

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

ELAINE AMARAL LEITE

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO
PROLONGADA CONTENDO CISPLATINA**

Belo Horizonte - MG

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ELAINE AMARAL LEITE

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE LONGA
CIRCULAÇÃO CONTENDO CISPLATINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial, para a obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte - MG

2010

L533a Leite, Elaine Amaral
Avaliação da toxicidade aguda e atividade antitumoral de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina / Elaine Amaral Leite. – 2010.
162 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Tratamento – Teses. 2. Lipossomas - Teses. 3. Tecnologia farmacêutica – Teses. 4. Agentes antineoplásicos - Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 615.4

**Dedico esse trabalho àqueles que sempre
estiveram ao meu lado:
meus pais, Lázaro e Diná
meu irmão, Leonardo**

AGRADECIMENTOS

À minha família, obrigada por dividirem comigo tantos momentos de dificuldades e multiplicarem a alegria das vitórias alcançadas.

Aos meus pais, Lázaro e Diná, pelo amor, carinho, dedicação e presença constante em minha vida. Obrigada por apoiarem sempre todas as minhas decisões e por acreditarem em mim e em meus sonhos.

Ao meu irmão, Leo, por tudo que representa na minha vida, pela amizade, companheirismo, apoio, incentivo e torcida por minhas realizações.

À minha cunhada, Lu, pela amizade, carinho, apoio e presença em todos os momentos.

À Iacmi, por todos esses anos de convivência, pela amizade única, pelas conversas, pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos difíceis.

À Profa. Mônica, agradeço imensamente pela admirável orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e presença marcante no decorrer desse projeto. Obrigada pela confiança, paciência, incentivo e amizade. Agradeço ainda por ter me recebido em sua equipe e pela oportunidade de trabalhar contigo, uma pessoa tão especial e com qualidades ímpares: honesta, justa, otimista, exemplo de dedicação e competência profissional, atributos esses que muito contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos professores, Vildete, Renata, Gilson, Lucas e Valbert, agradeço pela convivência durante esses anos, pelo incentivo, apoio e por toda contribuição científica.

À Profa. Ângela Maria Lana pela colaboração imprescindível durante a realização das análises estatísticas.

À patologista Érika Meinick pela realização das avaliações histopatológicas e pela disponibilidade em discutir os laudos.

Ao Prof. Lauro, pela paciência, atenção e gentileza em fotografar as imagens das análises histopatológicas.

Ao Prof. Geovanni Cassali pela gentileza de disponibilizar o Laboratório de Patologia Comparada para a realização das análises histomorfométricas e pela atenção dispensada na análise dos resultados.

Aos professores Luiz Gonzaga e Paulo Savassi, ao Alberto e Ana Paula pelas sugestões dispensadas no decorrer desse trabalho.

Aos meus amigos do LTF: Álvaro, Cris Giuberti, Laís, Talita, Sávia, Berta, Guilherme Diniz, Soninha, José Geraldo, Luciene, André, Soraya, Guilherme Carneiro, Erly, Vanessa, Cristiane Moraes, Délia, Gisele, Martinha, Isabel, João, Diego, Samuel, Elton, Andréa, Daniel, Betânia, Lucas, Juliana, Ricardo, Laurinha, Cristiane Melo, Tatiana, Lorena e Denise, que fizeram parte desses anos de trabalho, agradeço pela amizade e convivência.

Agradeço de maneira especial aos amigos: Álvaro, Cris Giuberti, Sávia, Gui, Martinha, Gi, Lu e André pela amizade, companheirismo, cumplicidade, pelas horas e horas de conversas e acima de tudo pelos bons momentos vividos. Juntos dividimos o peso das dificuldades e compartilhamos inúmeros momentos de alegrias e conquistas.

Ao Eduardo, técnico responsável do LTF, obrigada pela amizade, paciência, presteza, por todas as vezes que me socorreu quando alguma coisa dava errado. Agradeço ainda pela colaboração dispensada na execução desse trabalho.

À Cristina Maria, pelo grande auxílio nas análises histomorfométricas e ajuda na obtenção das fotomicrografias.

Ao Gui, pela enorme ajuda nas figuras de histologia.

Ao Jamil, técnico do Laboratório de Físico-química de Proteínas (ICB/UFMG) pela presteza e disposição em operar a ultracentrífuga na parte inicial desse trabalho.

À veterinária Maria Adelaide e ao José Batista por estarem sempre disponíveis e alegres, auxiliando na manutenção e cuidado aos animais.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG pelos inúmeros momentos compartilhados.

À FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro.

Muitas foram as pessoas que direta ou indiretamente estiveram presentes comigo durante esse percurso, que torceram e colaboraram de forma essencial para a realização desse trabalho. Por isso, a todos a quem não me referi, obrigada!

E sobretudo, agradeço a Deus por ser tão maravilhoso comigo, colocando pessoas tão especiais em minha vida e, principalmente, por conduzir meus passos, abrindo-me portas e iluminando sempre o meu caminho.

"O mais importante na ciência não está na obtenção
de novos fatos, mas na descoberta de novas
maneiras de pensar a respeito deles."

(Willian Lawrence Bragg)

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo a quimioterapia uma das alternativas para o tratamento dessa doença. A cisplatina (CDDP) é um dos agentes citotóxicos mais ativos e tem sido comumente utilizada como quimioterápico de primeira escolha contra vários tipos de tumores. Entretanto, a efetividade de seu uso clínico é limitada pelos efeitos adversos graves, principalmente pela nefrotoxicidade, e sua tendência de promover quimioresistência. Novos carreadores nanoestruturados, lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo CDDP (SpHL-CDDP) foram desenvolvidos objetivando promover uma liberação de CDDP mais seletiva para as células cancerosas, o que pode contribuir para reduzir ou eliminar a toxicidade e aumentar sua eficácia terapêutica. Este trabalho apresenta a avaliação pré-clínica de SpHL-CDDP focando a toxicidade aguda após sua administração por via intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP) em camundongos Swiss sadios e a eficácia antitumoral após o tratamento por via IV em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Para o estudo de toxicidade aguda, os animais receberam diferentes doses de CDDP livre ou SpHL-CDDP e os parâmetros avaliados incluíram: variação do peso corporal, determinação da dose letal capaz de conduzir à mortalidade de 50% dos animais (DL_{50}) e da dose máxima tolerada (DMT), avaliação hematológica e bioquímica bem como avaliação histopatológica dos rins, fígado, baço e medula óssea. Os resultados demonstraram maior perda de peso corporal dos camundongos tratados com CDDP livre do que aqueles tratados com SpHL-CDDP, após a administração por via IP e IV. Os valores da DL_{50} e DMT foram significativamente aumentados em camundongos machos e fêmeas após o tratamento com SpHL-CDDP comparado com o tratamento com CDDP livre, em ambas as vias investigadas. Alterações nos parâmetros hematológicos foram observadas após a administração de baixas doses de CDDP livre (5 e 10 mg/kg) por via IP, enquanto por via IV essas alterações ocorreram após a administração de doses mais altas (20 mg/kg). Esses achados associados às alterações histopatológicas confirmaram o potencial mielossupressor da CDDP. Por outro lado, o tratamento com SpHL-CDDP não provocou modificação dos parâmetros hematológicos indicando ausência de mielotoxicidade. Com relação à nefrotoxicidade, o tratamento com CDDP livre causou alterações significativas nos

níveis de uréia, creatinina e no índice uréia/creatinina em camundongos machos e fêmeas. Além disso, a avaliação microscópica dos rins revelou uma severa necrose tubular. Em contraste, alterações menos pronunciadas dos parâmetros bioquímicos e ausência de modificação histopatológica foram observadas nos grupos tratados com SpHL-CDDP. Nenhuma alteração morfológica do fígado e baço foi observada após ambos os tratamentos pelas duas vias utilizadas. Para o estudo de atividade antitumoral, camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich receberam três doses de SpHL-CDDP (16 mg/kg) ou CDDP livre (8 mg/kg) por via IV e os parâmetros avaliados incluíram a determinação do volume do tumor e sua caracterização histomorfométrica. O tratamento com SpHL-CDDP inibiu significativamente o crescimento do volume do tumor em comparação com a CDDP livre. Nenhuma diferença nas características histomorfométricas foi observada entre ambos tratamentos. Portanto, SpHL-CDDP mostrou ser menos tóxico que CDDP livre, permitindo aumentar a dose administrada o que promoveu um maior efeito farmacológico em relação à CDDP livre. Esses resultados demonstraram que SpHL-CDDP é um candidato promissor para a quimioterapia de tumores que respondem ao tratamento com CDDP.

Palavras-chave: cisplatina, lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, toxicidade aguda, eficácia antitumoral

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of mortality in the world, with chemotherapy being a valuable alternative for the disease treatment. Cisplatin (CDDP) is one of the most active cytotoxic agents and has been commonly used as first line chemotherapy against several tumors. However, the effectiveness of its clinical use is limited by severe side effects, mainly nephrotoxicity, and its tendency to provoke chemoresistance. New nanostructured carriers, pH-sensitive and long-circulating liposomes containing CDDP were developed aiming to promote a more selective administration of CDDP to cancer cells that may contribute to a decrease in or elimination of toxicity and enhance its therapeutic efficacy. This work presents the pre-clinical evaluation of SpHL-CDDP focusing on acute toxicity after its administration by intravenous (IV) and intraperitoneal (IP) route in healthy Swiss mice and antitumoral efficacy after administration by IV route in Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice. For acute toxicity study, animals received different doses of free CDDP or SpHL-CDDP and the parameters evaluated included: body weight variation, LD₅₀ and maximum tolerated dose (MTD) determination, hematological and biochemical analysis as well as histopathological evaluation of kidneys, liver, spleen and bone marrow. The results showed a greater loss of body weight in mice treated with free CDDP than those treated with SpHL-CDDP, after administration by IP and IV route. The LD₅₀ and MTD were significantly increased in male and female mice after SpHL-CDDP treatment compared with free CDDP treatment, in both routes investigated. Hematological parameters alterations were observed after administration of low doses of free CDDP (5 and 10 mg/kg) by IP route, while by IV route these alterations only occurred after the administration of high doses (20 mg/kg). These findings associated to the morphological alterations confirmed the myelosuppressor effect of CDDP treatment. On the other hand, SpHL-CDDP treatment provoked no modification over hematological parameters indicating the absence of myelotoxicity. As regards nephrotoxicity, free CDDP treatment caused significant alterations in the blood urea, creatinine levels and urea/creatinine index of male and female mice. In addition, the microscopic examination of kidneys revealed a severe toxic tubular necrosis. In contrast, slight alterations of biochemistry parameters and absence of histopathological modifications were observed in mice

treated with SpHL-CDDP. No morphological alteration of liver and spleen was observed after both treatments by two routes used. Concerning antitumoral activity, Ehrlich solid tumor-bearing Swiss mice received three doses of SpHL-CDDP (16 mg/kg) or free CDDP (8 mg/kg) by IV route and the tumor volume was evaluated along time as well as the histomorphological characterization of tumor was performed. The treatment with SpHL-CDDP inhibited significantly the growth of tumor volume in comparison with free CDDP. No difference in the histomorphometrical features has been detected. Therefore, SpHL-CDDP treatment showed to be less toxic than free CDDP treatment allowing to increase the administered dose, and consequently, to achieve a greater pharmacological effect than that observed after free CDDP treatment. These results demonstrated that SpHL-CDDP is a promising candidate for chemotherapy of tumors which are sensitive to CDDP treatment.

Key-words: cisplatin, pH-sensitive and long-circulating liposomes, acute toxicity, antitumoral efficacy

LISTA DE FIGURAS

1	Fórmula estrutural da CDDP.....	29
2	Formação dos aductos da CDDP.....	30
3	Reações de hidrólise da CDDP.....	31
4	Representação esquemática do mecanismo de toxicidade da CDDP via gamaglutamiltranspeptidase (GGT).....	33
5	Representação esquemática de lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa, com material hidrofílico em seu interior, envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos lípides (B).....	35
6	Estruturas químicas do hemisuccinato de colesterila (A) e dioleoilfosfatidiletanolamina (B).....	38
7	Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.....	39
1.1	Variação do peso corporal de camundongos Swiss machos (A e B) e fêmeas (C e D) observada durante 14 dias após a administração IP de CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	71
1.2	Taxa de sobrevivência de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com CDDP livre, SpHL-CDDP, salina e SpHL.....	73
1.3	Níveis de uréia (A) e creatinina (B) de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados por via IP com diferentes doses de CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	80
1.4	Fotomicrografias da medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D).....	84
1.5	Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D).....	84
1.6	Fotomicrografias do fígado de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D).....	85
1.7	Fotomicrografias do baço de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D).....	85
1.8	Variação do peso corporal de camundongos Swiss machos (A e B) e fêmeas (C e D) monitorado durante 14 dias após a administração IV de CDDP livre, SpHL-CDDP, salina e SpHL.....	92
1.9	Taxa de sobrevivência de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com CDDP livre, SpHL-CDDP, salina e SpHL.....	94

1.10 Níveis plasmáticos de uréia (A), creatinina (B) e índice uréia/creatinina (C) de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados três dias após o tratamento por via IV com CDDP livre nas doses de 20 e 15 mg/kg para machos e fêmeas, respectivamente; SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg para machos e fêmeas, respectivamente; salina e SpHL.....	103
1.11 Fotomicrografias do tecido ósseo de camundongos Swiss machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) tratados com solução salina (A e B), CDDP livre (C e D) e SpHL-CDDP (E e F). C e D representam cortes histológicos realizados quatorze dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 10 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente. E e F mostram cortes histológicos realizados quatorze dias após o tratamento com SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente.....	107
1.12 Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) tratados com solução salina (A e B), CDDP livre (C e D) e SpHL-CDDP (E e F). Os animais foram sacrificados quatorze dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 10 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente e SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente.....	109
1.13 Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss machos (A e C) e fêmeas (B e D) tratados com solução CDDP livre (A e B) e SpHL-CDDP (C e D). Os animais foram sacrificados três dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 15 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente e SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente.....	110
1.14 Fotomicrografias do tecido hepático (A, C e E) e esplênico (B, D e F) de camundongos Swiss machos tratados com solução salina (A e B), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (C e D) e SpHL-CDDP na dose de 35 mg/kg (E e F). Os animais foram sacrificados quatorze dias após o tratamento.....	111
2.1 Esquema representativo do protocolo experimental para o estudo de atividade antitumoral.....	130
2.2 Efeito antitumoral (A) de CDDP livre na dose de 8 mg/kg (●), SpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg (▲), NSpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg (■), SpHL (Δ) e NSpHL (□) administrados em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Em B, os valores foram calculados usando as equações obtidas na análise de regressão para os diferentes tratamentos.....	136
2.3 Fotomicrografias do tumor sólido de Ehrlich representativas das diferentes variáveis avaliadas no estudo histomorfométrico: neoplasia (A), necrose (B) e inflamação (C).....	139
2.4 Perfil de variação do peso corporal de camundongos Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich e submetidos a diferentes tratamentos. Os gráficos A, B, C e D representam a variação de peso observada nos dias 7, 14, 19 e 23, respectivamente, após o início do tratamento.....	141

LISTA DE TABELAS

1.1 DL₅₀ e DMT estabelecidas após administração IP de CDDP livre ou SpHL-CDDP em camundongos Swiss.....	74
1.2 Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	77
1.3 Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	78
1.4 Avaliação da alteração renal detectada no período inicial pós-tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	81
1.5 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	82
1.6 DL₅₀ e DMT estabelecidas após tratamento IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP em camundongos Swiss.....	95
1.7 Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados quatorze dias após o tratamento por via IV com CDDP ou SpHL-CDDP.....	97
1.8 Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados quatorze dias após o tratamento por via IV com CDDP ou SpHL-CDDP.....	98
1.9 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal avaliados em camundongos machos e fêmeas quatorze dias após a administração por via IV de CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	101
1.10 Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP.....	105
2.1 Características físico-químicas de diferentes formulações lipossomais.....	134
2.2 Variáveis Morfométricas avaliadas no tumor sólido de Ehrlich de camundongos Swiss fêmeas submetidos a diferentes tratamentos.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
APN	Diaminopeptidase
AST	Aspartato aminotransferase
CDDP	Cisplatina
CHEMS	Hemisuccinato de colestera
Cis	Cisteína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DL ₅₀	Dose letal que induz a morte de 50% dos animais
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DSPE-MPEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina associada a metoxipolietilenoglicol 2000
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
FA	Fosfatase alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GGT	γ -glutamyltransferase
GHS	Glutathione
GLC4	Linhagem celular de carcinoma de pulmão sensível à cisplatina
GLC4/CDDP	Linhagem celular de carcinoma de pulmão resistente à cisplatina
Gli	Glicina
Glu	Ácido glutâmico
GOG	Grupo de Oncologia Ginecológica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ICT	Inibição do crescimento do tumor
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa

LUV	Lipossoma unilamelar grande
MLV	Lipossoma multilamelar
NSpHL	Lipossomas não pH-sensíveis de circulação prolongada sem CDDP
NSpHL-CDDP	Lipossomas não pH-sensíveis de circulação prolongada contendo CDDP
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
SC	Subcutânea
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL	Lipossomas pH-sensíveis de longa circulação sem CDDP
SpHL-CDDP	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo CDDP
SPI-077	Lipossoma de circulação prolongada contendo cisplatina
SUV	Lipossoma unilamelar pequeno
TE	Teor de encapsulação
TOC	Transportadores orgânicos de cátions
VRT	Volume relativo do tumor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Visão Geral do Câncer.....	25
2.2 Tratamento do Câncer.....	27
2.3 Cisplatina.....	28
2.4 Lipossomas.....	35
<u>2.4.1 Lipossomas de Cisplatina.....</u>	<u>40</u>
2.5 Estudos pré-clínicos.....	45
<u>2.5.1 Estudo de toxicidade.....</u>	<u>46</u>
<u>2.5.2 Avaliação da atividade antitumoral.....</u>	<u>52</u>
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivos Específicos.....	55
CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO CISPLATINA.....	56
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Material.....	60
2.2 Preparação de SpHL-CDDP.....	60
2.3 Caracterização química e físico-química de SpHL-CDDP.....	61
<u>2.3.1 Determinação do diâmetro e potencial zeta.....</u>	<u>61</u>
<u>2.3.2 Determinação do teor de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP.....</u>	<u>62</u>
<u>2.3.3 Determinação da relação CDDP/fosfolípide.....</u>	<u>63</u>
2.4 Experimentação <i>in vivo</i>	64
<u>2.4.1 Animais.....</u>	<u>64</u>
<u>2.4.2 Avaliação da Toxicidade Aguda.....</u>	<u>64</u>
2.5 Análise Estatística.....	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68

PARTE 1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SpHL-CDDP ADMINISTRADOS POR VIA INTRAPERITONEAL.....	68
3.1 Resultados.....	69
<u>3.1.1 Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP.....</u>	<u>69</u>
<u>3.1.2 Avaliação do peso dos animais.....</u>	<u>69</u>
<u>3.1.3 Mortalidade e Sinais Clínicos.....</u>	<u>72</u>
<u>3.1.4 Investigações hematológicas.....</u>	<u>74</u>
<u>3.1.5 Análise Bioquímica.....</u>	<u>79</u>
<u>3.1.6 Avaliação Histopatológica.....</u>	<u>83</u>
3.2 Discussão.....	86
PARTE 2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SpHL-CDDP ADMINISTRADOS POR VIA INTRAVENOSA.....	89
3.1 Resultados.....	90
<u>3.1.1 Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP.....</u>	<u>90</u>
<u>3.1.2 Avaliação do peso dos animais.....</u>	<u>90</u>
<u>3.1.3 Mortalidade e Sinais Clínicos.....</u>	<u>92</u>
<u>3.1.4 Investigações hematológicas.....</u>	<u>95</u>
<u>3.1.5 Análise Bioquímica.....</u>	<u>99</u>
<u>3.1.6 Avaliação Histopatológica.....</u>	<u>106</u>
3.2 Discussão.....	112
PARTE 3 ESTUDO COMPARATIVO DA TOXICIDADE AGUDA INDUZIDA PELA CDDP LIVRE E SpHL-CDDP CONSIDERANDO A VIA DE ADMINISTRAÇÃO UTILIZADA.....	116
CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SpHL-CDDP EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE TUMOR SÓLIDO DE EHRlich.....	123
1 INTRODUÇÃO.....	124
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	127
2.1 Material.....	128
2.2 Preparação e caracterização dos lipossomas.....	128
2.3 Preparo e inoculação das células tumorais.....	129

2.4 Avaliação da atividade antitumoral.....	129
2.5 Avaliação histomorfométrica.....	131
2.6 Análise estatística.....	132
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
3.1 Resultados.....	134
<u>3.1.1 Caracterização físico-química dos lipossomas.....</u>	134
<u>3.1.2 Atividade antitumoral.....</u>	134
3.2 Discussão.....	142
CONCLUSÕES.....	145
PERSPECTIVAS.....	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
APÊNDICES.....	159
APÊNDICE A.....	160

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que apresenta elevada incidência e alta taxa de mortalidade no mundo, sendo a segunda maior causa de morte no Brasil. Apesar dos inúmeros avanços no conhecimento da biologia do câncer, os avanços terapêuticos não seguiram a mesma dinâmica (FERRARI, 2005). Uma das principais formas de intervenção médica no tratamento do câncer é a quimioterapia, cuja tendência atual é a utilização de fármacos cada vez mais seletivos e isentos ou com menor número de efeitos adversos. Compostos de platina são agentes antitumorais bem estabelecidos na prática clínica, sendo a cisplatina (CDDP) o composto dessa classe mais amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de tumores malignos (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; ARMSTRONG *et al.*, 2006). Seu uso clínico, entretanto, é restrito em função dos efeitos tóxicos induzidos pelo fármaco, os quais incluem principalmente nefrotoxicidade aguda e neurotoxicidade crônica (MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2009). Outras limitações incluem a resistência intrínseca ou adquirida em muitos tipos de tumores e a rápida inativação do fármaco, resultante de complexação com proteínas plasmáticas (MONTI *et al.*, 2005).

Para reduzir os efeitos tóxicos, contornar a resistência e aumentar o índice terapêutico da CDDP, várias formulações nanoestruturadas têm sido desenvolvidas, incluindo formulações lipossomais (BOULIKAS, 2004; CARVALHO-JÚNIOR, 2007a,b; NEWMAN *et al.*, 1999). Melhorar a eficiência de liberação de compostos platinados, como a CDDP, pode contribuir para uma diminuição da toxicidade e ainda permitir que doses mais elevadas sejam administradas, promovendo um aumento da resposta farmacológica da CDDP (BOULIKAS, 2007). Em trabalhos anteriores, uma formulação lipossomal denominada SpHL-CDDP foi desenvolvida por nosso grupo de pesquisa e avaliada quanto à sua citotoxicidade, biodistribuição e eficácia antitumoral em modelo experimental de camundongos acometidos pelo tumor sólido e ascítico de Ehrlich (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a,b; CARVALHO-JÚNIOR, 2008; VIEIRA, 2003). SpHL-CDDP é uma formulação contendo CDDP encapsulada em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada. Após a administração intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP), SpHL-CDDP exibiu um tempo de circulação sanguínea prolongado e alterou a

distribuição tecidual em relação à CDDP livre. Uma redução da retenção do fármaco no tecido renal e um aumento significativo da concentração de CDDP na região tumoral foram observados após a administração IV e IP de SpHL-CDDP em modelo experimental murino (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Contudo, o efeito farmacológico da CDDP não foi alterado em virtude de sua encapsulação nas vesículas lipossomais, uma vez que o perfil de crescimento do tumor sólido de Ehrlich, avaliado após a administração de SpHL-CDDP por via IV foi semelhante ao observado para o tratamento com CDDP livre (CARVALHO-JÚNIOR, 2008).

Nesse contexto, aspirando possíveis aplicações clínicas de SpHL-CDDP, a proposta desta tese de doutorado foi explorar os aspectos pré-clínicos relacionados à toxicidade aguda de SpHL-CDDP após sua administração por via IV e IP. Além disso, avaliar o potencial de SpHL-CDDP em proporcionar uma melhor resposta terapêutica em relação ao tratamento com CDDP livre, mediante o estudo da sua atividade antitumoral com o emprego de camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich utilizando doses maiores em relação às empregadas em estudos anteriores (CARVALHO-JÚNIOR, 2008).

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Visão Geral do Câncer

O câncer é objeto de estudo de vários centros de pesquisa em todo o mundo, sendo o responsável por aproximadamente 13% das mortes, cerca de sete milhões de pessoas a cada ano. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009) apontam o câncer como a segunda maior causa de morte por doença no Brasil e, as estimativas para o ano de 2010, que são válidas também para o ano de 2011, apontam a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino.

A multiplicação e a diferenciação morfológica e funcional são processos essenciais para os seres vivos. Esses dois processos recebem influências de um grande número de agentes internos e externos às células, porém estão sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Não é surpresa que, com certa frequência, surjam transtornos nos mecanismos que os controlam. Alterações nesse sistema regulatório resultam em distúrbios do crescimento e da diferenciação ou distúrbios de ambos ao mesmo tempo, e, uma das consequências são as chamadas neoplasias (BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2006). Portanto, segundo Brasileiro-Filho e colaboradores (2006) uma neoplasia pode ser entendida *“como uma lesão constituída pela proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de alterações nos genes e proteínas que regulam o crescimento e a diferenciação celulares”*.

Do ponto de vista clínico, evolutivo e comportamental, as neoplasias são divididas em duas categorias: benignas e malignas. As neoplasias benignas caracterizam-se pela presença de células bem diferenciadas, com atipias celulares e arquiteturais

discretas, baixo índice mitótico, crescimento lento e expansivo e, além disso, o tumor é bem delimitado e geralmente não recidivam após cirurgia. Por outro lado, as neoplasias malignas, também denominadas câncer, apresentam alterações na expressão gênica com tendências à síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária, suas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células normais, são mais resistentes a hipóxia, mais indiferenciadas, têm menor adesão entre si, tem motilidade considerável e geralmente originam metástase (BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2006).

