosa, num total de três administrações, com intervalos entre doses de 7 dias. O volume do tumor foi medido seguindo a fórmula $V = \pi/6 (d_1 \times d_2 \times d_3)$, sendo d_1 , d_2 e d_3 as medidas geométricas dos três diâmetros ortogonais (largura, comprimento e profundidade). Os animais tiveram acesso livre à água e ração e foram mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação. O protocolo adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.6 Avaliação do peso e da sobrevida

Os animais foram pesados em intervalos regulares de tempo, os sinais clínicos foram registrados e a sobrevida foi também acompanhada durante um período de até 66 dias após a primeira dose de tratamento.

2.7 Análise Estatística

As comparações da atividade antitumoral e mudanças no peso corpóreo obtidas dos diferentes tratamentos foram realizadas utilizando o Teste de Lilliefors e Bartlett para verificação de normalidade e homocedasticidade da variância, respectivamente. Os dados foram analisados em parcelas, com grupos nas parcelas e tempo na subparcela. Todos os dados relativos ao volume tumoral e ao peso dos animais foram transformados pela equação: $y = \log(\text{variável}) + \frac{1}{2}$. O teste de Scott-Knott foi utilizado para comparar as medidas. A estimativa dos modelos de regressão foi utilizada nos intervalos de tempo de investigação da evolução do tumor e da mudança de peso corporal. Análises de sobrevivência foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier (os diferentes grupos foram comparados pelo *log rank test*). A significância estatística foi considerada como sendo $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos lipossomas

A porcentagem de encapsulação de CDDP nos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação foi de $26,3 \pm 1,1\%$. O diâmetro médio e o potencial zeta das vesículas foram de 110 nm e 0,6 mv, respectivamente. Os SpHL-CDDP apresentaram um índice de polidispersão igual a 0,07, indicando ótima homogeneidade na distribuição do diâmetro das vesículas.

3.2 Avaliação da resistência celular aos SpHL-CDDP

A Figura 12 mostra o efeito dos SpHL-CDDP no crescimento das células GLC4

e GLC4/CDDP. Pode-se observar que a resposta citotóxica desta formulação de CDDP é similar para ambas as linhagens celulares.

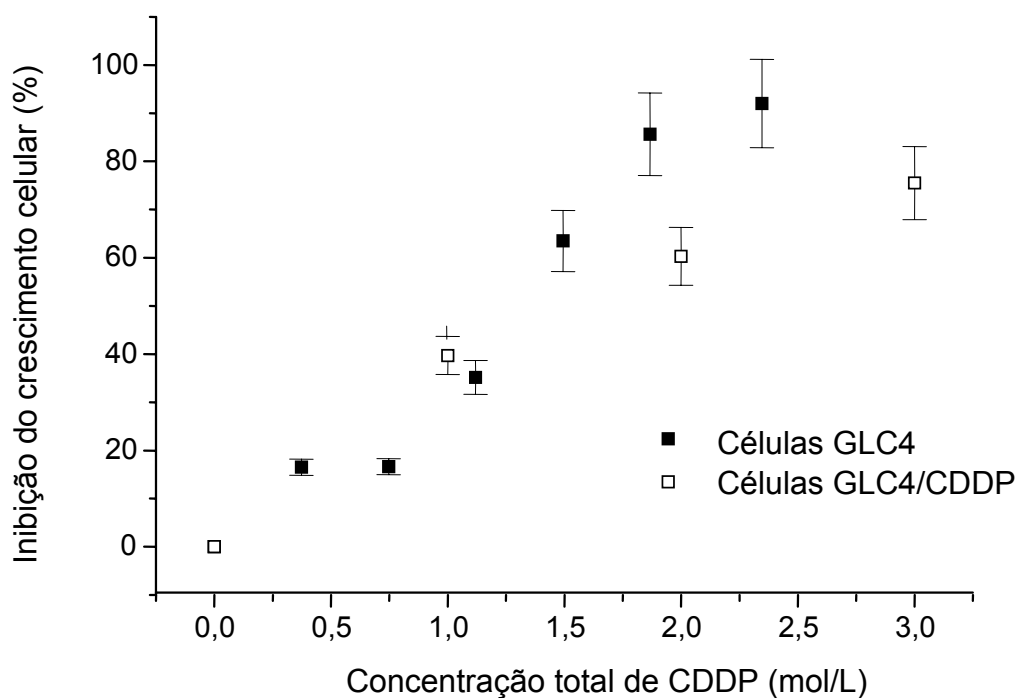


Figura 12 - Curva dose-resposta de células GLC4 e GLC4/CDDP para SpHL-CDDP obtida após três dias de incubação. Os dados referem-se às médias e desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

A Figura 13 apresenta o perfil da porcentagem de inibição de crescimento das células GLC4 e GLC4/CDDP em função da concentração intracelular de platina. Comparando a acumulação de platina nestas linhagens celulares, podemos dizer que são necessárias concentrações similares de CDDP para produzir o mesmo efeito citotóxico. Por exemplo, considerando a IC_{50} para a formulação de SpHL-CDDP obtêm-se concentrações intracelulares de platina idênticas para ambas as linhagens celulares, sendo igual a 4×10^{-17} mol/cel.

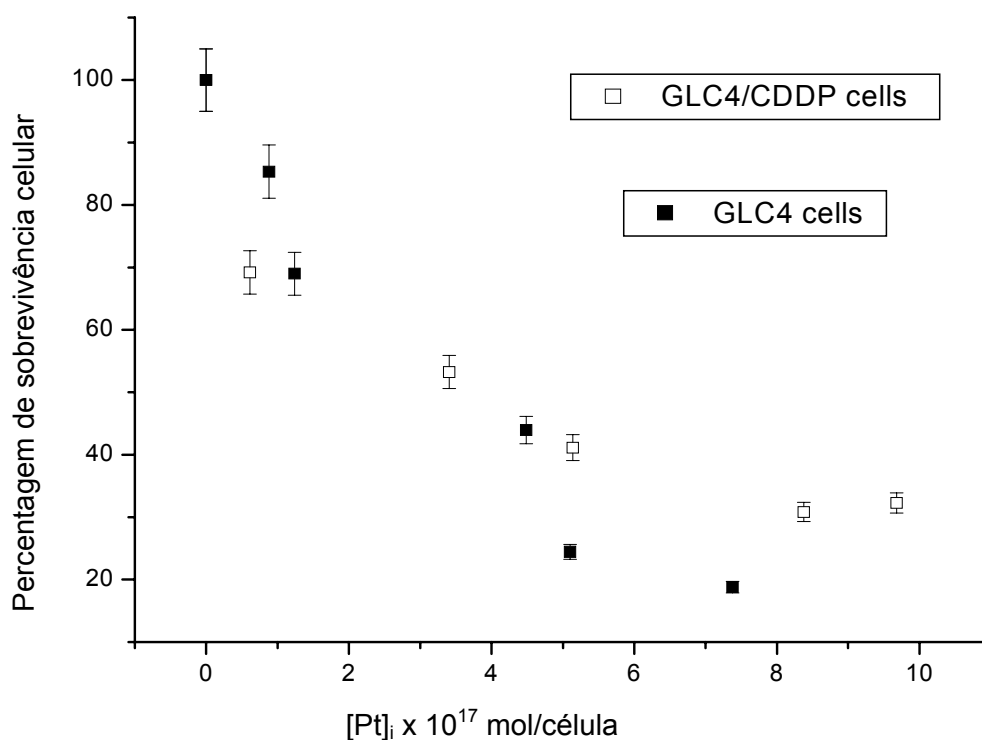


Figura 13 - Perfil da sobrevivência das linhagens celulares GLC4 e GLC4/CDDP em função da concentração intracelular de platina após a exposição de dose equitóxica de SpHL-CDDP por 3 dias.

A Tabela 4 indica a concentração que inibe 50% do crescimento celular de GLC4 e GLC4/CDDP para a CDDP livre e SpHL-CDDP assim como as concentrações intracelulares de platina. A atividade citotóxica de CDDP livre foi maior do que a de SpHL-CDDP na linhagem celular GLC4. Provavelmente, isto se deve às diferenças no mecanismo de captura celular destas formulações de CDDP. Entretanto, em relação à linhagem celular GLC4/CDDP foi necessária uma menor concentração de CDDP sob a forma de SpHL-CDDP do que CDDP livre para inibir 50% do crescimento celular. Além disso, pôde-se verificar que os valores de IC₅₀ obtidos para SpHL-CDDP nas linhagens celulares GLC4 e GLC4/CDDP são idênticos, obtendo-se um fator de resistência (RF) igual a 1,1. A concentração intracelular de platina requerida para a obtenção de IC₅₀ de SpHL-CDDP foi aproximadamente 2,5 vezes menor do que aquela observada para CDDP livre. Estes resultados nos mostram que a encapsulação de CDDP em SpHL permite contornar a resistência da linhagem celular GLC4/CDDP ao tratamento com CDDP.

Tabela 4. IC₅₀, fator de resistência e concentração intracelular de platina após três dias de incubação com as formulações de CDDP e SpHL-CDDP. Os dados são expressos como média e desvio padrão, sendo obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata.

Formulações	Linhagem Celular	IC ₅₀ (µM)	RF	[Pt] _i x 10 ¹⁷ (mol/cel)
CDDP	GLC4	0,40 ± 0,05		9,8
CDDP	GLC4/CDDP	2,50 ± 0,20	6,3	10,7
SpHL-CDDP	GLC4	1,32 ± 0,10		4,0
SpHL-CDDP	GLC4/CDDP	1,45 ± 0,15	1,1	4,0

3.3 Avaliação da atividade antitumoral de SpHL-CDDP

As Figuras 14 e 15 mostram o perfil da avaliação antitumoral para as formulações de SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e CDDP livre assim como os respectivos controles [(SpHL, NSpHL e solução de NaCl 0,9% (p/v)]. Pode-se observar que, levando-se em consideração os valores médios obtidos no intervalo de tempo de investigação, houve uma menor velocidade de crescimento do tumor após o tratamento dos camundongos com SpHL-CDDP e CDDP livre.

O crescimento do tumor com o uso da formulação SpHL-CDDP foi menor em comparação à formulação NSpHL-CDDP (Figura 14). Este resultado sugere a importância do uso do derivado fosfatidiletanolamina na composição lipossomal, conferindo sensibilidade à membrana lipídica frente a uma região de pH ácido como o da região tumoral. Todos os três grupos controles [(SpHL brancos, NSpHL brancos e solução de NaCl 0,9% (p/v)] avaliados mostraram um maior crescimento do tumor

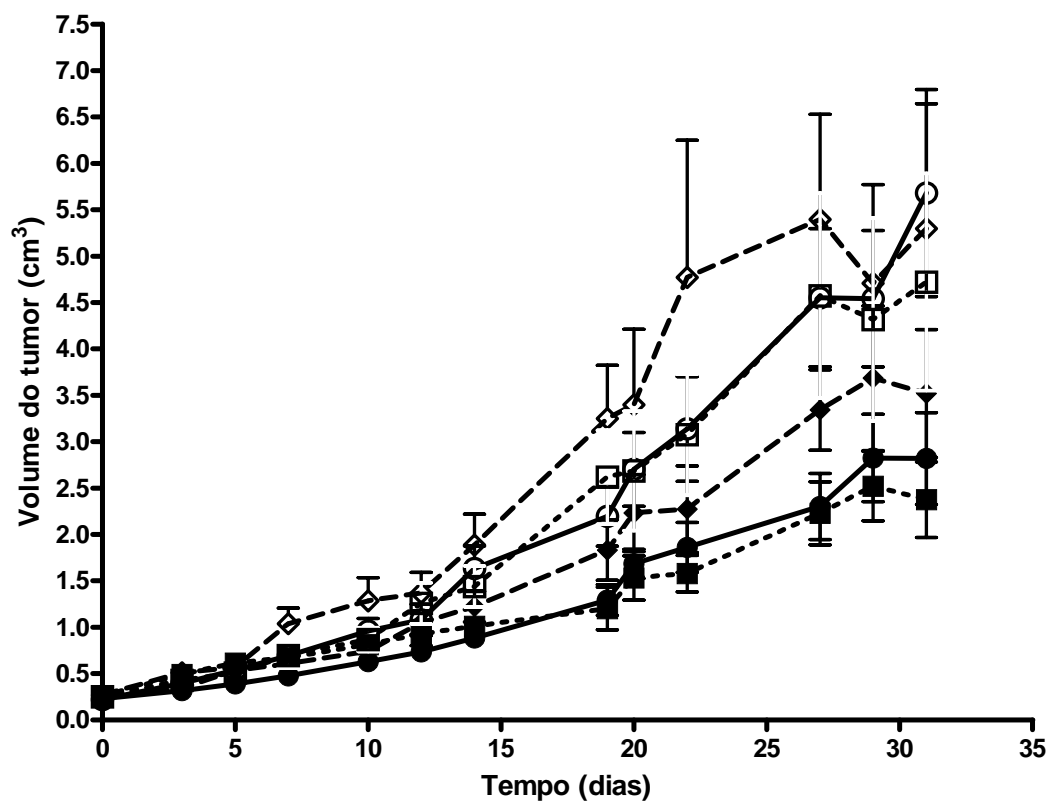


Figura 14 - Perfil do crescimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss fêmeas submetidas aos seguintes tratamentos: • SpHL-CDDP; ◊ NSpHL-CDDP; ■ CDDP livre; ○ SpHL; ◊ NSpHL; □ Solução de NaCl 0,9% (p/v), nos dias 0, 7 e 14.

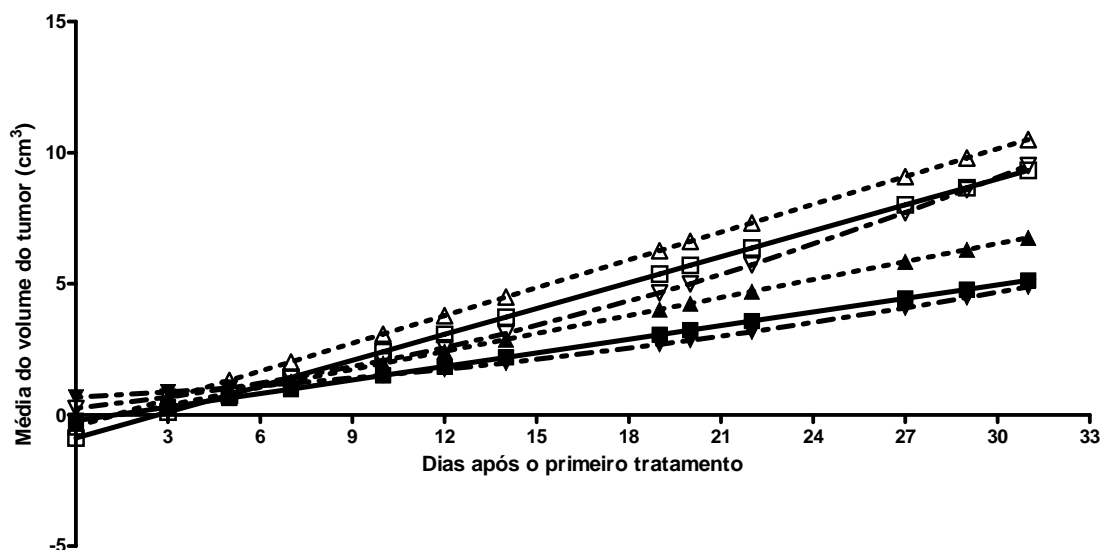


Figura 15 – Efeito antitumoral após a administração intravenosa de CDDP (▼), SpHL-CDDP (■) ou NSpHL-CDDP (▲) em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. A dose de CDDP em cada formulação foi de 8 mg/kg. Também são mostrados nesta figura os seguintes grupos controle: SpHL (□), NSpHL (△) ou solução de NaCl 0.9% (w/v) (▽). Os valores do volume tumoral foram calculados usando as equações da análise por regressão linear obtida para cada tratamento. Os valores de r^2 das curvas CDDP, SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, SpHL, NSpHL e solução de NaCl 0.9% (p/v) são: 97,85; 95,22; 95,98; 94,08; 94,46 e 95,98, respectivamente.

3.4 Avaliação do peso dos animais

A Figura 16 apresenta uma comparação da variação de peso dos camundongos acometidos pelo tumor de Ehrlich e tratados com as diferentes formulações, tais como: SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e CDDP livre assim como os respectivos controles [(SpHL brancos, NSpHL brancos e solução de NaCl 0,9% (p/v)].

O tratamento dos camundongos acometidos com tumor sólido de Ehrlich com o uso de CDDP livre ocasionou uma perda de peso dos animais, a qual foi mais acentuada 22 dias após o início do tratamento (Figura 16). Esta resposta clínica dos animais pode estar relacionada à toxicidade da CDDP. A encapsulação de CDDP em SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP permitiram contornar

este efeito indesejável. No entanto, vale destacar que considerando que a atividade antitumoral de CDDP e SpHL-CDDP é equivalente até 29 dias após início do tratamento, pode-se sugerir que o aumento de peso verificado deve-se ao ganho de massa corporal e não ao crescimento do tumor. Por outro lado, em relação ao tratamento com NSpHL-CDDP fica a dúvida se o aumento de peso dos animais deve-se ao ganho de massa corporal ou ao aumento do volume do tumor, uma vez que sua atividade antitumoral é menor do que a observada para o tratamento com CDDP livre. Os camundongos do grupo controle tratados com solução de NaCl 0,9% (p/v) não apresentaram redução de peso em nenhum dos intervalos de tempo investigado. O ganho de peso constante observado nesse grupo de animais pode ser resultante do desenvolvimento normal dos mesmos juntamente com o aumento do volume do tumor.

Também foi observada uma severa reação na pele dos animais, apresentando necrose no local de administração da formulação CDDP livre.

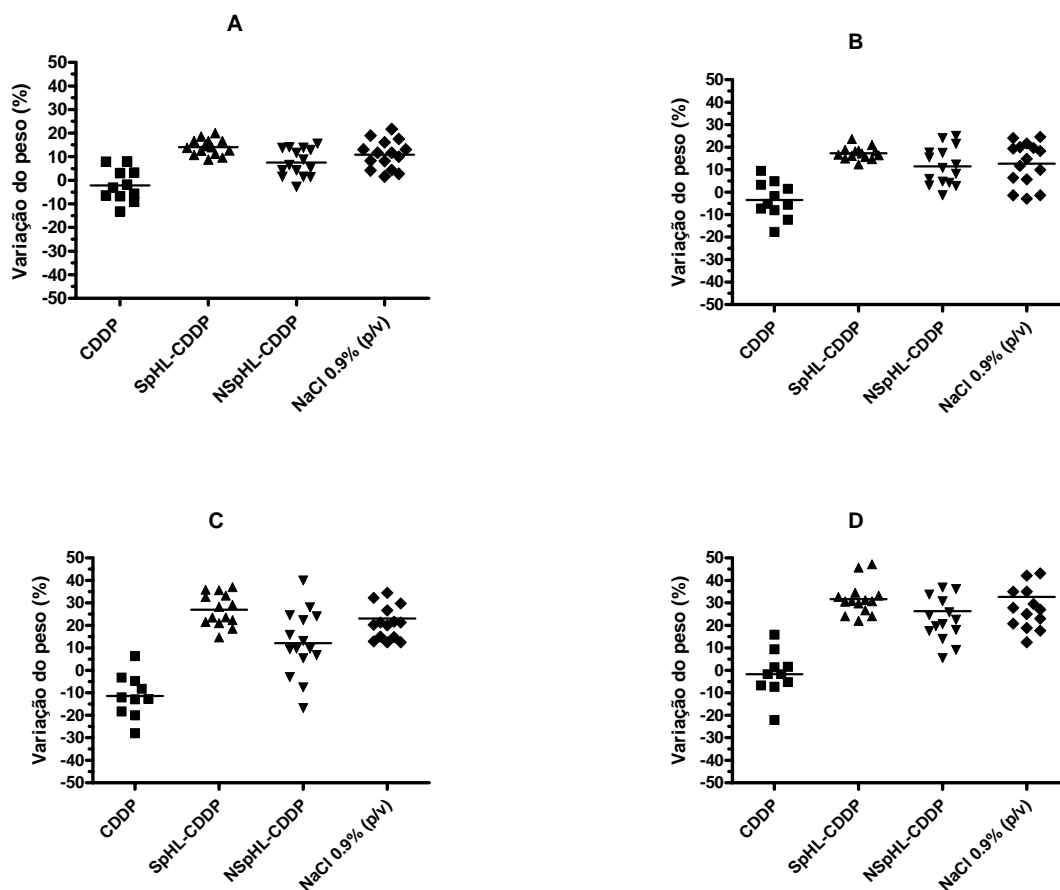


Figura 16 - Perfil da variação de peso dos camundongos Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich e submetidos a diferentes tratamentos. Os gráficos A, B, C e D correspondem à variação de peso observada nos dias 7, 14, 22 e 29 dias, respectivamente, após o início dos tratamentos. SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e NaCl 0,9% (p/v) apresentam diferença estatística em relação à CDDP livre ao nível de $p < 0,001$ (ANOVA seguido de Tukey's Multiple Comparison Test).