Pode-se dizer que o câncer é uma doença essencialmente genética cujos processos de iniciação e progressão envolvem etapas nas quais o DNA acumula uma série de mutações decorrentes de alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos. Essas alterações, estruturais e/ou funcionais, levam à ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, além de comprometer também genes de reparo e genes de apoptose. Sabe-se que os fatores ambientais possuem um importante papel na etiologia do câncer e, dentre os principais fatores, destacam-se os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e o estilo de vida do indivíduo. Além disso, fatores endógenos relacionados com o sistema de reparo a danos do DNA e o sistema de detoxificação e eliminação de carcinógeno também influenciam a carcinogênese. Todos esses fatores atuam desencadeando alterações no DNA da célula que culminam na transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Do ponto de vista físico, os tumores malignos podem ser classificados como tumores sólidos ou císticos. É sabido que os tumores sólidos apresentam características fisiopatológicas peculiares tais como hipervascularização, arquitetura vascular incompleta, secreção de fatores de permeabilidade vascular e ausência de um sistema linfático efetivo. Alguns estudos demonstraram que essas características são a base do chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentados (efeito EPR) (MAEDA *et al.*, 2000). Os tumores sólidos possuem capilares com permeabilidade aumentada, em relação aos vasos normais, como resultado do processo de angiogênese. Esses capilares possuem poros de diâmetro

que variam de 100 a 800 nm, permitindo a penetração de macromoléculas. Além disso, os tecidos tumorais são caracterizados por alta pressão intersticial, que pode retardar o extravasamento dessas macromoléculas. A falta de um sistema linfático para drenagem resulta em acúmulo dessas partículas no interior dos tecidos tumorais, ocasionando o efeito EPR. Outra característica importante dos tecidos patológicos (tumores, inflamações e infecções) é a presença de um pH extracelular menor que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Segundo Stubbs e colaboradores (1999), a principal explicação para essa diferença de gradiente de pH entre tecidos normais e tumorais está relacionada com o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da célula cancerosa.

2.2 Tratamento do Câncer

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a erradicação da doença. Entretanto, nas situações onde a cura é impossível, o foco passa a ser a melhoria dos sintomas e a preservação da qualidade de vida associada a um aumento da sobrevida dos pacientes. Atualmente, as modalidades de tratamento do câncer incluem processos cirúrgicos, terapia radioativa, quimioterapia e terapia biológica (imunoterapia e terapia gênica). A aplicação isolada ou a associação de tais modalidades tem maximizado a chance de cura ou o controle da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor está em estágio inicial e não apresenta metástase. A terapia radioativa é frequentemente combinada com a cirurgia com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito utilizada. Entretanto, em aproximadamente dois terços dos pacientes, as neoplasias se caracterizam por micrometástases, o que torna

necessária uma terapia sistêmica que pode ser efetuada com o tratamento quimioterápico (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com relação à quimioterapia, o foco principal dessa modalidade terapêutica envolve a destruição das células neoplásicas. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, as capilares e as do sistema imunológico. Esse fato explica a ocorrência de uma série de efeitos adversos altamente deletérios para o organismo em decorrência da quimioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005). Nesse contexto, um dos grandes desafios enfrentados na quimioterapia do câncer é o desenvolvimento de agentes antineoplásicos que apresentem baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral. Atualmente, não existem fármacos que satisfaçam estes critérios, e a utilização clínica dos agentes antitumorais exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na busca de um índice terapêutico favorável. Dentre os quimioterápicos mais utilizados destacam-se os derivados de platina, como a CDDP.

2.3 Cisplatina

O potencial da CDDP como agente antitumoral foi reconhecido a partir de uma observação feita por Barnett Rosenberg e colaboradores (1969), ao estudar os possíveis efeitos de um campo elétrico sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Eles observaram que as bactérias apresentavam um crescimento totalmente irregular e filamentoso e, de forma inesperada, paravam de se dividir. Esse fato foi atribuído não aos fenômenos elétricos, mas sim à presença de um agente químico, a CDDP. Estudos adicionais determinaram que o isômero cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ era o principal responsável pela alteração no padrão de crescimento das bactérias. Em seguida, demonstraram que esse mesmo isômero apresentou elevada atividade antitumoral em ratos implantados com células de sarcoma 180 e de leucemia 1210. Em 1978, a CDDP foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico.

Considerado um dos quimioterápicos mais efetivos e potentes na terapia antitumoral, a CDDP é frequentemente utilizada em combinação com outros fármacos como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; KONDAGUNTA *et al.*, 2005; MUGGIA; FOJO, 2004). Atualmente, a CDDP vem sendo também utilizada no tratamento da carcinomatose peritoneal, uma doença comum em pacientes com câncer ginecológico e do trato gastrointestinal (ARMSTRONG *et al.*, 2006).

Quimicamente, a CDDP é o cis-diaminodicloroplatina (II), um complexo inorgânico divalente de configuração planar formado por um átomo de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amônio na posição *cis* do plano horizontal (**Figura 1**).

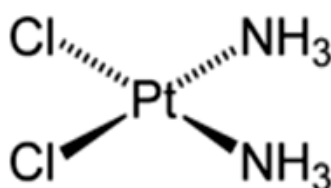


Figura 1 - Fórmula estrutural da cisplatina.

O mecanismo de ação da CDDP está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA. O principal sítio de ligação da CDDP com o DNA é o N7 da guanina, embora também existam relatos de ligação com N3 da adenina. A CDDP desencadeia ligações cruzadas intra e interfilamentos em particular com a guanina e adenina mudando a conformação do DNA e inibindo a sua síntese (**Figura 2**).

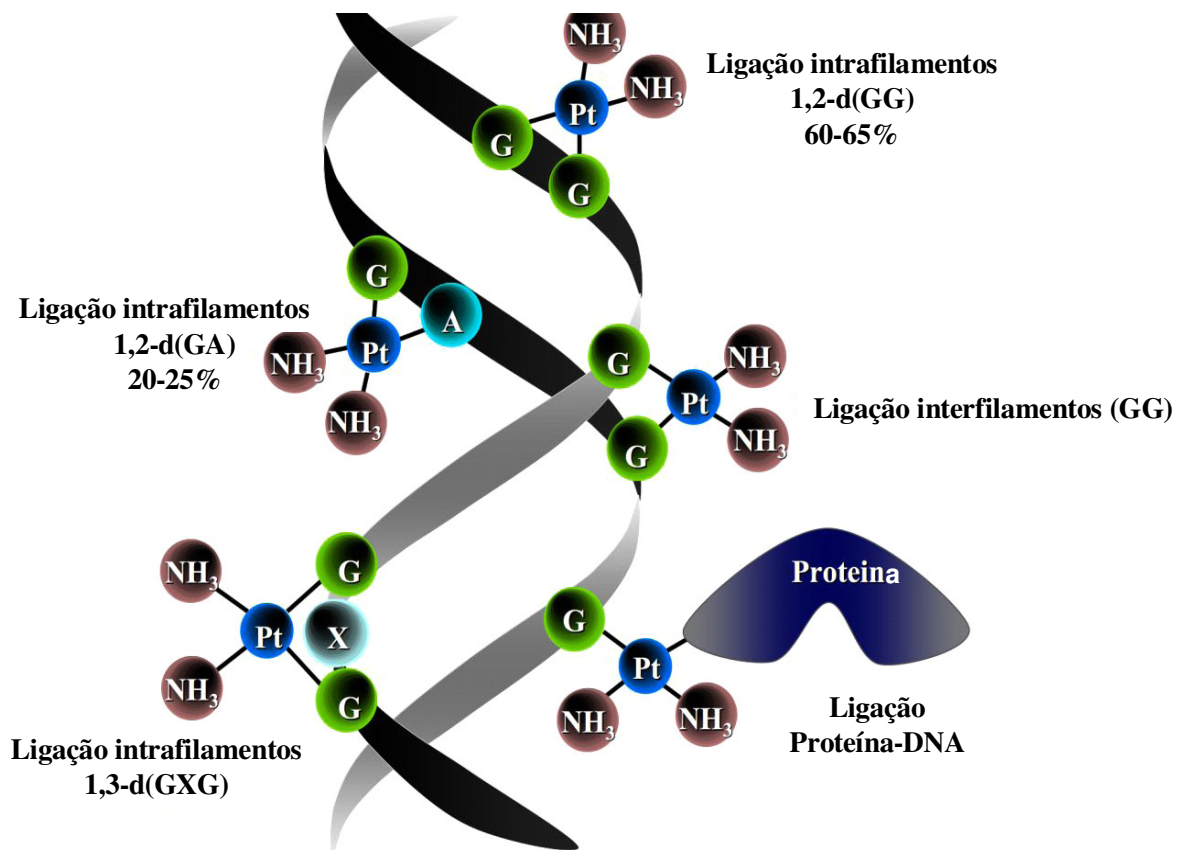


Figura 2 - Formação dos aductos da CDDP. O átomo de platina se liga covalentemente à posição N7 da guanina e N3 da adenina, formando ligações cruzadas 1,2 ou 1,3 intrafilamentos ou ligações cruzadas interfilamentos. Pt (platina), G (guanina), A (adenina) (adaptado de BOULIKAS, 2007).

Após penetrar na célula, os íons cloreto da molécula de CDDP são lentamente deslocados por moléculas de água formando complexos de platina carregados positivamente, a espécie ativa da CDDP, que interagem com sítios nucleofílicos de DNA, RNA e proteínas. Esse processo é desencadeado devido à baixa concentração intracelular (~3-20 mM) de íons cloreto em relação à concentração extracelular (~100 mM). A hidrólise intracelular da CDDP leva à formação de metabólitos ativos, diaquo-diamino-platino e mono-cloro-mono-aquo-diaminoplatino, capazes de alquilar bases púricas e pirimídicas do DNA (**Figura 3**). Estudos prévios demonstraram que as alterações conformacionais ocasionadas pela ligação da

CDDP ao DNA afetam os processos de replicação e transcrição, provocando torções da fita de DNA que dificultam a ação de enzimas de reparo e o remodelamento da cromatina e leva a célula cancerosa à morte por apoptose (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003).

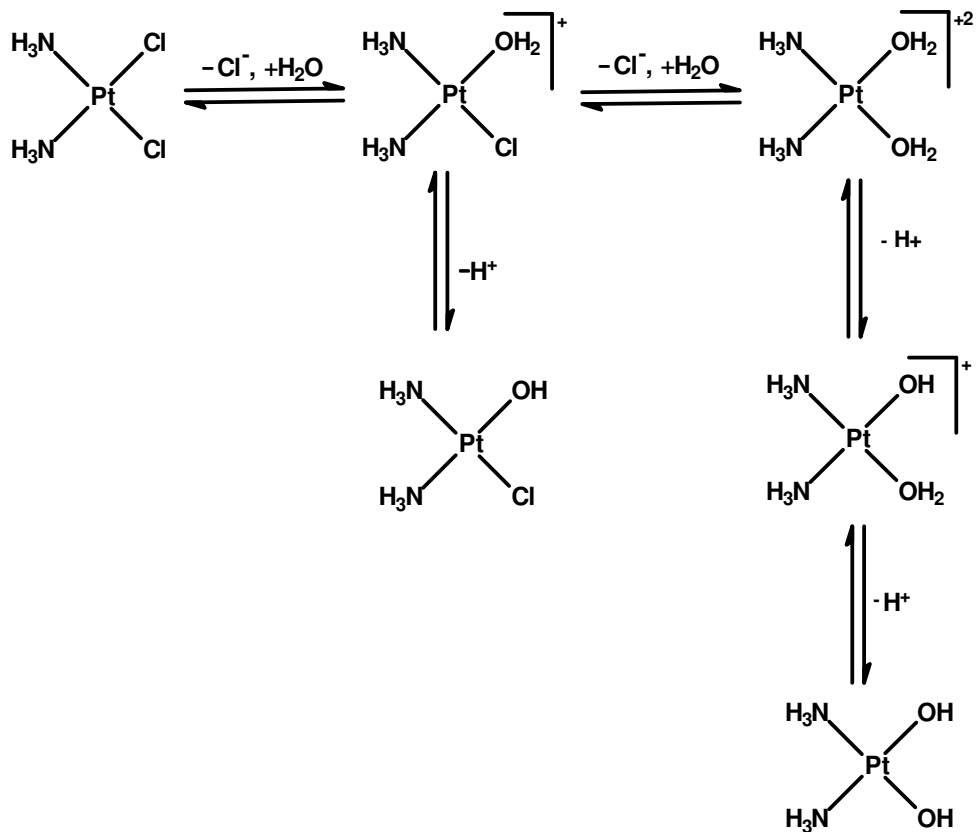


Figura 3 - Reações de hidrólise da CDDP.

A CDDP é comumente administrada por via parenteral, principalmente por via IV e IP. Comercialmente, está disponível como solução injetável na concentração de 1 mg/mL. Os esquemas típicos de administração IV de CDDP, como agente único a adultos ou crianças, são: 50-100 mg/m² como infusão a cada 3 ou 4 semanas; ou infusão de 15-20 mg/m² por dia durante 5 dias consecutivos, a ser repetido a cada 3 ou 4 semanas (MARTINDALE, 2005). Por via IP, os regimes terapêuticos utilizam a CDDP também nas doses de 50-100 mg/m², normalmente em associação com

outros quimioterápicos (ARMSTRONG *et al.*, 2006, MARKMAN *et al.*, 2006). Entretanto, a administração continuada deste quimioterápico é bastante limitada em função de reações adversas graves, incluindo efeitos agudos como náusea e vômitos além de efeitos adversos crônicos, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade e ototoxicidade. A disfunção renal manifesta-se como o efeito adverso mais problemático, dificultando o tratamento quimioterápico. É sabido que os efeitos terapêuticos da CDDP são significativamente melhorados com o aumento da dose administrada, no entanto, doses mais altas implicam em maior vulnerabilidade dos rins aos efeitos deletérios, os quais se manifestam, principalmente, por comprometimento dos túbulos renais e redução da taxa de filtração glomerular (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

Segundo revisão feita por Yao e colaboradores (2007), o mecanismo de nefrotoxicidade da CDDP envolve sua conversão a moléculas potencialmente nefrotóxicas nas células dos túbulos proximais. Concentrações elevadas de CDDP são encontradas no citosol, mitocôndria, núcleo e microssomas. Sabe-se que a captação de CDDP ocorre principalmente através de transportadores orgânicos de cátion (TOC) e, os rins acumulam CDDP em maior grau que os outros órgãos sendo a sua principal fonte de excreção. Existem basicamente três isoformas de TOC conhecidas como TOC 1, TOC 2 e TOC 3, as quais são expressas no fígado, rim e placenta, respectivamente. Em humanos, a CDDP não é transportada por TOC 1, mas por TOC 2, o que explica parcialmente a maior toxicidade renal induzida pela CDDP (YAO *et al.*, 2007). A CDDP é conjugada à glutathione (GSH) e metabolizada, via γ -glutamyltransferase (GGT), a um composto tiol reativo, uma potente nefrotoxina (**Figura 4**). A GGT é uma enzima localizada na superfície da membrana celular e é responsável pela clivagem de GSH extracelular em ácido glutâmico e cisteinil-glicina. A cisteinil-glicina por sua vez é clivada a cisteína e glicina por uma diaminopeptidase. Dessa forma, GGT proporciona uma elevação nos níveis de cisteína intracelular, a qual pode tornar-se limitante para o crescimento celular e para a síntese de GSH intracelular. Vários estudos têm demonstrado que níveis elevados de GGT nas células dos túbulos renais aumentam a sensibilidade dessas células à toxicidade pela CDDP. Por outro lado, a expressão aumentada nas células cancerosas torna-as mais resistentes à CDDP (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

Essa diferença do papel de GGT na atividade antitumoral e na nefrotoxicidade sugere que o mecanismo pelo qual a CDDP destrói as células cancerosas é distinto do mecanismo que induz a morte celular das células do tecido renal.

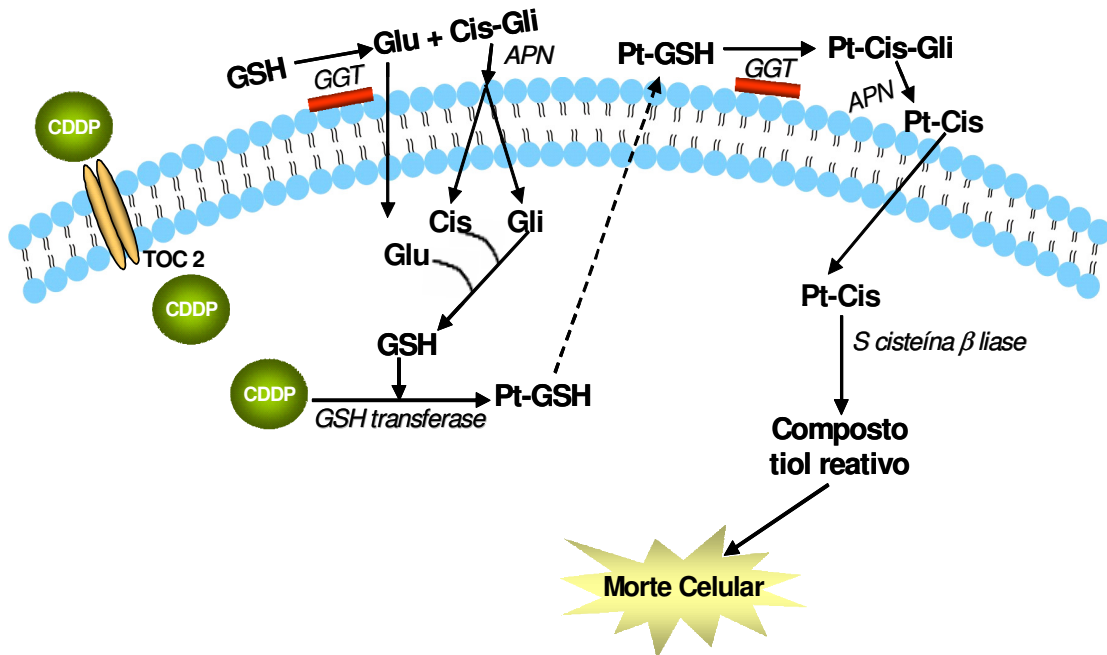


Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de toxicidade da CDDP via γ -glutamilttransferase (GGT). Glutationa (GSH), ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cis), glicina (Gli), diaminopeptidase (APN), transportadores orgânicos de cátions (TOC).

Embora, os mecanismos *in vivo* de nefrotoxicidade não estejam bem elucidados, alguns estudos sugerem uma correlação com os mecanismos de apoptose, inflamação, fibrogênese e estresse oxidativo. Dependendo do tempo de exposição e da dose administrada, a CDDP pode ainda induzir morte das células tubulares por necrose ou por apoptose. Estudos têm demonstrado que em altas concentrações, a CDDP induz morte celular por necrose enquanto em baixas concentrações o fármaco induz morte celular por apoptose por uma via dependente de caspase 3. Além disso, as alterações mais comuns nos estudos histopatológicos do tecido renal incluem necrose tubular, degeneração e edema intersticial (UEHARA *et al.*, 2005).

Além dos efeitos adversos graves, a CDDP apresenta outros inconvenientes como a capacidade de interagir com outros fármacos administrados concomitantemente na terapia antineoplásica e o desenvolvimento de resistência clínica. Como exemplo de incompatibilidades da CDDP com outros fármacos ou constituintes da formulação pode-se citar: (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 % (p/v); (iii) degradação da CDDP decorrente de sua interação com trometamol, um excipiente utilizado na formulação de 5-fluouracila (FOURNIER *et al.*, 1992; TRISSEL *et al.*, 1996). Com relação à resistência adquirida, quatro alterações bioquímicas parecem estar envolvidas: (i) aumento dos níveis de GSH; (ii) aumento dos níveis de metalotioneína; (iii) aumento na capacidade de reparo celular; (iv) alterações no influxo e efluxo da CDDP nas células (MONTI *et al.*, 2005). A GSH é um nucleófilo potente que reage com a CDDP antes que essa se ligue ao DNA, formando um complexo que é eliminado da célula. A metalotioneína é uma proteína de 61-62 aminoácidos que se liga à CDDP produzindo um composto com 10 átomos de platina por molécula. Alguns estudos demonstraram um aumento significativo dos níveis de GSH e/ou metalotioneína em linhagens de células resistentes à CDDP (RABIK; DOLAN, 2007). Outro fator responsável pela redução da citotoxicidade é o aumento na capacidade de reparo, o qual pode ser determinado por uma competição entre as proteínas responsáveis pelo reparo do DNA e o sinal de apoptose (CHU, 1994). Além disso, estudos têm demonstrado que as linhagens tumorais resistentes acumulam menos CDDP que as linhagens sensíveis (JAIN *et al.*, 1996)

Na tentativa de contornar esses inconvenientes e melhorar o índice terapêutico da CDDP, tem sido proposto o desenvolvimento de análogos menos tóxicos que a CDDP, como por exemplo, carboplatina e oxaliplatina. Porém, nenhum deles apresenta um amplo espectro de ação como a CDDP (BOULIKAS, 2007). Outra estratégia adotada refere-se a modificações farmacotécnicas como a encapsulação da CDDP em sistemas de liberação de fármacos, tais como microesferas (KUMAGAI *et al.*, 1996; TAMURA *et al.*, 2002a), nanocápsulas (BURGER *et al.*, 2002; VELINOVA *et al.*, 2004), micelas (MIZUMURA *et al.*, 2001; NISHIYAMA *et al.*, 2003) e lipossomas (BOULIKAS, 2004; HARRINGTON *et al.*, 2001; CARVALHO-JUNIOR *et al.*, 2007a).

2.4 Lipossomas

Esses sistemas foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores (1965) como modelo de membrana biológica. Durante estudos para avaliar a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, Bangham observou que alguns lípides, em meio aquoso, se organizavam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas, os lipossomas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram suspensas coloidalmente em um meio aquoso externo (**Figura 5**). Em 1971, Gregoriadis e colaboradores propuseram a utilização dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos. O grande potencial terapêutico dos lipossomas deve-se a sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição lipídica, carga superficial, fluidez da membrana e sua capacidade de incorporar fármacos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos.

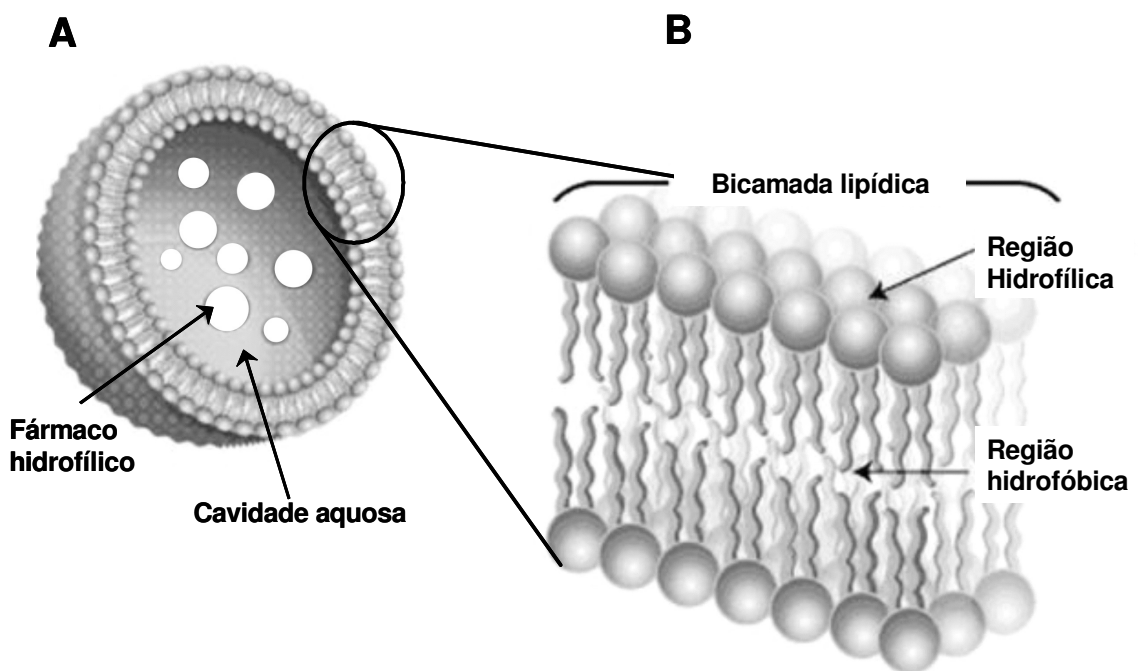


Figura 5 - Representação esquemática do lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa, com material hidrofílico em seu interior, envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos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

Os lipossomas podem ser classificados com relação ao tamanho, número de bicamadas, composição e mecanismo de liberação intracelular. Lipossomas que apresentam apenas um compartimento aquoso circundado por uma bicamada lipídica são denominados unilamelares de pequeno tamanho (SUV, *Small Unilamellar Vesicles*) com diâmetro médio de 25 a 100 nm ou unilamelares de grande tamanho (LUV, *Large Unilamellar Vesicles*) com diâmetro médio superior a 100 nm. Aqueles que apresentam vários compartimentos aquosos circundados por várias bicamadas lipídicas são denominados lipossomas multilamelares (MLV, *Multilamellar Vesicles*) e possuem diâmetro médio superior a 1000 nm (LASIC, 1998). Com relação à composição e ao mecanismo de liberação intracelular, as vesículas podem ser classificadas como convencionais, de circulação prolongada e polimórficas, incluindo nessa última classe, os lipossomas pH-sensíveis, termo-sensíveis e catiônicos (BATISTA *et al.*, 2007).

Inicialmente, o desenvolvimento de sistemas vesiculares encontrou alguns obstáculos no âmbito farmacêutico e farmacológico. Sob o aspecto farmacêutico, os lipossomas apresentavam uma instabilidade físico-química e biológica e baixa eficiência de encapsulação dos fármacos. Em relação ao aspecto farmacológico, os lipossomas eram rapidamente capturados pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) após administração sistêmica. Estudos sobre o comportamento *in vivo* da primeira geração de lipossomas, denominados convencionais, demonstraram que os mesmos se acumulavam rapidamente em tecidos ricos em macrófagos tais como fígado, baço e medula óssea e, eram rapidamente eliminados da circulação sanguínea, limitando sua ação em outros tecidos (ALLEN; HANSEN, 1991). A partir disso, foram propostas a incorporação de glicolípidos na membrana lipídica bem como modificações químicas na superfície dos lipossomas com o objetivo de torná-los capazes de escapar do SFM e permanecerem um tempo maior na circulação sanguínea (revisado por GABIZON; PAPAHAADJOPOULOS, 1992). Esses lipossomas modificados, conhecidos como lipossomas de circulação prolongada, representaram um grande passo para a sua aplicação *in vivo*. Allen e Chonn (1987) desenvolveram os primeiros lipossomas de circulação prolongada contendo monosialogangliosídeos e observaram uma redução significativa na captação pelos macrófagos do SFM. Entretanto, os monosialogangliosídeos apresentam alguns inconvenientes como a fonte de extração (cérebro de gado), que

é considerada inadequada para uso farmacêutico e o custo elevado do processo extrativo. Em 1990, Klibanov e colaboradores mostraram que a incorporação de um polímero hidrofílico, o polietilenoglicol (PEG), na bicamada lipídica aumentou significativamente o tempo de circulação sanguínea dos lipossomas. Segundo esses autores, a presença de grupos volumosos hidrofílicos na superfície dos lipossomas constitui um impedimento estérico à ligação de proteínas plasmáticas, opsoninas, impedindo o reconhecimento e a destruição pelas células do SFM. Alguns estudos têm mostrado que, independente da composição lipídica e da carga superficial, a capacidade de evasão do SFM assim como as propriedades de circulação prolongada das vesículas são decorrentes da presença de grupos hidrofílicos como o PEG. De modo geral, concentrações de 5-10 % de PEG com massa molecular variando de 1000-2000 Da são suficientes para reduzir a opsonização e conferir maior estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

Na tentativa de aumentar a especificidade de interação dos lipossomas com as células-alvo e a quantidade do fármaco liberado nestas células, o desenvolvimento de lipossomas polimórficos, entre eles lipossomas pH-sensíveis, também têm sido proposto. O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos patológicos como tumores, tecidos inflamados e infecciosos apresentam um pH extracelular menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967). Os lipossomas pH-sensíveis consistem na combinação de lípides insaturados, como a fosfatidiletanolamina (PE) e seus derivados, entre eles a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), com compostos carboxilados como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS) (**Figura 6**) (SIMÕES *et al.*, 2004).

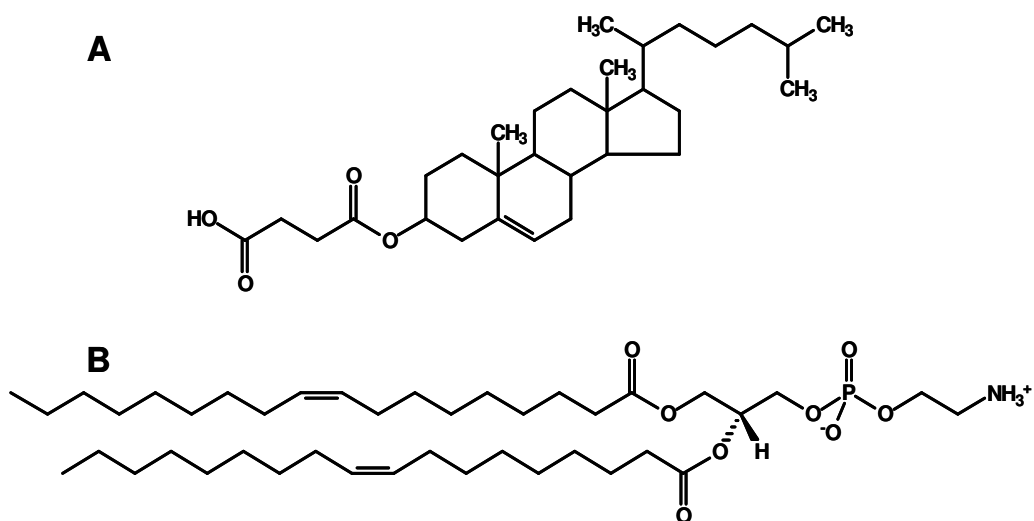


Figura 6 – Estruturas químicas do hemissuccinato de colesterila (A) e dioleoilfosfatidiletanolamina (B).

Ao contrário da maioria dos fosfolípides, a PE apresenta uma cabeça polar pequena e pouco hidratada, a qual ocupa um volume menor quando comparado com sua respectiva cadeia de hidrocarboneto, exibindo, portanto, uma organização supramolecular do tipo cônica. Essa organização favorece a formação de interações intermoleculares entre grupos amina e fosfato da cabeça polar, o que explica a tendência dessas moléculas em adquirir a fase hexagonal invertida (H_{II}) não sendo capazes de formar vesículas. A obtenção de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, como o CHEMS, os quais encontram-se sob a forma ionizada em pH fisiológico. O CHEMS se distribui homogêaneamente entre as moléculas de PE e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupos carboxílicos presentes no CHEMS e os grupos fosfatos presentes nos fosfolípides favorece a organização lamelar e a formação dos lipossomas (**Figura 7**). Enquanto em pH fisiológico esses lipossomas são estáveis, sua exposição a um meio ácido, como é o caso dos tecidos tumorais, resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; SIMÕES *et al.*, 2004). Além disso, deve-se enfatizar que ao considerar a

administração IV, para alcançar as células alvo, como por exemplo, as células cancerosas, os lipossomas precisam exibir tempo de circulação prolongado. Estudos têm mostrado que a inclusão de fosfolípides acoplado ao PEG aumenta a estabilidade *in vivo* e proporciona maior tempo de circulação sanguínea sem alterar suas propriedades de pH-sensibilidade até atingir o órgão ou tecido alvo (SIMÕES *et al.*, 2004).

Diante disso, o emprego de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada como carreadores de agentes antineoplásicos, especificamente da CDDP, pode ser uma alternativa potencial para a redução de sua toxicidade e para o aumento de sua eficácia antitumoral, conduzindo a uma liberação preferencial na região tumoral devido ao ambiente de menor pH em relação às regiões normais.

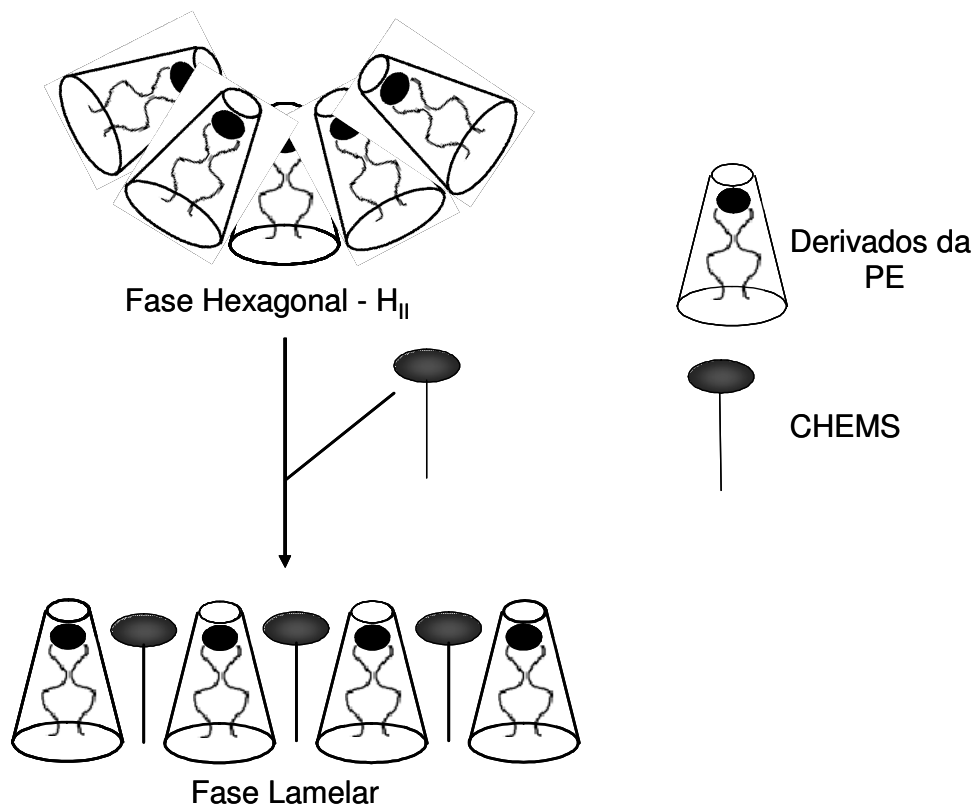


Figura 7 – Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.

2.4.1 Lipossomas de Cisplatina

Vários estudos têm demonstrado que os lipossomas podem modificar a distribuição tecidual do fármaco encapsulado, sendo esse comportamento dependente das características físico-químicas das vesículas e não do conteúdo encapsulado (FERRARI, 2005; HARRINGTON *et al.*, 2000). Como mencionado anteriormente, a CDDP livre é administrada por via IV e IP. Portanto, os estudos pré-clínicos bem como estudos clínicos, utilizando diferentes formulações lipossomais contendo CDDP, também têm focado a utilização de ambas as vias de administração.

2.4.1.1 Administração intravenosa

A utilização de sistemas nanoestruturados como carreadores de CDDP têm mostrado modificações importantes no perfil toxicológico e na atividade antitumoral desse antineoplásico, após administração por via IV.

Lipossomas convencionais contendo CDDP constituídos de fosfatidilcolina, fosfatidilserina e colesterol foram avaliados em ratos portadores de imunocitoma IgM. Os resultados mostraram menor incidência e severidade de lesões renais após a administração das formulações lipossomais em comparação com a CDDP livre. Por outro lado, a atividade antitumoral da CDDP lipossomal foi similar quando comparada com a CDDP livre (STEERENBERG *et al.*, 1988 *apud* HARRINGTON *et al.*, 2000).

Newman e colaboradores (1999) verificaram aumento da concentração da CDDP na região tumoral, melhora da eficácia terapêutica e redução da toxicidade em camundongos acometidos com carcinoma de cólon e pulmão após a administração de CDDP encapsulada em lipossomas de circulação prolongada. Essa formulação, conhecida como SPI-077, é constituída por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina associada a metoxipolietilenoglicol 2000 (DSPE-MPEG₂₀₀₀), razão molar 51:44:5, respectivamente. Os resultados

demonstraram que o nível de platina nos rins foi significativamente menor (cerca de quatro vezes) em animais tratados com a formulação lipossomal comparado àqueles tratados com a mesma dose de CDDP livre. Além disso, quando os camundongos receberam uma dose de 100 mg/kg de CDDP lipossomal nenhuma morte foi observada, ao passo que a dose letal (DL₅₀) para a CDDP livre foi 12 mg/kg. Com relação aos estudos pré-clínicos de eficácia antitumoral realizado em camundongos portadores de tumor de cólon (C26) ou pulmão, Newman e colaboradores (1999) mostraram que SPI-077 exibiu atividade superior à CDDP livre. Entretanto, os estudos clínicos de fase I e II em pacientes portadores de carcinoma escamoso de cabeça e de pescoço avançado demonstraram ineficácia dessa formulação, sendo esse fato atribuído à baixa biodisponibilidade e a lenta cinética de liberação da CDDP a partir dos lipossomas (HARRINGTON *et al.*, 2001).

Estudos pré-clínicos de outra formulação lipossomal, denominada Lipoplatin[®], constituída por dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-MPEG₂₀₀₀ mostraram menor nefrotoxicidade após o tratamento com essa formulação em relação ao tratamento com a CDDP livre em camundongos e ratos (BOULIKAS, 2004; DEVARAJAN *et al.*, 2004). Os resultados desse estudo demonstraram que os animais tratados com CDDP livre desenvolveram insuficiência renal com clara evidência de danos tubular enquanto aqueles tratados com a mesma dose de Lipoplatin não apresentaram injúria renal (DEVARAJAN *et al.*, 2004). Outro estudo realizado em cães permitiu definir que o Lipoplatin pode ser seguramente administrado na dose de 150 mg/m² sem a necessidade de protocolos de hidratação, enquanto a dose máxima tolerada estabelecida após o tratamento com CDDP livre foi 70 mg/m². Stathopoulos e colaboradores (2005) conduziram um estudo clínico de fase I, administrando essa mesma formulação lipossomal contendo CDDP por infusão IV, em vinte e sete pacientes com tumores malignos avançados pré-tratados (19 com carcinoma pancreático, 6 com carcinoma de células renais, 1 com câncer gástrico e 1 com carcinoma escamoso de cabeça e de pescoço). Nesse estudo, os pacientes receberam doses de Lipoplatin[®] variando de 25 a 125 mg/m². Toxicidade hematológica e do trato gastrointestinal foram observadas apenas nos pacientes tratados com Lipoplatin[®] na dose de 125 mg/m². Entretanto, não foi observado o aparecimento de nefrotoxicidade em nenhum dos pacientes.

Carvalho-Júnior e colaboradores (2007a) avaliaram a biodistribuição da CDDP livre e dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo CDDP, administrados por via IV, em camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich. Esses lipossomas constituídos de DOPE, CHEMS e DSPE-MPEG₂₀₀₀ apresentaram uma razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente e uma concentração lipídica total igual a 40 mM. Os resultados demonstraram uma quantidade de CDDP na região tumoral duas vezes maior após a administração de SpHL-CDDP em relação à CDDP livre. Além disso, a retenção de CDDP no tecido renal e o coeficiente de partição tecido-sangue foi maior após a administração IV de CDDP livre em comparação com a administração de SpHL-CDDP. Esses resultados mostraram que a administração de SpHL-CDDP contribuiu para uma menor passagem de CDDP para o tecido renal, o que pode conseqüentemente reduzir a toxicidade neste órgão. Carvalho-Júnior e colaboradores (2007b) demonstraram ainda que os SpHL-CDDP apresentaram uma maior atividade citotóxica sobre linhagem celular A549 (células cancerosas de pulmão humano) do que a CDDP livre. Por outro lado, SpHL-CDDP exibiu a mesma eficiência antitumoral em células sensíveis (GLC4) e em células resistentes à CDDP (GLC4/CDDP), sugerindo que esta formulação lipossomal de CDDP pode burlar os mecanismos de resistência oferecidos pelas células à penetração do fármaco. Além disso, a atividade antitumoral de SpHL-CDDP e CDDP livre administrados na dose de 8 mg/kg, semanalmente por três ciclos, foi avaliada em modelo animal experimental portador de tumor sólido de Ehrlich e os resultados demonstraram efeitos similares em ambas as formulações (CARVALHO-JÚNIOR, 2008).

2.4.1.2 Administração intraperitoneal

Apesar do grande progresso na quimioterapia sistêmica, a maioria dos pacientes em tratamento oncológico ainda morre em função dessa doença. Atualmente, vários estudos têm demonstrado vantagens da terapia IP em relação à terapia sistêmica, tornando-a potencialmente benéfica em situações nas quais a doença permanece em grande parte limitada à cavidade peritoneal e desenvolve um quadro de

carcinomatose peritoneal. A carcinomatose peritoneal é uma forma frequente de metástase em pacientes com câncer gástrico, duodenal, pancreático e, principalmente, em mulheres com carcinoma ovariano. Esse tumor é caracterizado por múltiplos depósitos metastáticos variando de pequenos nódulos a grandes massas tumorais que frequentemente invadem órgãos subjacentes e, normalmente, são acompanhadas de ascite (CHAUFFERT *et al.*, 2003). Diante disso, foi introduzida na terapia a administração IP de quimioterápicos para o tratamento da carcinomatose peritoneal com o objetivo de aumentar os níveis do fármaco na região tumoral, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos.

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

Segundo revisão feita por Alberts e colaboradores (2006), três grandes estudos clínicos de fase III, conduzidos pelo Grupo de Oncologia Ginecológica (GOG 104, GOG 114 e GOG 172) investigaram a hipótese de que a administração IP de CDDP quando comparada à administração IV prolongaria a sobrevida de mulheres com câncer ovariano em estágio avançado. Os resultados do primeiro estudo, GOG 104, mostraram um aumento de oito meses na duração da sobrevida e 24% de redução da mortalidade no grupo tratado com o regime IP. Além disso, foi observado menor pico de concentração plasmática da CDDP, após administração IP, o que explicaria a menor incidência de toxicidade em relação àquelas tratadas com CDDP por via IV. Os dados do estudo GOG 114 demonstraram uma sobrevida média de 63 meses para as pacientes submetidas ao tratamento IP com CDDP enquanto que para aquelas que receberam o tratamento IV a sobrevida foi de 52 meses. Esse foi o primeiro estudo que apresentou uma sobrevida superior a cinco anos após administração IP de CDDP. O estudo mais recente, GOG 172, demonstrou uma

sobrevida média similar ao estudo GOG 114 (66 e 50 meses para as pacientes tratadas com CDDP por via IP e IV, respectivamente). Porém, um número menor de pacientes submetidas ao tratamento por via IP em relação à via IV completou todos os ciclos de tratamento (42 e 83%, respectivamente) devido aos efeitos tóxicos da quimioterapia, complicações relacionadas com o implante do cateter, recusa do paciente e aparecimento de infecção não advinda do implante do cateter.

Embora existam evidências de efeitos superiores da CDDP administrada por via IP em relação à via IV após cirurgia citoreduzora, o problema de sua toxicidade ainda permanece e parece ser um grande obstáculo para implementação efetiva da via IP (ARMSTRONG *et al.*, 2006; GORE *et al.*, 2006). Além disso, a administração IP da CDDP é limitada a pacientes que após cirurgia citoreduzora apresentam nódulos residuais com diâmetro inferior a 0,5 cm (CHAUFFERT *et al.*, 2003). Porém, a penetração de CDDP nas doses usuais não é suficiente para destruir as células tumorais localizadas no centro de grandes tumores. Para penetrar em um tumor profundamente, o fármaco deve estar em contato com o mesmo por um período de tempo prolongado ou em uma concentração consideravelmente mais alta. Entretanto, como a CDDP é um composto hidrossolúvel de baixa massa molar (300 Da), ela é absorvida rapidamente através dos capilares e atinge a circulação sanguínea, o que resulta em altas concentrações plasmáticas do fármaco e, conseqüentemente, nos efeitos adversos graves mencionados anteriormente.

Estudos recentes têm utilizado substâncias vasoconstritoras, como a epinefrina, com o objetivo de reduzir a passagem do fármaco da cavidade peritoneal para a corrente sanguínea, favorecendo conseqüentemente, sua difusão nos nódulos tumorais (FAVOULET *et al.*, 2001; CHAUFFERT *et al.*, 2003).

Outra estratégia a ser adotada visando manter o agente antineoplásico por um maior período de tempo na cavidade IP é o emprego de sistemas controladores da liberação, os lipossomas. Como as partículas corpusculares são absorvidas lentamente pelo sistema linfático, não são capazes de atravessar diretamente para a circulação sanguínea mediante a passagem pela membrana peritoneal, ficando retidas na cavidade peritoneal. Portanto, o uso dos lipossomas contendo agentes

antitumorais no tratamento da carcinomatose peritoneal poderia ter uma aplicação potencial (KUMAGAI *et al.*, 1996).

Boulikas (2004) demonstrou a redução de toxicidade após tratamento IP com lipossomas de CDDP, Lipoplatin[®], utilizando como modelo experimental ratos Wistar. Os resultados demonstraram valores normais para os parâmetros indicativos de toxicidades renal, hepática e medular no grupo de animais tratados com uma dose única (30 mg/kg) da formulação lipossomal em comparação com animais não tratados. No entanto, neutropenia grave foi observada no grupo de animais tratados com três doses repetidas de Lipoplatin[®] (30 mg/kg), administradas semanalmente, embora não tenha sido observada nefrotoxicidade mesmo após administração repetida. A redução dos efeitos tóxicos observada após administração dos lipossomas de CDDP em comparação à CDDP livre foi atribuída à alteração do perfil de biodistribuição da CDDP encapsulada em lipossomas.

Araújo e colaboradores (2008) avaliaram a biodistribuição de CDDP livre e de SpHL-CDDP, administrados por via IP, em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. Os resultados demonstraram uma quantidade de CDDP na região tumoral aproximadamente três vezes maior após a administração de SpHL-CDDP em relação à CDDP livre. Além disso, a retenção de CDDP no tecido renal foi menor após a administração de SpHL-CDDP livre em comparação com a administração de CDDP livre, o que pode conseqüentemente contribuir para a redução da toxicidade neste órgão.

2.5 Estudos pré-clínicos

Os estudos pré-clínicos são essenciais para dar embasamento à administração de novos medicamentos em seres humanos. Esses estudos devem checar os parâmetros de segurança e eficácia através da avaliação da toxicidade e da atividade *in vitro* e *in vivo*, fornecendo informações sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e a toxicologia de fármacos em desenvolvimento. Informações de segurança e eficácia obtidas nessa fase são fundamentais para estimar uma dose

inicial a ser administrada em seres humanos e identificar parâmetros a serem monitorados para detectar possíveis efeitos adversos (MEYER; SVENDSEN, 2003). Portanto, vale ressaltar que um grande número de entidades químicas não chega aos estudos clínicos devido a riscos inaceitáveis detectados nos estudos pré-clínicos.

Baseado nas orientações da *European Medicines Agency* (EMA) e *International Conference on Harmonisation* (ICH) para registro de medicamentos, os principais objetivos da avaliação pré-clínica de medicamentos antineoplásicos são: estabelecer a dose máxima tolerada (DMT) e identificar sinais de toxicidade em órgãos alvos relacionados à exposição do fármaco e a ciclos de tratamento para assegurar o aumento de doses nos estudos clínicos de fase I e a duração da terapia (EMA, 1998; ICH, 2008).

2.5.1 Estudo de toxicidade

Com relação à avaliação pré-clínica de segurança, estudos de toxicidade em dose única (toxicidade aguda), toxicidade após a administração de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade além de avaliação da segurança farmacológica e farmacocinética/toxicocinética deverão ser realizados. De modo geral, os estudos de segurança são conduzidos em duas espécies, sendo uma roedora e outra não-roedora, visando obter uma melhor base para a extrapolação dos dados de toxicidade para humanos. A escolha de um modelo experimental adequado requer informações prévias das semelhanças e diferenças entre o perfil farmacocinético no animal e no homem. Além disso, deve-se considerar a facilidade da reprodução ou aquisição da espécie, o tempo de crescimento/desenvolvimento e a facilidade de manuseio em condições experimentais. De acordo com essas informações, ratos e cães tem sido comumente utilizados em investigações de segurança (WHO, 2004).

Com base nas diferentes regulamentações preconizadas por diversos órgãos internacionais para estudo de toxicidade aguda (EMA, 1998; FDA, 1996; ICH,

2008), tais investigações devem ser conduzidas em animais saudáveis, de origem conhecida, com peso e idade adequados. Especificamente, com base nas regulamentações do EMEA (1998) e do ICH (2008) para o estudo de toxicidade aguda de agentes antineoplásicos, esse deve ser realizado em uma espécie roedora e, em casos onde essa espécie não apresenta boa correlação com a toxicidade humana, como por exemplo, para os antifolatos ou novos agentes sob investigação que apresentem um novo mecanismo de ação, os estudos devem também ser conduzidos em uma espécie não-roedora. Os guias preconizam ainda que o período de acompanhamento dos animais seja de no mínimo quatorze dias pós-tratamento e que, em todos os grupos experimentais sejam avaliados os sinais clínicos, o peso corporal e a patologia clínica (hematológica e química clínica) e ainda, que todos os animais sejam necropsiados.

Como mencionado anteriormente, o uso da CDDP na prática clínica é limitado em função de seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, mielotoxicidade e distúrbios gastrintestinais. Além disso, há relatos de que a administração de altas doses de CDDP induz hepatotoxicidade (PRATIBHA *et al.*, 2006). Neste contexto, a avaliação da bioquímica clínica de uma nova formulação contendo CDDP deve inicialmente focar, dentre outros, os parâmetros que avaliem a função renal e a função hepática.