3.5 Análise da sobrevida

O tempo médio de sobrevida dos grupos tratados com CDDP, SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP foi de 52, 66 e 66 dias, respectivamente (Figura 17A). Os animais submetidos aos tratamentos com solução de NaCl 0,9% (p/v), SpHL, NSpHL mostraram tempo médio de sobrevida de 62, 62 e 66 dias, respectivamente. A mediana de sobrevida dos animais tratados com SpHL-CDDP foi estatisticamente maior que aquela observada para os animais tratados com CDDP ($p < 0,0001$). O grupo tratado com NSpHL-CDDP não

mostrou aumento do tempo de sobrevida (66 dias) quando comparado ao grupo tratado com SpHL-CDDP ($p > 0,05$). Este fato mostra que também a encapsulação da cisplatina em lipossomas não-pH sensíveis e de longa circulação contribuiu para uma maior sobrevida dos animais. Os camundongos sob tratamento com SpHL e NSpHL exibiram o mesmo tempo médio de sobrevida daqueles animais tratados com SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP, seus respectivos grupos controle (Figura 17B). De forma diferente, os animais tratados com CDDP apresentaram uma mediana de sobrevida significativamente menor (52 e 62 dias para os tratamentos com CDDP e solução de NaCl 0,9% (p/v), $p < 0,0001$). Estes resultados indicam a baixa toxicidade das formulações lipossomais de CDDP em comparação à administração da CDDP em sua forma livre. É importante salientar que as medianas de sobrevida para os três grupos controle não apresentou diferença estatisticamente significativa. Este resultado mostra que a administração de lipídeos, como os constituintes das preparações lipossomais, não induz efeitos tóxicos nos animais.

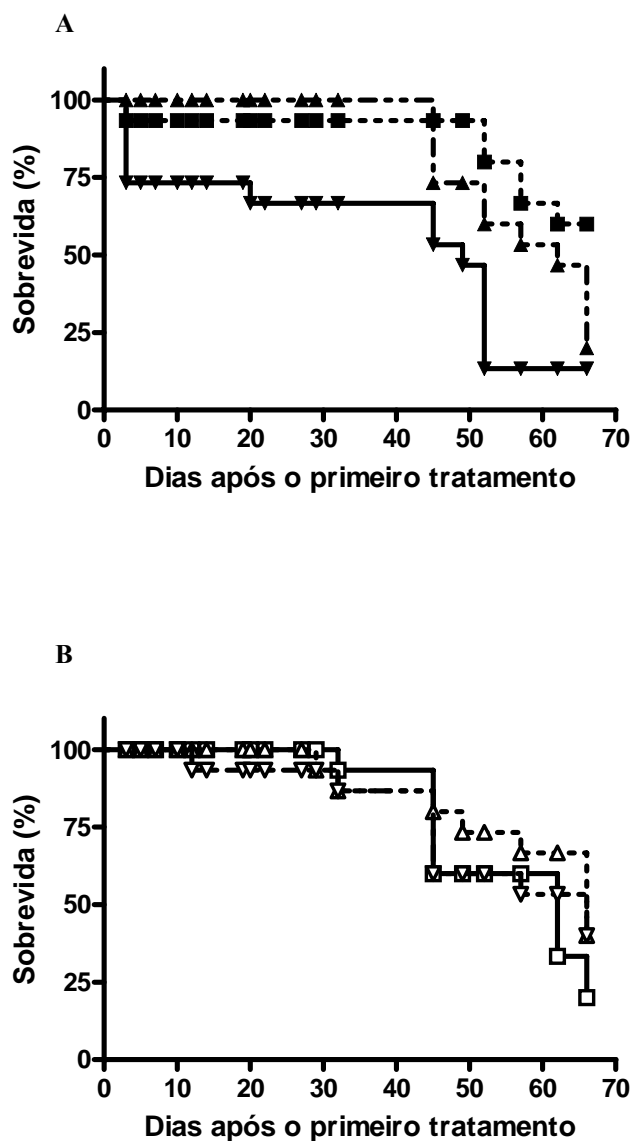


Figura 17 – Sobrevida dos camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich tratados com CDDP (A, ▼), SpHL-CDDP (A, ■) ou NSpHL-CDDP (A, ▲). A dose de CDDP em cada formulação foi de 8 mg/kg. A sobrevida dos grupos submetidos aos tratamentos seguintes também foi avaliada: SpHL (B, □), NSpHL (B, △) ou solução de NaCl 0.9% (p/v) (B, ▽).

4. DISCUSSÃO

Estudos prévios mostraram a capacidade dos SpHL-CDDP promoverem uma maior concentração da CDDP no sítio tumoral. Além disso, após a administração intravenosa de SpHL-CDDP foi observada uma baixa perfusão da CDDP no tecido renal (JUNIOR *et al*, 2007). Estes resultados sugerem que o uso de SpHL-CDDP como sistema de liberação de fármacos pode melhorar a

eficácia terapêutica da CDDP. Portanto, neste trabalho foi realizada a investigação da eficácia antitumoral de SpHL-CDDP em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. De acordo com os dados obtidos, a encapsulação de CDDP em SpHL-CDDP não alterou a atividade antitumoral do fármaco. De modo contrário, o controle do volume do tumor com o tratamento pelos NSpHL-CDDP se mostrou menor que aquele observado com o tratamento por CDDP. Os sistemas carreadores de longa circulação são capazes de aumentar a concentração de drogas nos tumores pela condição aumentada do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). O efeito EPR é uma consequência da formação de capilares de endotélio fenestrados no tumor e a ausência do sistema linfático com a capacidade de transportar fármacos para a corrente sanguínea (GRYPARIS *et al.*, 2007). Além disso, a eficiência terapêutica do sistema carreador de fármacos também envolve a liberação do agente antineoplásico no sítio tumoral. Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a composição lipídica do SpHL-CDDP contribuiu para o efeito antitumoral. Primeiramente, pode-se afirmar que a adição de DSPE-PEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica contribuiu para o efeito de longa circulação do SpHL-CDDP em comparação à CDDP livre na corrente sanguínea, como foi demonstrado pelos valores de $ASC_{(0 \rightarrow \infty)}$ e V_{ss} obtidos do estudo de farmacocinética. A presença de DOPE na composição lipídica dos lipossomas confere propriedades fusogênicas à bicamada dos lipossomas. Em meio ácido, como na região do tumor, o CHEMS sofre protonação resultando na desestabilização da membrana com a consequente liberação da CDDP, levando à conclusão que os lipossomas contendo DOPE possuem uma eficácia muito maior que aqueles compostos por DOPC. Outra vantagem do tratamento com SpHL-CDDP sobre o tratamento com CDDP livre é a maior taxa de sobrevivência obtida. Este resultado é devido a uma menor toxicidade da preparação lipossomal. Considerando a limitação do aumento de dose pela toxicidade apresentada pela CDDP livre, a otimização na terapia do tratamento do câncer pela utilização da SpHL-CDDP poderá, certamente, ser observada com o uso de maiores doses dessa formulação.

5.0 CONCLUSÃO

O tratamento com SpHL-CDDP apresentou uma maior eficácia antitumoral e menor toxicidade quando comparado ao tratamento com NSpHL-CDDP e CDDP, respectivamente. Estes resultados justificam a continuidade dos estudos, *in vivo*, da atividade antitumoral de SpHL-CDDP com a aplicação de outros esquemas de doses.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Nos últimos vinte e cinco anos ocorreu um aumento de conhecimentos da biologia geral do câncer, no entanto os avanços clínicos não seguiram a mesma dinâmica (FERRARI, 2005). A tendência é propor uma terapia que torne os fármacos cada vez mais seletivos e com menores reações adversas. Dessa forma, são duas as principais metas das pesquisas em antineoplásicos: aumentar a eficácia terapêutica por dose, e, dotar os agentes terapêuticos com propriedades capazes de superar as barreiras biológicas melhorando a seletividade do fármaco para os tecidos comprometidos.

Como já discutido anteriormente, a CDDP é um dos antineoplásicos de uso corrente na clínica, mas apresenta limitações em virtude de sua toxicidade. Essa dificuldade pode ser reduzida ou eliminada mediante modificações na formulação, como a sua encapsulação em sistemas nanoestruturados, como os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação. Na etapa de desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica faz-se necessário a realização de estudos pré-clínicos, envolvendo investigações de atividade terapêutica, biodistribuição e toxicidade, com o intuito de se conhecer o seu comportamento biológico o qual estará relacionado com a eficácia e segurança de um novo potencial medicamento. Portanto, essa tese de doutorado, teve como objetivos explorar aspectos de biodistribuição e farmacocinética; atividade citotóxica, especificamente a resistência ao tratamento com SpHL-CDDP, e finalmente, a atividade antitumoral e toxicidade em modelo animal experimental.

Para a realização dos estudos de biodistribuição e farmacocinética é importante ter um método de quantificação do fármaco em órgãos e tecidos que seja simples e rápido. A CDDP tem sido dosada em meios biológicos por meio de espectroscopia de absorção atômica. No entanto, esse método é moroso e requer tratamento específico para cada órgão e tecido

individualmente, a fim de se eliminar a influência das diferentes matrizes no método de quantificação. Por esse motivo, foi importante desenvolver um método de obtenção da CDDP radiomarcada. A irradiação da CDDP no reator nuclear de pesquisa TRIGA MARK I IPR-R1, mediante sua proteção numa cápsula de cádmio, permitiu a obtenção de CDDP radiomarcada intacta e com uma atividade específica ($57,0 \text{ kBq.mg}^{-1}$) apropriada para a sua detecção nos estudos de biodistribuição e farmacocinética.

Após a administração intravenosa de SpHL-CDDP em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich foi observada uma captura significativa pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear, fígado e baço, sendo essa distribuição tecidual extensiva. Apesar disso, pôde-se observar que a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação levou a uma menor distribuição da CDDP pelo organismo, e conseqüentemente, a uma maior permanência da formulação de SpHL-CDDP na corrente sanguínea. O volume de distribuição durante a fase terminal foi 2,8 vezes superior para o tratamento com a CDDP livre em comparação com o tratamento com SpHL-CDDP. Os valores de $ASC_{(0 \rightarrow \infty)}$ foram iguais a 64,70 e 141,51 h.µg/mL após a injeção de CDDP e SpHL-CDDP, respectivamente, sendo portanto 2,2 vezes maior para o segundo tratamento. Certamente, esse maior tempo de circulação sanguínea de SpHL-CDDP contribuiu para a maior concentração de CDDP no tumor a partir da injeção de SPHL-CDDP do que aquela observada após a administração de CDDP livre. Além disso, o estudo de distribuição de CDDP no tumor, mediante a determinação do K_p , nos revelou que a formulação de SpHL-CDDP apresenta maior afinidade pelo mesmo do que a CDDP livre, o que pode levar a uma maior eficácia terapêutica do tratamento de tumores com SpHL-CDDP. Outro fato de extrema relevância observado após a administração de SpHL-CDDP foi o menor extravasamento de CDDP para o tecido renal. Esse novo perfil de biodistribuição pode representar uma redução da toxicidade renal induzida pelo tratamento com CDDP.

O estudo de avaliação da atividade antitumoral de SpHL-CDDP revelou que o efeito farmacológico da CDDP não sofreu alteração em virtude de sua encapsulação nas vesículas lipossomais, pois o efeito sobre o crescimento do tumor sólido de Ehrlich foi similar ao observado para o tratamento com CDDP livre. A comparação do efeito antitumoral de SpHL-CDDP com o de NSpHL-CDDP demonstrou que a composição lipídica envolvendo o derivado da fosfatidiletanolamina (DOPE) que apresenta propriedades fusogênicas e o derivado do colesterol (CHEMS), sensível à mudança de pH, parece ter influência no melhor efeito antitumoral da primeira formulação lipossomal de CDDP. Ainda, como sugerido a partir do estudo de biodistribuição e farmacocinética, o tratamento do tumor sólido de Ehrlich com SpHL-CDDP é capaz de induzir menor efeito tóxico do que o tratamento com CDDP livre. Isso foi comprovado pela ausência de perda de peso e maior sobrevivência dos animais tratados com SpHL-CDDP em comparação com aqueles tratados com CDDP livre. Finalmente, uma capacidade interessante demonstrada pelos SpHL-CDDP é sua habilidade em contornar a resistência ao tratamento com derivado platinado, como a CDDP.

Portanto, a partir do trabalho realizado até o momento, pode-se propor as seguintes perspectivas:

- Estudar a atividade antitumoral de SpHL-CDDP em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich com o emprego de maiores doses.
- Estudar a toxicidade aguda e crônica/subcrônica de SpHL-CDDP.
- Estudar a atividade antitumoral de SpHL-CDDP em outros modelos animais experimentais
- Estudar a distribuição intracelular de SpHL-CDDP após sua administração *in vivo*.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCâncer – Associação Brasileira do Câncer. Disponível em: www.abcancer.org.br. Acesso em novembro/2008.

ALBERTS, D.S.; GREEN, S.; HANNINGTAN, E.V. Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide vs cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the Southwest Oncology Group of a phase III randomized trial in stages 3 and 4 ovarian cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, p. 706-717, 1992.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28(1), p. 118-129, 2005.

ANDREWS, P.A.; HOWELL, S.B. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. **Cancer Cells**, v. 2, p. 35-43, 1990.

ANDREWS, P.A.; VELURY, S.; MANN, S.C.; HOWELL, S.B. cis-Diamminedichloro-platinum (II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 48, p. 68-73, 1988.

ARAVANTINOS, G.; FOUNTZILAS, G.; KOSMIDIS, P.; DIMOPOULOS, M.A.; STATHOPOULOS, G.P.; PAVLIDIS, N.; BAFALOUKOS, D.; PAPADIMITIOU, C.; KARPATIOS, S.; GEORGOULIAS, V.; PAPAKOSTAS, P.; KALOFONS, H.P.; GRIMANI, E.; SKARLOS, D.V. Paclitaxel plus carboplatin versus paclitaxel plus alternating carboplatin and cisplatin for initial treatments of advanced ovarian cancer: long-term efficacy results: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. **Annals of Oncology**, v. 16, p. 1116-1122, 2005.

ARMSTRONG, A.J.; GEORGE, D.J. Sartraplatin in the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3(5), p. 877-883, 2007.

ARRIAGADA, R.; BERGMAN, B.; DUNANT, A.; PIGNON, J.P.; VANSTEENKISTE, J. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 351-360, 2004.

BAJORIN, D.F.; SAROSDY, M.F.; PFISTER, D.G. Randomized trial of etoposide and cisplatin versus etoposide and carboplatin in patients with good-risk germ cell tumours: a multiinstitutional study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 4, p. 598-606, 1993.

BANDAK, S.; GOREN, D.; HOROWITZ, A.; TZEMACH, D.; GABIZON, A. Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models. **Anticancer Drugs**, v. 10, n. 10, p.911-920, 1999.

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

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncology Reports**, v. 10(6), p. 1663-1182, 2003.

BOULIKAS, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. **Oncology Reports**, v. 13, p. 3-12, 2004.

BOVEN, E.; VERSCHRAAGEN, M.; HULSCHER, T.M.; ERKELENS, C.A.M.; HAUSHEER, F.H.; PINEDO, H.M.; VAN DER VIJGH, W.J.F. BNP7787, a novel protector against platinum-related toxicities, does not affect the efficacy of cisplatin or carboplatin in human tumour xenografts. **European Journal of Cancer**, V. 38, p. 1148-1156, 2002.

CALVERT, A.H.; HARLAND, S.J.; NEWELL, D.R.; SIDDIK, Z.H.; JONES, A.C.; McELWAIN, T.J.; RAJU, S.; WILTSHAW, E.; SMITH, I.E.; BAKER, J.M., PECKHAM, M.J.; HARRAP, K.R. Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 9, n. 3, p.140-147, 1982.

CALVERT, H.; JUDSON, I.; VAN DER VIJGH, W.J. Platinum complexes in cancer medicine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity. **Cancer Surveys**, v. 15, p. 189-217, 1993;

CHU, G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 787-790, 1994.

DE ANDRES, L.; BRUNET, J.; LOPEZ-POUSA, A. Randomized trial of neoadjuvant cisplatin and fluoracil versus carboplatin and fluoracil in patients with stage IV-M0 head and neck cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, p. 1493-1500, 1995.

DELATTRE, J.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F.; PHILIPOT, J.R.; SCHUBER, F. Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In: **Les Liposomes Aspects Technologiques. Biologiques et Pharmacologiques**. Paris: Les éditions INSERM & Editions Médicales Internationales, p. 179-213, 1993.

DU, H.; CHANDAROY, P.; HUI, S.W. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1326, n. 2, p. 239-248, 1997.

EASTMAN, A.; SCHULTE, N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry**, v. 27, p. 4730-4734, 1988.

EGORIN, M.J.; VAN ECHO, D.A.; OLMAN, E.A.; WHITACRE, M.Y.; FOREST, A.; ALSNER, J. Prospective validation of a pharmacologically based dosing scheme for the cis-Diamminedichloroplatinum (II) analogue Diamminecyclobutanedicarbonylatoplatinum. **Cancer Research**, v. 45, p. 6502-6506, 1985.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and Challenges. **Nature Reviews**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FERREIRA, A.C. Private Communication, 2004.

FILHO, I. V. Importância da radioterapia no tratamento do NSCL estágio avançado. In: **Simpósio Mineiro de Oncologia**, 4., 2002, Belo Horizonte: Office Editora e Publicidade Ltda, p. 34-36, 2002.

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

FOURNIER, C.; HECQUET, B.; BASTIAN, G.; KHAYAT, D. Modification of the physicochemical and pharmacological properties of anticancer platinum compounds by commercial 5-fluoracil formulations: a comparative study using cisplatin and carboplatin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 461-466, 1992.

FOX, L.E.; TOSHACH, K.; CALDERWOOD-MAYS, M.; KHOKHAR, A.R.; KUBILIS, P.; PEREZ-SOLER, R. MACEWEN, E.G. Evaluation of toxicosis of liposome-encapsulated cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane platinum (II) in clinically normal cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60(2), p. 257-263, 1999.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28(3), p. 511-518, 2005.

FRIEDLANDER, G., KENNEDY, J. W., MACIAS, E., S. MILER, J.M. in: **Nuclear and Radiochemistry**. Wiley-Interscience, pp 435-439, 1981.

GHOSH, S.; MAITY, P. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization in combination with cisplatin reduces EAC tumor growth. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1550-1559, 2006.

GRYPARIS, E.C.; HATZIAPOSTOULOU, M.; PAPADIMITRIOU, E.; AVGOUSTAKIS, K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG

nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 67, p. 1-8, 2007.

GUASTALLA, J.P.; PUJADE-LAURANIE, E.; WEBEER, B.; CURÉ, H.; ORFEUVRE, H.; MOUSSEAU, M.; VINCENT, P.; DIÉRAS, V.; TUBIANA-MATHIEU, N.; JACQUIN, J.P.; MIGNOT, L.; LEDUC, B.; VIENS, P.; PARISO, D. Efficacy and safety of the paclitaxel and carboplatin combination in patients with previously treated advanced ovarian carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 9, p. 37-43, 1998.

GULINO, P.M.; GRANTHAM, F.H.; SMITH, S.H.; HAGGERTY, A. C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, p. 857-869, 1967

HARRINGTON, K.J.; LEWANSKI, C.R.; NORTHCOTE, A.D., WHITTAKER, J.; WELLBANK, H.; VILE, R.G.; PETERS, A.M.; STUART, J.S.W. Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077TM) in patients with inoperable head and neck cancer. **Annals of Oncology**, v. 12, p. 493-496, 2001.

HARRINGTON, K.J.; ROWLINSON-BUSZA, G.; SYRICOS, K.N.; VILE, R.G.; USTER, P.S.; PETERS, A.M.; STEWART, J.S.W. Pegylated liposome-encapsulated Doxorubicin and cisplatin enhance the effect of radiotherapy in a tumor xenofraft model. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 4939-4949, 2000.

HAUGNES, H.S.; AASS, N.; FOSSA, S.D.; DAHL, O.; KLEPP, O.; WIST, E.A.; SVARTBERG, J.; WILSGAARD, T.; BREMNES, R.M. Components of the metabolic syndrome in long-term survivors of testicular cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, p. 241-248, 2007.

HOESCHELLE, J.D.; BUTLE, T.A.; ROBERTS, J.A. Analysis and Refinement of the Microscale Synthesis of the ^{195m}Pt-labeled Antitumor Drug, cis-Dichlorodiammineplatinum (II), cis-DDP*. **Radiochimica Acta**, v. 31, 27-36, 1982.

HOSPERS, G.A.P.; MULDER, N.H.; DE JONG, B.; UGES, D.R.A.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.J., DE VRIES, E.G.E. Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) *in vitro*. **Cancer Research**, v. 48, p. 6803-6807, 1988.

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

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. **Reviews of Physiology and Biochemistry Pharmacology**, v. 146, p. 1-53, 2003.

JIANG, Q.; FAN, L.; YANG, G.; GUO, W.; HOU, W.; CHEN, L.; WEI, Y. Improved therapeutic effectiveness by combining liposomal honokiol with cisplatin in lung cancer model. **BMC Cancer**, v. 8:242, p. 1-8, 2008.

JUNIOR, A.D.; MOTA, L.G.; NUNAN, E.A.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; LEAL, A.S.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. **Life Sciences**. v. 80, p. 659-664, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.A. Célula cancerosa. In: **A Célula Biologia Celular e Molecular**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 16, p. 292-303, 2000.

KAWAI, K.; MAKI, H.; EHRLICH, W. Synthesis of ^{195m}Pt Radiolabeled, cis-Dichlorodiammineplatinum (II) of High Chemical and Radiochemical Purity Using High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Radiochemical Nuclear Chemistry Letters**. v.136, p. 67-74, 1989.

LAGO, S.; ROSSARI, J.R. Avaliação da melhora dos resultados com a introdução do paclitaxel nos esquemas de primeira linha. In: **Simpósio Mineiro de Oncologia**, 2002, Belo Horizonte: Office Editora e Publicidade Ltda, p. 72-75, 2002.

LANZI, C.; PEREGO, P.; SUPINO, R.; ROMANELLI, S.; PENSA, T.; CARENINI, N.; VIANO, I.; COLANGELO, D.; LEONE, R.; APOSTOLI, P.; CASSINELLI, G.; GAMBETTA, R.A.; ZUNINO, F. Decrease drug accumulation and increased tolerance to DNA damage in tumor cells with a low level of cisplatin resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1247-1254, 1998.

LASIC, D. D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LIMA, E.M.; ALVES, J.P.S. Quimioterapia paliativa em câncer de pulmão não-pequenas células. In: **Simpósio Mineiro de Oncologia**, 4., 2002, Belo Horizonte: Office Editora e Publicidade Ltda, p. 39-44, 2002.

MAYER, F.; HONECKER, F.; LOOIJENGA, L.H.J.; BOKEMEYER, C. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 825-832, 2003.

NEW, R. R. Liposomes in biological systems. In: **Liposomes a Practical Approach**. R. R.C. New, ed. (Oxford University Press, England), pp. 221-252, 1990.

NEWMAN, M.S.; COLBERN, G.T.; WORKING, P.K.; ENGBERS, C.; AMANTEA, M.A. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 43, p. 1-7, 1999.

O'DWYER, P.J.; STEVENSON, J.P.; JOHNSON, S.W. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. Review. **Drugs**, v. 59, n. 4, p. 19-27, 2000.

OLIVEIRA, M.C.; BOUTET, V.; FATTAL, E.; BOQUET, D.; GROGNET, J.M.; COUVREUR, P.; DEVERRE, J.R. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Sciences**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

OLIVEIRA, M.C.; FATTAL, E.; COUVREUR, P.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-meroligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1372, n. 2, p. 301-310, 1998.

ÖZER, A.Y.; FARIVAR, M.; HINCAL, A. A Temperature and pH-sensitive liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, n. 3, p. 97-101, 1993.

PAIVA, M.B.; GRAEBER, I.P.; CASTRO, D.J.; SUH, M.J.; PACK, W.H.; ESHRAGHI, A.A.; SAXTON, R.E. Laser and cisplatin for treatment of human squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 108, n. 9, p. 1269-1279, 1998.

PARKER, R.J.; EASTMAN, A.; BOSTICK-BRUTON, F.; REED, E. Acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells is associated with enhanced repaired of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 772-777, 1991.

PASSINI, A.; ZUNINO, F. New cisplatin analogues - on the way to better antitumor agents. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 26, p. 615-624, 1987.

PÉREZ, J.M.; MIGUEL, A.F.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 35, p. 109-120, 2000.

PEREZ-SOLER, R.; SHIN, D.M.; SIDDIK, Z.H.; MURPHY, W.K.; HUBER, M.; LEE, S.J.; KHOKHAR, A.R.; HONG, W.K. **Clinical Cancer Research**. v. 3, p. 373-9, 1997.

RABIK, C.A., DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treatment Reviews**. V. 33, p. 9-23, 2007.

SADZUKA, S.; HIROTA, T. Intraperitoneal administration of doxorubicin encapsulated liposomes against peritoneal dissemination. **Toxicology Letters**, v.116. n. 1-2, p. 51-59, 2000.

SAVA, G. Tumor animal models used for evaluating the antineoplastic activity of platinum coordination complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 137, n. 1-2, p. 39-44, 2001.

SCHRIJVERS, D.; van HERPEN, C.; KERGER, J.; JOOSENS, E.; van LAER, C.; AWADA, A.; van der WEYNGAERT, D. HGUYEN, H.; LE BOUDERC C.; CASTELIJNES, J.A.; KAANDERS, J.; DE MULDER, P.; VERMOKEN, J.B. Docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil in patients with locally advanced unresectable head and neck cancer: a phase I-II feasibility study. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 638-645, 2004.

SHIRAZI, F.H.; MOLEPO, J.M.; STEWART, D.J.; RAAPHORST, G.P.; GOEL, R. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p. 211-218, 1996.

SIEGEL, D.P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. **Biophysical Journal**, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SINGH, G. A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 58, p. 71-80, 1989.

SKARE, N.G. Quimioterapia neo-adjuvante em câncer de pulmão. in: **Simpósio Mineiro de Oncologia**, 4., 2002, Belo Horizonte: Office Editora e Publicidade Ltda, p. 37-38, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Projeto Câncer no Brasil, p.13-20 p, 2000.

STATHOPOULOS, G.P.; BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M.; RIGATO, S.K.; STATHOPOULOS, J.G. Liposomal cisplatin combined with gemcitabine in pretreated advanced pancreatic cancer patients: a phase I-II study. **Oncology Reports**, v. 15(5), p. 1201-1204, 2006.

STEWART, F.M.O; HARKINS, B.J.O; HAHN, S.S.O; DANIEL, T.M. Cisplatin, 5-fluorouracil, mitomycin C, and concurrent radiation therapy with and without esophagectomy for esophageal carcinoma. **Cancer**, v. 64(3), p. 622-628, 1989.

STORDAL, B.; PAVLAKIS, N.; DAVEY, R. A sistematic review of platinum and taxane resistance from bench to clinic: An inverse relationship. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, p. 688-703, 2007.

STRUMBERG, D.; BRÜGGE, S.; KORN, M.W.; KOEPPEN, S.; RANFT, J.; SHEIBER, G.; REINERS, C.; MÖCKEL, C.; SEEBER, S.; SHEULEN, M.E. Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 229-236, 2002

STUBBS, M.; Mc SHEEHY, P.M.J.; GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 39, n. 1, p. 13-30, 1999.

SYKES, T.R.; STEPHENS-NEWSHAM, L.G.; NOUJAIM, A.A. Reactor production and detection of radiolabeled cis-platinum. **Applied Radiations and Isotopes**, v. 37, p. 231-236, 1986.

TACHIBANA, R.; HARASHIMA, H.; AZUMANO, M.; NIWA, M.; FUTAKI, S.; KIWADA, H. Intracellular regulation of macromolecules using pH-sensitive liposomes and nuclear localization signal: qualitative and quantitative evaluation of intracellular trafficking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 538-544, 1998.

TARDI, P.; CHOICE, E.; MASIN, D.; REDELMEIER, T.; BALLY, M.; MADDEN, T.D. Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models. **Cancer Research**, v 60, p. 3389-3393, 2000.

TRISSEL, L.A.; MARTINEZ, J.F. Compatibility of thiotepa (lyophilized) with selected drugs during simulated y-site administration. **American Journal of Health-System pharmacy**. v. 53, p. 1041-1051, 1996.

VAAGE, J.; DONOVAN, D.; WIPFF, E.; ABRA, R.; COLBERN, G.; USTER, P.; WORKING, P. Therapy of xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes. **International Journal of Cancer**, v. 80, p. 134-137, 1999.

van de VAART, P.J.M.; van der VANGE, N.; ZOETMULDER, F.A.N.; van GOETHEM, A.R.; van TELLINGEN, O.; ten BOKKEL HUININK, W.W.; BEIJEN, J.H.; BARTELINK, H.; BEGG, A.C. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 1, p. 148-154. 1988.

YANG, E.S.; MURPHY, B.M. ; CHUNG, C.H. ; NETTERVILLE, J.L. Evolution of clinical trials in head and neck cancer. **Clinical Reviews in Oncology/Hematology**, Article in press, 2008.

WANG, S.; MI, J-B.; CHANG, W-B.; CI, YX.; ZHAO, YK.; ZHU, LY.; XU, G. Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-

encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, p. 589-592, 2003.

ZAMBONI, W.C.; GERVAIS, A.C.; EGORIN, M.J.O.; SCHELLENS, J.H.M.; DELAUTER, B.J.; ZUHOWSKI, E.G.; PLUIM, D.; HAMBURGER, D.R.; WORKING, P.K.; COLBERN, G.; EISEMAN, J.L. Disposition of platinum (Pt) in B16 murine melanoma tumors after administration of cisplatin or pegylated liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103). Proc 11th NCI EORTC AACR Symp. abstract no. 132, 2000 *apud* JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. **Reviews of Physiology and Biochemistry Pharmacology**, v. 146, p. 1-53, 2003.

ZAMBONI, W.C. Concept and Clinical Evaluation of Carrier-Mediated Anticancer Agents. **The Oncologist**, V. 13, p. 248-260, 2008.

Life Science, 2008 (submetido)

Antitumoral Effect of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Against Ehrlich Solid Tumor

A. D. Carvalho Júnior^{1,2}, E. A. Leite¹, L. G. Mota¹, L. G. V. Coelho³, A. M. Q. Lana⁴, V. C. Nascimento¹, E. A. Nunan¹, W. V. Castro⁵, M. C. De Oliveira^{1*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Faculdade de Farmácia-Bioquímica, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua da Glória, 185, 39100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

³ Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30310-570, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding Author:

Phone: +55-31-34096945

Fax: +55-31-34096935

e-mail: monicacristina@ufmg.br

Abstract

Aims: Cisplatin (CDDP) is a cornerstone in chemotherapy and one of the most effective anticancer drug. However, its clinical use is hampered by the induction of side effects and its tendency to provoke chemoresistance. To circumvent these inconveniences, drug delivery systems, such as long-circulating and pH-sensitive liposomes containing CDDP (SpHL-CDDP) have been developed. The aim of this study was to evaluate the antitumoral effect and toxicity of SpHL-CDDP, as compared to free CDDP and long-circulating and non-pH-sensitive liposomes containing CDDP (NSpHL-CDDP), in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice. Main methods: After the intravenous administration of these formulations at a dose of 8 mg/kg (3 cycles), the tumor volume, survival rate, and body weight variation were evaluated. Key findings: The tumor growth was similar after SpHL-CDDP and free CDDP treatments. However, NSpHL-CDDP showed to be of lesser efficacy in controlling the tumor growth than the other two treatments. On the other hand, the survival rates obtained for SpHL-CDDP and NSpHL-CDDP treatments were higher than that observed for free CDDP treatment. Furthermore, while the free CDDP treatment provoked a loss in body weight, mice treated with both liposomal formulations of CDDP showed no loss in body weight. These findings showed that SpHL-CDDP were able to maintain the antitumoral effect of CDDP without inducing the appearance of toxicity. In addition, the composition of SpHL-CDDP proved to be relevant to the therapeutic efficacy. Significance: These findings revealed the beneficial effects of SpHL-CDDP as CDDP carriers, demonstrating their potential in the treatment of tumors.

Key words: **long-circulating and pH-sensitive liposomes, cisplatin, antitumoral effect, toxicity.**

Introduction

cis-Diamminedichloroplatinum (II) or cisplatin (CDDP) is one of the most widely used chemotherapeutic agents for the treatment of solid tumors. CDDP covers a broad spectrum, having being used to treat breast, lung and neck, as well as ovary and testicular cancers. However, some limitations are associated with the clinical application of CDDP, such as toxic side effects, especially nephrotoxicity, and drug resistance (Rabik and Dolan 2007; Wang et al. 2007). Among the various resistance mechanisms involved, decreased cellular accumulation of CDDP has been demonstrated in most cases (Carvalho Júnior et al. 2007). Therefore, to overcome these CDDP-related disadvantages, much effort has been made to develop CDDP delivery systems, for example, the use of liposomes (Steerenberg et al. 1988; Newman et al. 1999; Júnior et al. 2007). Liposomes are able to reduce unwanted drug actions, which can cause toxicity; improve drug bioavailability; and provide targeted drug delivery (Allen et al. 1995). In the case of cancer treatment, passive targeting can be reached with the use of liposomes as carriers of anticancer agents. Solid tumors present peculiar pathophysiological characteristics, such as hyperplasia and hypermeability of tumor vasculature, which facilitate the extravasation of colloidal systems (Uchino et al. 2005). However, the antitumoral efficacy of these systems depends on their ability to release the drug into the tumor's extracellular fluid (Zamboni et al. 2004). In our research group, we have developed a new formulation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing CDDP (SpHL-CDDP). It is known that pH-sensitive liposomes are destabilized in acidic mediums, such as a tumor site, following the release of the encapsulated drug. Thus, it is expected that the released CDDP in this specific site can improve the antitumoral effect and reduce or eliminate the side effects. Previous studies of tissue distribution showed a higher concentration and affinity of CDDP toward tumor

tissues from SpHL-CDDP administration, as compared to free CDDP injection (Júnior et al. 2007). Therefore, the present study, had the aim of investigating whether these findings could contribute to an enhanced antitumoral efficacy of SpHL-CDDP against Ehrlich solid tumor in Swiss mice.

Materials and methods

Materials

CDDP was supplied by Quiral Quimica do Brasil S.A. Distearoylphosphatidylethanolaminepolyethyleneglycol₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) were supplied by Lipoid GmbH. Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) was purchased from the Sigma Chemical Company. Sodium chloride was purchased from Merck. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Liposome preparation

SpHL-CDDP was prepared by reverse-phase evaporation as described by Junior et al. (2007). DOPE, CHEMS, and DSPE-PEG₂₀₀₀ (5.7:3.8:0.5 molar ratio, respectively) were dissolved in chloroform at a 40 mM total lipid concentration and submitted to evaporation under reduced pressure until a thin lipid film had been obtained. Long-circulating and non-pH-sensitive liposomes containing CDDP (NSpHL-CDDP) were also prepared using DOPC, CHEMS, and DSPE-PEG₂₀₀₀ at the same lipid ratio and concentration of SpHL-CDDP. The film obtained was dissolved in ethyl ether, and a CDDP solution (2 mg/mL), prepared in a 0.9% w/v NaCl solution, was added. The mixture was stirred with a vortex, and the ethyl ether was completely removed under reduced pressure. The liposomes were then sequentially extruded (Lipex Biomembranes

Extruder, Vancouver, Canada) through a series of polycarbonate membranes with pore sizes of 0.4, 0.2, and 0.1 μm (5 cycles for each). Non-entrapped CDDP was eliminated by ultracentrifugation (Ultracentrifuge SORVALL Ultra 80, USA) at 150,000 x g at 4°C for 80 minutes. The empty liposomes (without drug, SpHL, or NSpHL) were also prepared as described above.

Liposome characterization

The liposomes were characterized by their encapsulation percentage, size, and zeta potential. The encapsulation percentage of CDDP into liposomes was determined by high-performance liquid chromatography. The chromatographic apparatus consisted of a Model 515 pump (Waters Instruments, Milford, USA), a model 717 Plus auto-injector (Waters Instruments), and a Model 2487 variable wavelength UV detector (Waters Instruments) connected to the Millennium software. Separations were performed using a Lichrospher® 100 NH₂ guard column, 4 x 4 mm , 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) connected to a 25 cm x 4 mm Lichrospher® 100 NH₂ column, 10- μm particles (Merck). The eluent system was composed of methanol/ethylacetate/N,N-dimethylformamide/water, 4:4:1:1, and the flow rate was 1.0 mL/min. Samples (20 μL) were injected, and the eluate absorbance was monitored at 310 nm. The amount of CDDP was determined in the stock solution used for the preparation of liposomes as well as in the supernatant. The encapsulation percentage (EP) was calculated as:

$$EP = \frac{[\text{CDDP}]_{\text{stock solution}} - [\text{CDDP}]_{\text{supernatant}}}{[\text{CDDP}]_{\text{stock solution}}} \times 100$$

The mean diameter of the liposomes containing CDDP was determined by means of quasi-elastic light scattering, at 25 °C, at an angle of 90°. The zeta potential was

assessed by the electrophoretic mobility determination at the angle of 90°. The size and zeta potential measurements were performed in triplicate using the 3000HS Zetasizer equipment (Malvern Instruments, England). The samples were diluted using a 0.9% w/v NaCl solution.

Ehrlich solid tumor model

Ehrlich tumors were grown in female Swiss mice. The mice were kept in an area maintained in a standardized light/dark cycle and had free access to food and water. The Ehrlich cell line was kindly supplied by Dr. Jorge Luiz Pesquero (Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil). Tumor cells were inoculated intraperitoneally into mice, and the tumors were collected after eight days. A viable tumor cell suspension was then prepared at a density of 1.08×10^6 cells/mL. Tumors cells were transplanted subcutaneously in the right flank of 20-25 g of female Swiss mice (School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil). Tumors were allowed to grow for 15 days until all inoculated mice had palpable tumors measuring approximately 9 to 10 mm. All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the Federal University of Minas Gerais and comply with the guidelines for the proper care and use of laboratory animals, as recommended by the Institute of Laboratory Animal Resources.

Antitumoral activity

When the tumor volume reached approximately 9 to 10 mm, the animals were submitted to different treatments (fifteen animals per group). Free CDDP, SpHL-CDDP, and NSpHL-CDDP were administered intravenously, at a dose of 8 mg/kg, into Ehrlich

solid tumor-bearing Swiss mice. Animals in the control groups were treated with 0.9% (w/v) NaCl solution, SpHL, or NSpHL, using the same volume of respective formulations containing CDDP. The formulations were administered on days 0, 7, and 14. Antitumoral activity was evaluated in terms of tumor volume by measuring three orthogonal diameters with a slide caliper. The solid tumor volume was calculated according to the formula: $V = \pi/6 \times (D_1 \times D_2 \times D_3)$, where D_1 , D_2 , and D_3 represent the length, width, and height, respectively. Tumor growth was monitored for 32 days. The toxicity of formulations containing CDDP was evaluated by monitoring survival rates and body weight changes. The survival rate was noted daily up to 66 days after each treatment. The mice were weighed at 0, 7, 14, 22, and 29 days after application, and their weight was expressed as the percentage of the initial body weight.

Pharmacokinetic study

For pharmacokinetics, radioabelled CDDP (CDDP*) was previously prepared as described by Leal et al. (2006). After, free CDDP* or CDDP* encapsulated into long-circulating and pH-sensitive liposomes (SpHL-CDDP*) were injected intravenously into Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice ($n = 5$). At time intervals of 10, 30, and 60 min. and 4, 8, 12, 24, 48, and 72 hours, the mice were anesthetized with a mixture of xylazine (7.2mg/kg) and ketamine (60mg/kg). Blood samples were collected immediately using a cardiac puncture. The radioactivity of the blood was measured by an automatic scintillation apparatus covering an energy window of 50-150 keV (ANSR-Abott, USA), over a 4 min. time period. Standard samples containing the same injected amount of CDDP* or SpHL-CDDP* were counted simultaneously in a separate tube, which were taken as 100% of radioactivity. The concentrations of radioactivity in the blood were expressed as the mean of the percentage of the dose injected per gram.

Pharmacokinetic parameters were determined using the WinNonlin software version 03.1A (Pharsight, Mountain View, CA, USA). Noncompartmental analysis model 201 (bolus i.v administration) was used with the log/linear trapezoidal rule. Parameters, including terminal half-life ($T_{1/2\lambda Z}$), T_{max} , C_{max} , total body clearance (Cl), volume of distribution at steady state (V_d), and area under the curve (AUC) were determined. Pharmacokinetic parameters associated with the terminal phase were calculated using the last three measured time points to estimate the terminal half-life.

Statistical Analysis

Comparisons of the antitumoral activity and changes in body weight obtained through different treatments were performed using the Lilliefors and Bartlett tests to verify normality and homogeneity of variance, respectively. Data were analyzed by arranging the parts, which are then subdivided into groups (part) and time (subpart). Data relative to tumor volume and body weight were transformed by using the following equation: $y = \log(\text{variable}) + 1/2$. The Scott-Knott test was used to compare the mean values. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Regression model estimates were used at time intervals for tumor growth investigations as well as for changes in body weight. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method, while the different groups were compared by the log rank test. A probability value of <0.05 was also considered to indicate a significant difference.

Results

Liposome characterization

The entrapment percentage of CDDP into SpHL-CDDP was equal to 26.3 ± 1.1 %. The mean diameter and zeta potential of the vesicles dispersion was 110 nm and 0.6 mV,

respectively, showing a good homogeneity (polydispersity index equal to 0.07). These data were obtained from three experiments.

Antitumoral activity

The *in vivo* antitumoral activity of SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, and free CDDP treatments was determined by assessing the tumor volume variation over time, followed by the regression analysis (Figure 1). It could be observed that the tumor growth rate for SpHL-CDDP and free CDDP treatments is lower when compared to the other treatments. However, there is no significant difference in the ability of SpHL-CDDP and free CDDP to inhibit the growth of the Ehrlich solid tumor up to 31 days after the first injection of each treatment ($P > 0.05$) (Table 1). At ten days post-administration, NSpHL-CDDP showed the same tumor growth inhibition profile observed for SpHL-CDDP and free CDDP treatments. However, after this time interval, NSpHL-CDDP proved to be less efficient in controlling the tumor volume than SpHL-CDDP and free CDDP (Table 1). This finding suggests that the lipid composition of the liposomal formulation containing CDDP does in fact play a role in antitumoral efficacy. Concerning the antitumoral efficacy of the control groups, it could be observed that at 31 days post-administration of the NSpHL treatment, the tumor growth inhibition level was similar to that obtained using the NSpHL-CDDP treatment (Table 1). This finding suggests that the CDDP release from NSpHL-CDDP, as well as its antitumoral action, can be impaired. However, the SpHL control group showed a lower tumor growth inhibition than did the SpHL-CDDP group. This finding confirms that this formulation is able to deliver the anticancer agent to the tumor site. Finally, the 0.9% (w/v) NaCl solution treatment also presented a higher tumor volume than did the free CDDP treatment. It is worth noting that the higher control over the tumor growth rate with free

CDDP and SpHL-CDDP treatments occurred after the second injection of each formulation.