2.5.1.2 Função renal

Os rins são órgãos dinâmicos que representam o maior sistema de controle da homeostase corporal. Apresentam como principal função a formação da urina por meio da ultrafiltração nos glomérulos, da reabsorção tubular seletiva de água e solutos e da secreção tubular seletiva de solutos. Além disso, atuam na produção de hormônios tais como eritropoietina (estimula a produção de eritrócitos) e renina (mantém as concentrações de sódio e, conseqüentemente, a pressão arterial) e na metabolização de vitamina D (GUYTON; HALL, 1998). Embora constituam menos de 1% da massa corporal, os rins recebem cerca de 20 a 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e, conseqüentemente, todo fármaco ou substância química que atinja a

circulação sistêmica atingirá os rins em quantidades elevadas. Portanto, os rins são considerados alvos frequentes de toxicidade de muitos xenobióticos (DEKANT; VAMVAKAS, 1996). Vários fatores estão envolvidos na maior susceptibilidade dos rins aos efeitos tóxicos dos fármacos, entretanto, o alto fluxo sanguíneo e a concentração de alguns fármacos pelo mecanismo de reabsorção tubular são os mais importantes. Além disso, a biotransformação dos fármacos, em especial da CDDP, em metabólitos reativos potencialmente tóxicos é um fator importante no desenvolvimento de nefrotoxicidade. Nos túbulos proximais são encontrados altos níveis de enzimas responsáveis pelo processo de metabolização (como a enzima citocromo P450), tornando-os particularmente susceptíveis aos danos químicos. Como os metabólitos são geralmente instáveis, tendem a interagir com as macromoléculas presentes nos sítios onde foram gerados, induzindo assim aos efeitos tóxicos. Além disso, altas concentrações de GSH são também encontradas nos rins o que demonstra o seu importante papel nos mecanismos de detoxificação (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

Como o rim é o órgão alvo de toxicidade da CDDP, alterações significativas nas funções normais são comumente observadas após o tratamento com esse antineoplásico, estabelecendo com frequência um quadro de insuficiência renal aguda. Uma redução de 20 a 40% na taxa de filtração glomerular, assim como aumento nos níveis séricos de uréia e creatinina, são alterações frequentes observadas após o tratamento com CDDP (DEKANT; VAMVAKAS, 1996). A maioria dos estudos para acompanhamento da função renal de animais tratados com CDDP utiliza como parâmetros avaliativos a determinação plasmática de uréia e creatinina, bem como a avaliação morfológica do tecido renal.

A uréia é o produto final do catabolismo protéico sendo sintetizada primariamente no fígado e excretada principalmente pelos rins. Um aumento na uréia sanguínea pode refletir tanto uma aceleração no catabolismo protéico quanto uma diminuição na sua excreção urinária. Níveis aumentados de uréia são comumente encontrados em situações clínicas de hipercatabolismo protéico, glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda, dentre outros. Por outro lado, uma redução nos níveis séricos de uréia pode ser detectada em quadros de insuficiência hepática grave, diminuição do

catabolismo protéico e nefrose não complicada de insuficiência renal (MILLER, 1999).

A creatinina é uma substância nitrogenada não protéica formada durante o metabolismo muscular da creatina e fosfocreatina. A creatinina é excretada por filtração glomerular e não é secretada nem reabsorvida em quantidades significativas. Contudo, elevações nos níveis séricos de creatinina são consideradas importantes indicativos de comprometimento da função renal. Apesar de ser um teste específico na identificação de disfunção renal, alterações nos níveis de creatinina são detectadas somente após a perda de aproximadamente 50% da função renal, o que torna o teste tardio, pouco sensível e impreciso (MILLER, 1999). É sabido ainda que nos estágios iniciais de falência renal, pode ocorrer aumento na secreção de creatinina, o que reduz seus níveis plasmáticos. Portanto, nesses estágios iniciais, a razão uréia/creatinina é utilizada como um marcador importante que reflete uma redução na perfusão renal bem como na taxa de filtração glomerular, sugerindo um dano renal inicial que leva à falência renal (ASNA *et al.*, 2005).

Com relação às alterações morfológicas do tecido renal advindas da administração de CDDP, essas são observadas principalmente nas células epiteliais do segmento S3, e, inicialmente são detectadas nos túbulos proximais. As análises microscópicas revelam degeneração, necrose e descamação das células epiteliais. Nos quadros de falha renal aguda, a lesão predominante é a necrose aguda, cuja severidade é dose e tempo-dependente (YAO *et al.*, 2007).

2.5.1.2 Função hepática

Se por um lado, a nefrotoxicidade decorrente do tratamento com CDDP é bem caracterizada e é um fator limitante da terapia com CDDP, por outro, pouco se sabe sobre os danos hepáticos induzidos por esse fármaco. Além disso, a hepatotoxicidade não é um fator limitante da terapia, mas ocorre comumente quando a CDDP é administrada em altas doses (PRATIBA *et al.*, 2006).

O fígado, através de suas enzimas, participa de complexas funções de armazenar, sintetizar, metabolizar, conjugar e excretar numerosas substâncias endógenas e exógenas. Por ser um órgão com diversas funções metabólicas, qualquer avaliação do seu estado funcional será dependente da sua capacidade de executar uma função metabólica específica. Por isso, provas bioquímicas realizadas no soro sanguíneo tornam-se um excelente subsídio para a elucidação de comprometimento hepático induzido por diferentes fármacos (MEYER; SVENDSEN, 2003). Dentre os exames laboratoriais utilizados para avaliar a função hepática, tem sido recomendado à avaliação da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e GGT, além da determinação do proteinograma e dos níveis das bilirrubinas.

Em condições fisiológicas, as enzimas são encontradas em pequenas quantidades no plasma sanguíneo e em grandes quantidades no interior das células de certos tecidos. Assim, um aumento da atividade sérica de tais enzimas indica alterações teciduais decorrente do aumento da permeabilidade da membrana celular e extravasamento dessas enzimas para o plasma sanguíneo (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Em pequenos animais, a dosagem sérica de ALT é o teste de escolha para avaliar o comprometimento hepático. A ALT é uma enzima que está livre no citoplasma dos hepatócitos e é essencialmente hepato-específica para cães e gatos. Qualquer lesão tissular ou doença que afete o parênquima hepático induz a liberação de ALT na corrente sanguínea. Dessa forma, a ALT além de ser sensível é bastante específica para o diagnóstico de lesão hepática. O aumento da ALT está relacionado com a extensão da lesão e não com a gravidade da mesma. Portanto, mesmo que uma lesão não cause morte celular, pode ser suficiente para induzir a liberação de ALT na corrente sanguínea (KRAMER; HOFFMAN, 1997). A AST também é comumente utilizada para avaliar lesão hepática em pequenos animais, porém apresenta menor especificidade que ALT. Por ser uma enzima citosólica e mitocondrial, a liberação de AST na corrente sanguínea apenas ocorre com uma lesão de maior extensão. Portanto, o aumento da atividade enzimática sérica de AST é diretamente proporcional ao número de hepatócitos afetados. Outro marcador utilizado no diagnóstico de lesão hepatocelular é a FA. Embora, nem todo

comprometimento hepático cause um aumento significativo dessa enzima, necrose hepatocelular geralmente leva a um aumento transitório da FA (KRAMER; HOFFMAN, 1997). Com relação a GGT, a membrana celular do epitélio do ducto biliar apresenta grande atividade enzimática da GGT (KRAMER; HOFFMAN, 1997). Sua elevação é a alteração laboratorial mais frequente nas doenças hepatobiliares, pois é observada nas lesões hepáticas inflamatórias, tóxicas e nas colestases. Dessa forma, a atividade sérica de GGT está aumentada, em grau dependente da magnitude da hiperplasia e do bloqueio do sistema biliar. A GGT tem maior especificidade que a AST e a FA para avaliar doença hepática (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Na patologia clínica, a avaliação do proteinograma também tem grande importância para o estabelecimento do grau de comprometimento hepático, visto que o fígado é o principal responsável pela produção de proteínas plasmáticas e, que a albumina é produzida exclusivamente por esse órgão. Diante disso, a determinação dos teores séricos de proteína total deve estar associada à quantificação de albumina sérica e, eventualmente, ao fracionamento eletroforético de globulinas. Geralmente não se observa hipoalbuminemia até que ocorra perda de 60 a 80% da função hepática (TRALL, 2007). Embora a maior parte das globulinas que participam do sistema imune seja sintetizada nos tecidos linfóide, o fígado é outro importante órgão de síntese. A insuficiência hepática pode resultar em menor síntese, portanto em menor concentração sérica de globulina. Segundo Kramer e Hoffman (1997), o primeiro sinal de anormalidade hepática é comumente identificado pela menor proporção de albumina em relação à globulina.

Por fim, a dosagem de bilirrubina sérica também tem grande importância no diagnóstico de hepatopatias. A bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina, após a destruição normal ou patológica das hemácias. Ao ser lançada no plasma, a bilirrubina liga-se rapidamente à albumina formando um complexo que é denominado bilirrubina não conjugada ou indireta. Ao passar pelos hepatócitos, a bilirrubina se desliga da albumina e conjuga-se ao ácido glicurônico, transformando-se em glicuronídeos de bilirrubina, conhecidos como bilirrubina conjugada ou direta. Nos quadros de lesões hepatocelulares aguda ocorre aumento simultâneo das bilirrubinas direta e indireta (MILLER; GONÇALVES, 1999).

2.5.2 Avaliação da atividade antitumoral

Os estudos *in vivo* de atividade antitumoral são frequentemente conduzidos em roedores, principalmente camundongos, levando em consideração as prováveis diferenças com o homem no que diz respeito à farmacocinética e farmacodinâmica. A seleção de um modelo animal adequado, incluindo espécie, cepa e tipo de tumor, deve ser dependente das propriedades do agente quimioterápico e das indicações terapêuticas propostas (EMEA, 1998).

Na oncologia, diversos modelos experimentais têm sido propostos, quer para compreender os mecanismos básicos da biologia tumoral quer para a investigação de novas modalidades terapêuticas. Os modelos de tumores experimentais transplantáveis são os mais utilizados, dentre eles, os tumores ascítico e sólido de Ehrlich. Essa utilização decorre principalmente da facilidade de padronização do número e das características das células tumorais inoculadas e devido ao desenvolvimento rápido da neoplasia, o que restringe o tempo de estudo (DAGLI *et al.*, 1992).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna e corresponde a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea (EHRlich, 1906). Esse tumor desenvolve-se em cavidades serosas como a abdominal e pleural, bem como em músculos. As formas ascítica ou sólida de seu crescimento ocorrem conforme o local de inoculação. Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica, desenvolvendo um quadro de carcinomatose peritoneal. Essa forma tem como característica um grande acúmulo de líquido no abdômen e uma baixa resposta inflamatória, com pequeno infiltrado de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade. Quando inoculado no tecido subcutâneo, as células desenvolvem a forma sólida do tumor. Morfologicamente, as células apresentam um alto grau de atipias, caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e com uma relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e capilares neoformados (HOSSNE, 2002).

O tumor de Ehrlich possui capacidade de crescimento em quase todas as linhagens de camundongos, é considerado pouco imunogênico, pois não expressa moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II. Devido a sua baixa imunidade, esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, com proliferação celular acelerada e invasão de tecidos adjacentes (KODAMA; KODAMA, 1975).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Esta tese de doutorado tem como objetivo avaliar os parâmetros de segurança e eficácia, mediante o estudo de toxicidade aguda e da atividade antitumoral *in vivo*, de uma nova formulação lipossomal contendo CDDP, SpHL-CDDP.

3.1 Objetivos Específicos

Em âmbito mais específico os objetivos principais são:

- ✓ Determinar a DMT e a DL₅₀ da CDDP livre e dos SpHL-CDDP administrados por via IV ou IP em camundongos Swiss sadios;
- ✓ Avaliar as alterações hematológicas, indicativas de mielotoxicidade, advindas da administração IV ou IP de diferentes doses de SpHL-CDDP em camundongos Swiss sadios e comparar com a administração de CDDP livre;
- ✓ Avaliar as alterações bioquímicas, indicativas de toxicidade renal e hepática, observadas após a administração IV ou IP de SpHL-CDDP em camundongos Swiss sadios e comparar com a administração de CDDP livre;
- ✓ Avaliar as alterações histológicas da medula óssea, rins, fígado e baço de camundongos Swiss sadios tratados por via IV ou IP com SpHL-CDDP e comparar com a administração de CDDP livre;
- ✓ Estudar a atividade antitumoral de SpHL-CDDP administrados por via IV em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich e comparar com a administração de CDDP livre e uma formulação lipossomal não pH-sensível contendo CDDP (NSpHL-CDDP).

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO CISPLATINA

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Como mencionado anteriormente, a CDDP é largamente utilizada, tanto em pacientes adultos quanto em crianças, na terapia contra vários tipos de cânceres humanos. De acordo com o tipo de tumor, a CDDP é utilizada em associação com outros fármacos em diferentes esquemas terapêuticos, administrados por via IP ou IV. Entretanto, como a maioria dos antineoplásicos, a CDDP atua indiscriminadamente, tanto nas regiões tumorais quanto nas regiões não acometidas pelo tumor, causando uma série de efeitos adversos graves para o organismo. O inconveniente do uso desse quimioterápico reside, sobretudo, na nefrotoxicidade severa, mielosupressão, ototoxicidade e neurotoxicidade, além de efeitos colaterais como náuseas e vômitos, que podem levar à interrupção do tratamento. Os pacientes que necessitam dessas terapias e os médicos que as prescrevem são obrigados a fazer um balanço da relação risco/benefício para avaliar se, e até quando, pode-se utilizar esse fármaco.

A encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis pode constituir uma alternativa para contornar esses inconvenientes, pois SpHL-CDDP pode conduzir a uma maior seletividade farmacológica decorrente da liberação preferencial da CDDP no sítio tumoral, diminuindo e/ou eliminando a toxicidade sistêmica. Como já mencionado, estudos de biodistribuição demonstraram que a administração de SpHL-CDDP induziu uma menor passagem da CDDP para o tecido renal em comparação com a administração do fármaco livre (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Pensando em possíveis aplicações clínicas dos SpHL-CDDP no tratamento da carcinomatose peritoneal por via IP, bem como, no tratamento por via IV dos diversos tipos de tumores sólidos, faz-se necessário avaliar a toxicidade pré-clínica dessa formulação a fim de avaliar sua segurança e seu potencial para aplicação clínica. Portanto, nesta primeira parte do estudo foi avaliada a toxicidade aguda de SpHL-CDDP após sua administração por via IP e IV em camundongos Swiss sadios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPE e DSPE-MPEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). CHEMS e a solução padrão de fósforo foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A cisplatina (CDDP) foi adquirida da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). N-2-hidroxiethylpiperazina e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol, acetato de etila e a dimetilformamida, todos os solventes grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Ohio, Estados Unidos). Clorofórmio P.A. e éter etílico P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio P.A. e o isopropanol foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e destilada.

2.2 Preparação de SpHL-CDDP e CDDP livre

A preparação dos lipossomas foi realizada pelo método de evaporação em fase reversa, como descrito anteriormente por Carvalho-Júnior e colaboradores (2007a). Os lipossomas foram preparados utilizando um rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Primeiramente, alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-MPEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, e submetidas à evaporação para eliminação do solvente. Em seguida, o filme lipídico obtido foi dissolvido em éter etílico e, uma solução de CDDP a 2,0 mg/mL preparada em solução de NaCl 0,9% (p/v) foi adicionada. A razão entre as fases aquosa e etílica foi igual a 1:3, respectivamente. A mistura obtida foi submetida à agitação no vórtex durante 3 minutos, produzindo uma emulsão do tipo água/óleo. A emulsão foi, em seguida, levada ao rotavapor e o éter etílico foi completamente removido sob

pressão reduzida, até a formação das vesículas lipídicas. Os lipossomas obtidos foram calibrados, utilizando um extrusor Lipex Biomembranes modelo T001 (Vancouver, Canadá), mediante sua passagem em membranas de policarbonato de 0,4 μm , 0,2 μm e 0,1 μm (5 ciclos em cada membrana). A CDDP não encapsulada foi separada dos lipossomas por ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima[®] L-80XP, Beckman Coulter) a 150.000 g, a 10 °C, durante 90 minutos para a obtenção dos lipossomas purificados. Os lipossomas brancos (SpHL sem CDDP) foram preparados nas mesmas condições descritas acima.

A solução de CDDP livre foi preparada mediante solubilização de 50 mg de CDDP em 20 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v), sob aquecimento em temperatura de 37 °C, seguida de agitação em vórtex. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução de NaCl 0,9% (p/v).

2.3 Caracterização química e físico-química de SpHL-CDDP

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

2.3.1 Determinação do diâmetro e potencial zeta

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

inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas. O potencial zeta das vesículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons associado à mobilidade eletroforética utilizando também o equipamento Zetasizer 3000 HSA. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão.

2.3.2 Determinação do teor de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada como método de doseamento da CDDP. O aparato consistiu de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector DAD modelo 2996 (Waters Instruments, Milford, Estados Unidos), conectado a um computador apresentando o software *Empower*, versão 2.0. Para a separação da CDDP foi utilizada uma pré-coluna 4 x 4 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Alemanha) conectada a uma coluna Lichrosper[®] 100 NH₂, 25 cm x 4 mm, 10 μ m (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente foi composto por acetato de etila, metanol, dimetilformamida e água, na proporção 4:4:1:1, respectivamente. O volume de injeção foi de 20 μ L, em fluxo igual a 1,0 mL.min⁻¹ e o material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 310 nm. Inicialmente, a membrana lipídica dos SpHL-CDDP foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:2, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída 1,5 vezes com o sistema eluente e injetada no cromatógrafo. A quantidade de CDDP foi determinada nos lipossomas antes da ultracentrifugação (SpHL-CDDP não purificados) e após a ultracentrifugação (SpHL-CDDP purificados). O teor de encapsulação (TE) da CDDP foi calculado de acordo com a seguinte equação:

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

2.3.3 Determinação da relação CDDP/fosfolípide

A concentração de fosfolípidos presente nas preparações foi determinada de acordo com o método descrito por Bartlett (1959). O método consistiu em um doseamento colorimétrico baseado na formação de um complexo entre íons fosfato e molibdato, o qual em meio ácido apresenta uma coloração azul. A intensidade da coloração azul produzida foi proporcional à concentração de fósforo contida na amostra. A sensibilidade do método está compreendida entre 0,5 e 5 µg de fósforo.

Primeiramente, 250 µL da solução padrão de fósforo ou de SpHL-CDDP foi adicionada em tubos de borossilicato. Em seguida, o fósforo orgânico presente nas amostras foi mineralizado através da adição de 400 µL de uma solução de ácido sulfúrico 10 N. Os tubos foram transferidos para um dry-block (MA 4004, Marconi, Brasil) à temperatura de 180-195 °C e aquecidos durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e, 100 µL de uma solução de água oxigenada 10% (v/v) foram adicionados. Os tubos foram novamente transferidos para o dry-block à temperatura de 180-195 °C e aquecidos durante 30 minutos. Em situações onde a solução não se encontrava límpida, o procedimento anterior foi novamente realizado. Em seguida, os tubos foram novamente resfriados à temperatura ambiente e, 4,6 mL de uma solução de molibdato de amônio (2,22g de molibdato de amônio, 0,7 mL de H₂SO₄ 36 N e água destilada qsp 100 mL) e 0,5 mL de uma solução de ácido ascórbico a 10% (p/v) foram adicionados. Os tubos foram agitados vigorosamente com o auxílio de um vórtex e aquecidos à temperatura de 90 °C por 20 minutos. Um complexo de cor azulada foi formado e a densidade ótica da solução foi medida em espectrofotômetro (Hitachi U 2001, Japão) em comprimento de onda igual a 800 nm. Para a obtenção da curva de calibração de fósforo foram utilizados cinco diferentes pontos (1, 2, 3, 4 e 5 µg) desse elemento a partir de uma solução padrão de fósforo 0,65 mM. Os testes foram realizados em triplicata e a equação da reta foi determinada por regressão linear. Para a dosagem da concentração de fósforo presente nos SpHL-CDDP, as amostras foram preparadas de acordo com a concentração teórica de fosfolípidos de modo a se obter uma massa de fósforo de aproximadamente 3 µg de fósforo.

2.4 Experimentação *in vivo*

2.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (30 ± 5 g) e fêmeas (25 ± 5 g), com 6 semanas de idade, obtidos no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação e tiveram livre acesso à ração e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e estão de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.4.2 Avaliação da Toxicidade Aguda

Os parâmetros utilizados para a avaliação da toxicidade aguda incluíram: avaliação dos sinais clínicos, acompanhamento do peso corporal, mortalidade, análise hematológica e bioquímica, além de avaliação histopatológica.

Para o estudo de toxicidade aguda após administração da CDDP livre ou SpHL-CDDP por via IP, diferentes grupos de camundongos, machos e fêmeas, receberam uma dose única de CDDP livre (5; 10; 20 e 30 mg/kg) ou SpHL-CDDP (7; 12; 30; 45 e 80 mg/kg). A solução de CDDP livre e SpHL-CDDP foram injetadas nos animais imediatamente após sua preparação. Os grupos controle receberam solução salina ou SpHL (a dose de lípide foi equivalente àquela administrada nos animais tratados com SpHL-CDDP nas doses de 30 e 80 mg/kg). Cada grupo experimental consistiu de 10 camundongos machos e 10 fêmeas. A escolha da dose inicial foi baseada em dados da literatura, cujos valores de DMT estabelecidos para a CDDP livre administrada por via IP foram de aproximadamente 8 mg/kg, enquanto para CDDP

associada a microesferas, os valores de DMT estabelecidos foram de aproximadamente 35 mg/kg (TAMURA *et al.*, 2002c).

Para o estudo de toxicidade aguda após administração da CDDP livre ou SpHL-CDDP por via IV, diferentes grupos de camundongos, machos e fêmeas, receberam uma dose única de CDDP livre (5; 7,5; 10; 15; 20 e 25 mg/kg) ou SpHL-CDDP (20; 25; 30; 35 e 40 mg/kg). A solução de CDDP livre e SpHL-CDDP foram injetadas nos animais imediatamente após sua preparação. Os grupos controle receberam solução salina ou SpHL (a dose de lípide foi equivalente àquela administrada nos animais tratados com SpHL-CDDP na dose de 40 mg/kg). Cada grupo experimental consistiu de 5 camundongos machos e 5 fêmeas. A escolha da dose inicial foi baseada em dados da literatura, cujos valores de DMT para a CDDP livre administrada por via IV foram aproximadamente igual a 6-8 mg/kg (NEWMAN *et al.*, 1999).

Após o tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP os animais foram acompanhados por um período de 14 dias. Durante esse período experimental, mudanças no comportamento e o peso dos animais foram monitorados. Além disso, o tempo em que os sinais de toxicidade ou morte ocorreram também foi registrado. Para os dados de peso corporal, a variação do peso ao longo do período experimental foi calculada em relação ao peso inicial. A DL₅₀ foi determinada usando o método estabelecido por Litchfield e Wilcoxon (1949). A DMT foi definida como a maior dose que causou perda de peso inferior a 15%, não causou morte ou qualquer sinal de toxicidade proeminente durante os 14 dias de observação (VASSILEVA *et al.*, 2007).

2.4.2.1 Investigações Hematológicas e Química Clínica

4 ww2

Exames hematológicos e bioquímicos foram realizados em todos os animais sobreviventes 14 dias após o tratamento com CDDP livre, SpHL-CDDP, solução NaCl 0,9% (p/v) ou SpHL. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e ketamina (60 mg/kg) e amostras de sangue foram

coletadas em tubos sem anticoagulantes (para avaliação bioquímica) e em tubos contendo 0,18% (p/v) de EDTA (para avaliação hematológica). A coleta do sangue foi realizada no plexo braquial dos animais e o sangue foi imediatamente transferido para os diferentes tubos e encaminhado para análise. Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos (total e diferencial) e contagem de plaquetas. Todas as análises foram realizadas usando um analisador automatizado (Abacus Junior Vet, Diatron R Messtechnik GmbH, Áustria). As funções hepática e renal foram avaliadas utilizando-se a química clínica. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de ALT, AST, FA, GGT, proteína total, globulina e albumina. A nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração sérica de uréia e creatinina. Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica utilizando um autoanalisador (Cobas Mira Plus, Roche, EUA) e kits de diagnóstico obtidos do Laboratório Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

2.4.2.2 Avaliação Histopatológica

Para análise histopatológica, os rins, o fígado, o baço e a medula óssea foram removidos, lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e fixados em formaldeído a 10% (v/v). Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μ m de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas por um patologista e as imagens foram obtidas usando um microscópio óptico conectado a uma câmera.

2.5 Análise Estatística

Os dados hematológicos e bioquímicos foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para a verificação da normalidade e homocedasticidade da

variância utilizou-se os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pelas equações: $y = \log (\text{variável} + 1)$ ou $y = \text{raiz} (\text{variável} + 1)$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância seguida do teste de Tukey. Para analisar a variação de peso corporal, foi realizada análise de covariância e os valores antes do tratamento foram considerados como covariável. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SpHL-CDDP ADMINISTRADOS POR VIA INTRAPERITONEAL

3.1 Resultados

3.1.1 Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP

A porcentagem de encapsulação da CDDP nos SpHL-CDDP foi $24,7 \pm 3,2$. A razão molar CDDP:lípide nos SpHL-CDDP foi de $0,050 \pm 0,003$. O diâmetro médio das vesículas de SpHL-CDDP foi igual a $133,1 \pm 7,7$ nm e o índice de polidispersão foi igual a 0,11, indicando que esta formulação é monodispersa. SpHL-CDDP exibiram valores de potencial zeta próximo da neutralidade ($0,9 \pm 1,3$ mV). SpHL apresentaram valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta equivalentes aqueles obtidos para SpHL-CDDP. Esses achados foram similares àqueles descritos anteriormente por Carvalho-Júnior e colaboradores (2007a).