Animal toxicity study

The toxicity of each treatment regimen was monitored using the loss of animal body weight, local skin reactions, and the survival rate as indicators. Figure 2 shows the time course of the body weight change of mice which received an i.v. injection of SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, and free CDDP, as well as of the control groups [SpHL, NSpHL or 0.9% (w/v) NaCl solution]. In the mice group which received an i.v. injection of free CDDP, the body weight decreased gradually, reaching a maximum loss on the twenty-second day (10.2 %) (Figure 2). On the twenty-ninth day, animals treated with free CDDP showed a recovery of their initial body weight. In contrast, neither SpHL-CDDP nor NSpHL-CDDP treatment groups presented any body weight loss at the investigated time intervals (Figure 2). The increases in body weights in the control groups were due to the remarkable increases in tumor size, whereas the decreases in body weights in the free CDDP group resulted from CDDP toxicity. A severe skin reaction, with a necrosis of the injection sites, was also observed in mice treated with free CDDP. The survival in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice which received three doses of different formulations containing CDDP, over a 66-day period, was also tested. Kaplan-Meier survival curves are shown in Figure 3, which also reflect the toxicities of different formulations containing CDDP. The median survival of the free CDDP treatment group, the SpHL-CDDP treatment group, and the NSpHL-CDDP treatment group was of 52, 66, and 66 days, respectively (Fig 3A). The 0.9 % (w/v) NaCl solution, SpHL, and NSpHL control groups showed a median survival of 62, 62, and 66 days. The median survival of mice treated with SpHL-CDDP was statistically

longer than that of mice treated with free CDDP ($P < 0.0001$). Mice injected with NSpHL-CDDP, as compared to mice injected with SpHL-CDDP ($P > 0.05$), did not present improved survival times at the end of 66 days. In addition, the encapsulation of CDDP in long-circulating and non-pH-sensitive liposomes also contributed to a longer survival period of mice treated with NSpHL-CDDP. Mice injected with SpHL and NSpHL control groups exhibited the same survival time observed after SpHL-CDDP and NSpHL-CDDP administration, respectively (Figure 3B). In contrast to free CDDP, the group treated with 0.9% (w/v) NaCl presented a significantly longer survival period (62 days, $P < 0.0001$). These findings indicate the low toxicity of CDDP liposomal formulations, as compared to its free form. Moreover, it is important to note that the median survival of three control groups was not significantly different. This result therefore proves that the lipid composition does not in fact induce toxic effects.

Pharmacokinetic study

Figure 4 (A and B) illustrates the concentration of CDDP in the blood versus the time after the i.v. injection of free CDDP* and SpHL-CDDP* in Ehrlich solid tumor-bearing mice. The pharmacokinetic parameters are summarized in Table 2. The maximum radioactivity (C_{max}) in the blood was determined as 6.76 $\mu\text{g/mL}$ for free CDDP* and 17.15 $\mu\text{g/mL}$ for SpHL-CDDP*. The $T_{1/2\alpha}$ of free CDDP* and SpHL-CDDP* after i.v. injection were 13.51 and 10.65 h, respectively. The $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ of free CDDP* and SpHL-CDDP* were 64.70 and 141.51 h. $\mu\text{g/mL}$, respectively. The $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ of SpHL-CDDP* in the blood was 2.19 times larger than that of free CDDP*. The apparent volume of distribution at steady state (V_{ss}) of CDDP* and SpHL-CDDP* were equal to 1807.91 and 651.60 mL/kg, respectively. The results showed that V_z of free CDDP* was 2.77 times higher than that of SpHL-CDDP*, which revealed that the long

circulation of SpHL-CDDP had been achieved. The total body clearance of free CDDP* (92.73 mL/h/Kg) is higher than that of SpHL-CDDP* (42.40 mL/h/Kg).

Discussion

Previous work from this team of researchers has demonstrated the ability of SpHL-CDDP to promote a high concentration of CDDP in the tumor. Moreover, after the intravenous administration of SpHL-CDDP, a lower perfusion of the anticancer agent to the renal tissue was observed (Junior et al., 2007). These findings indicate that the use of SpHL-CDDP as a drug delivery system may well improve the therapeutic efficacy of CDDP. Thus, in this work, we performed investigations related to the antitumoral efficacy of SpHL-CDDP in the Ehrlich solid tumor animal model. According to the data obtained (Figure 1), the encapsulation of CDDP into SpHL did not alter the antitumoral activity of the drug. In contrast, the control of the tumor volume through NSpHL-CDDP treatment was lower than that observed for free CDDP treatment. It is known that long-circulating carriers are able to increase the drug accumulation in tumors due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect. The EPR effect is a consequence of the formation of leaky capillaries around the tumor and a lack of a lymphatic system for the transport of drugs to the bloodstream (Gryparis et al., 2007). However, the therapeutic efficacy of a drug delivery system also involves the release of anticancer agents in the tumor site. From our findings, we can suggest that the lipidic composition of SpHL-CDDP seems to play a role in the antitumoral effect. First, it can be affirmed that the addition of DSPE-PEG₂₀₀₀ in the bilayer composition contributed to a longer circulation of SpHL-CDDP than of free CDDP in the bloodstream, as was demonstrated by $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ and V_{ss} values obtained from the pharmacokinetic study. In addition, the presence of DOPE in the liposome composition confers fusogenic properties to the

bilayers. In acidic medium, such as a tumor site, CHEMS undergoes protonation, resulting in the destabilization of bilayers and the release of CDDP, thus leading to the conclusion that liposome containing DOPE produce a much greater efficacy than those composed by DOPC. One advantage of SpHL-CDDP treatment over free CDDP treatment was the higher survival rate obtained. This finding most likely resulted from the toxicity of free CDDP treatment. Considering the limitation of increasing doses of free CDDP, mainly due to its toxicity, improvements in cancer therapy, through the use of SpHL-CDDP, will almost certainly be observed at high doses of this drug delivery system. Thus, future studies aimed at evaluating the *in vivo* antitumoral effect of SpHL-CDDP at high doses are already underway in our research group.

Conclusion

In conclusion, SpHL-CDDP treatment presented a higher antitumoral efficacy and lower toxicity when compared to NSpHL-CDDP and free CDDP treatments, respectively. These results justify further study of the *in vivo* antitumoral activity of SpHL-CDDP through the application of other dose schedules.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMIG, CNPq, and FINEP for their financial support. We also wish to thank Lipoid GmbH and Quiral Química do Brasil S. A. for providing materials.

References

Allen TM, Newman MS, Woodle MC, Mayhew E, Uster PS. Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International Journal of Cancer* 62, 199-204, 1995.

Carvalho Junior AD, Vieira FP, De Melo VJ, Lopes MTP, Silveira JN, Ramaldes GA, Garnier-Suillerot A, Pereira-Maia EC, De Oliveira MC. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Brazilian Journal of Medical and biological Research* 40, 1-9, 2007.

Gryparis EC, Hatziapostolou M, Papadimitriou E, Avgoustakis K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67, 1-8, 2007.

Junior AD, Mota LG, Nunan EA, Wainstein AJ, Leal AS, Cardoso VN, De Oliveira MC. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sciences* 80, 659-64, 2007.

Leal AS, Carvalho Junior AD, Abrantes FM, Menezes MA, Ferraz V, Cruz TS, Cardoso VN, de Oliveira MC. Production of the radioactive antitumoral cisplatin. *Applied radiation and Isotopes* 64, 178-81, 2006.

Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin

encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 43, 1–7, 1999.

Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 33, 9-23, 2007.

Steenberg PA, Storm G, de Groot G, Claessea A, Bergers JJ, Franken MAM, van Hoesel QGCM, Wubs KL, de Jong WH. Liposomes as drug carrier system for cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 21, 299–307, 1988.

Uchino H, Mmatsumura Y, Negishi T, Koizumi F, Hayashi T, Honda T, Nishiyama N, Kataoka K, Naito S, Kakizoe T. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *British Journal of Cancer* 93, 678-87, 2005.

Wang L, Liu J, Huang M, Xu N. Comparison of pharmacokinetics, efficacy and toxicity profile of gemcitabine using two different administration regimens in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Zhejiang University Science B* 8, 307-313, 2007.

Zamboni WC, Jung LL, Egorin MJ, Potter DM, Friedland DM, Belani CP, Agarwala SS, Wong MM, Fakih M, Trump DL, Jin R, Strychor S, Vozniak M, Troetschel M, Ramanathan RK. Phase I and pharmacologic study of intermittently administered 9-

nitrocamptothecin in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* 10, 5058-64, 2004.

Figure and table legends

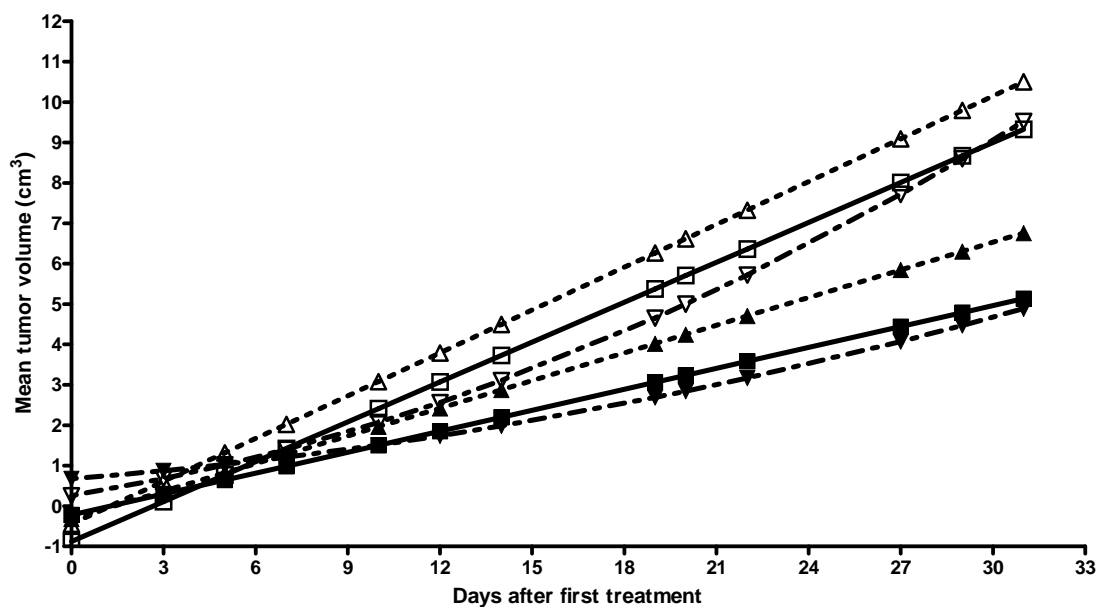


Figure 1 – Antitumor effect after intravenous administration of free CDDP (▼), SpHL-CDDP (■), or NSpHL-CDDP (▲) in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice . The dose of CDDP in each formulation was of 8 mg/kg. The following control groups were also administered: SpHL (□), NSpHL (Δ), or 0.9% (w/v) NaCl solution (▽). The values of tumor volume were calculated using the equations of linear regression analysis obtained for each treatment. The respective r^2 values of the curves of free CDDP, SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, SpHL, NSpHL, and 0.9 % (w/v) NaCl solution treatments are 97.85, 95.22, 95.98, 94.08, 94.46, and 95.98.

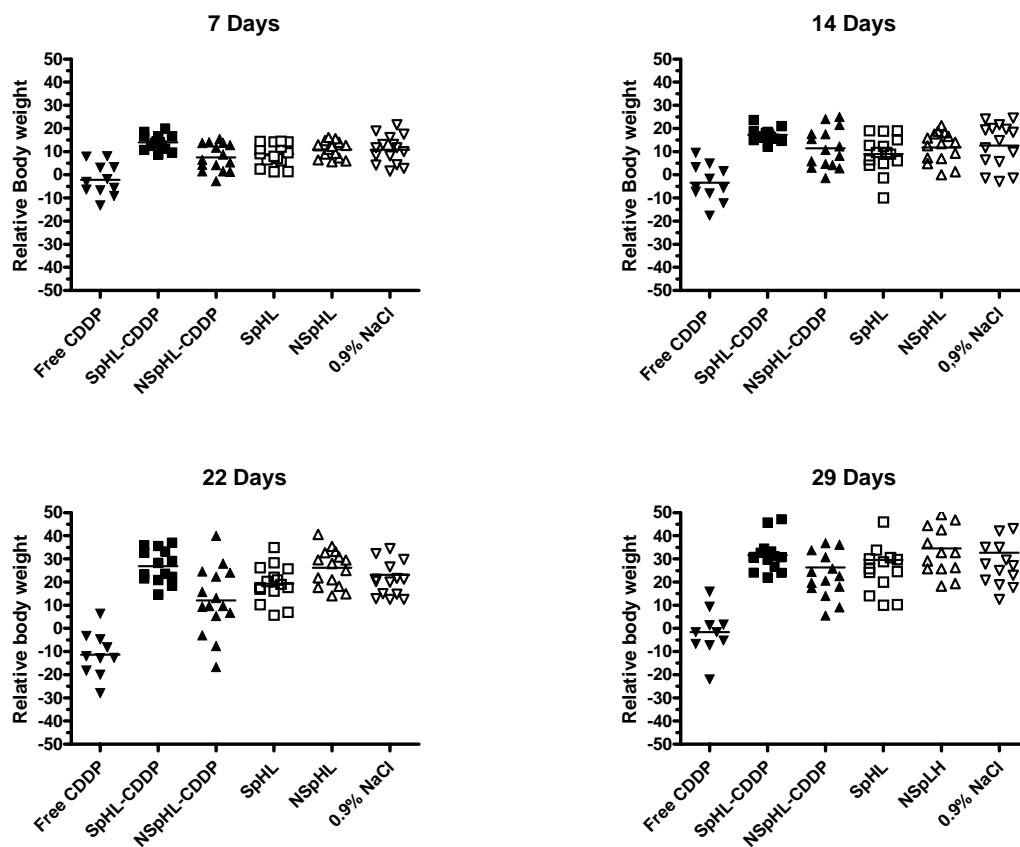


Figure 2 – Body weight changes in mice treated with free CDDP (▼), SpHL-CDDP (■), or NSpHL-CDDP (▲). The dose of CDDP in each formulation was of 8 mg/kg. The body weight of the following control groups was also evaluated: SpHL (□), NSpHL (△), or 0.9% (w/v) NaCl solution (Δ).

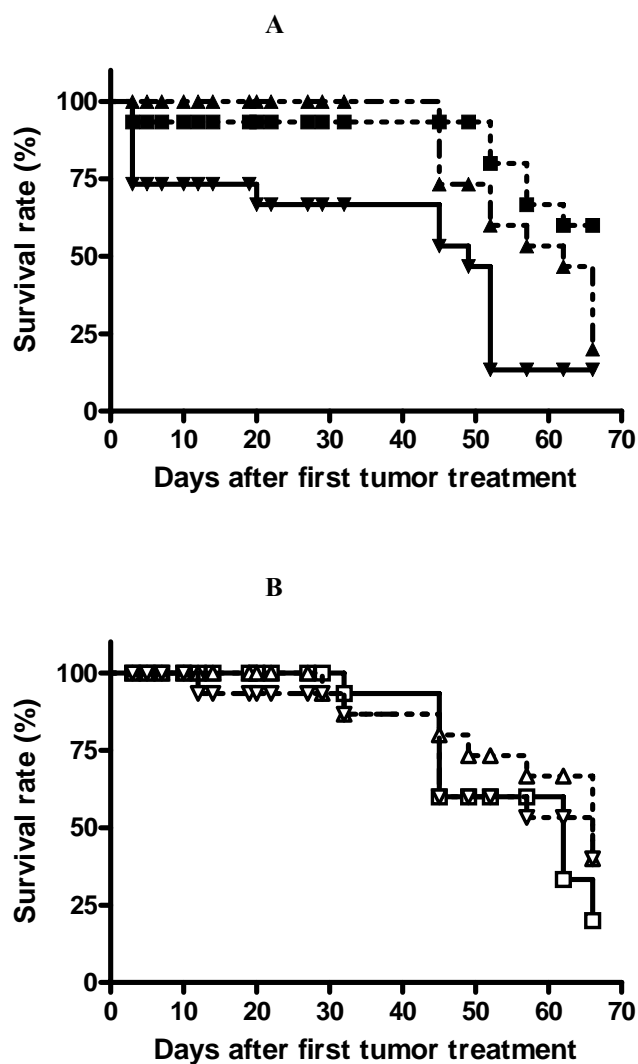
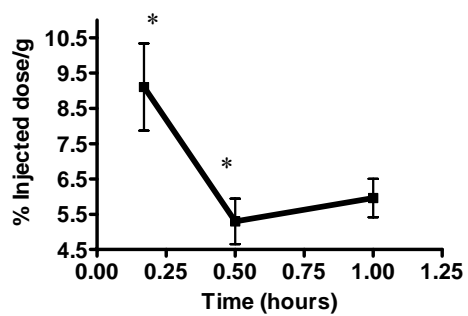
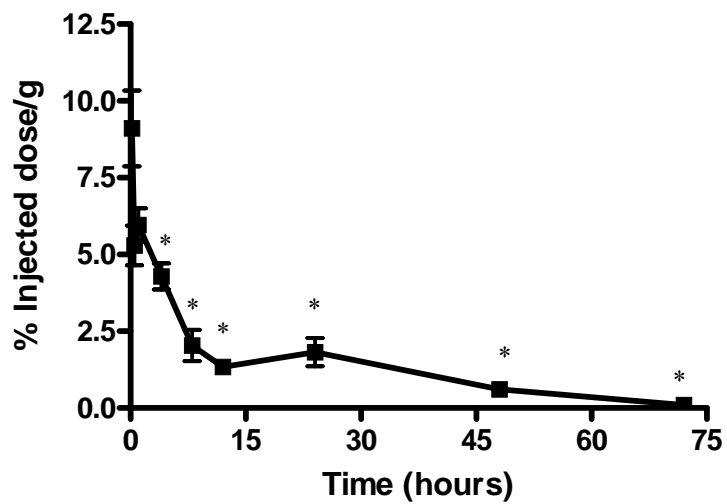


Figure 3 – Survival of Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice treated with free CDDP (A, ▼), SpHL-CDDP (A, ■), or NSpHL-CDDP (A, ▲). The dose of CDDP in each formulation was of 8 mg/kg. The survival of the following control groups was also evaluated: SpHL (B, □), NSpHL (B, Δ), or 0.9% (w/v) NaCl solution (B, ∇).



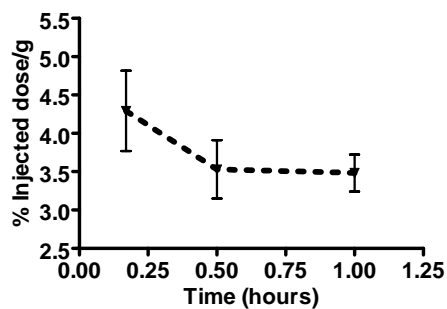
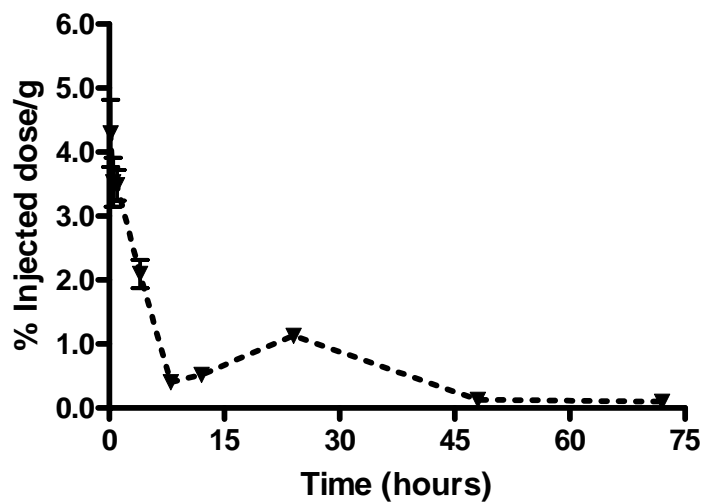


Figure 4 – Concentration-time profile of CDDP in blood after intravenous administration of SpHL-CDDP (A) or free CDDP (B) in Ehrlich solid tumor-bearing mice. Results are expressed as means \pm standard error. The insert indicates the tissue distribution profile up to 1 h. The asterisks indicate a statistically significant difference between free CDDP and SpHL-CDDP* treatments ($p < 0.05$).

Table 1 – Ehrlich tumor volume variation in Swiss mice following intravenous injection of free CDDP, SpHL-CDDP, or NSpHL-CDDP. The Scott-Knott test was used to compare the mean values of each treatment and different letters represent significant difference between them.

Treatment	Time (Days)													
	0	3	5	7	10	12	14	19	20	22	27	29	31	
Free CDDP	0.49 ^a	0.94 ^a	1.17 ^a	1.29 ^b	1.55 ^b	1.77 ^b	1.93 ^b	2.30 ^d	2.92 ^b	3.02 ^c	4.25 ^b	4.81 ^b	4.54 ^c	
SpHL-CDDP	0.44 ^a	0.60 ^a	0.74 ^a	0.91 ^b	1.20 ^b	1.40 ^b	1.69 ^b	2.47 ^d	3.21 ^b	3.55 ^c	4.52 ^b	5.40 ^b	5.38 ^c	
NSpHL-CDDP	0.46 ^a	0.60 ^a	1.02 ^a	1.15 ^b	1.41 ^b	2.00 ^a	2.33 ^b	3.50 ^c	4.26 ^a	4.34 ^c	6.38 ^a	7.03 ^a	6.72 ^b 10.85	
SpHL	0.42 ^a	0.75 ^a	1.03 ^a	1.33 ^b	1.83 ^a	2.06 ^a	3.12 ^a	4.19 ^b	5.16 ^a	5.99 ^b	8.69 ^a 10.30	8.67 ^a	a	
NSpHL	0.51 ^a	0.98 ^a	1.08 ^a	1.98 ^a	2.46 ^a	2.61 ^a	3.60 ^a	6.21 ^a	6.49 ^a	9.11 ^c	^a	8.99 ^a	9.39 ^b	
0,9% (w/v) NaCl	0.48 ^a	1.08 ^a	1.98 ^a	2.46 ^a	2.61 ^a	3.60 ^a	6.21 ^a	6.49 ^a	9.11 ^c	a	10.30	8.99 ^a	9.39 ^b	9.01 ^b

Table 2 – Pharmacokinetic parameters of free CDDP* or SpHL-CDDP* in the plasma of Swiss mice. The WinNonlin program was used for a non-compartmental model.

Parameter	Unit	Free CDDP*	SpHL-CDDP*
		Value	Value
C _{max}	µg/mL	6.76	17.15
T _{1/2λZ}	h	13.51	10.65
AUC _(0→t)	h.µg/mL	62.04	139.75
AUC _(0→∞)	h.µg/mL	64.70	141.51
V _Z	mL/kg	1807.91	651.60
Cl	mL/h/kg	92.73	42.40



Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice

Álvaro D.C. Júnior ^{a,b}, Luciene G. Mota ^a, Elzília A. Nunan ^a, Alberto J.A. Wainstein ^{c,d}, Ana Paula D.L. Wainstein ^{c,d}, Alexandre S. Leal ^e, Valbert N. Cardoso ^a, Mônica C. De Oliveira ^{a,□}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31279-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua da Glória, 187, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

^c Biocancer S.A., Av. Bernardo Monteiro, 890/904, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Serviço de Reator e Irradiações, Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear CDTN/Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN, Caixa Postal 941, 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received 19 July 2006; accepted 19 October 2006

Abstract

Multidrug resistance and drug toxicity represent major obstacles to cancer chemotherapy. Drug delivery systems, such as liposomes, offer improved chemical stability of encapsulated drugs, enhanced accumulation in tumors and decreased toxicity. The aim of this study was to evaluate the tissue distribution of stealth pH-sensitive liposomes containing cisplatin (SpHL-CDDP), compared with free cisplatin (CDDP), in solid Ehrlich tumor-bearing mice. After administering a 6 mg/kg single intravenous bolus injection of either free radiolabeled cisplatin or SpHL containing radiolabeled cisplatin, blood and tissues were analyzed for cisplatin content by determining radioactivity using an automatic scintillation apparatus. The area under the CDDP concentration–time curve (AUC) obtained for blood after SpHL-CDDP administration was 2.1 fold larger when compared with free CDDP treatment. The longer circulation of SpHL-CDDP led to a higher tumor AUC, and the determination of the ratio between AUC in each tissue and that in blood (Kp) showed a higher accumulation of CDDP in SpHL-CDDP administrated tumors. The SpHL-CDDP was also significantly uptaken by the liver and spleen. The distribution of SpHL-CDDP in these organs was extensive, revealing a high extravasation of CDDP to the tissues. The SpHL-CDDP kidney uptake was also greater than that of free CDDP; however, the Kp value found was lower. This indicates that the SpHL-CDDP led to a reduction of CDDP retention by renal tissue. Thus, these results indicate that the SpHL-CDDP may indeed be useful in alleviating renal damage induced by CDDP and thus represents a promising delivery system for cancer treatment through CDDP.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Stealth pH-sensitive liposomes; Cisplatin; Tissue distribution

Introduction

cis-Diamminedichloroplatinum (II) or cisplatin (CDDP) is one of the most effective chemotherapeutic agents used in the treatment of ovary, lung, testicle, head, and neck carcinoma (Kondagunta et al., 2005; Guillot et al., 1992; Le Chevalier et al., 1994; Shirazi et al., 1996; Muggia and Fojo, 2004).

However, its continuous use is limited due to its toxic effects, such as, myelotoxicity, neurotoxicity, and mainly, severe nephrotoxicity. Moreover, another restriction on the use of CDDP is the emergence of intrinsic and acquired resistance in many common tumor types (Hospers et al., 1988; Muggia and Los, 1993; Siddik, 2003; Wernyj and Morin, 2004). In order to circumvent these inconveniences, CDDP liposomal formulations have been developed. The plasma pharmacokinetics and tissue distribution of drugs encapsulated into liposomes is a characteristic that depends on the lipidic membrane, not the

□ Corresponding author. Tel.: +55 31 34996945; fax: +55 31 34996935.
E-mail address: monicacristina@ufmg.br (M.C. De Oliveira).

encapsulated content. This fact can allow for a reduction in or elimination of toxicity and an increase in therapeutic efficacy. Non-long-circulating liposomes composed of phosphatidylcholine/phosphatidylserine/cholesterol were evaluated by Steenberg et al. (1988) as CDDP carriers. This liposome formulation induced a lower incidence and severity of renal lesions on IgM immunocytoma-bearing LOU/M rats when compared to the free CDDP formulation. However, the antitumor activity of this liposomal CDDP was similar to that of the free CDDP and the encapsulation of CDDP into this liposome formulation was unable to overcome drug resistance. Sterically stabilized long-circulating liposomes have also been studied as CDDP delivery systems. Preclinical *in vivo* studies using C26 colon carcinoma and the Lewis lung tumor model showed positive results with the employment of liposomal CDDP constituted by hydrogenated soy phosphatidylcholine/methoxypolyethyleneglycoldistearoylphosphatidylethanolamine/cholesterol. These liposomes have a prolonged circulation time and an increased tumor platinum uptake. In addition, its antitumor effect is significantly improved when compared to free CDDP (Newman et al., 1999). However, phase I–II clinical studies were conducted and this formulation of liposomes containing CDDP was not efficacious. The lack of efficacy was attributed to low bioavailability and slow release kinetics, in such a way that the drug concentration fails to exceed the threshold for therapeutic effect (Bandak et al., 1999; Harrington et al., 2001). It thus becomes necessary to modify the lipid formulation to improve its efficacy. We have developed a new formulation of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP (SpHL-CDDP). These liposomes are composed of unsaturated phosphatidylethanolamine and take advantage of its fusogenic properties to reach the CDDP release into the cytosol. These liposomes proved to be effective against human lung cancer cell line (A459) and were able to circumvent the resistance through the use of CDDP resistant GLC4 cell line (De Oliveira et al., submitted manuscript, 2006). The present report describes and compares the tissue distribution of SpHL-CDDP and free CDDP after intravenous administration in Ehrlich solid tumor-bearing mice.

Materials and methods

Materials

CDDP was kindly supplied by Quiral Química do Brasil S.A. Distearoylphosphatidylethanolaminopolyethyleneglycol (DSPE-PEG) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) were supplied by Lipoid GmbH. Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) was purchased from the Sigma Chemical Company. Sodium chloride was purchased from Merck. All other chemicals and reagents used were of analytical grade. In addition, female Swiss mice were allowed free access to a standard laboratory pellet diet with water *ad libitum*.

Irradiation of CDDP

The CDDP was irradiated as described by Leal et al. (2005). A sample of CDDP (2.0 mg) was placed inside a cadmium capsule of 1 mm thickness. This was then irradiated into the TRIGA MARK I IPR R-1 reactor of the CDTN, applying an

average thermal and epithermal neutron flux of 6.4×10^{11} and 4.4×10^{10} neutrons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively, at 100 kW. The irradiation time was 8 h. After 8 h of irradiation, the radiolabeled CDDP (CDDP¹¹¹) was allowed to decay for 24 h.

Preparation of liposomes

Initially, chloroform aliquots of DOPE, CHEMS and DSPE-PEG2000 (lipid concentration 40 mM; molar ratio 5.7:3.8:0.5) were transferred to a round bottom flask and submitted to evaporation. The lipid film obtained was dissolved in ethyl ether and then added to the 2 mg/mL CDDP solution prepared in the 0.9% w/v NaCl solution. The ratio of aqueous and ether phases was equal to the 1:3, respectively. The resulting mixture was submitted to fast vortex agitation to produce a type water/oil emulsion. Next, ethyl ether was evaporated with the resulting formation of liposomes. These liposomes were submitted to a filtration through 0.4 μ , 0.2 μ , and 0.1 μ polycarbonate membranes (5 cycles for each). Finally, the unencapsulated CDDP was eliminated by ultracentrifugation (Ultracentrifuge SORVALL Ultra 80, USA) at $150,000 \times g$ at 10 °C for 80 min.

Liposome characterization

The liposomes were characterized by their encapsulation percentage, size, and zeta potential. The encapsulation percentage of CDDP into liposomes was determined by the quantification of gamma radiation in the supernatant, non-purified, and purified liposomes. The radioactivity was measured by an automatic scintillation apparatus covering an energy window of 50–150 keV (ANSR-Abbott, USA). Counting time was 4 min. The sample volume employed was in agreement with the optimum volume of the equipment (1.5 mL). The encapsulation percentage (EP) was calculated by means of the following equation: $EP = \frac{\text{CDDP}^{111} \text{ amount in purified liposomes}}{\text{total CDDP}^{111} \text{ in liposomes before purification}}$. The mean diameter of the liposomes containing CDDP was determined by the quasi-elastic light scattering, at 25 °C, and at an angle of 90°. The zeta potential was evaluated by the electrophoretic mobility determination at the angle of 90°. The size and zeta potential measurements were performed in triplicate using the 3000HS Zetasizer equipment (Malvern Instruments, England). The samples were diluted using a 0.9% w/v NaCl solution.

Ehrlich tumor model

Ehrlich tumors were grown in female Swiss mice. The mice were kept in an area maintained in a standardized light/dark cycle and had free access to food and water. The Ehrlich cell line was kindly supplied by Dr. Jorge Luiz Pesquero (Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil). Tumor cells were inoculated intraperitoneally into mice, and the tumors were collected after eight

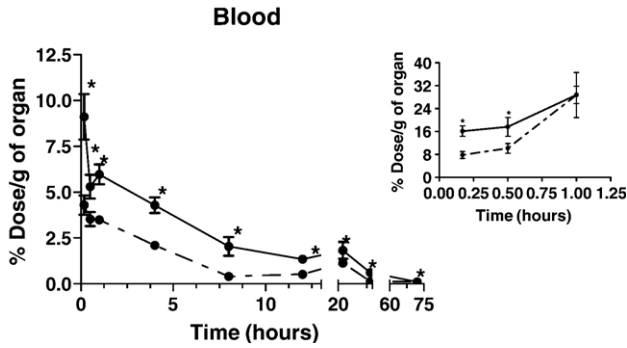


Fig. 1. Concentration–time profile of CDDP in blood after intravenous administration of free CDDP (.....) or SpHL (—) in solid Ehrlich tumor-bearing mice. Results are expressed as means \pm standard error. The insert indicates the tissue distribution profile up to 1 h. The asterisks indicate a statistically significant difference between free CDDP and SpHL treatments ($p < 0.05$).

days. A viable tumor cell suspension was then prepared at a density of 1.08×10^6 cells/mL. Tumor cells were transplanted subcutaneously in the right flank of 20–25 g female Swiss mice (School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil). Tumors were allowed to grow for 15 days until all inoculated mice had palpable tumors measuring approximately 9 to 10 mm. All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the Federal University of Minas Gerais and comply with the guide for the care and use of laboratory animals recommended by the Institute of Laboratory Animal Resources.

Biodistribution studies

The free CDDP or CDDP encapsulated into stealth pH-sensitive liposomes were injected intravenously into Ehrlich tumor-bearing Swiss mice ($n = 5$) at a dosage of 6 mg/kg. The liposomes were injected into mice immediately after their preparation. At the indicated times (10, 30, and 60 min and 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h), the mice were anesthetized with a mixture of xylazine (7.5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg). Blood was collected immediately from a cardiac puncture. Liver, spleen, kidneys, heart, and tumor were removed, washed with distilled water, dried with filter paper, and weighed. The radioactivity of the organs and blood was measured by an automatic scintillation apparatus covering an energy window of 50–150 keV (ANSR-Abbott, USA). Counting time was 4 min. A standard dosage containing the same injected amount was counted simultaneously in a separate tube, which was taken as 100% of radioactivity. The results were expressed as % injected dose/g of tissue. The data were statistically analyzed by ANOVA ($p < 0.05$). The tissue–blood partition coefficient (K_p) was determined by dividing the area under the tissue concentration–time curve by the area under the blood concentration–time curve.

Results

Liposome characterization

The entrapment percentage of CDDP into liposomes was equal to $26.3 \pm 1.1\%$. The mean diameter and zeta potential of

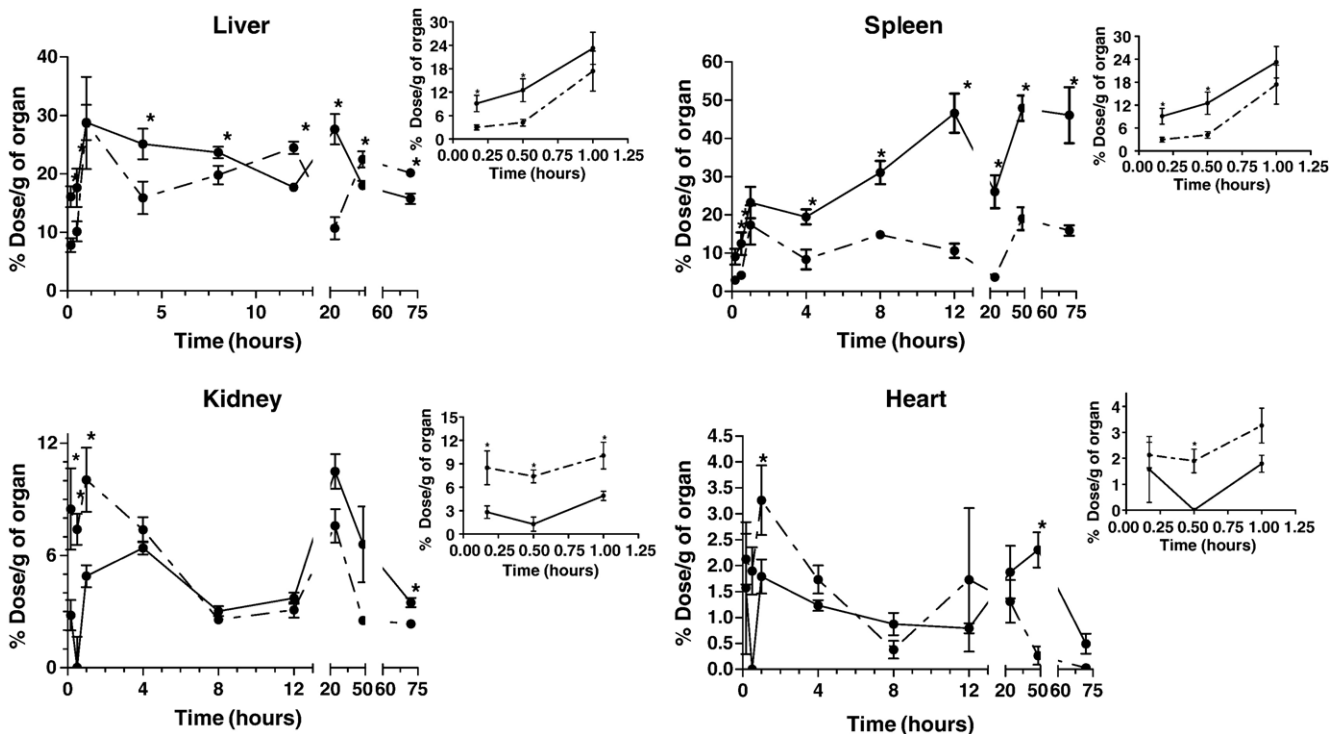


Fig. 2. Concentration–time profile of CDDP in tissues after intravenous administration of free CDDP (.....) or SpHL (—) in solid Ehrlich tumor-bearing mice. Results are expressed as means \pm standard error. The insert indicates the tissue distribution profile up to 1 h. The asterisks indicate a statistically significant difference between free CDDP and SpHL treatments ($p < 0.05$).

the vesicle dispersion was 110 nm and 0.6 mV, respectively, showing a good homogeneity (polydispersity index equal to 0.07). These data were obtained from three experiments.

Tissue distribution of CDDP formulations

After a single i.v. injection of SpHL-CDDP, the blood showed a higher CDDP uptake at 72 h than that after free CDDP administration. The area under the blood concentration versus time curve (AUC) was 2.1 fold higher following SpHL-CDDP treatment (96.6 and 45.8% dose/g h in SpHL-CDDP and free CDDP-treated animals, respectively) (Fig. 1). In the liver, the CDDP radioactivity peak was attained 1 h after injection for both free CDDP and SpHL-CDDP (Fig. 2). After 1 h, the CDDP levels decreased for the group treated with SpHL-CDDP, with a gradual elimination occurring over the experimental period. For the free CDDP-treated group, the CDDP uptake in liver presented a fluctuation during the entire experimental period. In the spleen, the maximum CDDP uptake was achieved after 12 h and 1 h after SpHL-CDDP and free CDDP administration, respectively. The maximum CDDP uptake found in SpHL-CDDP treatment was four times higher than that obtained after free CDDP injection. At 24 h, a reduction of the CDDP concentration for both treatments was observed, followed by an increase in CDDP at 48 and 72 h. In the kidney, the uptake of free CDDP up to 1 h was higher than the uptake observed after the administration of SpHL-CDDP. After SpHL-CDDP administration, the CDDP concentration reached its highest level at 1 h. However, after 4 h, a decline of renal CDDP concentration in SpHL-CDDP and free CDDP-treated mice could be observed. At 24 h, after free CDDP and SpHL-CDDP treatments, the drug concentration reached another peak, followed by a decline at later times. In the heart, the distribution profile was similar after SpHL-CDDP and free CDDP injections. The maximum uptake of CDDP occurred at 1 h for both treatments. The CDDP levels were equivalent at all interval times, except at 48 h, where the amount of CDDP was higher after SpHL-CDDP administration. In the tumor, the CDDP level attained a maximum peak at 24 h after SpHL-CDDP administration, showing a drug concentration of approximately two fold higher than that after free CDDP

Table 1

Tissue–blood partition coefficient (K_p)[□] for different tissues of female mice after intravenous injection of free CDDP (A) or SpHL (B)

Tissue	K_p (A)	K_p (B)	K_p (B)/ K_p (A)
Liver	29.72	15.59	0.52
Kidney	6.73	4.79	0.71
Spleen	20.11	28.83	1.43
Heart	1.28	1.16	0.91
Tumor	1.23	1.51	1.23

[□] K_p calculated from AUC_{0-72} tissue-to-blood ratio.

administration (Fig. 3). Tumor CDDP levels following free CDDP treatment were lower than the drug concentration reached with SpHL-CDDP treatment. The tumor AUC for SpHL-CDDP treatment was 2.6 fold higher than that after free CDDP administration (145.7 and 56.3% dose/g h, respectively). The tissue–blood partition coefficients for free CDDP and SpHL-CDDP treatments are shown in Table 1. The CDDP showed a high perfusion into the tissues after both free CDDP and SpHL-CDDP administration. However, higher levels of extensive tissue distribution were found for free CDDP treatment. The K_p values for the liver and kidney were, respectively, 2.7 and 1.7 times higher than the SpHL-CDDP treatment, indicating that free CDDP treatment leads to a higher drug accumulation in these tissues. The CDDP retention in the heart was lower for both treatments, which is reflected by their low K_p when compared with other organs. The CDDP accumulation at tumor sites was higher for SpHL-CDDP treatment than for free CDDP treatment. In the case of free CDDP treatment, the K_p value was equal to the unit, indicating that uptake is not extensive and that CDDP concentration at tumor sites is a reflection of blood concentration. The K_p ratio (K_p for SpHL-CDDP/ K_p for free CDDP) showed a higher CDDP retention in the spleen and tumor for the SpHL-CDDP-treated mice.