3.1.2 Avaliação do peso dos animais

Durante os 14 dias de monitoramento, não foi observada perda de peso em camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com CDDP livre (5 mg/kg) ou SpHL-CDDP (7 mg/kg), exceto para o grupo de camundongos fêmeas no segundo e quarto dias após injeção de SpHL-CDDP e CDDP livre, respectivamente (**Figura 1.1**). Por outro lado, uma perda de peso no período inicial pós-administração de CDDP livre (10 mg/kg) ou SpHL-CDDP (12 mg/kg) foi observada no grupo de camundongos machos (**Figura 1.1 A e B**). A recuperação do peso corporal dos animais dentro do grupo tratado com CDDP livre foi mais tardia do que dentro do grupo tratado com SpHL-CDDP (décimo e oitavo dias, respectivamente; $P < 0,05$). Entretanto, no caso de camundongos fêmeas, um maior impacto sobre o peso corporal pôde ser detectado. Os camundongos fêmeas tratados com CDDP livre (10 mg/kg) apresentaram uma pronunciada perda de peso (-36%) até o oitavo dia pós-tratamento e a recuperação também ocorreu a partir do décimo dia. Por outro lado, após a administração de SpHL-CDDP na dose de 12 mg/kg, a perda máxima de peso observada foi igual a 12%. Além disso, o ganho de peso foi maior

para as fêmeas tratadas com SpHL-CDDP do que àquelas tratadas com CDDP livre ($P < 0,05$; **Figura 1.1 C e D**). Sinais de toxicidade mais expressivos relacionados à perda de peso corporal foram observados após o tratamento com CDDP livre na dose de 20 mg/kg (**Figura 1.1 A e C**). Os camundongos machos e fêmeas apresentaram uma grande perda de peso até o quarto dia pós-injeção. Além disso, vale destacar que uma taxa de mortalidade significativa ocorreu em ambos os sexos de camundongos (90% e 70% para machos e fêmeas, respectivamente) até o quinto dia após a administração de CDDP livre na dose de 20 mg/kg (**Figura 1.2**). Os camundongos fêmeas que sobreviveram apresentaram uma recuperação do peso a partir do sexto dia pós-injeção de CDDP livre. Em contraste, camundongos machos e fêmeas que receberam SpHL-CDDP, na dose de 30 mg/kg, mostraram uma perda de peso corporal até o quarto dia pós-tratamento (**Figura 1.1 B e D**), enquanto apenas dois camundongos machos morreram e nenhuma morte foi observada no grupo de camundongos fêmeas (**Figura 1.2**). A variação de peso corporal para os animais tratados com SpHL-CDDP nas doses de 45 e 80 mg/kg não foi registrada, uma vez que uma alta taxa de mortalidade ocorreu no período inicial do tratamento (70% até o quarto dia pós-injeção). O grupo controle tratado com solução salina, em ambos os sexos, mostrou um ganho de peso durante o período de investigação, exceto os quatro primeiros dias no caso de fêmeas, o qual apresentou perda de 16% do peso corpóreo. As razões para essa perda de peso inicial não estão claras. Os animais que receberam SpHL apresentaram uma perda de peso no período inicial, até o quarto dia, mas a recuperação ocorreu a partir do sexto dia pós-tratamento (**Figura 1.1 B e D**).

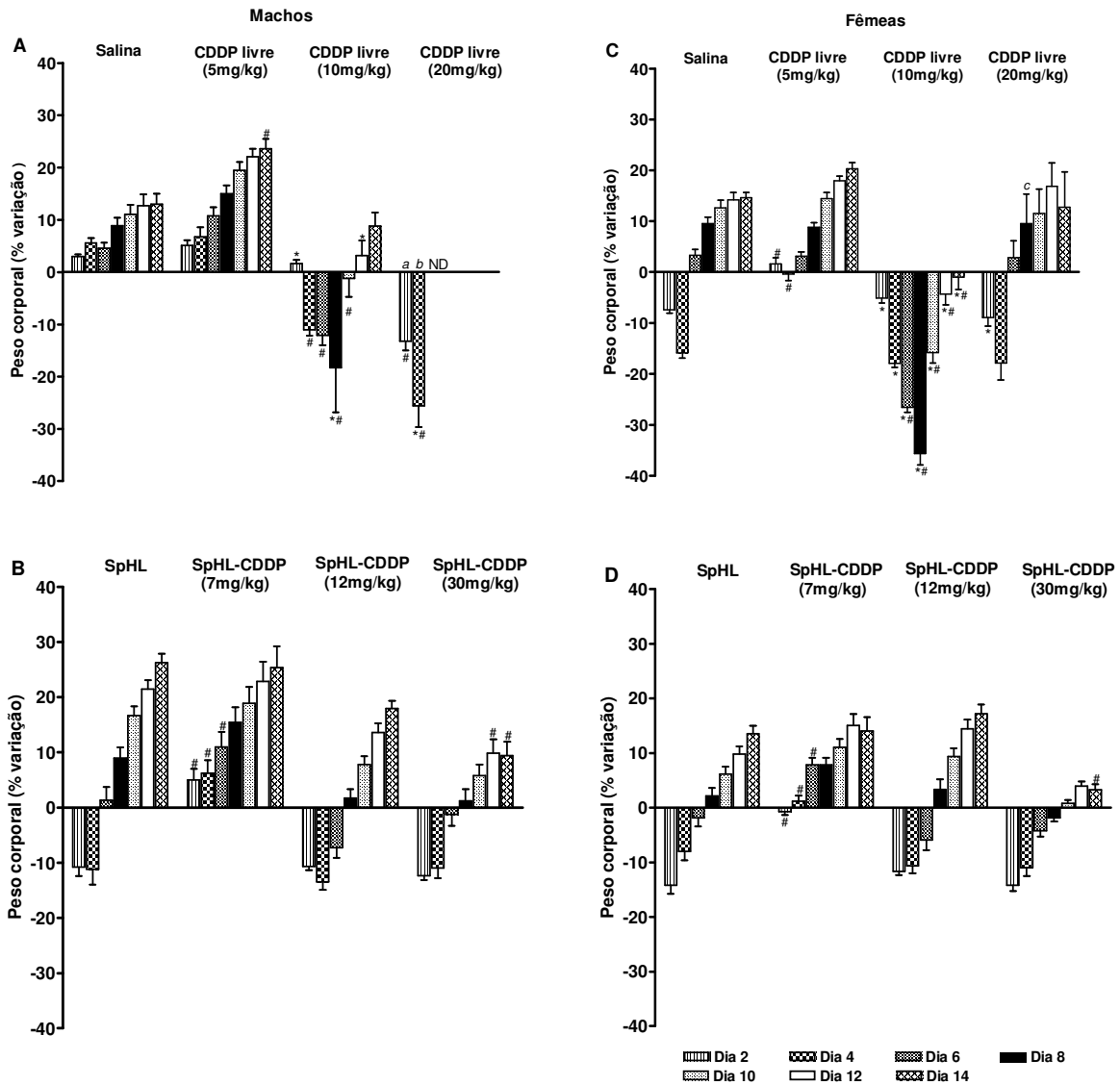


Figura 1.1 - Variação do peso corporal de camundongos Swiss machos (A e B) e fêmeas (C e D) observada durante 14 dias após a administração IP de CDDP livre ou SpHL-CDDP. * Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP em doses similares (5, 10 e 7, 12 mg/kg, respectivamente). # Representa diferença significativa entre os tratamentos CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$. ^{a,b,c} Variação do peso corporal foi determinada apenas para oito, sete e três camundongos sobreviventes, respectivamente. ND indica que a variação não foi determinada a partir do sexto dia devido à morte dos animais. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

3.1.3 Mortalidade e Sinais Clínicos

Na **Figura 1.2** estão apresentados os resultados de mortalidade de camundongos machos e fêmeas após o tratamento com CDDP livre, SpHL-CDDP e controles (salina e SpHL). A administração de CDDP livre na dose de 10 mg/kg em fêmeas induziu uma alta mortalidade (60%), enquanto nenhuma morte foi observada após o tratamento com SpHL-CDDP em dose similar (12 mg/kg). Além disso, um alto nível de mortalidade também foi observado em camundongos machos (90%) e fêmeas (70%) tratados com CDDP livre na dose de 20 mg/kg. O tratamento com 30 mg/kg de CDDP livre causou 100% de morte dos camundongos de ambos os sexos. Por outro lado, a administração de SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg induziu apenas 20% de morte no grupo de camundongos machos e nenhuma morte foi observada no grupo de camundongos fêmeas. O aumento da dose administrada de SpHL-CDDP para 45 mg/kg levou a uma alta taxa de mortalidade (80% e 90% para machos e fêmeas, respectivamente). Após a administração de 80 mg/kg de SpHL-CDDP, pôde-se observar a morte de todos os animais. Nenhuma morte foi observada no grupo controle tratado com solução salina e somente uma morte ocorreu em ambos os sexos de camundongos tratados com SpHL apresentando concentração lipídica equivalente àquela presente no tratamento com SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg. No grupo controle tratado com SpHL apresentando concentração lipídica equivalente àquela presente no tratamento com SpHL-CDDP na dose de 80 mg/kg, ocorreu 10% e 20% de morte para fêmeas e machos, respectivamente.

Após a administração de todas as doses de CDDP livre, alguns efeitos como diarreia, ataxia e fraqueza foram observados em todos os camundongos machos e fêmeas, no entanto, nos grupos tratados com SpHL-CDDP, esses efeitos foram somente observados após a administração de altas doses (45 e 80 mg/kg). Além disso, piloereção foi detectada nos grupos que receberam CDDP livre em todas as doses. Para os grupos que receberam SpHL-CDDP, piloereção foi observada após a administração de 30, 45 e 80 mg/kg. Entretanto, nos animais tratados com 30 mg/kg de SpHL-CDDP esse efeito desapareceu no terceiro dia após o

tratamento. Nenhum sinal clínico aparente de toxicidade foi detectado nos grupos controle tratados com solução salina ou SpHL.

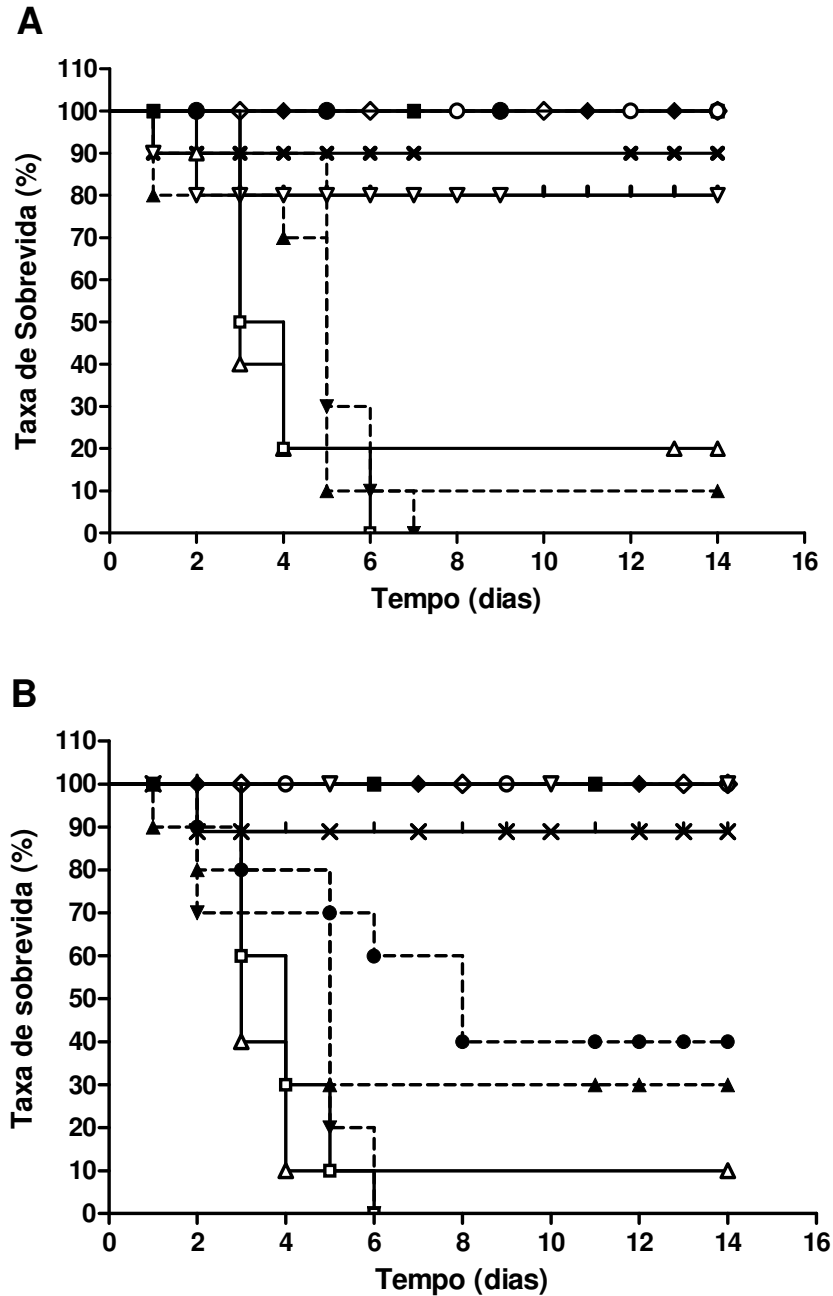


Figura 1.2 - Taxa de sobrevivida de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com CDDP livre (5 mg/kg, ◆; 10 mg/kg, ●; 20 mg/kg, ▲; 30 mg/kg, ▼), SpHL-CDDP (7 mg/kg, ◇; 12 mg/kg, ○; 30 mg/kg, ▽; 45 mg/kg, Δ; 80 mg/kg, □), salina (■) e SpHL (dose de lípides foi equivalente àquela administrada no tratamento com SpHL-CDDP na dose 30 (x) e 80 (l) mg/kg).

Os valores de DL₅₀ e DMT estabelecidos para camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP estão apresentados na **Tabela 1.1**. Os resultados mostraram que os valores de DL₅₀ obtidos após o tratamento com SpHL-CDDP para camundongos machos e fêmeas foram, respectivamente, 2,7 e 3,2 vezes superiores àqueles obtidos após a administração de CDDP livre. A DMT estabelecida após o tratamento com SpHL-CDDP foi cerca de 3 vezes superior àquela estabelecida com a administração de CDDP livre. Esses resultados demonstram que a encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada é capaz de reduzir sua toxicidade *in vivo*.

Tabela 1.1 - DL₅₀ e DMT estabelecidas após administração IP de CDDP livre ou SpHL-CDDP em camundongos Swiss

Sexo	Tratamento	DL ₅₀ (mg/kg)	95% IC ^a	DL ₅₀ SpHL-CDDP / DL ₅₀ CDDP livre	DMT (mg/kg)
Machos	CDDP livre	16,8	12,9 - 21,9	2,7	< 10
	SpHL-CDDP	45,4	37,4 - 55,1		< 30
Fêmeas	CDDP livre	14,9	10,6 - 21,6	3,2	< 10
	SpHL-CDDP	47,5	41,8 - 54,0		30

^a IC significa intervalo de confiança de 95%.

3.1.4 Investigações hematológicas

As alterações dos parâmetros hematológicos de camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre e SpHL-CDDP estão sumarizadas nas **Tabelas 1.2 e 1.3**. Inicialmente, foi investigado o efeito da interação sexo e tratamento nos diferentes parâmetros hematológicos. Os resultados estatísticos demonstraram a ausência desse efeito na quantificação de hemácias, hemoglobina e linfócitos (**Tabela 1.2**), ao passo que, a quantificação do hematócrito, contagem de leucócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas foram diretamente influenciados por essa interação (**Tabela 1.3**). Nenhuma alteração significativa sobre a contagem de hemácias e a

quantificação de hemoglobina foi observada após a administração da maioria das doses de CDDP livre e SpHL-CDDP (**Tabela 1.2**). Uma pequena redução nos níveis de hemácia e hemoglobina foi detectada somente após a injeção de CDDP livre na dose de 10 mg/kg. A administração de SpHL-CDDP (12 mg/kg) induziu um aumento da contagem de hemácias e hemoglobina em comparação com o grupo controle SpHL. As razões dessas alterações permanecem ainda sem esclarecimento. Com relação aos níveis de linfócitos, pôde-se observar que os mesmos foram drasticamente afetados pela administração de CDDP livre em todas as doses. A contagem de linfócitos foi significativamente menor nos grupos tratados com CDDP livre em comparação aos grupos controle tratados com solução salina ou SpHL ($P < 0,05$). O tratamento com SpHL-CDDP não afetou a contagem de linfócitos quando comparado ao grupo controle SpHL ($P > 0,05$). Uma redução no hematócrito foi detectada em camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 10 mg/kg quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina e ao grupo tratado com SpHL-CDDP (**Tabela 1.3**). Esses achados associados com a diminuição na contagem de hemácias e nos níveis de hemoglobina sugerem o aparecimento de uma leve anemia após o tratamento com CDDP livre. Por outro lado, esse sinal de toxicidade não apareceu em camundongos que receberam SpHL-CDDP.

A contagem de leucócitos total foi significativamente reduzida e associada com uma marcada neutropenia em camundongos machos e fêmeas submetidos ao tratamento com CDDP livre nas doses de 5 e 10 mg/kg ($P < 0,05$) (**Tabela 1.3**). Nenhuma alteração nas contagens de leucócitos e neutrófilos foi observada após a administração de SpHL-CDDP em camundongos machos e fêmeas quando comparado ao grupo controle tratado com SpHL, demonstrando que a encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada mantém as células do sistema imune dentro dos níveis de normalidade. Nenhuma diferença significativa foi observada na contagem de monócitos de animais tratados com SpHL-CDDP, ao passo que, para camundongos machos tratados com CDDP livre, diferenças significativas foram detectadas. Além disso, nenhuma alteração na contagem de eosinófilo e basófilo foi observada após ambos tratamentos (dados não apresentados).

Finalmente, os níveis de plaquetas aumentaram significativamente em camundongos machos tratados com CDDP livre na dose de 5 mg/kg e em camundongos fêmeas tratados com CDDP livre (10 mg/kg) e SpHL-CDDP (30 mg/kg). Vale ressaltar que todos os parâmetros hematológicos foram similares entre os grupos controle tratados com solução salina ou SpHL. Este fato indica que a administração IP de lípides não induz toxicidade hematológica.

Tabela 1.2 - Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP*

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)		SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5	10	7	12	30
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	M	8,1 ± 0,2	7,8 ± 0,2	8,6 ± 0,4	7,2 ± 0,3	8,2 ± 0,2	9,4 ± 0,2	7,1 ± 0,2
	F	8,4 ± 0,5	8,0 ± 0,2	7,1 ± 0,4	7,1 ± 0,4	7,7 ± 0,5	9,1 ± 0,1	7,6 ± 0,2
	G	8,3 ± 0,3	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,3	7,0 ± 0,3 ^{a,b}	8,0 ± 0,3	9,3 ± 0,1 ^b	7,3 ± 0,2
Hemoglobina (g/dl)	M	13,6 ± 0,4	12,4 ± 0,2	12,7 ± 0,5	10,8 ± 0,5	13,0 ± 0,5	15,0 ± 0,2	12,2 ± 0,4
	F	13,6 ± 0,8	12,6 ± 0,2	11,9 ± 0,6	11,7 ± 0,3	12,7 ± 0,6	15,2 ± 0,4	12,8 ± 0,2
	G	13,6 ± 0,4	12,5 ± 0,1	12,4 ± 0,4	11,1 ± 0,4 ^{a,b}	12,8 ± 0,4	15,1 ± 0,2 ^b	12,5 ± 0,2
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	M	3,6 ± 0,3	4,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	4,6 ± 0,7	5,0 ± 0,2	3,3 ± 0,4
	F	3,1 ± 0,4	2,7 ± 0,5	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,5	3,6 ± 0,4	2,6 ± 0,2
	G	3,4 ± 0,3	3,4 ± 0,3	1,8 ± 0,2 ^{a,b}	1,9 ± 0,2 ^{a,b}	3,2 ± 0,6	4,3 ± 0,3	3,0 ± 0,3

* Esses parâmetros não foram influenciados pela interação sexo e tratamento. M (machos), F (fêmeas) e G (média do grupo)

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP em doses similares (5, 10 e 7, 12 mg/kg, respectivamente).

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

Tabela 1.3 - Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP*

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)		SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5	10	7	12	30
Hematócrito (%)	M	45 ± 1	38 ± 1	43 ± 2 ^c	33 ± 1 ^{a,b}	42 ± 1	51 ± 1 ^b	39 ± 1
	F	47 ± 3	40 ± 1	33 ± 2 ^{a,b}	34 ± 2 ^{a,b}	44 ± 1	50 ± 1 ^b	41 ± 1
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	M	5,8 ± 0,6	6,7 ± 0,6 ^c	2,1 ± 0,2 ^{a,b}	2,5 ± 0,2 ^{a,b}	7,5 ± 1,3 ^c	7,7 ± 0,3 ^c	6,5 ± 0,9
	F	5,2 ± 0,4	4,7 ± 0,7	1,9 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,4 ^{a,b}	2,9 ± 0,7	6,1 ± 0,5	4,7 ± 0,4
Neutrófilos (10 ³ /mm ³)	M	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,4	0,3 ± 0,1 ^{a,b}	0,2 ± 0,0 ^{a,b}	2,4 ± 1,3 ^c	2,4 ± 0,2	3,0 ± 0,5 ^c
	F	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,3	0,1 ± 0,0 ^b	0,5 ± 0,1 ^{a,b}	1,1 ± 0,3	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Monócitos (10 ³ /mm ³)	M	0,141 ± 0,047	0,171 ± 0,021 ^c	0,004 ± 0,004 ^{a,b}	0,007 ± 0,005 ^{a,b}	0,191 ± 0,082 ^c	0,139 ± 0,031	0,206 ± 0,097
	F	0,059 ± 0,021	0,046 ± 0,016	0,025 ± 0,006	0,006 ± 0,006 ^a	0,024 ± 0,015	0,121 ± 0,023	0,096 ± 0,017
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	M	682 ± 59 ^c	697 ± 96 ^c	957 ± 83 ^{b,c}	806 ± 54 ^c	768 ± 39	837 ± 35 ^c	792 ± 54
	F	427 ± 39	494 ± 50	327 ± 79 ^a	1085 ± 98 ^{a,b}	803 ± 40	605 ± 35	885 ± 73 ^b

* Esses parâmetros foram influenciados pela interação sexo e tratamento. M (machos) e F (fêmeas).

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP em doses similares (5, 10 e 7, 12 mg/kg, respectivamente).

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

^c Representa diferença estatística significativa entre camundongo macho e fêmea.

O nível de significância foi considerado para valores de $P < 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

3.1.5 Análise Bioquímica

As alterações nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal estão apresentadas na **Figura 1.3**. A administração IP de CDDP livre nas doses de 5 e 10 mg/kg em camundongos machos e fêmeas não afetou os níveis sanguíneos de uréia e creatinina quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina (**Figura 1.3 A**). Entretanto, para verificar as possíveis razões de morte observada para o grupo tratado com CDDP livre na dose de 20 mg/kg, a toxicidade renal foi avaliada quatro dias após a administração dessa mesma dose (a razão de escolha deste procedimento se deve ao fato de que nenhuma morte foi observada nesse intervalo de tempo, como demonstrado na **Figura 1.2**). Os resultados desse estudo demonstraram aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de uréia e creatinina de camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 20 mg/kg. Os valores foram aproximadamente 9,5 vezes maiores que os do grupo controle (**Figura 1.3 A e B**). Entretanto, nenhuma alteração nos níveis de uréia foi detectada após o tratamento com SpHL-CDDP nas doses de 7 e 12 mg/kg em ambos os sexos de camundongos. Aumento significativo nos níveis de uréia foram somente observados após a administração de 30 mg/kg de SpHL-CDDP (valor aproximadamente 1,7 vezes superior ao obtido para o grupo controle tratado com SpHL) (**Figura 1.3 A**). Surpreendentemente, os grupos que receberam SpHL-CDDP nas doses de 7 e 12 mg/kg apresentaram menores níveis de creatinina do que o grupo controle tratado com SpHL. Nos camundongos machos e fêmeas tratados com SpHL-CDDP (30 mg/kg), foram obtidos níveis de creatinina similares aos camundongos tratados com SpHL ($P > 0,05$). É interessante notar que mesmo quando altas doses de SpHL-CDDP foram administradas, a toxicidade renal ainda foi menor que após o tratamento com CDDP livre. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle. Além disso, camundongos machos e fêmeas submetidos ao tratamento com CDDP livre apresentaram um índice uréia/creatinina duas vezes maior que aqueles tratados com SpHL-CDDP (**Tabela 1.4**). Por outro lado, o índice uréia/creatinina dos animais tratados com SpHL-CDDP foi similar àqueles encontrados para o grupo controle tratado com solução salina. Portanto, esses achados indicam que o tratamento com SpHL-CDDP foi capaz de eliminar a

redução na perfusão renal bem como na taxa de filtração glomerular causada pela administração de CDDP livre.

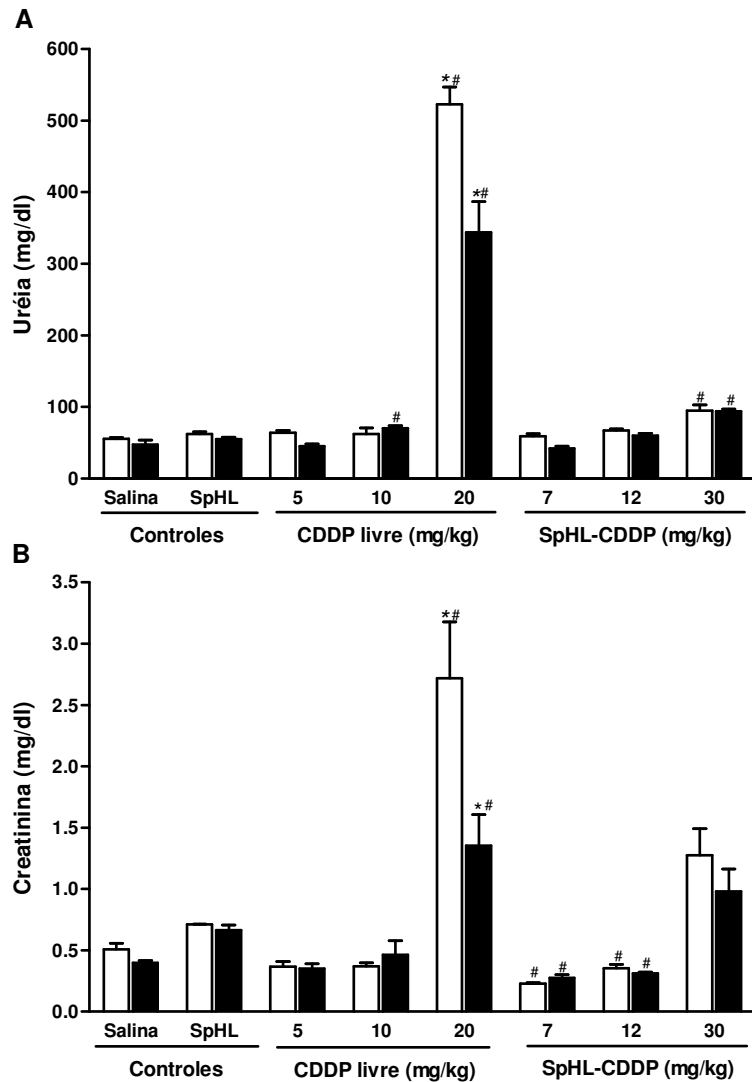


Figura 1.3 - Níveis de uréia (A) e creatinina (B) de camundongos Swiss machos (□) e fêmeas (■) tratados por via IP com diferentes doses de CDDP livre ou SpHL-CDDP. * Representa diferença estatística significativa entre o tratamento com CDDP livre e SpHL-CDDP em doses similares (5, 10, 20 e 7, 12, 30 mg/kg, respectivamente). # Representa diferença estatística significativa entre o tratamento com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

Tabela 1.4 - Avaliação da alteração renal detectada no período inicial pós-tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP

Tratamento	Índice Uréia/Creatinina	
	Machos	Fêmeas
Salina	115 ± 27	118 ± 7
CDDP livre (20 mg/kg)	221 ± 35 ^{a,b}	261 ± 40 ^{a,b}
SpHL-CDDP (30 mg/kg)	96 ± 15	112 ± 23

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos CDDP livre e SpHL-CDDP.

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos CDDP livre ou SpHL-CDDP e o controle salina.

O nível de significância foi considerado para valores de $P < 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

Na **Tabela 1.5** estão apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática. Para camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre (5 e 10 mg/kg), nenhuma alteração clínica significativa foi observada em comparação com o grupo controle tratado com solução salina, exceto para a quantificação de AST no grupo de camundongos machos submetidos ao tratamento com CDDP livre (10 mg/kg). Entretanto, camundongos machos e fêmeas que receberam CDDP livre na dose de 20 mg/kg apresentaram níveis aumentados de AST, ALT e GGT, indicando o aparecimento de toxicidade hepática após a administração de altas doses de CDDP livre. Após a injeção de SpHL-CDDP (30 mg/kg), um aumento nos níveis de ALT e AST foi observado apenas no grupo de camundongos fêmeas. Além disso, alterações nos níveis de GGT foram detectadas após a administração de SpHL-CDDP nas doses de 12 e 30 mg/kg, em ambos os sexos de camundongos. Praticamente, nenhum efeito nos níveis de FA, proteína total, albumina e globulina foram observados após a administração de ambas formulações em todas as doses avaliadas.

Tabela 1.5 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IP com CDDP livre ou SpHL-CDDP

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)			SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5	10	20	7	12	30
ALT (IU/L)	M	60 ± 4	71 ± 3	60 ± 4	59 ± 4	246 ± 49 ^{b,c}	52 ± 4	64 ± 5	81 ± 5 ^c
	F	70 ± 5	69 ± 6	62 ± 10	56 ± 9	141 ± 29 ^b	50 ± 6	75 ± 5	174 ± 29 ^b
AST (IU/L)	M	194 ± 29	179 ± 13	247 ± 29	269 ± 24 ^{a,b}	615 ± 44 ^b	200 ± 21	166 ± 16	178 ± 12 ^c
	F	193 ± 13	209 ± 41	212 ± 36	243 ± 38	470 ± 117 ^b	238 ± 24	185 ± 19	408 ± 12 ^b
GGT (g/dL)	M	4,7 ± 0,3	2,2 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,5 ± 0,7 ^c	9,5 ± 0,9 ^b	2,8 ± 0,2	4,8 ± 0,6 ^b	5,6 ± 0,5 ^{b,c}
	F	4,2 ± 0,5	2,3 ± 0,5	4,7 ± 0,6	2,0 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,5 ^b	3,8 ± 0,2	5,4 ± 0,3 ^b	3,6 ± 0,3
FA (IU/L)	M	108 ± 12 ^c	93 ± 11	127 ± 5 ^a	140 ± 12	130 ± 16	57 ± 9	169 ± 11 ^b	57 ± 7 ^c
	F	136 ± 7	111 ± 12	116 ± 15	121 ± 11	112 ± 15	55 ± 6 ^b	144 ± 10	145 ± 15
Proteína Total (g/dL)	M	6,8 ± 0,2 ^c	5,2 ± 0,3	4,8 ± 0,7 ^c	5,5 ± 0,3	6,9 ± 1,1	4,2 ± 0,3	4,5 ± 0,1	6,2 ± 0,6
	F	5,1 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	6,6 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,7 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Albumina (g/dL)	M	2,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	F	3,1 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,2 ± 0,8	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,4	3,3 ± 0,3
Globulina (g/dL)	M	2,9 ± 0,2 ^c	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,1 ^c	3,1 ± 0,1	4,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,2
	F	3,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,4	2,9 ± 0,2	3,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,8 ± 0,4

ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), GGT (γ -glutamilttransferase), FA (fosfatase alcalina), M (machos) e F (fêmeas). ^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP em doses similares (5, 10 e 7, 12 mg/kg, respectivamente). ^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle. ^c Representa diferença estatística significativa entre camundongos machos e fêmeas. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

3.1.6 Avaliação Histopatológica

Neste estudo, somente as fotomicrografias de camundongos fêmeas foram apresentadas, uma vez que as mesmas alterações histopatológicas foram observadas em ambos os sexos de camundongos. A avaliação histopatológica da medula óssea está representada na **Figura 1.4**. Como discutido acima, a administração de CDDP livre (20 mg/kg) induziu 100% de mortalidade dos camundongos. Por essa razão, as alterações histológicas da medula óssea após o tratamento com 20 mg/kg de CDDP livre também foram investigadas. Os cortes histológicos do tecido hematopoiético demonstraram uma hipocelularidade caracterizada por aumento do material intercelular e diminuição dos precursores das células sanguíneas, a qual foi mais acentuada na linhagem megacariocítica (**Figura 1.4 B**). Entretanto, nenhuma alteração microscópica na medula óssea foi observada para os animais tratados com 30 mg/kg de SpHL-CDDP. O perfil morfológico da medula óssea desses animais foi semelhante ao encontrado nos animais dos grupos controle tratados com solução salina ou SpHL (**Figura 1.4 D**).

Com relação à toxicidade renal, a avaliação microscópica dos rins de camundongos submetidos ao tratamento com CDDP livre na dose de 20 mg/kg revelou severa necrose tubular aguda (**Figura 1.5 B**). Cortes histológicos do parênquima renal demonstraram morte celular e degeneração das células tubulares com um epitélio tubular achatado, luzes tubulares dilatadas e preenchidas por um material proteináceo. Esses resultados mostraram uma correlação direta entre os altos níveis de uréia e creatinina sanguíneos e a presença de alteração renal. Por outro lado, não houve evidência de disfunção renal nos animais tratados com SpHL-CDDP (**Figura 1.5 D**). As características morfológicas dos rins foram similares aos grupos controle (salina e SpHL) (**Figura 1.5 A e C**). Portanto, vale destacar que mesmo após a administração de uma dose alta de SpHL-CDDP (30 mg/kg), nenhuma alteração indicativa de toxicidade renal foi observada.

Com relação aos tecidos hepático e esplênico, nenhuma alteração histológica foi observada em camundongos submetidos ao tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP em todas as doses administradas (**Figuras 1.6 e 1.7**).

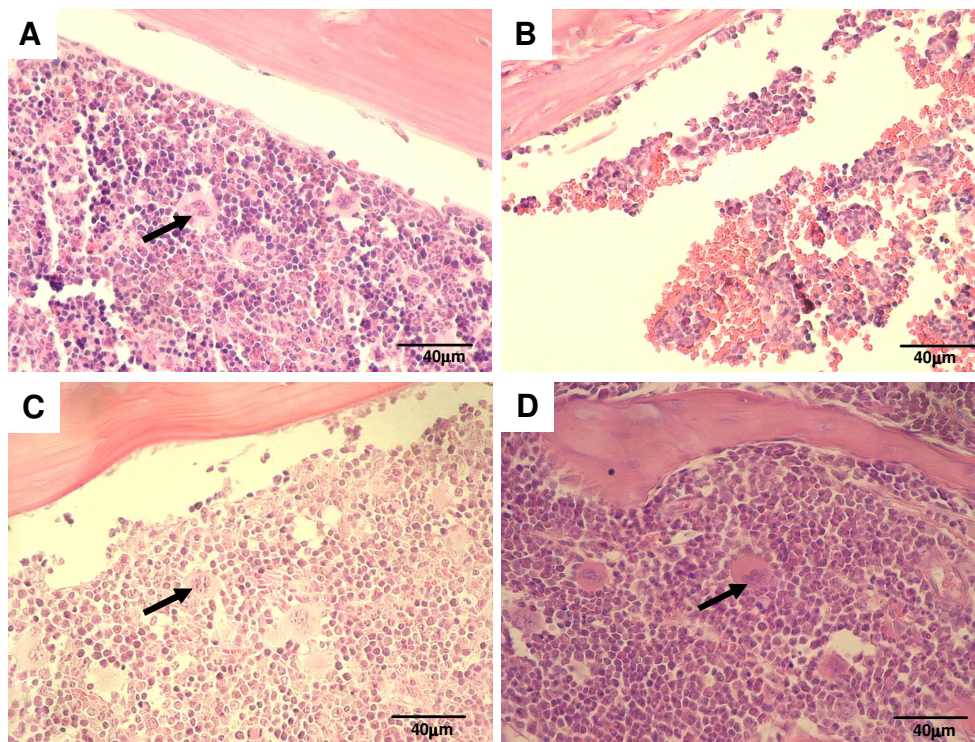


Figura 1.4 - Fotomicrografias da medula óssea de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D). As setas mostram a presença de megacariócitos no tecido hematopoiético. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

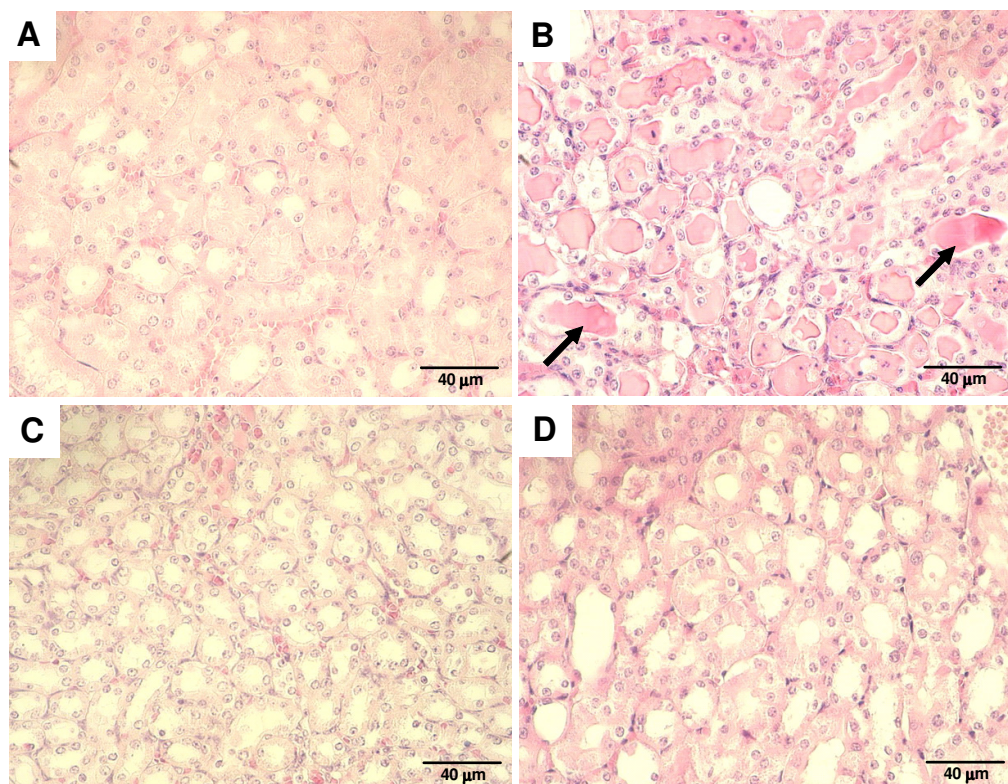


Figura 1.5 - Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D). As setas mostram a presença de material proteináceo no interior dos túbulos renais. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

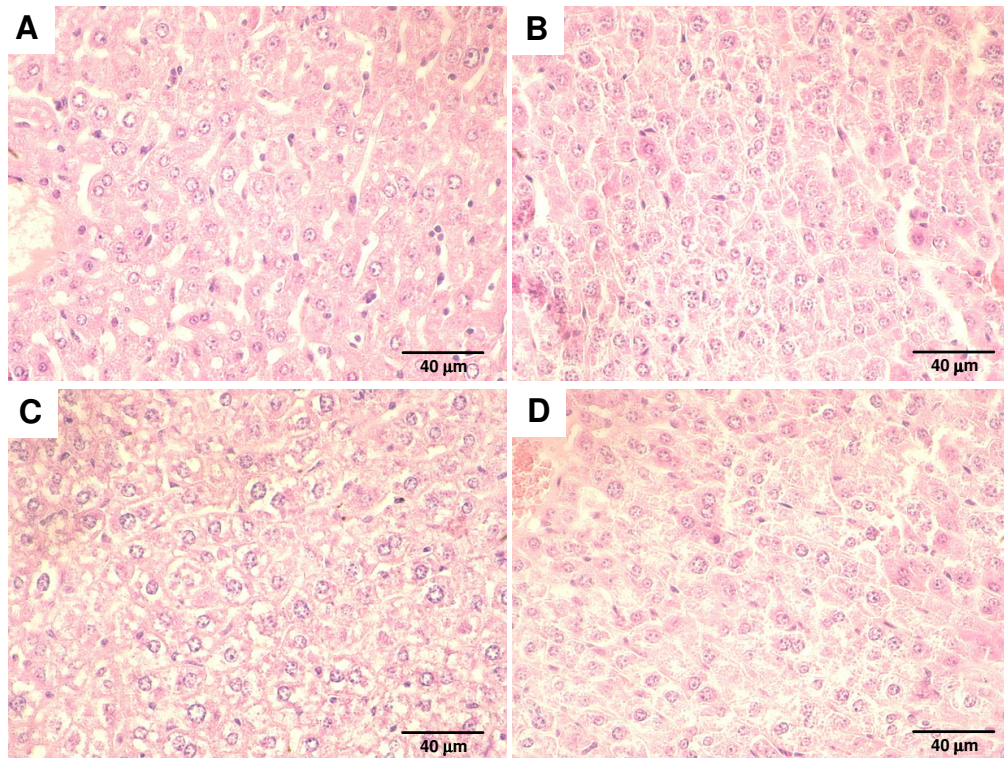


Figura 1.6 - Fotomicrografias do fígado de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

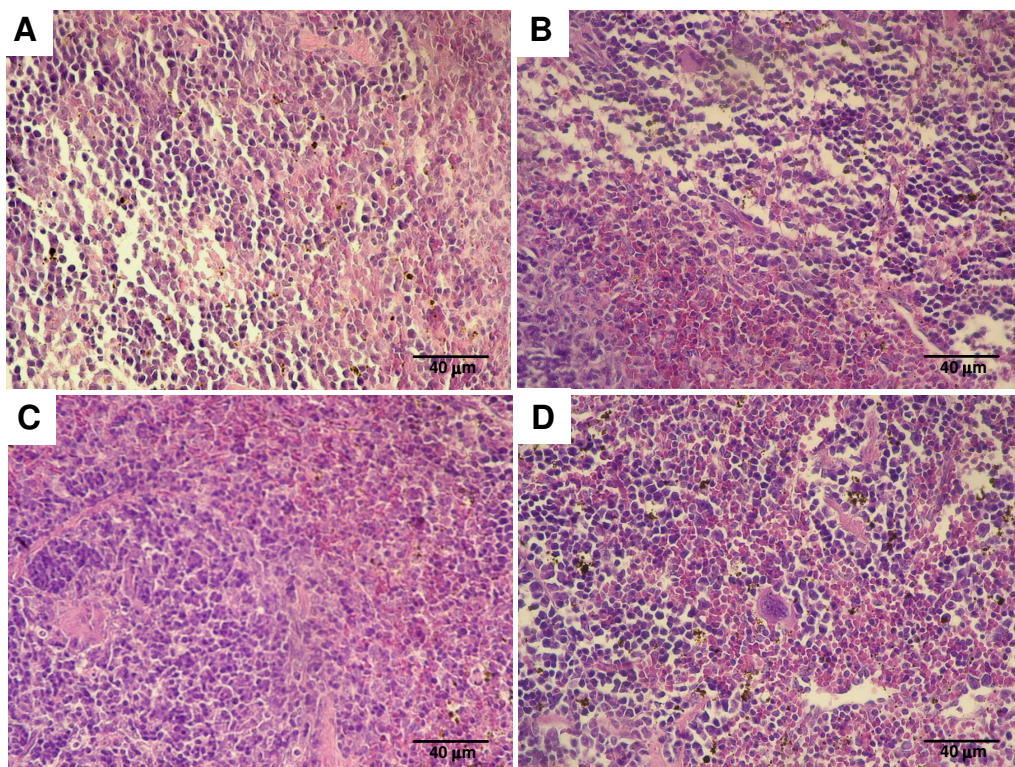


Figura 1.7 - Fotomicrografias do baço de camundongos Swiss fêmeas tratados com solução salina (A), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (B), SpHL (C) e SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg (D). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

3.2 Discussão

A quimioterapia IP para o tratamento de carcinomatose peritoneal usando como agente antitumoral a CDDP é limitada devido a sua absorção através da membrana peritoneal. Conseqüentemente, toxicidade sistêmica pode ser observada, a qual se manifesta principalmente no tecido renal e é o principal fator dose-limitante da terapia com CDDP, por reduzir a qualidade de vida dos pacientes e restringir os protocolos de tratamento (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2002). Sistemas nanoestruturados contendo CDDP têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a concentração local do fármaco ou a duração da exposição do fármaco na cavidade peritoneal, dentre estes destacam-se: microesferas, nanopartículas e lipossomas (BOULIKAS, 2004; TAMURA *et al.*, 2002 a,b; XU *et al.*, 2006). Esta nova tentativa terapêutica pode contribuir para uma diminuição ou eliminação dos efeitos tóxicos sistêmicos. Nessa primeira parte do estudo, a toxicidade aguda de um novo carreador nanoestruturado contendo CDDP, SpHL-CDDP (desenvolvido por nosso grupo de pesquisa), foi avaliada. A encapsulação da CDDP neste novo sistema de liberação para a administração IP tem algumas vantagens potenciais. A rápida absorção da CDDP através da membrana peritoneal pode ser evitada, resultando, portanto, em sua retenção na cavidade peritoneal por períodos longos de tempo e seu melhor influxo nas células tumorais. Essa localização de SpHL-CDDP próximo ao sítio tumoral pode favorecer a liberação preferencial da CDDP nessa região devido ao baixo pH. Uma maior concentração de CDDP no sítio tumoral pode levar a uma penetração mais profunda dentro do tumor, melhorando, portanto, sua eficácia terapêutica. Além disso, sabe-se que a CDDP apresenta uma ação vesicante a qual pode ser contornada com o uso de lipossomas (BAIREY *et al.*, 1997; PHILLIPS *et al.*, 2002; SCHRIJVERS, 2003). Para desenvolver um novo agente terapêutico contendo CDDP, uma série de estudos pré-clínicos deve ser conduzida. Portanto, nesse estudo, vários parâmetros indicativos de toxicidade foram investigados, a saber: variação do peso corporal, mortalidade, perfis hematológico e bioquímico (funções renal e hepática) e avaliação histopatológica após a administração IP em camundongos Swiss machos e fêmeas.

A administração de CDDP livre (5 mg/kg) ou SpHL-CDDP (7 mg/kg) resultou em um perfil de perda de peso corporal semelhante. Porém, a injeção de CDDP livre em doses superiores a 10 mg/kg em camundongos machos e fêmeas induziu uma resposta diferente com relação ao peso corporal quando comparado ao grupo SpHL-CDDP. A redução do peso foi extremamente maior em camundongos fêmeas que receberam 10 mg/kg de CDDP livre. Além disso, a recuperação do peso em ambos os sexos de camundongos que receberam CDDP livre ocorreu mais tardiamente do que para o grupo que recebeu SpHL-CDDP. Os sinais de toxicidade tornaram-se mais evidentes no grupo tratado com CDDP livre a partir da dose de 10 mg/kg, uma vez que os valores de DL_{50} para camundongos machos e fêmeas foram 16,8 e 14,9 mg/kg, respectivamente. No entanto, SpHL-CDDP provou ser capaz de reduzir a toxicidade induzida pela CDDP em camundongos machos e fêmeas, visto que aumentou aproximadamente 3 vezes os valores da DL_{50} , os quais foram estabelecidos como 45,4 e 47,5 mg/kg para machos e fêmeas, respectivamente. É importante ressaltar ainda que sinais clínicos como diarreia, ataxia e fraqueza foram observados após o tratamento de CDDP livre em todas as doses avaliadas, enquanto que, no tratamento com SpHL-CDDP, esses sinais foram somente detectados em doses mais altas que a DL_{50} .

Os parâmetros hematológicos investigados confirmaram a maior toxicidade induzida pela CDDP livre, quando comparada à administração de doses similares de SpHL-CDDP. Sabe-se que a quimioterapia com CDDP induz uma supressão hematopoiética, a qual foi confirmada, nesse estudo, mediante a depressão do número de hemácias, leucócitos, linfócitos e neutrófilos e da quantidade de hemoglobina e hematócrito (ASNA *et al.*, 2005; WORKING *et al.*, 1998). Em contraste, nenhuma alteração dos parâmetros hematológicos foi observada após o tratamento com SpHL-CDDP (30 mg/kg), indicando ausência de mielotoxicidade. A análise histopatológica da medula óssea também demonstrou redução dos precursores celulares sanguíneos nos animais tratados com CDDP livre, entretanto, nenhuma alteração notável foi observada após o tratamento com SpHL-CDDP.

No que diz respeito à toxicidade renal, é bem documentado na literatura que a CDDP induz lesões túbulo-intersticiais, danificando os túbulos proximais, especificamente o segmento S3 da região medular além de provocar alterações

mitocondriais nos néfrons distais (YAO *et al.*, 2007). No presente estudo, foram observadas diferenças significativas no tecido renal de camundongos submetidos ao tratamento com CDDP livre em comparação com aqueles tratados com SpHL-CDDP. Os animais tratados com CDDP livre apresentaram um comprometimento histológico característico de necrose tubular aguda, enquanto o perfil histopatológico dos camundongos tratados com SpHL-CDDP foi semelhante aos grupos controle tratados com SpHL ou salina. Alguns estudos relatam que, o comprometimento renal também pode ser expresso em função do aumento dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina. Entretanto, nas fases inicial de injúria renal, pode ocorrer um aumento da secreção de creatinina, conseqüentemente, evitando um aumento dos níveis plasmáticos da mesma (ASNA *et al.*, 2005). Assim, nessa fase inicial, é comum expressar o dano renal pelo índice uréia/creatinina, uma vez que valor elevado desse índice reflete a redução da perfusão renal bem como da taxa de filtração glomerular, como foi observado após a administração de CDDP livre. Contudo, o uso de SpHL-CDDP demonstrou claramente prevenir a toxicidade renal como foi evidenciado pela redução do índice uréia/creatinina. É importante enfatizar que embora sejam observadas alterações nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina após o tratamento com uma dose alta de SpHL-CDDP (30 mg/kg), essas não comprometeram a sobrevivência dos animais diferentemente do observado após a administração de CDDP livre na dose de 20 mg/kg. Provavelmente, a redução das alterações renais observadas após o tratamento com SpHL-CDDP foi devido à capacidade dos lipossomas de modificar o perfil de distribuição do fármaco encapsulado. Estudos de biodistribuição realizado em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich após injeção IP de CDDP livre e SpHL-CDDP, demonstraram um maior coeficiente de partição tecido renal/sangue após o tratamento com CDDP livre (3,8) em comparação com o tratamento com SpHL-CDDP (1,8) (ARAÚJO *et al.*, 2008). Esses resultados indicam o maior extravasamento da CDDP livre para o tecido renal, o que pode induzir severa nefrotoxicidade.

Diante do exposto, os resultados demonstraram importantes diferenças no espectro de toxicidade IP dos SpHL-CDDP quando comparados com a CDDP livre, revelando os efeitos benéficos desses lipossomas como carreadores da CDDP. Esse perfil favorável de toxicidade indica seu potencial para estudos clínicos futuros.

PARTE 2
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SpHL-CDDP
ADMINISTRADOS POR VIA INTRAVENOSA

3.1 Resultados

3.1.1 Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP

A porcentagem de encapsulação da CDDP nos SpHL-CDDP foi de $23,4 \pm 5,5$. O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas de SpHL-CDDP foi igual a $140,4 \pm 9,2$ nm e $0,087 \pm 0,009$, respectivamente. SpHL-CDDP exibiram valores de potencial zeta próximo da neutralidade ($0,9 \pm 1,3$ mV). SpHL apresentaram valores de diâmetro médio e índice de polidispersão iguais a 145 nm e 0,051, respectivamente. O potencial zeta também apresentou valores próximos da neutralidade.