Discussion

It has been demonstrated that the liposomes are drug delivery systems which are able to modify tissue distribution, metabolism, and in vivo elimination as well as reduce the toxicity of free drugs (Harrington et al., 2000a,b; Ferrari, 2005). In addition, in cancer chemotherapy, the liposomes can take advantage of the overexpression of fenestrations in the neovasculature to increase drug concentration at tumor sites (Ferrari, 2005). In this work, we investigated the tissue distribution of a novel liposomal formulation of CDDP containing DOPE, CHEMS, and DSPE-PEG in its composition, known as stealth pH-sensitive liposomes. These kinds of liposomes are in and of themselves a targeting strategy for cancer therapy. The pH at tumor sites is low, in contrast to that of healthy tissues, and thus the employment of stealth pH-sensitive liposomes as a CDDP carrier, can favor its preferential release in this region. In an acidic medium, the CHEMS undergoes protonation, whereas the liposomes collapse into a non-bilayer structure, thereby leading to its disruption and subsequent release of CDDP. Thus, these liposomes can be an alternative used to enhance the bioavailability and the efficacy

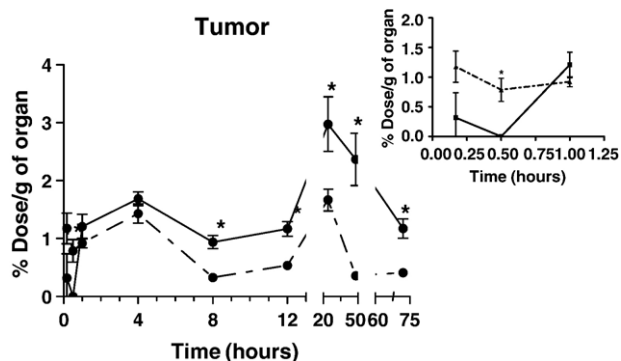


Fig. 3. Concentration–time profile of CDDP in tumor after intravenous administration of free CDDP (•••••) or SpHL (—) in solid Ehrlich tumor-bearing mice. Results are expressed as means \pm standard error. The insert indicates the tissue distribution profile up to 1 hour. The asterisks indicate a statistically significant difference between free CDDP and SpHL treatments ($p < 0.05$).

of that pegylated liposomal CDDP studied by Harrington et al. (2001). In the present study, the CDDP level in the bloodstream, following SpHL-CDDP treatment, was several times higher than that achieved with free CDDP, as reflected by differences in blood AUC. The SpHL-CDDP were also removed by the organs of the mononuclear phagocytic system as occurred in the long-circulating pegylated liposomes (SPI-077) evaluated by Newman et al. (1999). The spleen was responsible for a higher clearance and showed a high tissue–blood partition ratio. This indicates that SpHL-CDDP has an affinity toward the spleen, causing the extravasation of CDDP to this tissue. The high concentration of CDDP obtained by the liver, following SpHL-CDDP administration, is also the result of an extensive uptake, which is a reflection of its high K_p value. Free CDDP was also mainly cleared from blood to spleen and liver. This finding can be explained by the metabolic function of these organs and by the high affinity binding of CDDP to proteins in tissues and blood (McIntosh et al., 1997). The high K_p values in the spleen and the liver show the high CDDP uptake by these organs. Native cisplatin interacts with plasma proteins, particularly albumin, and the complex obtained may explain the high uptake of CDDP by the liver and the spleen within 1 h, followed by a slower uptake from 1 to 4 h. In contrast, the SpHL-CDDP uptake by the liver remained high until 8 h. The reduction of the SpHL-CDDP uptake by the liver and the spleen at 12 h and 4 h, respectively, may be due to the saturation of the mononuclear phagocytic system. After these time periods, an additional uptake of SpHL-CDDP by the liver occurred, followed by its slow elimination over the entire experiment time period. These results are similar to the studies of Wang et al. (2003). Kidney tissue, the major site of toxicity for CDDP, presented a high CDDP concentration at 1 h and again at 24 h after SpHL-CDDP administration. This increase at 24 h may be the result of the degradation of liposomes in the liver and the spleen, releasing CDDP and/or related species from cells into the blood followed via renal elimination. The SpHL-CDDP treatment led to a higher AUC in the kidney than did free CDDP treatment. However, the tissue–blood partition ratio found for free CDDP was higher, revealing a great partitioning of CDDP between renal tissue and vascular space. This renal accumulation may lead to a severe toxicological effect. Thus, the SpHL-CDDP treatment contributed to the reduction of the extravasation of CDDP to renal tissue, and most likely, to alleviate kidney damage. In the heart, the distribution profile is similar after both free CDDP and SpHL-CDDP injections during investigated time intervals. Although, the heart AUC for SpHL-CDDP group was higher than that for the free CDDP group, the level of extravasation to the tissue is similar for both treatments. The longer retention of SpHL-CDDP than free CDDP in the bloodstream, as demonstrated by blood AUC measurements, led to a higher CDDP concentration in the tumor after SpHL-CDDP administration. The K_p value for SpHL-CDDP treatment is greater than the unit, indicating that the tissue distribution is extensive. Moreover, the $K_p\text{SpHL}/K_p\text{free CDDP}$ ratio showed that the CDDP affinity toward tumor tissues from SpHL-CDDP treatment was 23.0% higher when compared with that for free CDDP. Thus, this higher retention of CDDP by the tumor and

the higher AUC obtained through SpHL-CDDP treatment may lead to a high CDDP concentration in this tissue, and consequently, to an enhanced antitumoral efficacy.

Conclusion

In conclusion, the SpHL-CDDP administration in the solid Ehrlich tumor-bearing mice model showed that this delivery system can be an interesting strategy to improve the bioavailability of the CDDP in the tumor. Furthermore, the lower retention of SpHL-CDDP by the kidney indicates the potential of this carrier to decrease the CDDP toxicity. These results point toward a product that could be more effective, opening up the possibility of applying higher dosages as it is more tolerable and may prove to be useful for patients who have difficulty dealing with the toxicity of free CDDP.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMIG, CNPq, and FINEP for their financial support. We also wish to thank Lipoid GmbH and Quiral Química do Brasil S.A. for providing materials. A.D.C. Jr wishes to thank CAPES for his grant.

References

- Bandak, S., Horowitz, D., Horowitz, A., Tzemach, D., Gabizon, A., 1999. Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models. *Anticancer Drugs* 10, 911–920.
- Ferrari, M., 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 5, 161–171.
- Guillot, T., Spielmann, M., Kac, J., Luboinski, B., Tellez-Bernal, E., Munck, J.N., Bachouchi, M., Armand, J.P., Cvitkovic, E., 1992. Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 102, 311–319.
- Harrington, K.J., Lewanski, C.R., Stewart, J.S.W., 2000a. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 1: preclinical development. *Clinical Oncology* 12, 2–15.
- Harrington, K.J., Lewanski, C.R., Stewart, J.S.W., 2000b. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: clinical development. *Clinical Oncology* 12, 16–24.
- Harrington, K.J., Lewanski, C.R., Northcote, A.D., Whittaker, J., Wellbank, H., Vile, R.G., Peters, A.M., Stewart, J.S.W., 2001. Phase I–II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077™) in patients with inoperable head and neck cancer. *Annals of Oncology* 12, 493–496.
- Hospers, G.A., Mulder, N.H., de Jong, B., de Ley, L., Uges, D.R., Fichtinger-Schepman, A.M., Scheper, R.J., de Vries, E.G., 1988. Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in vitro. *Cancer Research* 48, 6803–6807.
- Kondagunta, G.V., Bacik, J., Donadio, A., Bajorin, D., Marion, S., Sheinfeld, J., Bosl, G.J., Motzer, R.J., 2005. Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology* 23, 6549–6555.
- Le Chevalier, T., Brisgand, D., Douillard, J.Y., 1994. Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *Journal of Clinical Oncology* 12,360–367.

- Leal, A.S., Carvalho Júnior, A.D., Abrantes, F.M., Menezes, M.A.B.C., Ferraz, V., Cruz, T.S., Cardoso, V.N., De Oliveira, M.C., 2005. Production of the radio- active antitumoral cisplatin. *Applied Radiation and Isotopes* 64, 178–181.
- McIntosh, D.P., Cooke, R.J., McLachlan, A.J., Daley-Yates, P.T., Rowland, M., 1997. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin and conjugates of platinum with carboxymethyl dextran and A5B7 monoclonal antibody in CD1 mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 1478–1483.
- Muggia, F.M., Fojo, T., 2004. Platinums: extending their therapeutic spectrum. *Journal of Chemotherapy* 16, 77–82.
- Muggia, F.M., Los, G., 1993. Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications. *Stem Cells* 11, 182–193.
- Newman, M.S., Colbern, G.T., Working, P.K., Engbers, C., Amantea, M.A., 1999. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 43, 1–7.
- Shirazi, F.H., Molepo, J.M., Stewart, D.J., Raaphorst, G.P., Goel, R., 1996. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140, 211–218.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279.
- Steenberg, P.A., Storm, G., de Groot, G., Claessea, A., Bergers, J.J., Franken, M.A.M., van Hoesel, Q.G.C.M., Wubs, K.L., de Jong, W.H., 1988. Liposomes as drug carrier system for cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 21, 299–307.
- Wang, S., Mi, J-B., Li, Y-Z., Chang, W-B., Ci, Y-X., 2003. Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 589–592.
- Wernyj, R.P., Morin, P.J., 2004. Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. *Drug Resist Updates* 7, 227–232.

Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes

A.D. Carvalho Júnior¹,
F.P. Vieira¹, V.J. De Melo³,
M.T.P. Lopes³, J.N. Silveira²,
G.A. Ramaldes¹,
A. Garnier-Suillerot⁵,
E.C. Pereira-Maia⁴
and M.C. De Oliveira¹

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos,
²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas,
Faculdade de Farmácia,
³Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas,
⁴Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
⁵Laboratoire BioMoCeTi UMR 7033, Université Paris 13, Paris, France

Abstract

We encapsulated cisplatin into stealth pH-sensitive liposomes and studied their stability, cytotoxicity and accumulation in a human small-cell lung carcinoma cell line (GLC4) and its resistant subline (GLC4/CDDP). Since reduced cellular drug accumulation has been shown to be the main mechanism responsible for resistance in the GLC4/CDDP subline, we evaluated the ability of this new delivery system to improve cellular uptake. The liposomes were composed of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), cholesteryl hemisuccinate (CHEMS), and distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) and were characterized by determining the encapsulation percentage as a function of lipid concentration. Among the different formulations, DOPE/CHEMS/DSPE-PEG liposomes (lipid concentration equal to 40 mM) encapsulated cisplatin more efficiently than other concentrations of liposomes (about 20.0%, mean diameter of 174 nm). These liposomes presented good stability in mouse plasma which was obtained using a 0.24-M EDTA solution (70% cisplatin was retained inside the liposomes after 30 min of incubation). Concerning cytotoxic effects, they are more effective (1.34-fold) than free cisplatin for growth inhibition of the human lung cancer cell line A459. The study of cytotoxicity to GLC4 and GLC4/CDDP cell lines showed similar IC₅₀ values (approximately 1.4 μM), i.e., cisplatin-resistant cells were sensitive to this cisplatin formulation. Platinum accumulation in both sensitive and resistant cell lines followed the same pattern, i.e., approximately the same intracellular platinum concentration (4.0 x 10⁻¹¹ mol/cell) yielded the same cytotoxic effect. These results indicate that long-circulating pH-sensitive liposomes, also termed as stealth pH-sensitive liposomes, may present a promising delivery system for cisplatin-based cancer treatment. This liposome system proved to be able to circumvent the cisplatin resistance, whereas it was not observed when using non-long-circulating liposomes composed of phosphatidylcholine, phosphatidylserine, and cholesterol.

Correspondence

M.C. De Oliveira
Departamento de Produtos
Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia
UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627
31270-901 Belo Horizonte, MG
Brasil
Fax: +55-31-3499-6935
E-mail: moniacristina@ufmg.br

Research supported by FAPEMIG and
CNPq. A.D. Carvalho Júnior was the
recipient of a CAPES fellowship.

Received April 10, 2006

Accepted March 26, 2007

Key words

- Cisplatin
- Liposomes
- Encapsulation
- Cytotoxicity
- Human lung cancer cell line A459
- Human cervix squamous carcinoma cell line A431
- Baby Hamster Kidney cell line (BHK-21)
- GLC4 cell line
- GLC4/CDDP cell subline

Introduction

cis-Diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) or cisplatin is one of the most effective chemotherapeutic agents used for the treatment of ovary, lung, testicle, head, and neck carcinoma (1-5). However, its use presents some inconveniences, such as development of resistance in human ovarian cell line A2780, cervical cancer cell line ME180 and colon carcinoma cell line LoVo; side effects, principally nephrotoxicity, and chemical incompatibility with other drugs used simultaneously in polychemotherapy, such as etoposide and thiotepa (6,7). The appearance of resistance during therapy is an important limitation to the use of CDDP, leading to treatment failure (8-11). The use of higher doses of CDDP is not desirable due to the toxicity of the drug to multiple organs, such as damage to the kidneys and bone marrow, intractable vomiting, peripheral neuropathy, deafness, seizures, and blindness (12-14). The reasons for resistance to cisplatin have been reported to be multifactorial. Four main events accompany it in most cases: i) decreased accumulation of drug concentration (to below that necessary for cytotoxic activity), ii) increased levels of sulfur-containing molecules such as glutathione or metallothionein (which could play a role in metal detoxification), iii) enhanced repair of DNA damage caused by CDDP-DNA adducts by nucleotide excision repair proteins such as ERCC1, XPA, and XPB which can remove DNA adducts produced by CDDP, and iv) increased tolerance to CDDP-DNA adducts as a consequence of deficiencies in the mismatch repair system and enhanced replication bypass (15-18). Among the various resistance mechanisms involved, decreased cellular accumulation of CDDP has been demonstrated in most cases (19-24). Reduced intracellular CDDP concentration results in decreased DNA platination, which leads to CDDP resistance. The mechanism by which CDDP enters cells

is not known. It has been postulated that cellular uptake of CDDP occurs by passive diffusion; however, some reports support a protein-mediated transport (21,24-26).

Thus, the employment of new delivery systems of CDDP such as stealth pH-sensitive liposomes can be a strategy to overcome these limitations. The encapsulation of CDDP into pH-sensitive liposomes can improve its entry into cells, can lead to another pharmacokinetics profile, reducing or eliminating the side effects, and can allow the association with other drugs without the appearance of degradation products. These liposomes are generally taken up by the cells through an endocytosis process. The release of CDDP into the cytoplasm results from the ability of these liposomes to cross the endosomal membrane. Inside endosomes, the stealth pH-sensitive liposomes are exposed to an acidic medium, pH 5.5-6.5, which provokes their fusion with and the destabilization of the endosome membrane. Then, the encapsulated content is delivered into the cytoplasm (27,28). Therefore, in the present study, we investigated the encapsulation of CDDP into stealth pH-sensitive liposomes, the cytotoxic activity of the preparation, and its ability to circumvent CDDP resistance using A549, A431, BHK-21, and GLC4, GLC4/CDDP cell lines, respectively.

Material and Methods

Material

Cisplatin was supplied by Quiral Química do Brasil S.A. (Juiz de Fora, MG, Brazil). Distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol (DSPE-PEG) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) were supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and sodium chloride was purchased from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Preparation of liposomes

Initially, DOPE, CHEMS, and DSPE-PEG₂₀₀₀ were dissolved in chloroform (lipid concentration 20, 30, and 40 mM; molar ratio 5.7:3.8:0.5) and were transferred to a round bottom flask and submitted to evaporation. The lipid film obtained was dissolved in ethyl ether and then added to the 2 mg/mL CDDP solution prepared in 0.9% NaCl. The ratio of the aqueous to ether phase was 1:3. The resulting mixture was submitted to fast vortex agitation to produce a type of water/oil emulsion. Next, ethyl ether was evaporated, with the resulting formation of liposomes. These liposomes were submitted or not to filtration through 0.4- μ m and 0.2- μ m polycarbonate membranes (5 cycles each) and the unencapsulated CDDP was eliminated by ultracentrifugation with a Sorvall Ultra 80 ultracentrifuge (Albertville, MN, USA) at 150,000 *g* at 10°C for 60 min.

Characterization of liposomes

The liposomes were characterized on the basis of their encapsulation percentage, size and zeta potential. The encapsulation percentage of CDDP into liposomes was determined by high-performance liquid chromatography. The chromatographic apparatus consisted of a Model 515 pump (Waters Instruments, Milford, MA, USA), a Model 717 Plus auto-injector (Waters Instruments) and a Model 2487 variable wavelength UV detector (Waters Instruments) connected to the Millennium software. Separations were done using Lichrospher[®] 100 NH₂ guard column, 4 x 4 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Germany) connected to a 25 cm x 4 mm Lichrospher[®] 100 NH₂ column, 10- μ m particles (Merck). The eluent system was composed of methanol/ethyl acetate/*N,N*-dimethylformamide/water, 4:4:1:1, and the flow rate was 1.0 mL/min. Samples (20 μ L) were injected and the eluate absorbance was monitored at 310 nm. The amount of CDDP was

determined in the stock solution employed for the preparation of liposomes and in the supernatant. The encapsulation percentage (EP) was calculated as:

$$EP = \frac{[\text{CDDP}]_{\text{liposomes before ultracentrifugation}} - [\text{CDDP}]_{\text{supernatant}} \times 100}{[\text{CDDP}]_{\text{liposomes before ultracentrifugation}}}$$

The loading capacity was assessed by measuring inorganic phosphorus (29). The mean diameter of the liposomes-containing CDDP was determined by the quasi-elastic light scattering, at 25°C and at an angle of 90°. The zeta potential was evaluated by the determination of electrophoretic mobility at the 90° angle. The measurements were performed in triplicate using the 3000 HS Zetasizer equipment (Malvern Instruments, Worcestershire, England). The samples were diluted with a 0.9% NaCl.

Liposome stability

Stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP were diluted 10-fold in 0.9% NaCl, pH 6.5, or mouse plasma, pH 7.4, and incubated at 37°C for 30 min. The platinum released from liposomes containing CDDP was separated and determined by ultracentrifugation at 150,000 *g*, 10°C, for 60 min followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (Springvale, Victoria, Australia).

Cytotoxicity assay

The human lung cancer cell line A459 and human cervix squamous carcinoma cell line A431 were cultured in modified DEMEN medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The Baby Hamster Kidney cell line (BHK-21) was grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All cell lines were maintained at 36.5°C in a humidified 2.5% CO₂ atmosphere. An aliquot containing 4 x 10³ BHK

cells, 5×10^3 A549 or A431 cells was distributed in 96-well plates. After 24 h of growth, the cells were submitted to treatment with free CDDP, stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP and empty stealth pH-sensitive liposomes. The CDDP concentration employed was 79.4 nM, 3.7 and 0.46 μ M for the A431, A549 and BHK cells, respectively. These concentrations correspond to the IC_{50} of CDDP for each cell line. The treatment was performed on three consecutive days, with a change of the culture medium for each new treatment. Seventy-two hours after the initial treatment, cell viability was assessed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. First, 10 μ L of a 5-mg/mL tetrazolium salt solution was added to each well of the plate. After 4 h, MTT crystals were solubilized in 150 μ L dimethylsulfoxide. Absorbance readings were performed at 600 nm using a Stat Fax 2100 spectrophotometer (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA). Data were analyzed by two-way ANOVA and the means were compared by applying the Bonferroni test ($P \leq 0.05$) using the GraphPad Prism, version 4.0, software.

Evaluation of resistance of cisplatin

The GLC4 cell line was derived from the pleural effusion of a patient with small cell lung carcinoma in the laboratories of Prof. E.G.E. de Vries (Department of Internal Medicine, University Hospital, Groningen, The Netherlands). The GLC4/CDDP subline was obtained by continuous exposure to CDDP. The cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cultures were initiated at 10^5 cells/mL and grew exponentially to about 10^6 cells/mL within three days. Cell viability was checked by Trypan blue exclusion. The number of cells was determined by Coulter counter analysis. For the long-term growth

inhibition 1×10^5 cells/mL were cultured for 72 h in the presence and absence of different concentrations of CDDP encapsulated or not into stealth pH-sensitive liposomes. The sensitivity to the drug was evaluated by the IC_{50} , i.e., the drug concentration needed to inhibit cell growth by 50%. A resistance factor (RF) was obtained by dividing the IC_{50} of resistant cells by the IC_{50} of sensitive cells. RF is equal to 6.3 for CDDP and CDDP resistance is stable for at least 8 months (24).

Determination of cellular platinum concentrations

Cells were incubated with different concentrations of CDDP or CDDP containing stealth pH-sensitive liposomes for 3 days. After incubation, an aliquot was taken and washed twice with ice-cold PBS and the pellet was resuspended in 65% HNO_3 . Platinum concentration was determined by atomic absorption spectroscopy using a Varian model Zeeman 220 spectrophotometer (Mulgrave, Victoria, Australia) equipped with a graphite tube atomizer and an autosampler.

Results and Discussion

Preparation of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP

Formulation studies showed that the encapsulation of CDDP was significantly improved by increasing the amount of lipids used. Percent CDDP entrapment ranged from 6.6 to 18.6% depending on the lipid concentration (Table 1). The loading capacity of liposomes also increased when the lipid concentration varied only from 30 to 40 mM (Table 1). However, these liposomes showed a heterogeneous size distribution (444.5 nm, polydispersity index equal to 0.6) that could induce the destabilization of the vesicles, provoking the release of CDDP. Thus, these liposomes were submitted to extrusion

against 0.4- and 0.2- μ m polycarbonate membranes before purification by ultracentrifugation. However, the size reduction did not alter the entrapment percentage (20.0%), but produced a vesicle suspension of homogeneous diameter (174 nm, polydispersity index equal to 0.03) and a zeta potential equal to 1.6 mV. The liposomes containing the largest amount of CDDP were chosen for the evaluation of cytotoxicity and resistance.

Liposome stability

Stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP showed good stability in protein-rich medium such as mouse plasma. Approximately 70% CDDP remained inside the liposomes after their incubation in this medium. The leakage of CDDP from the liposomes exposed to 0.9% NaCl was similar, with no significant difference ($P < 0.05$). Probably, the release of CDDP from liposomes was due to heating (37°C) and not to the destabilization provoked by interactions with plasma proteins.

Cytotoxicity

Figure 1 illustrates the cytotoxic effects of CDDP encapsulated or not into stealth pH-sensitive liposomes on normal and tumor cell lines. The cytotoxic activity of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP was higher than that of free CDDP against the A549 cell line ($P < 0.05$). However, these liposomes did not prove to be more effective against the A431 cell line. Cell growth inhibition was lower with the encapsulation of CDDP into stealth pH-sensitive liposomes. The same effect was observed for the GLC4 cell line (Table 2). The cellular sensitivity to CDDP encapsulated into stealth pH-sensitive liposomes was lower than for free CDDP, as revealed by the determination of the IC_{50} . These findings suggest that the cytotoxic activity of these liposomes containing CDDP is dependent on the cell line type. Statistical

analysis indicated the influence of cell type on the response to treatment with free CDDP or with stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP. The A459 cells showed higher sensitivity to treatment with stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP than A431 cells ($P = 0.0006$). Perhaps, the cell line-associated differences in the efficacy of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP are related to the uptake mechanisms

Table 1. Effect of lipid concentration on the encapsulation of CDDP into stealth pH-sensitive liposomes.

Lipid concentration during preparation of liposomes	Entrapment (%)	Loading capacity (mg CDDP/nmol lipid)
20 mM	6.95 \pm 0.32	10.96 \pm 0.35
30 mM	8.80 \pm 0.29	10.20 \pm 0.92
40 mM	18.60 \pm 1.26	14.32 \pm 0.81

Data are reported as means \pm SD for three determinations. CDDP = cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin).

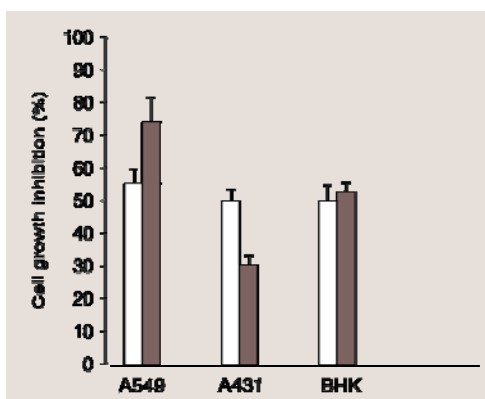


Figure 1. Cytotoxic activity of free CDDP (open bars) and of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP (filled bars). Data are reported as means \pm SD and were obtained from six experiments. CDDP = cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin); A549 = human lung cancer cell line; A431 = human cervix squamous carcinoma cell line; BHK-21 = Baby Hamster Kidney cell line.