3.1.2 Avaliação do peso dos animais

A **Figura 1.8** apresenta os resultados de variação do peso dos camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP ao longo dos 14 dias experimentais. Foi observado um ganho no peso corporal dos camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 5 mg/kg durante todo o período experimental, exceto nos dois primeiros dias no grupo de camundongos fêmeas, no qual uma pequena perda (3%) de peso foi detectada (**Figura 1.8 A e C**). Após o tratamento com 7,5 mg/kg de CDDP, uma perda de peso corporal no período inicial da avaliação também foi detectada no grupo de camundongos machos, porém a perda máxima observada foi igual a 6% e a recuperação do peso corporal ocorreu a partir do sexto dia experimental. Os camundongos fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 7,5 mg/kg apresentaram uma perda de peso corporal durante os 14 dias de monitoramento e a redução máxima obtida foi igual a 14% (sexto e oitavo dias pós-tratamento). A administração de CDDP livre na dose de 10 mg/kg também induziu uma perda de peso corporal até o quarto dia pós-tratamento em ambos os sexos de camundongos (**Figura 1.8 A e C**). Pronunciados sinais de toxicidade relacionados com a alteração do peso foram observados em

camundongos fêmeas e machos tratados com CDDP livre nas doses de 15 e 20 mg/kg, respectivamente. O grupo de camundongos fêmeas apresentou uma grande perda de peso corporal no período inicial de observação e todos os animais morreram até o sétimo dia pós-tratamento. No grupo de camundongos machos, uma taxa de mortalidade expressiva (40%) foi observada até o quinto dia experimental (**Figura 1.9**). Os animais sobreviventes mostraram uma recuperação do peso corporal a partir do décimo dia pós-administração de CDDP livre. Por outro lado, o tratamento de camundongos machos e fêmeas com 20 mg/kg de SpHL-CDDP induziu uma perda de peso corporal até o quarto dia de observação (**Figura 1.8 B e D**) e nenhuma morte foi observada em ambos os sexos (**Figura 1.9**). Para os animais submetidos à administração de SpHL-CDDP na dose de 25 mg/kg, também foi detectada uma redução no peso corporal no período inicial de monitoramento e a recuperação ocorreu a partir do sexto dia. O aumento da dose administrada para 30 mg/kg levou a uma perda de peso pronunciada em camundongos fêmeas e, somente um animal sobreviveu mantendo o peso corporal reduzido ao longo do período experimental. A administração de 35 mg/kg de SpHL-CDDP em camundongos machos também induziu uma perda de peso expressiva observada até o quarto dia pós-tratamento. Com relação aos grupos controle tratados com solução salina ou SpHL, tanto camundongos machos quanto fêmeas, apresentaram um ganho de peso ao longo de todo o período experimental.

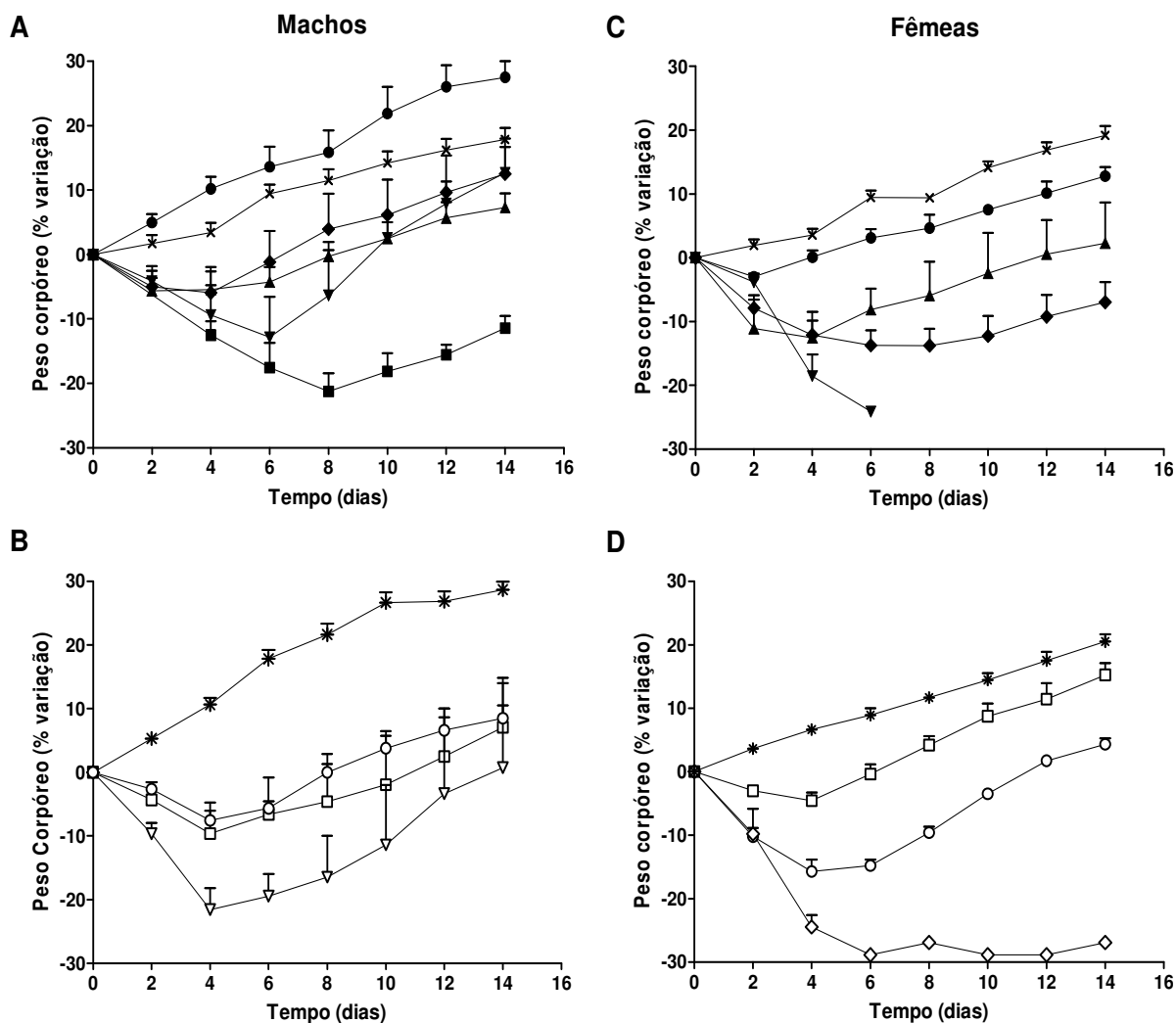


Figura 1.8 - Variação do peso corporal de camundongos Swiss machos (A e B) e fêmeas (C e D) monitorado durante 14 dias após a administração IV de CDDP livre (5 mg/kg, ●; 7,5 mg/kg, ◆; 10 mg/kg, ▲; 15 mg/kg, ▼; 20 mg/kg, ■), SpHL-CDDP (20 mg/kg, □; 25 mg/kg, ○; 30 mg/kg, ◇; 35 mg/kg, ▽), salina (×) e SpHL (*). Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média.

3.1.3 Mortalidade e Sinais Clínicos

Os resultados de sobrevivência de camundongos machos e fêmeas submetidos ao tratamento com CDDP livre, SpHL-CDDP assim como os grupos controle estão apresentados na **Figura 1.9**. Após administração de doses baixas de CDDP livre (5 e 7,5 mg/kg), nenhuma morte foi observada em ambos os sexos de camundongos. O tratamento com 10 e 15 mg/kg de CDDP livre induziu somente 20% de mortes em

camundongos machos, enquanto em camundongos fêmeas a taxa de mortalidade obtida foi de 40% e 100%, respectivamente. O aumento da dose administrada para 20 e 25 mg/kg em camundongos machos levou a uma taxa de mortalidade de 40% e 100%, respectivamente.

Por outro lado, nenhuma morte foi observada após o tratamento com SpHL-CDDP na dose de 20 mg/kg em ambos os sexos. A injeção de 25 e 35 mg/kg de SpHL-CDDP, induziu uma alta taxa de mortalidade (60%) dos camundongos machos. O aumento da dose administrada de SpHL-CDDP para 40 mg/kg conduziu à morte de todos os camundongos machos. Um alto nível de mortalidade também foi observado em camundongos fêmeas que receberam SpHL-CDDP na dose de 25 mg/kg (60%) e 30 mg/kg (80%), e 100% de morte foi obtido após o tratamento com 35 mg/kg de SpHL-CDDP.

Sinais clínicos de toxicidade como diarreia, ataxia, piloereção e fraqueza foram observados nos camundongos tratados com CDDP livre, enquanto nos animais submetidos ao tratamento com SpHL-CDDP esses efeitos foram apenas detectados após a administração de doses altas (35 e 40 mg/kg). Além disso, nos animais que receberam CDDP livre em doses superiores a 7,5 mg/kg, foi detectada uma severa reação na pele seguida de necrose no local da administração. Esse mesmo efeito não foi observado em nenhum grupo tratado com SpHL-CDDP. Nenhum sinal clínico aparente de toxicidade e nenhuma morte foram verificados nos grupos controle tratados com salina ou SpHL.

Os valores de DL_{50} e DMT obtidos para camundongos machos e fêmeas tratados por via IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP estão apresentados na **Tabela 1.6**. Os resultados demonstraram que SpHL-CDDP foi capaz de aumentar 1,7 e 2,4 vezes a DL_{50} em camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Por outro lado, a DMT estabelecida após o tratamento com SpHL-CDDP foi cerca de 3 vezes superior àquela estabelecida com a administração de CDDP livre, indicando que a encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP foi capaz de reduzir sua toxicidade sistêmica.

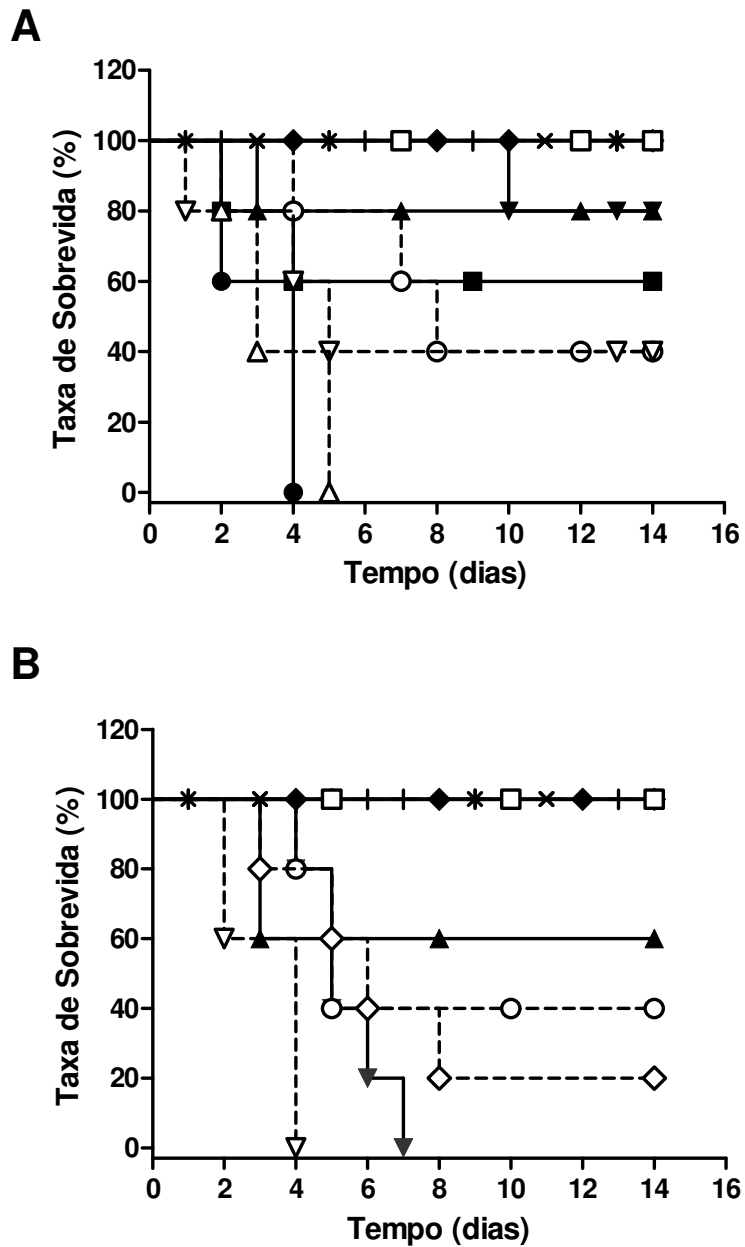


Figura 1.9 - Taxa de sobrevivência de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com CDDP livre (5 mg/kg, ×; 7,5 mg/kg, ◆; 10 mg/kg, ▲; 15 mg/kg, ▼; 20 mg/kg, ■; 25 mg/kg, ●), SpHL-CDDP (20 mg/kg, □; 25 mg/kg, ○; 30 mg/kg, ◇; 35 mg/kg, ▽; 40 mg/kg, Δ), salina (*) e SpHL (|) (a dose de lipídeo foi equivalente àquela administrada no tratamento com SpHL-CDDP na dose 40 mg/kg).

Tabela 1.6 - DL₅₀ e DMT estabelecidas após tratamento IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP em camundongos Swiss

Sexo	Tratamento	DL ₅₀ (mg/kg)	95% IC ^a	DL ₅₀ SpHL-CDDP / DL ₅₀ CDDP livre	DMT (mg/kg)
Machos	CDDP livre	15,9	13,0 - 19,4	1,7	7,5
	SpHL-CDDP	27,5	23,7 - 31,8		20
Fêmeas	CDDP livre	10,8	9,5 - 12,4	2,4	7,5
	SpHL-CDDP	25,9	23,1 - 29,1		20

^a IC representa o intervalo de confiança de 95% obtido nos grupos tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP.

3.1.4 Avaliação Hematológica

Os parâmetros hematológicos dos camundongos machos e fêmeas submetidos ao tratamento IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP estão sumarizados nas **Tabelas 1.7** e **1.8**. Para esses parâmetros também foi investigado o efeito da interação sexo e tratamento. Os resultados demonstraram a influência direta desse efeito de interação apenas para a quantificação de hemoglobina, contagem de linfócitos e plaquetas (**Tabela 1.8**) enquanto os demais parâmetros não sofreram influência desse efeito (**Tabela 1.7**).

Uma redução significativa nos níveis de hemácias e no hematócrito foi detectada após a administração de CDDP livre nas doses de 7,5 e 10 mg/kg. Nenhuma alteração na contagem de leucócitos, neutrófilos e monócitos foi observada após a administração de CDDP livre nessas mesmas doses. Como mencionado anteriormente, uma taxa de mortalidade de 100% foi obtida no grupo de camundongos fêmeas e 20% no grupo de camundongos machos tratados com CDDP livre na dose de 15 mg/kg. No entanto, para os machos que sobreviveram não foi detectada alteração significativa nos parâmetros hematológicos avaliados. O tratamento com CDDP livre (20 mg/kg) reduziu significativamente o hematócrito, a contagem de leucócitos e neutrófilos em relação ao grupo controle tratado com solução salina ($P < 0,05$). A quantificação do hematócrito também foi

significativamente reduzida, após o tratamento com 20 mg/kg (fêmeas e machos) e 25 mg/kg (fêmeas) de SpHL-CDDP em comparação com o grupo tratado com SpHL. Por outro lado, o tratamento com SpHL-CDDP não afetou a contagem de leucócitos, neutrófilos e monócitos em nenhuma das doses administradas (**Tabela 1.7**). Praticamente nenhuma alteração nos níveis de hemoglobina foi detectada após a administração de CDDP em todas as doses avaliadas. Uma redução nos níveis de linfócito foi detectada após a administração de CDDP livre na dose de 20 mg/kg (**Tabela 1.8**). Esses achados correlacionados com a diminuição de leucócitos e neutrófilos demonstram uma acentuada redução nas células de defesa do organismo o que poderia contribuir para a alta mortalidade obtida nesse grupo experimental (**Figura 1.9**). Por outro lado, esse sinal de toxicidade não apareceu em camundongos que receberam SpHL-CDDP. Com relação à contagem de plaquetas, uma plaquetopenia foi detectada nos camundongos machos tratados com CDDP livre na dose de 10 mg/kg e em camundongos fêmeas tratados com 25 mg/kg de SpHL-CDDP. Uma análise comparativa entre CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg), doses correspondentes à dose máxima tolerada em ambos os grupos, demonstrou que as alterações nos níveis de hemácias, hemoglobina e linfócitos decorrentes da administração com SpHL-CDDP apresentaram diferenças significativas em relação àquelas tratadas com CDDP livre. Além disso, vale ressaltar que não foram observadas diferenças entre parâmetros hematológicos dos grupos controle tratados com salina ou SpHL.

Tabela 1.7- Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados quatorze dias após o tratamento por via IV com CDDP ou SpHL-CDDP*

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)					SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5,0	7,5	10	15	20	20	25	35
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	M	8,3 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,4 ± 0,4	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,2	7,8 ± 0,4	6,6 ± 1,1	7,8 ± 0,2	N.D.	7,3 ± 0,2
	F	8,2 ± 0,1	8,4 ± 0,2	8,6 ± 0,4	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,3	N.D.	N.D.	7,6 ± 0,2	8,0 ± 0,1	N.D.
	G	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,2	8,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2 ^a	7,4 ± 0,2 ^a			7,7 ± 0,1 ^b		
Hematócrito (%)	M	44,3 ± 1,1	41,6 ± 1,0	45,3 ± 2,0	37,4 ± 1,7	39,4 ± 1,2	40,8 ± 2,0	33,3 ± 2,5 ^a	39,7 ± 1,0	N.D.	37,9 ± 0,1
	F	42,9 ± 0,4	44,1 ± 1,8	46,6 ± 0,4	35,9 ± 1,2	38,5 ± 2,1	N.D.	N.D.	36,5 ± 1,1	39,0 ± 0,4 ^a	N.D.
	G	43,8 ± 0,5	42,6 ± 1,0	46,0 ± 0,8	36,6 ± 1,0 ^a	39,0 ± 1,0 ^a			38,3 ± 0,9 ^a		
Leucócito (10 ³ /mm ³)	M	5,6 ± 0,4	6,5 ± 0,8	5,4 ± 0,8	4,8 ± 0,4	5,5 ± 0,6	5,2 ± 0,6	2,7 ± 0,2 ^a	6,3 ± 0,8	N.D.	4,1 ± 0,1
	F	5,8 ± 0,5	4,1 ± 0,6	4,8 ± 0,6	5,4 ± 0,7	4,7 ± 0,9	N.D.	N.D.	5,8 ± 0,7	5,4 ± 1,1	N.D.
	G	5,8 ± 0,4	5,5 ± 0,8	5,1 ± 0,7	5,2 ± 0,6	5,1 ± 0,7			6,1 ± 0,5		
Neutrófilo (10 ³ /mm ³)	M	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,3	0,8 ± 0,02 ^a	1,5 ± 0,3	N.D.	1,7 ± 0,1
	F	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,4	2,5 ± 0,6	1,4 ± 0,4	N.D.	N.D.	3,3 ± 0,3	2,7 ± 0,6	N.D.
	G	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3			2,3 ± 0,4		
Monócito (10 ³ /mm ³)	M	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,08	0,06 ± 0,001	0,08 ± 0,02	N.D.	0,10 ± 0,06
	F	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,04	N.D.	N.D.	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,01	N.D.
	G	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02			0,10 ± 0,02		

Esses parâmetros não foram influenciados pelo efeito de interação sexo e tratamento. M (machos), F (fêmeas) e G (média do grupo).

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg).

N.D. significa não determinado.

O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

Tabela 1.8 - Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados quatorze dias após o tratamento por via IV com CDDP ou SpHL-CDDP*

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)					SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5,0	7,5	10	15	20	20	25	35
Hemoglobina (g/dl)	M	12,8 ± 0,1	12,6 ± 0,2	13,4 ± 0,6	11,2 ± 0,5	11,2 ± 0,4	11,3 ± 0,4	10,4 ± 1,5	12,9 ± 0,3 ^{b,c}	N.D.	10,8 ± 0,1
	F	13,1 ± 0,3	13,4 ± 0,5	13,0 ± 0,5	11,4 ± 0,3	12,4 ± 0,6	N.D.	N.D.	11,3 ± 0,2 ^a	11,2 ± 0,3 ^a	N.D.
Linfócito (10 ³ /mm ³)	M	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,6	3,3 ± 0,5	2,3 ± 0,3	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3	1,8 ± 01 ^a	4,8 ± 0,6 ^{b,c}	N.D.	2,2 ± 0,2
	F	3,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4	3,0 ± 0,4	3,6 ± 0,6	3,9 ± 1,0	N.D.	N.D.	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,2	N.D.
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	M	460 ± 28	638 ± 54 ^c	768 ± 84 ^a	652 ± 21	268 ± 30 ^c	757 ± 122	483 ± 51	716 ± 53	N.D.	699 ± 140
	F	484 ± 25	427 ± 26	807 ± 48	732 ± 32	503 ± 38	N.D.	N.D.	677 ± 31	396 ± 32 ^a	N.D.

Esses parâmetros não foram influenciados pelo efeito de interação sexo e tratamento.

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg).

^c Representa diferença significativa entre grupos de camundongos M (machos) e F (fêmeas).

N.D. significa não determinado.

O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

3.1.5 Análise Bioquímica

As alterações nos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal avaliados 14 dias após o tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP estão apresentadas na **Tabela 1.9**. O tratamento com CDDP livre na dose de 5 mg/kg não induziu alterações significativas nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina em ambos os sexos de camundongos, em comparação com o grupo controle tratado com solução salina. Para camundongos machos e fêmeas submetidos à administração de CDDP livre na dose de 7,5 mg/kg, um aumento significativo nos níveis de uréia ($P < 0,05$) foi observado. O aumento da dose administrada para 10 mg/kg e 20 mg/kg em fêmeas e machos, respectivamente, induziu elevações significativas nos níveis plasmáticos de uréia em comparação com o grupo controle tratado com solução salina. Nenhuma alteração significativa nos níveis de creatinina foi observada após a administração de CDDP livre nas diferentes doses. Entretanto, nos estágios iniciais de comprometimento renal, um mecanismo compensatório de secreção pode ser ativado e parte da creatinina pode então ser secretada, mantendo seus níveis plasmáticos dentro dos limites de normalidade. Nessas situações, a avaliação do índice uréia/creatinina pode ser um indicativo de toxicidade renal em estágio inicial. Portanto, alterações significativas no índice uréia/creatinina após a administração de CDDP livre (7,5 e 10 mg/kg) foram observadas em fêmeas, enquanto para os machos, aumentos expressivos somente foram notados após a administração de 15 e 20 mg/kg de CDDP livre. Em relação ao tratamento com SpHL-CDDP praticamente nenhuma alteração significativa nos níveis de uréia e creatinina foram observados após a administração das diferentes doses, exceto no grupo de animais machos tratados com SpHL-CDDP na dose de 20 mg/kg, no qual uma redução nos níveis de uréia e creatinina foi observada, em comparação com o grupo controle tratado com SpHL. Aumento do índice uréia/creatinina foi apenas observado após a administração de uma dose alta de SpHL-CDDP (35 mg/kg) em camundongos machos. Além disso, uma análise comparativa dos dois tratamentos considerando a DMT de ambos, demonstrou que a administração de SpHL-CDDP reduziu significativamente a toxicidade renal induzida pela CDDP livre em camundongos machos como observado pelos níveis de uréia e creatinina. No grupo de camundongos fêmeas, diferenças significativas foram detectadas nos níveis de

uréia e no índice uréia/creatinina dos animais tratados com SpHL-CDDP em relação à CDDP livre (**Tabela 1.9**).

Tabela 1.9 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal avaliados em camundongos machos e fêmeas quatorze dias após a administração por via IV de CDDP livre ou SpHL-CDDP

Parâmetros	Controles		CDDP livre (mg/kg)					SpHL-CDDP (mg/kg)			
	Salina	SpHL	5	7,5	10	15	20	20	25	35	
Uréia (mg/dL)	M	51 ± 3	75 ± 1 ^a	38 ± 1 ^c	89 ± 8 ^{a,c}	72 ± 1 ^c	65 ± 5	83 ± 10 ^a	54 ± 5 ^{a,b}	N.D.	67 ± 12
	F	54 ± 4	66 ± 6	50 ± 2	119 ± 15 ^a	147 ± 78 ^a	N.D.	N.D.	42 ± 4 ^b	58 ± 1	N.D.
Creatinina (mg/dL)	M	0,70 ± 0,05	0,94 ± 0,05 ^c	0,45 ± 0,02	1,14 ± 0,23 ^c	0,87 ± 0,03	0,43 ± 0,06	0,44 ± 0,03	0,39 ± 0,04 ^{a,b}	N.D.	0,30 ± 0,02
	F	0,61 ± 0,05	0,49 ± 0,01	0,42 ± 0,05	0,62 ± 0,12	0,71 ± 0,21	N.D.	N.D.	0,59 ± 0,09	0,57 ± 0,07	N.D.
Índice Uréia/ creatinina	M	70 ± 4	85 ± 4 ^c	87 ± 5 ^c	96 ± 27 ^c	83 ± 4 ^c	157 ± 19 ^a	172 ± 39 ^a	140 ± 10 ^c	N.D.	228 ± 55 ^a
	F	91 ± 11	116 ± 2	132 ± 25	212 ± 32 ^a	197 ± 24 ^a	N.D.	N.D.	87 ± 10 ^b	105 ± 21	N.D.

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg).

^c Representa diferença estatística significativa entre M (machos) e F (fêmeas).

N.D. significa não determinado.