Table 2. IC_{50} , resistance factor (RF) and intracellular platinum concentrations after 3 days of incubation with CDDP or liposomal CDDP.

Compound	Cell line	IC_{50} (μ M)	RF	$[Pt]_i \times 10^{17}$ (mol/cell)
CDDP	GLC4	0.40 \pm 0.05		9.8
CDDP	GLC4/CDDP	2.50 \pm 0.20	6.3	10.7
Liposomal CDDP	GLC4	1.32 \pm 0.10		4.0
Liposomal CDDP	GLC4/CDDP	1.45 \pm 0.15	1.1	4.0

IC_{50} is the CDDP concentration required to inhibit cell growth by 50%. The resistance factor (RF) is the IC_{50} of the resistant cells divided by the IC_{50} of the sensitive cells. $[Pt]_i$ is the intracellular platinum concentration. Data are reported as the mean \pm SD of triplicate determinations. CDDP = cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin).

involved in each cell line. Lim et al. (30) demonstrated different levels of liposomal mitoxantrone accumulation in LS180 human colon carcinoma tumors compared to

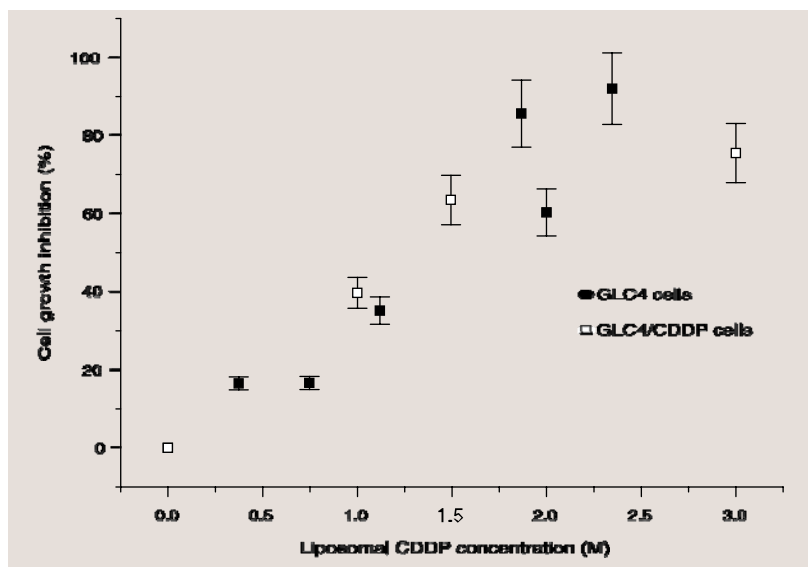


Figure 2. Dose-response curves of GLC4 and GLC4/CDDP cells for stealth pH-sensitive liposomes of CDDP obtained after 3 days of incubation. Data are reported as means \pm SD for three experiments. GLC4 = human small-cell lung carcinoma cell line; CDDP = cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin).

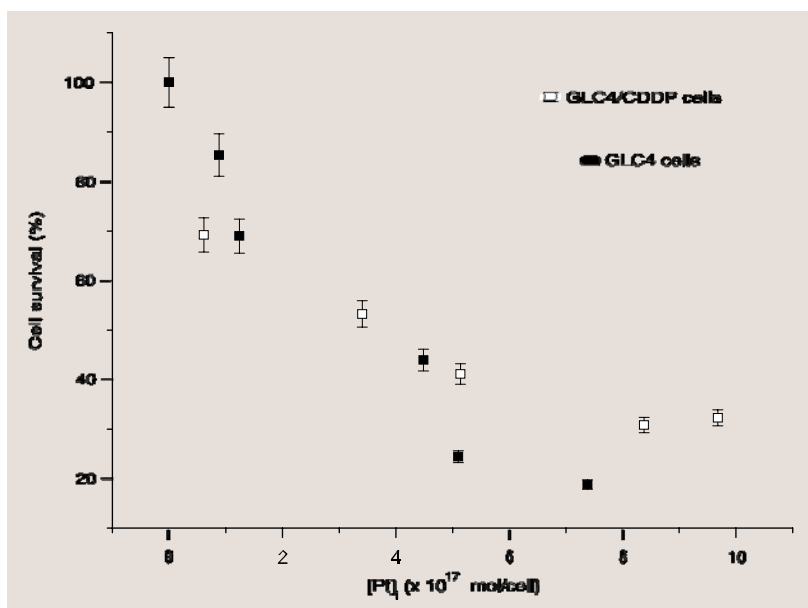


Figure 3. Cell survival as a function of intracellular platinum concentration after equitoxic drug exposure for 3 days. Data are reported as means \pm SD for three independent experiments. GLC4 = human small-cell lung carcinoma cell line; CDDP = cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin).

A431 tumors. This finding has been attributed to the more rapid liposome uptake in the LS180 cell line. The cytotoxicity of free or liposome-encapsulated CDDP on the BHK cell line was identical. This cell line was chosen for the assay due to the renal toxicity induced by the use of CDDP. In spite of this finding, it should be pointed out that the biodistribution behavior of the free drug and of the drug encapsulated into nanostructured systems is not the same. Júnior et al. (31) and Newman et al. (32) obtained different pharmacokinetics profiles from administration of liposomal formulations containing CDDP in comparison with free CDDP. In both studies, a lower renal accumulation of CDDP from liposomal CDDP treatment was observed than that from free CDDP. Thus, the *in vivo* toxicologic response to stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP can be modified, avoiding the occurrence of kidney failure. No cell growth inhibition was observed with empty stealth pH-sensitive liposomes.

Drug sensitivity

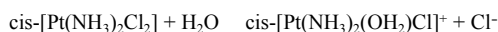
The effect of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP on the growth of the GLC4 and GLC4/CDDP cell lines is shown in Figure 2. One can observe that the response of both cell lines to a given dose of this new cisplatin formulation was comparable. Table 2 shows the drug concentration that inhibits cell growth by 50% and the RF obtained. For the sake of comparison, CDDP data are also shown. Intriguingly, the cytotoxic activity of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP on the sensitive cell line was inferior to that of free CDDP. This fact is probably related to different uptake mechanisms of the free and the encapsulated CDDP.

Drug accumulation after equitoxic exposure

The percentage of growth inhibition ver-

sus the content of platinum within the cell determined in GLC4 and in GLC4/CDDP is plotted in Figure 3. Comparing platinum accumulation in the two cell lines, one notices that almost the same levels of platinum are necessary to produce a certain cytotoxic effect. For example, incubation of CDDP with stealth pH-sensitive liposomes at IC_{50} doses yielded a comparable $[Pt]_i$ for both sensitive and resistant cells of about 4×10^{-17} mol/cell. We have previously shown that the accumulation of CDDP in both GLC4 and GLC4/CDDP cell lines follows the same pattern, i.e., incubation with equitoxic doses yields practically the same intracellular platinum levels. For example, incubation with CDDP at IC_{50} doses ($glc4 = 0.4 \mu\text{mol/L}$ and $glc4/cddp = 2.5 \mu\text{mol/L}$) yielded comparable $[Pt]_i$ of 10×10^{-17} mol/cell for both sensitive and resistant cells. These results show the importance of transport as a mechanism of resistance to CDDP exhibited by GLC4/CDDP cells. In the case of free CDDP, it was necessary to use a higher dose to force its uptake by GLC4/CDDP cells, a fact that was not observed with the use of stealth pH-sensitive liposomes containing CDDP. CDDP encapsulated into stealth pH-sensitive liposomes enters sensitive cells as easily as resistant cells. The liposomal formulation exhibited the same efficacy against CDDP-sensitive and CDDP-resistant cells, with an RF equal to 1.1 (Table 2). This factor is much lower than that for non-encapsulated CDDP, which is equal to 6.3 (24). Thus, these liposomes were able to overcome the resistance mechanisms. In addition, the lower intracellular platinum concentration detected when the cells were incubated with an equitoxic CDDP concentration (IC_{50}) suggests the occurrence of a different transport mechanism for stealth pH-sensitive liposomes. Aqueous formulations of CDDP are solutions of the native and hydrated forms of the drug in equilibrium, which is dependent on the pH and Cl^- concentrations. Chloride ions can be replaced with water molecules,

which in turn can be hydrolyzed, yielding hydroxy species. The most important product, the monohydrated species, $[Pt(NH_3)_2(OH_2)Cl]^+$, is formed by the following reaction:



We have previously proposed that CDDP uptake by sensitive GLC4 cells is the sum of two components: an energy-dependent pathway and passive diffusion. The active component is deficient in the GLC4/CDDP subline. The actively transported species is hydro-derivative, probably $[Pt(NH_3)_2(H_2O)OH]^+$ or $[Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl]^+$ (24). Cationic aquated species are more reactive with DNA, producing intra- and inter-strand adducts and, consequently, the cytotoxic effects. Therefore, one can speculate that the CDDP delivery by stealth pH-sensitive liposomes favors the formation of hydrated species. It is known that CDDP is almost completely converted to the monohydro species at pH 6.0 (80%) (33). As the stealth pH-sensitive liposomes enter the cells by endocytosis, the release of CDDP might occur as a consequence of the acidification process inside the endosomes, as explained above. Inside late endosomes the pH ranges from 5.5 to 6.0, and consequently, the main species present is the aquohydroxy-derivative. This could explain the achievement of a similar cytotoxicity level with the presence of a lower intracellular platinum concentration.

Finally, it is noteworthy that the stealth pH-sensitive liposomes might offer advantages over conventional liposomes due to their ability to deliver their contents into the cytoplasm. These liposomes can be an alternative to solve the clinical failure observed with the use of stealth liposomes in the treatment of neck and head carcinoma (34). The authors believe that the clinical inefficacy results from the low release of CDDP. To solve this problem would be appropriate to improve liposome composition. Thus, the

present study allowed us to determine more adequate conditions for the encapsulation of CDDP into stealth pH-sensitive liposomes. These stealth pH-sensitive liposomes are stable in plasma and this finding is important to the *in vivo* evaluation of their antitumoral efficacy and pharmacokinetics. Moreover, these liposomes proved to be active against a type of lung tumor cell line (A549) and to provide an excellent strategy to circumvent the pre-clinical resistance to treatment with CDDP. These carriers were able to introduce

the same level of CDDP into resistant and sensitive cells after incubation with equal CDDP concentrations.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Lipoid GmbH and Quiral Química do Brasil S.A. for providing materials. We are also grateful to Prof. Elzírnia Aguiar Nunan for help with the statistical analysis.

References

- Kondagunta GV, Bacik J, Donadio A, Bajorin D, Marion S, Sheinfeld J, et al. Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6549-6555.
- Guillot T, Spielmann M, Kac J, Luboinski B, Tellez-Bernal E, Munck JN, et al. Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1992; 102: 311-319.
- Le Chevalier T, Brisgand D, Douillard JY, Pujol JL, Alberola V, Monnier A, et al. Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 360-367.
- Shirazi FH, Molepo JM, Stewart DJ, Ng CE, Raaphorst GP, Goel R. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 140: 211-218.
- Muggia FM, Fojo T. Platinums: extending their therapeutic spectrum. *J Chemother* 2004; 16 (Suppl 4): 77-82.
- Stewart CF, Hampton EM. Stability of cisplatin and etoposide in intravenous admixtures. *Am J Hosp Pharm* 1989; 46: 1400-1404.
- Trissel LA, Martinez JF. Compatibility of thiotepa (lyophilized) with selected drugs during simulated Y-site administration. *Am J Health Syst Pharm* 1996; 53: 1041-1045.
- Hospers GA, Mulder NH, de Jong B, de Ley L, Uges DR, Fichtinger-Schepman AM, et al. Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) *in vitro*. *Cancer Res* 1988; 48: 6803-6807.
- Muggia FM, Los G. Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications. *Stem Cells* 1993; 11: 182-193.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279.
- Wernyj RP, Morin PJ. Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 227-232.
- Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* 1994; 269: 787-790.
- Conti M, De Giorgi U, Tazzari V, Bezzi F, Baccini C. Clinical pharmacology of intraperitoneal cisplatin-based chemotherapy. *J Chemother* 2004; 16 (Suppl 5): 23-25.
- Ekborn A, Hansson J, Ehrsson H, Eksborg S, Wallin I, Wagenius G, et al. High-dose cisplatin with amifostine: ototoxicity and pharmacokinetics. *Laryngoscope* 2004; 114: 1660-1667.
- Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 2000; 59 (Suppl 4): 1-8.
- Oldenburg J, Begg AC, van Vugt MJ, Ruevekamp M, Schornagel JH, Pinedo HM, et al. Characterization of resistance mechanisms to cis-diamminedichloroplatinum (II) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line *in vitro*. *Cancer Res* 1994; 54: 487-493.
- Santarpia M, Altavilla G, Salazar F, Taron M, Rosell R. From the bench to the bed: individualizing treatment in non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 71-76.
- Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes - state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 146: 1-54.
- Dzamtika S, Salerno M, Pereira-Maia E, Le Moyec L, Garnier-Suillerot A. Preferential energy- and potential-dependent accumulation of cisplatin-glutathione complexes in human cancer cell lines (GLC4 and K562): A likely role of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38: 11-21.
- Schmidt W, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 799-805.
- Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67: 1171-1176.
- Lanzi C, Perego P, Supino R, Romanelli S, Pensa T, Carenini N, et al. Decreased drug accumulation and increased tolerance to DNA damage in tumor cells with a low level of cisplatin resistance. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1247-1254.
- Cesar ET, de Almeida MV, Fontes AP, Pereira Maia EC, Garnier-Suillerot A, Rubia Costa CM, et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activity, and cellular accumulation of dinuclear platinum complexes derived from N,N'-di-(2-aminoethyl)-1,3-diamino-2-propanol, aryl substituted N-benzyl-1,4-butanediamines, and N-benzyl-1,6-hexanediamines. *J Inorg Biochem* 2003; 95: 297-305.
- Pereira-Maia E, Garnier-Suillerot A. Impaired hydrolysis of cisplatin derivatives to aquated species prevents energy-dependent uptake in GLC4 cells resistant to cisplatin. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8: 626-634.
- Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. Role of the Na⁺,

- K(+)-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1991; 51: 3677-3681.
26. Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, Corna E, Colangelo D, Zunino F, et al. Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 283-291.
27. Collins D. pH-sensitive liposomes as tools for cytoplasmic delivery. In: Philippot R, Schuber F (Editors), *Liposomes as tools in basic research and industry*. Boca Raton: CRC Press; 1995. p 201-214.
28. De Oliveira MC, Boutet V, Fattal E, Boquet D, Grognet JM, Couvreur P, et al. Improvement of *in vivo* stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sci* 2000; 67: 1625-1637.
29. New RRC. Characterization of liposomes. In: New RRC (Editor), *Liposomes a practical approach*. New York: Oxford University Press; 2000. p 105-161.
30. Lim HJ, Masin D, McIntosh NL, Madden TD, Bally MB. Role of drug release and liposome-mediated drug delivery in governing the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone used to treat human A431 and LS180 solid tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 337-345.
31. Jünior AD, Mota LG, Nunan EA, Wainstein AJ, Wainstein AP, Leal AS, et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sci* 2007; 80: 659-664.
32. Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 1-7.
33. Yachnin JR, Wallin I, Lewensohn R, Sirzen F, Ehrsson H. The kinetics and cytotoxicity of cisplatin and its monohydrated complex. *Cancer Lett* 1998; 132: 175-180.
34. Harrington KJ, Lewanski CR, Northcote AD, Whittaker J, Wellbank H, Vile RG, et al. Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077) in patients with inoperable head and neck cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 493-496.

Production of the radioactive antitumoral cisplatin

Alexandre S. Leal^{a,*}, Ávaro D. Carvalho Júnior^b, Fabiana M. Abrantes^{a,b},
Maria Ângela de B.C. Menezes^a, Vany Ferraz^c, Tamara S. Cruz^b,
Valbert N. Cardoso^d, Mônica C. de Oliveira^b

^aDivision for Radiation Technology, Nuclear Technology Development Centre (CDTN)/National Commission for Nuclear Energy (CNEN), P.O. Box 941, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bLaboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 – Pampulha – 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^cDepartment of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627–Pampulha–31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^dLaboratory of Radioisotopes, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 – Pampulha – 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received 25 April 2005; received in revised form 24 June 2005; accepted 9 July 2005

Abstract

This work presents the preparation of radiolabelled cis-dichlorodiammineplatinum (II), CDDP*, sealed in a cadmium capsule. The irradiation of CDDP covered by cadmium, employing exposure times longer than 2 h, demonstrated good chemical purity and high specific activity. This finding allowed a better detection of *in vivo* CDDP* and suggests that it may be a good tool for studies of long-term biodistribution of pharmaceutical formulations containing this drug.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Radiolabelled cisplatin; TRIGA research reactor; Neutron activation

1. Introduction

The cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) is one of the most effective chemotherapeutic agents in the treatment of ovary, lungs, testicle, head and neck carcinoma (Le Chevalier et al., 1994; Guillot et al., 1992; Shirazi et al., 1996; Williams and Einhorn, 1985). However, its use presents some inconveniences such as resistance development, side effects (principally nephrotoxicity), and incompatibility with other drugs used simultaneously in polychemotherapy. Investigations of

new formulations containing CDDP are being developed to eliminate these difficulties related to the use of CDDP (Harrington et al., 2000; Vaage et al., 1999). In addition, numerous studies are being carried out in order to elucidate the pharmacokinetics of CDDP, especially its distribution in the kidney, to try to establish a way to circumvent its toxicity (Newman et al., 1999; Peleg-Shulman et al., 2001). Hence, it is important to have the analytical techniques that allow the quantification of CDDP in studies performed both *in vitro* and *in vivo*. Atomic absorption spectrometry is frequently employed for the determination of platinum in many biological evaluations. However, this method requires laborious sample treatment (sample digestion

*Corresponding author. Tel./fax: +55 31 34993308.

E-mail address: asleal@cdtn.br (A.S. Leal).

and evaluation of the influence of the matrix of all tissues over the analysis method) and consequently, longer time for the analysis. The employment of radioactive labels has been an alternative to the CDDP quantification into biological medium. This labelled form, CDDP*, can be obtained by the activation of the precursor species, K_2PtCl_4 , or the metallic platinum itself followed by its synthesis (Hoeschelle et al., 1982; Kawai et al. 1989; Sykes et al., 1986). This approach can lead to a high specific activity and chemical purity but involves time for the radiochemical synthesis in addition to the costs of platinum isotopes. Another approach is the direct irradiation of the CDDP. Sykes et al., 1986 obtained CDDP* employing this strategy. However, use of this method resulted in a low specific activity ($\approx 38,0 \text{ kBq mg}^{-1}$) and led to the disassociation of the molecule after 2 h of direct irradiation. In this study, we investigated the preparation of CDDP* by the CDDP direct irradiation, with and without encapsulation, with a cadmium capsule using the TRIGA MARK I IPR R-1 research reactor. In addition, we evaluated the CDDP* biodistribution in mice affected by Ehrlich tumours. The results of this work was submitted to be published elsewhere.

2. Material and methods

2.1. Irradiation of CDDP

Each CDDP sample containing 2.0 mg of CDDP were prepared both with and without a cadmium capsule that had a thickness of 1.0 mm. The samples were irradiated in an average thermal and epithermal neutrons flux of $6.4 \cdot 10^{11}$ and $4.4 \cdot 10^{10}$ neutrons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively, at 100 kW (Manual do TRIGA, 2000). The irradiation times were 2 and 4 h for the bare sample and 8 h for the cadmium-covered sample. The CDDP* gamma spectra was obtained using an HPGe detector with 15% nominal efficiency and 1.85 keV FWHM for the 1332 keV peak of ^{60}Co . The calibration of energy and the efficiency curve for several distances from the detector were fitted using the suitable point sources as ^{60}Co , ^{65}Zn , ^{109}Cd , ^{137}Cs , ^{198}Au , ^{203}Hg , ^{241}Am and ^{254}Eu (Smodišet et al., 1988). The irradiated samples were measured at 5.0 cm from the detector. The software used for the data acquisition and spectrum analysis was GENIE 2000 (CANBERRA).

2.2. Determination of chemical purity

Determination of chemical purity was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic apparatus consisted of a Model 515 pump (Waters Instruments, Milford, MA, USA), a Model 717 Plus auto-injector (Waters Instru-

ments, Milford, MA, USA) and a Model 2487 variable wavelength UV detector (Waters Instruments, Milford, MA, USA) connected to the Millenium software. Separations were done using Lichrospher[®] 100 NH_2 guard column, 4 \times 4 mm, 5 mm (Merck, Darmstadt, Germany) connected to Lichrospher[®] 100 NH_2 column, 25 cm \times 4 mm, 10 mm (Merck, Darmstadt, Germany). The eluent system was composed of methanol/ethyl acetate/*N,N*-dimethylformamide/water 4:4:1:1 and the flow rate was of 1.0 mL min^{-1} . Samples (20 mL) were injected and the eluate absorbance was monitored at 310 nm.

3. Results and discussion

3.1. Irradiation of CDDP

The final specific activity for CDDP* was of approximately 40.0 and 57.0 Bq mg^{-1} for the bare and cadmium-covered samples, respectively, after 24 h of decay. These results can be considered similar to those obtained by Sykes et al. (1986). According to these authors, this is the highest specific activity obtainable without decomposition of the sample—due to the Szillard–Chalmers effect—which occurs during long irradiation times or high flux. However, the irradiation of the cadmium-covered sample showed that it is possible to get greater specific activity when irradiating the samples for up to 8 h. The higher activity obtained using the CDDP encapsulated in cadmium can be explained in terms of the data presented in Table 1 concerning the irradiation conditions and of energies involved in the neutron–molecules interactions. The probability of the disruption of the CDDP molecule depends mainly on the recoil energy of the activated nucleus emitting a gamma ray and, secondarily, on the collision with epithermal and fast neutrons (Friedlander et al., 1981). The recoil energies of ^{38}Cl atoms emitting gamma rays with energies 1.64 and 2.17 MeV are equivalent to 38.0 and 67.0 MeV, respectively, which is enough to break the Pt– NH_3 and Pt–Cl bonds having energies of 1.82 and 3.73 MeV, respectively (Ferreira and Cšar, 2004). The thermal/epithermal activity ratio, $A_{\text{th/epi}}$, for the ^{38}Cl atoms is around 19, which according to the parameters in Table 1, can explain the higher degree of degradation of the CDDP molecules in the bare sample. However, for all the Pt isotopes the contribution for the dissociation of the molecule is not expected to be so relevant due to the low energy of the gamma photons (≈ 0.6 MeV), corresponding to a recoil energy of approximately 1.0 MeV, which is not enough to break the Pt– NH_3 and Pt–Cl bonds.

In Fig. 1, the gamma spectra of the bare sample (after 2 h of irradiation) and the cadmium-covered samples are shown. It can be observed that both spectra are

Table 1
Main radionuclides produced by CDDP irradiation and nuclear data.

Stable nuclide	Natural abundance (%)	enb (barrel)	RI (barrel)	Radionuclide produced	Half-life	Decay mode	Energy (keV)	γ energy (keV) (abundance %)
¹⁰⁷ Ag	0.01	1.30	67.0	^{107m} Ag	2.560	IT	—	359.98 (6), 409.48 (6), 538.9 (11.7)
¹⁰⁹ Ag	0.79	2.2	—	^{109m} Ag	4.136	EC	—	—
¹¹³ Ag	12.9	0.09	—	^{113m} Ag	4.038	EC	—	30.8 (2.3), 98.8 (11.4), 26.7 (2.8)
¹¹⁵ Ag	25.3	0.74	8.0	^{115m} Ag	8.36	β^- (β^- , IT)	—	279.11 (2.8), 191.36 (3.7)
¹¹⁷ Ag	7.2	1.58	60.9	^{117m} Ag	30.876	β^- (β^- , IT)	—	317.05 (4.87), 498.74 (5.7), 542.9 (6.8)
¹⁰⁹ Cd	24.2	0.423	0.39	¹⁰⁹ Cd	IT: 50.914	β^- (β^- , IT)	—	162.69 (1.0), 87.48 (42.6)

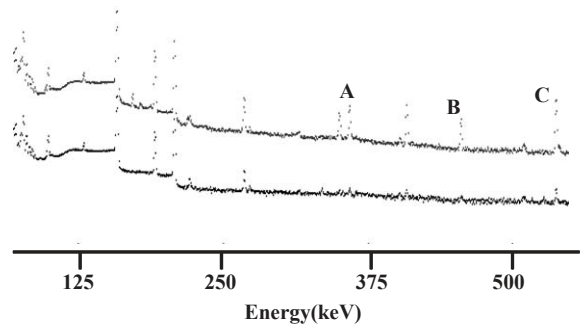


Fig. 1. Radiolabelled CDDP spectra after 2 h of irradiation. Upper: bare sample. A, B and C indicate the photopeaks of 359.0, 409.5 and 538.9 keV of ¹⁹¹Pt, respectively. Lower: cadmium covered sample.

similar up to 300.0 keV, but above this limit, photopeaks of ¹⁹¹Pt at 359.6, 409.4 and 538.9 keV were detected in the bare sample but not in the sample sealed in the cadmium capsule. This result, the higher activation of bare sample, is due to the higher value of the product $f_{th}S_{th}$ compared to f_{epi} . RI as can be verified from the values of the Table 1.

3.2. Determination of chemical purity

The irradiation of unencapsulated CDDP up to 2 h did not result in the molecule degradation (chemical yield equal to the 99%). However, in the case of irradiation time of 4 h, a darkening of the samples was observed. The percentage intact CDDP detected by HPLC was only 65%. The covering of CDDP with the cadmium capsule allowed longer irradiations, up to 8 h, without the decomposition of the molecule. In the Fig. 2, the chromatographic profiles of irradiated and unirradiated CDDPs are shown. The retention time (3.5 min) and the concentration of both solutions were similar, indicating that the cadmium capsule is able to prevent degradation of the molecule.

4. Conclusion

The encapsulation of CDDP in cadmium allowed its direct irradiation for a greater length of time by maintaining the integrity of the molecule. The specific activity obtained was enough to carry out the biodistribution study of CDDP in mice until 24 h after the administration. This finding is relevant because it will be a useful tool for the evaluation of the in vivo behaviour of new formulations of CDDP developed in our research group. Finally, in order to obtain a higher specific activity it will be interesting to verify the influence of the use of an higher neutron flux in future studies.

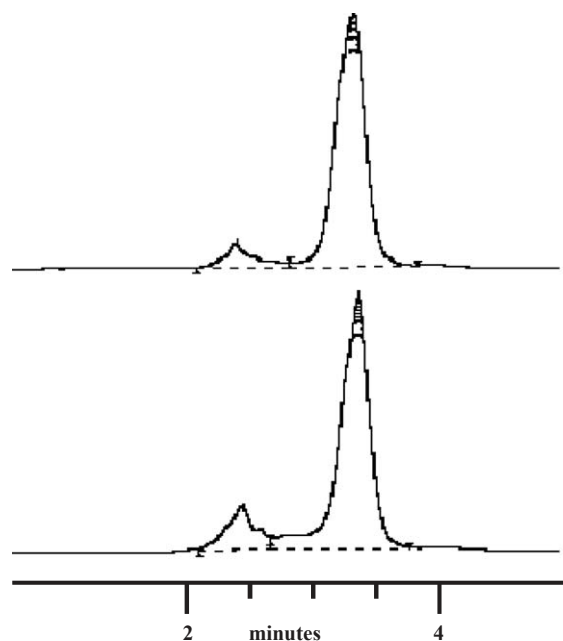


Fig. 2. Determination of CDDP chemical purity using the HPLC: (A) Non radiolabelled CDDP solution; (B) Radiolabelled CDDP obtained from irradiation time of 8 h.

Acknowledgements

The authors would like to thank FAPEMIG, CNEN and CNPq for their financial support and the colleagues at Service of the Reactor and Irradiation Service of CDTN for their co-operation, and specially Zildete Rocha and Amary C sar for their technical help.

References

- Friedlander, G., Kennedy, J.W., Macias, E., S. Miler, J.M., 1981. Nuclear and Radiochemistry. Wiley-Interscience, pp. 435–439.
- Ferreira, A. C sar, 2004. Private Communication.
- Guillot, T., Spielmann, M., Kac, J., et al., 1992. Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 102 (3), 311–319.
- Harrington, K.J., Rowlinson-Busza, G., Syrigos, K.N., et al., 2000. Pegylated liposome-encapsulated Doxorubicin and cisplatin enhance the effect of radiotherapy in a tumor xenograft model. *Clinical Cancer Research* 6, 4939–4949.
- Hoeschelle, J.D., Butle, T.A., Roberts, J.A., et al., 1982. Analysis and Refinement of the Microscale Synthesis of the $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -labeled Antitumor Drug, cis-Dichlorodiammineplatinum (II), cis-DDP*. *Radiochimica Acta* 31, 27–36.
- Kawai, K., Maki, H., Ehrlich, W., Akaboshi, 1989. Synthesis of $^{195\text{m}}\text{Pt}$ Radiolabeled, cis-Dichlorodiammineplatinum (II) of High Chemical and Radiochemical Purity Using High Performance Liquid Chromatography. *J Rad Nucl. Chem Lett.* 136, 67–74.
- Le Chevalier, T., Brisgand, D., Doulliard, J.Y., et al., 1994. Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multi-center trial including 612 patients. *J. Clin. Oncol.* 12 (2), 360–367.
- Manual de Operac o do Reator TRIGA IPR—R1, 2000. Nuclebr  S.A/CDTN, Belo Horizonte, Brasil. Cap. 2, pp. 25–28.
- Newman, M.S., Colbern, G.T., Working, P.K., et al., 1999. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 43, 1–7.
- Peleg-Shulman, T., Gibson, D., Cohen, R., et al., 2001. Characterization of serically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1510, 278–291.
- Shirazi, F.H., Molepo, J.M., Stewart, D.J., et al., 1996. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 140 (2), 211–218.
- Smodiř B., Jađmovi  R., Jovanovi  S., Stegnar, P., Vukotić P., 1988. Efficiency characterisation of HPGe detectors for use in the $k[\text{sup}]_0$ -method of neutron activation analysis. *Vestn. Slov. kem. druř*, (Documenta Chemica Yugoslavica) 35, 397–408.
- Sykes, T.R., Stephens-Newsham, L.G., Noujaim, A.A., 1986. Reactor production and detection of radiolabeled cisplatin. *Appl. Radiat. Isot.* 37, 231–236.
- Vaage, J., Donovan, D., Wipff, E., et al., 1999. Therapy of xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes. *International Journal of Cancer* 80, 134–137.
- Williams, S.D., Einhorn, L.H., 1985. Neoplasms of the testis. In: Calabresi, P., Schein, P.S., Rosemberg, S.A. (Eds.), *Medical Oncology*, pp. 1077–1088.

Use of Labelled Cisplatin Obtained by Direct Irradiation in a Preliminary Biodistribution Study

Álvaro Dutra de Carvalho Júnior¹, Fabiana Moreira Abrantes^{1,2}, Maria Ângela Menezes², Alexandre Soare Leal², Valbert Nascimento Cardoso³ and Mônica Cristina de Oliveira^{1*}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica; Departamento de Produtos Farmacêuticos; Faculdade de Farmácia; Universidade Federal de Minas Gerais; Avenida Antônio Carlos, 6627; Pampulha; 31270-901; monica@farmacia.ufmg.br; Belo Horizonte - MG - Brasil. ²Serviço de Reator e Irradiações; Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear; CDTN/Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN; C. P. 941; 30123-970; Belo Horizonte - MG - Brasil. ³Laboratório de Radioisótopos; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Faculdade de Farmácia; Universidade Federal de Minas Gerais; Avenida Antônio Carlos, 6627; Pampulha; 31270-901; Belo Horizonte - MG - Brasil

ABSTRACT

This work presents the preparation of radiolabelled cis-dichlorodiammineplatinum (II), CDDP, from its direct irradiation into a cadmium capsule, using the TRIGA MARK I IPR R-1 research reactor of the CDTN. The ability to detect CDDP* in Ehrlich tumour-bearing mice after administration via an intravenous route was evaluated. After 24 hours, blood and some organs were collected to determine the incorporated activity. The CDDP* showed a great chemical purity and high specific activity that resulted in an optimum in vivo detection. The CDDP* was taken up principally by liver, spleen and kidney. The CDDP* obtained from this condition was shown to be a good tool for biodistribution studies.*

Key words: Radiolabelled cisplatin, biodistribution, TRIGA research reactor

INTRODUCTION

Cis-Diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) or cisplatin has become one of the most widely used anti-cancer drugs in treating a variety of solid tumors, including testicular, head and neck, ovary and lung tumors (Jakupec et al., 2003; Muggia and Fojo, 2004; Le Chevalier et al., 1994; Guillot et al., 1992). However, its clinical employment has been limited by its toxicity as well as the appearance of resistance (Newman et al., 1999; Deraco et al., 2003; Wernyj and Morin, 2004). The CDDP therapy is particularly restricted by severe nephrotoxicity. It is known that CDDP induces

marked focal necrosis in the proximal and distal tubules and damage occurs mainly in the region of the proximal tubule (Singh, G., 1989). Several strategies have been implemented to overcome CDDP related toxicity, such as the synthesis of platinum analogues and the development of new CDDP formulations (Elias et al., 2003; Harrington et al., 2000). In addition, numerous studies are being carried out in order to elucidate the pharmacokinetics of CDDP, especially its distribution in the kidney, to establish the way to circumvent its toxicity [7-8]. In order to monitor the efficacy and safety of new treatment, it is important to determine the concentration of CDDP

* Author for correspondence

in several organs. For this reason, it is essential to have an adequate analytical method to quantify the CDDP in studies performed *in vivo*. Atomic absorption spectrometry is frequently employed in this sort of experiment. However, this method requires laborious sample treatment (sample digestion and evaluation of the influence of the matrix of all tissues over the analysis method), and consequently, longer time for the analysis. The employment of labeled compound has been an alternative to the CDDP quantification in biological medium. Sykes et al. (1986) prepared radiolabeled CDDP, CDDP*, by its direct irradiation, but the specific activity was low ($< 38.0 \text{ kBq/mg}$) and the decomposition of the molecule occurred after 2 hours of bombardment. Thus, CDDP* has been prepared using a cadmium capsule to allow the irradiation of CDDP for a longer time without its degradation. The irradiation was performed at TRIGA MARK I IPR R-1 research reactor. In addition, we were interested in evaluating the detection level of CDDP* after its administration in mice affected by Ehrlich tumour.

MATERIALS AND METHODS

Irradiation of CDDP

A sample of CDDP (2.0 mg) was placed inside a cadmium capsule of 1 mm thickness. It was irradiated in the TRIGA MARK I IPR R-1 reactor, employing an average thermal and epithermal neutron flux of 6.4×10^{11} and 4.4×10^{10} neutrons. $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively, at 100 kW. The irradiation time was 8 hours. The chemical purity was determined using high performance liquid chromatography. A 20- μL aliquot of CDDP* solution prepared in 0.9% w/v NaCl solution was injected onto the Lichrospher® 100 NH2 guard column, 4X4 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) connected to a Lichrospher® 100 NH2 column, 25 cmX4 mm, 10 μm (Merck, Darmstadt, Germany). The elution was performed with methanol/ethylacetate/N,N-dimethylformamide/water 4:4:1:1; the flow rate was of $1.0 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ and the eluate was monitored at 310 nm.

Ehrlich tumour model

Ehrlich tumor was grown in female Swiss mice. The mice were kept in an area maintained on a

standardised light/dark cycle and had free access to food and water. The Ehrlich cell line was kindly supplied by Dr. Jorge Luiz Pesquero (Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil). Tumour cells were inoculated intraperitoneally into mice and the tumor was harvested after eight days. A viable tumor cell suspension was then prepared at a density of 5.0×10^6 cells/mL. Tumours were transplanted subcutaneously in the right flank of 20-25 g female Swiss mice (Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil). Tumours were allowed to grow until all inoculated mice had palpable tumours (20 days postimplantation). All protocols were approved by the ethics committee for animal experiments of the Federal University of Minas Gerais and comply with the guide for the care and use of laboratory animals recommended by Institute of Laboratory Animal Resources.

Biodistribution study

After 8 hours of irradiation, the CDDP* was allowed to cool for 24 hours inside the TRIGA MARK I IPR R-1 research reactor. The CDDP* obtained was injected by an intravenous route into Ehrlich tumor-bearing Swiss mice ($n=3$) at a dose of 4 mg/kg. After 24 hours, the mice were anesthetized with a mixture of xylazine (7.5 mg/Kg) and ketamine (60 mg/Kg). Blood samples were collected and some organs, such as liver, kidney and spleen were excised. The organs were washed with distilled water, dried with filter paper and weighed. The radioactivity of the organs and blood was measured by an automatic scintillation apparatus covering an energy window of 70-210 or 50-150 keV (ANSR-Abott, USA). The counting times were of 2 and 4 min, respectively, for each energy window. The results were expressed as cpm/g of tissue. The data were statistically analyzed by ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

By covering the CDDP with a cadmium capsule a higher specific activity ($57.0 \text{ Bq}.\text{mg}^{-1}$) was obtained than for the bare samples ($40.0 \text{ Bq}.\text{mg}^{-1}$), without the rupture of the molecule, as shown by Leal et al. (in press, *Appl. Radiat. Isot.*). However, it is important to investigate whether this level of specific activity is sufficient to follow the

distribution of the drug *in vivo*. The CDDP* biodistribution results are shown in Fig. 1. The radioactivity was counted using an energy window of 70-210 KeV and 50-150 KeV, including or not photopeaks of ^{199}Au , respectively. In both cases, the CDDP* was observed to be taken up

principally by the spleen, liver and kidneys. The results did not show statistically significant differences in the CDDP uptake between liver and spleen when the radioactivity was determined in the energy window of 70-210 KeV ($p > 0.05$).

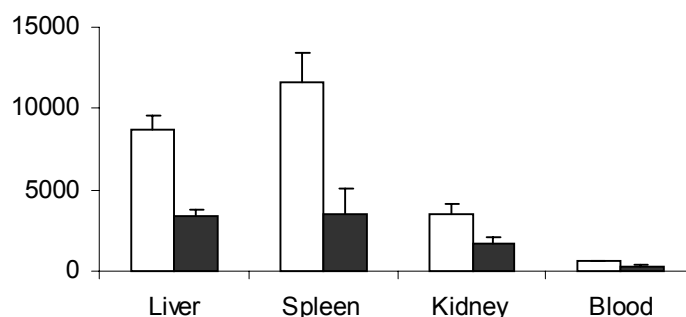


Figure 1 - Biodistribution of CDDP* after 24 hours of its administration in Ehrlich tumour bearing mice and measured at \square 70-210 keV and \blacksquare 50-150 keV. Values are expressed as mean \pm sd (n = 3).

The same results were observed at 50-150 KeV ($p > 0.05$). On the other hand, the kidney showed an uptake of CDDP* lower than liver for both counting systems. These preliminary results suggest that the quantification of radioactivity in the organs, including the ^{199}Au counting, does not affect the biodistribution of CDDP, and, thus, it would not be necessary to remove this nuclide. Furthermore, the detection of radioactivity with the ^{199}Au inclusion can contribute with a reduction in counting time of each sample, and consequently, it would not be necessary to make the data corrections considering the half-life of the $^{195\text{m}}\text{Pt}$. This biodistribution profile is in good agreement with the results obtained by Newman et co-workers (1999), who used graphite furnace atomic absorption spectrophotometry for the CDDP quantification. It leads one to suppose that the radiochemical purity obtained was satisfactory, such as that obtained by Sykes et al. (1986). In addition, it is noteworthy that the greater specific activity of CDDP allowed optimal radioactivity detection for the performance of biodistribution studies. Certainly, this fact will become more significant when a biodistribution evaluation in a time interval greater than 24 hours is required. Hence, the production of CDDP*

using the cadmium capsule showed it can be a useful tool for the evaluation of the *in vivo* behavior of new formulations of CDDP.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the FAPEMIG, CNEN and CNPq for their financial support. We gratefully acknowledge Dr. Jorge Luiz Pesquero and Quiral Química do Brasil S.A. for providing the Ehrlich cell line and cisplatin, respectively. We are also indebted to the colleagues of the Reactor and Irradiation Service of the CDTN for their cooperation, specially to Zildete Rocha and Amary César for their technical help.

RESUMO

O presente trabalho refere-se à obtenção de cis-diclorodiaminoplatina (II) radiomarcada, CDDP*, a partir de sua irradiação direta numa cápsula de cádmio. A irradiação foi realizada no reator de pesquisa TRIGA MARK I IPR R-1. Em seguida, foi avaliada a capacidade de detecção da radioatividade emitida por CDDP* após sua

administração intravenosa em camundongos acometidos por tumor de Ehrlich. Após 24 horas, fez-se a coleta de amostras de sangue e de alguns órgãos, a fim de se avaliar o nível de radioatividade presente nos mesmos. A CDDP* obtida apresentou uma ótima pureza química e elevada atividade específica que permitiu um excelente nível de detecção. A CDDP*

foi captada principalmente pelo fígado, baço e rins. Portanto, a CDDP* obtida na condição de bombardeamento supracitada mostrou ser uma ferramenta útil para a realização de estudos de biodistribuição.

REFERENCES

- Deraco, M.; Raspagliesi, F. and Kusamura, S. (2003), Management of peritoneal surface component of ovarian cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **12**, 561-583.
- Elias, D. M. and Sideris, L. (2003), Pharmacokinetics of heated intraoperative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Sur. Oncol. Clin. N. Am.*, **12**, 755-769.
- Guillot, T.; Spielmann, M.; Kac, J.; Luboinski, B.; Tellez-Bernal, E.; Munck, J. N.; Bachouchi, M.; Armand, J. P. and Cvitkovic, E. (1992), Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, **102**, 311-9.
- Harrington, K. J.; Lewanski, C. R. and Stewart, J. S. W. (2000), Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: Clinical development. *Clinical Oncology*, **12**, 16-24.
- Jakupec, M. A.; Galanski, M. and Keppler, B. K. (2003), Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **146**, 1-53.
- Le Chevalier, T.; Brisingand, D. and Doulliard, J. Y. (1994), Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 360-7.
- Muggia, F. M. and Fojo, T. (2004), Platinums: extending their therapeutic spectrum. *J. Chemother.*, **16**, 77-82.
- Newman, M. S.; Colbern, G. T.; Working, P. K.; Engbers, C. and Amantea, M. A. (1999), Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **43**, 1-7.
- Singh, G. (1989), A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology*, **58**, 71-80.
- Sykes, T. R.; Stephens-Newsham, L. G. and Noujaim, A. A. (1986), Reactor production and detection of radiolabeled *cis*-platinum. *Appl. Radiat. Isot.*, **37**, 231-236.
- Wernyj, R. P. and Morin, P. J. (2004), Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. *Drug Resist Updat.*, **7**, 227-232.

Received: July 12, 2005;
Revised: July 14, 2005;
Accepted: August 01, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)