O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

Diante desses resultados pode-se inferir que uma das possíveis razões de morte dos camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 20 e 15 mg/kg, respectivamente, e dos animais tratados com SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg (**Figura 1.9**) seja a nefrotoxicidade induzida pelo fármaco. Portanto, para confirmar essa hipótese, os parâmetros indicativos de toxicidade renal também foram investigados três dias após o tratamento com CDDP livre (doses de 15 e 20 mg/kg para camundongos fêmeas e machos, respectivamente) e SpHL-CDDP (doses de 25 e 35 mg/kg para camundongos fêmeas e machos, respectivamente). Esse dia foi determinado a partir da observação de que nenhum animal morreu até o terceiro dia pós-tratamento, como pode ser verificado na **Figura 1.9**, com exceção dos camundongos machos tratados com 35 mg/kg de SpHL-CDDP. Os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de uréia e creatinina ($P < 0,05$) dos camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre ou SpHL-CDDP em comparação com seus respectivos grupos controle (**Figura 1.10 A**). Vale ressaltar que a dose de SpHL-CDDP administrada tanto em camundongos machos quanto em camundongos fêmeas foi aproximadamente 1,7 vezes maior que a dose de CDDP livre administrada. No entanto, mesmo após a administração de SpHL-CDDP em doses superiores, as alterações observadas nos níveis de uréia (machos e fêmeas) e creatinina (machos) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) em relação à administração de CDDP livre. Por outro lado, as alterações nos níveis de creatinina detectadas no grupo de camundongos fêmeas tratados com SpHL-CDDP foram significativamente menores ($P < 0,05$) que aquelas induzidas pelo fármaco livre. Com relação ao índice uréia/creatinina, nenhuma alteração foi observada em camundongos machos e fêmeas tratados com CDDP livre em relação ao grupo controle. Entretanto, a administração de SpHL-CDDP em uma dose 1,7 vezes maior que aquela de CDDP livre provocou um aumento no índice uréia/creatinina (**Figura 1.10 C**). Esse conjunto de resultados sugere o aparecimento de um comprometimento renal tanto nos animais tratados com CDDP quanto naqueles tratados com SpHL-CDDP, porém nesses a toxicidade renal encontra-se em uma fase inicial. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de uréia, creatinina e no índice uréia/creatinina entre os grupos controle tratados com salina e SpHL ($P > 0,05$).

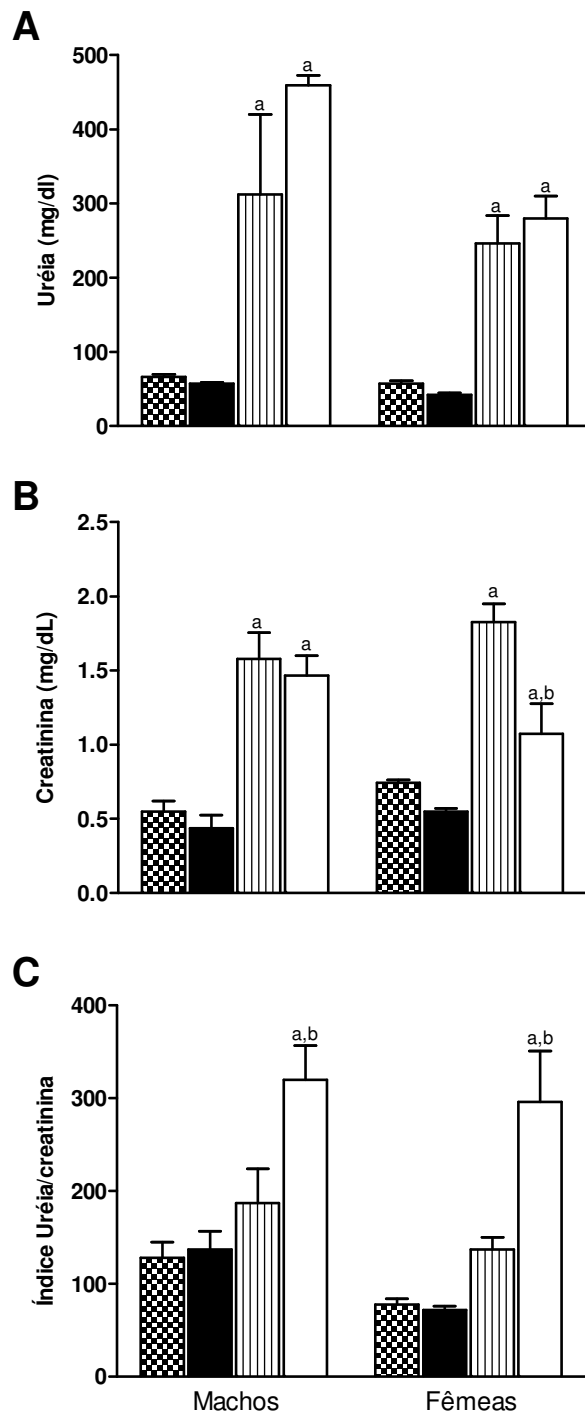


Figura 1.10 - Níveis plasmáticos de uréia (A), creatinina (B) e índice uréia/creatinina (C) de camundongos Swiss machos e fêmeas avaliados três dias após o tratamento por via IV com CDDP livre (▤) nas doses de 20 e 15 mg/kg para machos e fêmeas, respectivamente; SpHL-CDDP (□) nas doses de 35 e 25 mg/kg para machos e fêmeas, respectivamente; salina (▨) e SpHL (■). ^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre ou SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle. ^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre e SpHL-CDDP. O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

As alterações dos parâmetros bioquímicos relacionados com hepatotoxicidade estão apresentadas na **Tabela 1.10**. O tratamento com CDDP livre na dose de 5 mg/kg causou uma alteração nos níveis de AST de camundongos machos em comparação com o grupo controle tratado com solução salina. A administração de 7,5 mg/kg de CDDP em camundongos machos também induziu significativo aumento na concentração sérica de AST, FA, proteína total e globulina, porém nenhuma alteração na relação albumina/globulina foi detectada quando comparada com o grupo tratado com solução salina. Em camundongos fêmeas, o tratamento com CDDP livre nas doses de 5 e 10 mg/kg causou uma redução significativa nos níveis séricos de globulina, o que desencadeou uma redução nos níveis de proteína total. Com relação à GGT, um dos marcadores mais específicos de dano hepático, as alterações foram apenas observadas após a administração de CDDP livre na dose mais alta (20 mg/kg) em camundongos machos. Por outro lado, o tratamento de camundongos machos com SpHL-CDDP nas doses de 20 e 35 mg/kg induziu uma redução significativa na concentração de globulina acompanhado de uma diminuição de proteína total em relação ao controle tratado com SpHL. Porém, quando os níveis de proteína total e globulina desses grupos experimentais foram avaliados em relação ao grupo controle tratado com solução salina, nenhuma alteração foi detectada. Possivelmente, esta diferença observada entre os grupos controle seja devido à alta dose de lípides administrada, dose equivalente àquela administrada no tratamento com SpHL-CDDP a 40 mg/kg. Além disso, a administração de SpHL-CDDP (20 mg/kg) apresentou níveis de AST, FA, proteína total e globulina em camundongos machos significativamente menores do que os observados com o tratamento com CDDP livre (7,5 mg/kg). Para os camundongos fêmeas, menores concentrações de proteína total e frações também foram observadas entre o grupo de animais tratados com CDDP livre (7,5 mg/kg) e o grupo tratado com SpHL-CDDP (20 mg/kg).

Tabela 1.10 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao tratamento por via IV com CDDP livre ou SpHL-CDDP

Parâmetros		Controles		CDDP livre (mg/kg)					SpHL-CDDP (mg/kg)		
		Salina	SpHL	5	7,5	10	15	20	20	25	35
ALT (IU/L)	M	58 ± 4	74 ± 7	132 ± 11	96 ± 31	65 ± 6	123 ± 10	46 ± 9	37 ± 3	N.D.	109 ± 7
	F	82 ± 16	80 ± 7	124 ± 29	72 ± 13	40 ± 3	N.D.	N.D.	59 ± 17	68 ± 4	N.D.
AST (IU/L)	M	102 ± 8	205 ± 15	218 ± 12 ^a	281 ± 40 ^{a,c}	236 ± 80	166 ± 15	188 ± 54	151 ± 4 ^{a,b}	N.D.	179 ± 20
	F	104 ± 20	170 ± 12	214 ± 14	199 ± 10	223 ± 82	N.D.	N.D.	165 ± 29	180 ± 32	N.D.
FA (IU/L)	M	121 ± 13	185 ± 19	138 ± 5	197 ± 19 ^a	158 ± 6	158 ± 20	185 ± 5	103 ± 17 ^b	N.D.	189 ± 52
	F	109 ± 21	134 ± 20	181 ± 16	148 ± 27	134 ± 9	N.D.	N.D.	100 ± 19	89 ± 12	N.D.
Proteína total (10 ³ /mm ³)	M	4,9 ± 0,1	6,7 ± 0,1 ^d	4,4 ± 0,1	8,0 ± 0,8 ^a	4,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,3 ± 0,4	4,5 ± 0,2 ^{a,b}	N.D.	4,6 ± 0,2 ^a
	F	5,9 ± 0,2	5,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2 ^a	7,0 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,3 ^a	N.D.	N.D.	4,8 ± 0,4 ^b	4,1 ± 0,1 ^a	N.D.
Albumina (g/dL)	M	2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	N.D.	3,0 ± 0,4
	F	2,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,1 ± 0,3	2,2 ± 0,1	N.D.	N.D.	1,8 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,2	N.D.
Globulina (g/dL)	M	2,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1 ^{c,d}	2,2 ± 0,2	4,6 ± 0,4 ^{a,c}	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2 ^{a,b}	N.D.	2,6 ± 0,2 ^a
	F	3,3 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2 ^a	N.D.	N.D.	3,0 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,1	N.D.
GGT (g/dL)	M	2,0 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,7	3,4 ± 0,6 ^a	3,0 ± 0,4	N.D.	2,5 ± 0,5
	F	2,3 ± 0,6	1,8 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,2 ± 0,5	4,0 ± 0,6	N.D.	N.D.	1,8 ± 0,4	2,5 ± 1,5	N.D.

ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), GGT (gama glutamiltransferase).

^a Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre, SpHL-CDDP e seu respectivo grupo controle.

^b Representa diferença estatística significativa entre os tratamentos com CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg).

^c Representa diferença estatística significativa entre M (machos) e F (fêmeas).

^d Representa diferença estatística significativa entre o grupo tratado com salina e o grupo tratado com SpHL.

N.D. significa não determinado.

O nível de significância foi considerado para valores de $P \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média.

3.1.6 Avaliação Histopatológica

Nesse estudo, apenas os cortes histológicos do grupo controle tratado com solução salina foram representados uma vez que os resultados foram semelhantes àqueles obtidos para o grupo controle tratado com SpHL. Os cortes histológicos de tecido ósseo dos camundongos tratados com diferentes doses de CDDP livre e SpHL-CDDP estão apresentadas na **Figura 1.11**. A análise microscópica da medula óssea de camundongos machos, realizada quatorze dias após o tratamento com 20 mg/kg de CDDP livre, demonstrou uma pronunciada hipocelularidade com supressão predominante dos precursores eritrocíticos e mielocíticos (**Figura 1.11 C**). Para o grupo de camundongos fêmeas tratados com CDDP livre na dose de 10 mg/kg, nenhuma alteração morfológica da medula óssea foi observada (**Figura 1.11 E**). O tratamento com as diferentes doses de SpHL-CDDP não induziu alterações morfológicas da medula óssea (**Figura 1.11 D e F**). O perfil morfológico da medula óssea desses animais foi semelhante aos animais dos grupos controle tratados com solução salina ou SpHL.

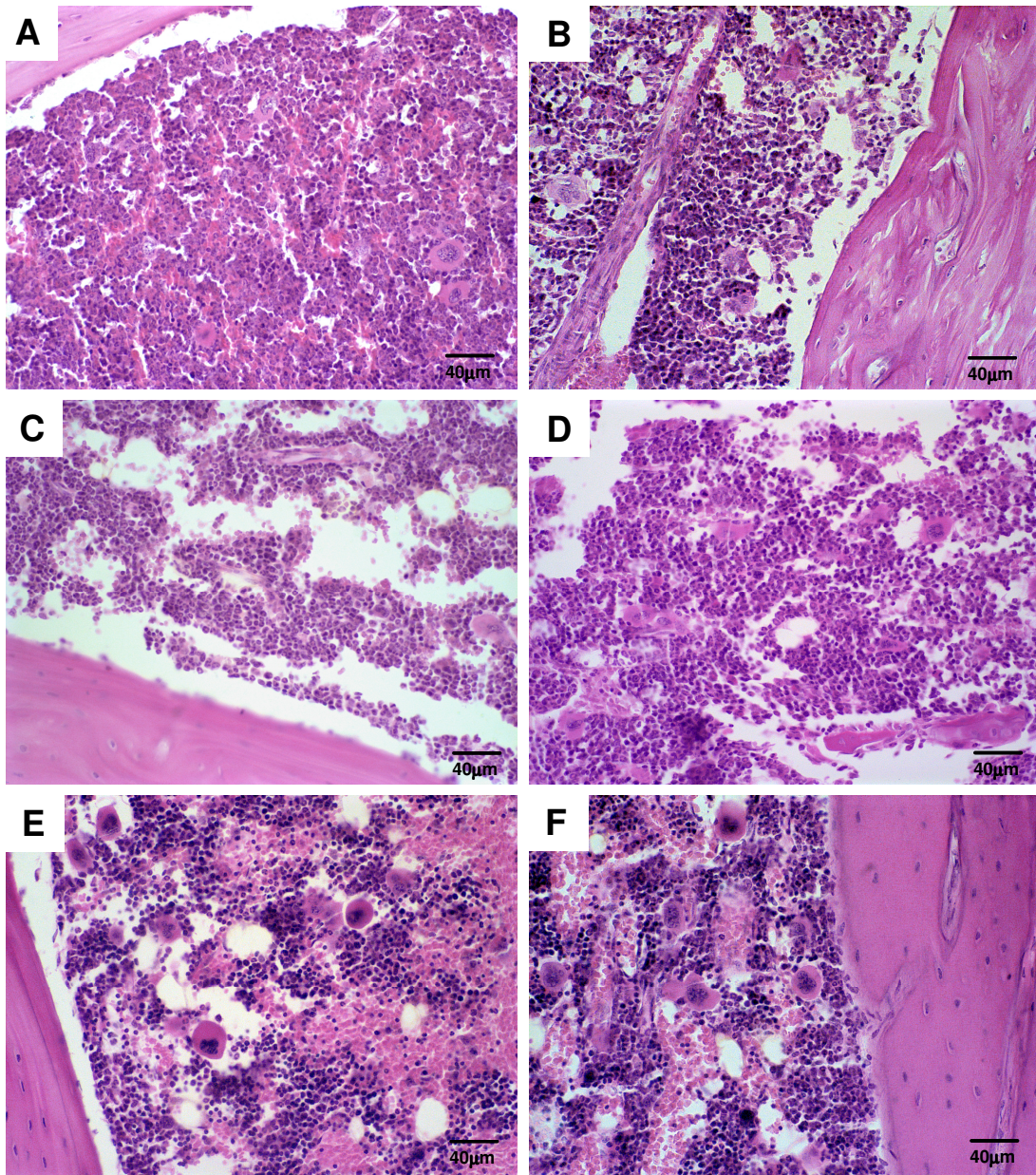


Figura 1.11 - Fotomicrografias do tecido hematopoiético de camundongos Swiss machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) tratados com solução salina (A e B), CDDP livre (C e D) e SpHL-CDDP (E e F). C e D representam cortes histológicos realizados quatorze dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 10 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente. E e F mostram cortes histológicos realizados quatorze dias após o tratamento com SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

Com relação à toxicidade renal, os camundongos machos tratados com 20 mg/kg de CDDP livre mostraram clara evidência de insuficiência renal com áreas de necrose coagulativa do epitélio tubular, o qual mostrou-se achatado, parcialmente descamado e com a luz tubular preenchida por material proteináceo róseo (**Figura 1.12 C**). Por outro lado, nenhuma evidência de disfunção renal foi observada em camundongos machos tratados com SpHL-CDDP (20 mg/kg), sendo o perfil morfológico semelhante ao grupo controle. Para os animais tratados com SpHL-CDDP (35 mg/kg) que sobreviveram até quatorze dias após o tratamento, também não foi observada alteração histológica do tecido renal (**Figura 1.12 E**). No caso de camundongos fêmeas, nenhuma alteração morfológica do tecido renal foi observada quatorze dias após o tratamento com CDDP livre na dose de 10 mg/kg e SpHL-CDDP na dose de 25 mg/kg (**Figura 1.12 D e F**). Por outro lado, a avaliação histológica do tecido renal dos camundongos sacrificados três dias após o tratamento com CDDP livre (20 mg/kg em machos e 10 mg/kg em fêmeas) demonstrou um perfil característico de necrose tubular aguda (**Figuras 1.13 A e 1.13 B**). Da mesma forma, o exame microscópico dos rins de camundongos machos sacrificados três dias após o tratamento com 35 mg/kg de SpHL-CDDP revelou o aparecimento de moderadas áreas de necrose tubular (**Figuras 1.13 C**). Os cortes histológicos do tecido renal de camundongos fêmeas submetidos ao tratamento com SpHL-CDDP na dose de 25 mg/kg também demonstraram alterações morfológicas indicativas de toxicidade renal. Esses resultados explicam a alta taxa de mortalidade dos animais obtidas nesses grupos experimentais. Vale destacar que o perfil morfológico do tecido renal foi semelhante entre os grupos controle tratados com solução salina ou SpHL. Esses resultados da avaliação histológica corroboram a inexistência de toxicidade renal induzida após o tratamento dos camundongos com a solução salina ou com SpHL.

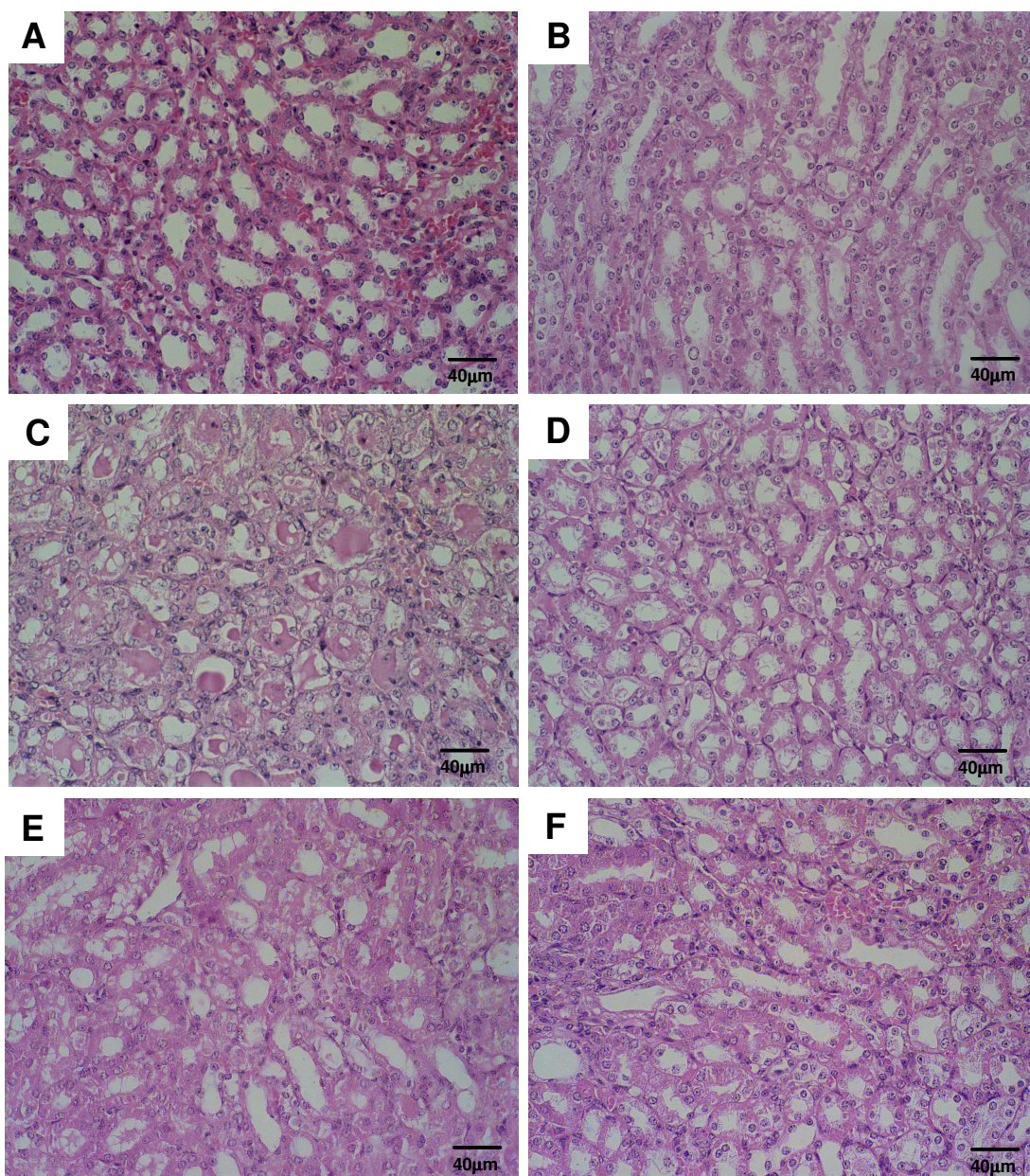


Figura 1.12 – Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) tratados com solução salina (A e B), CDDP livre (C e D) e SpHL-CDDP (E e F). Os animais foram sacrificados quatorze dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 10 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente e SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente. A, B, D, E e F apresentam cortes de tecido renal dentro dos limites de normalidade. Em C, extensas áreas de necrose podem ser observadas. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

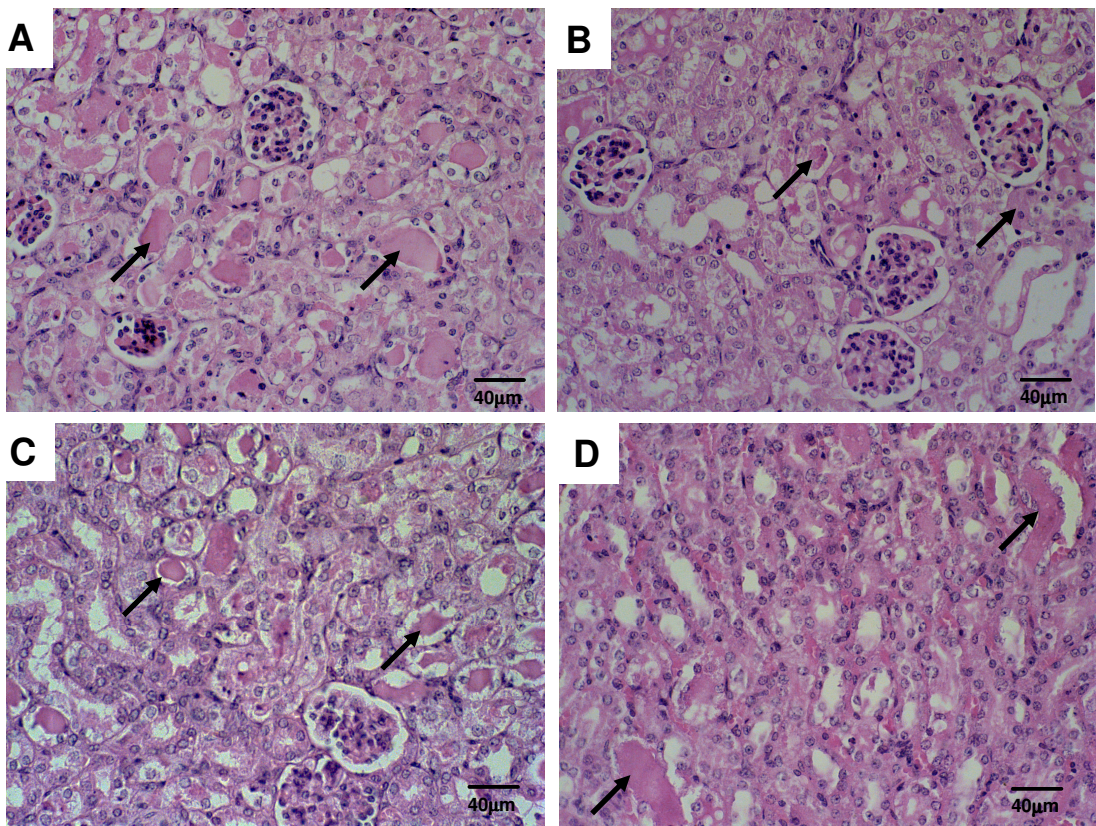


Figura 1.13 - Fotomicrografias do tecido renal de camundongos Swiss machos (A e C) e fêmeas (B e D) tratados com solução CDDP livre (A e B) e SpHL-CDDP (C e D). Os animais foram sacrificados três dias após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 15 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente e SpHL-CDDP nas doses de 35 e 25 mg/kg em machos e fêmeas, respectivamente. Em A pode-se observar extensas áreas de necrose (setas pretas), comprometendo praticamente todo parênquima renal. Em B, C e D, áreas de necrose (setas pretas) menos intensas e algumas células inflamatórias também podem ser visualizadas. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

Nenhuma alteração histopatológica do fígado e baço foi observada em camundongos machos e fêmeas submetidos ao tratamento com CDDP livre ou SpHL-CDDP em todas as doses administradas. Os cortes histológicos em diferentes níveis do parênquima hepático e esplênico mostraram-se dentro dos limites de normalidade, com a arquitetura dos órgãos preservada (**Figura 1.14**).

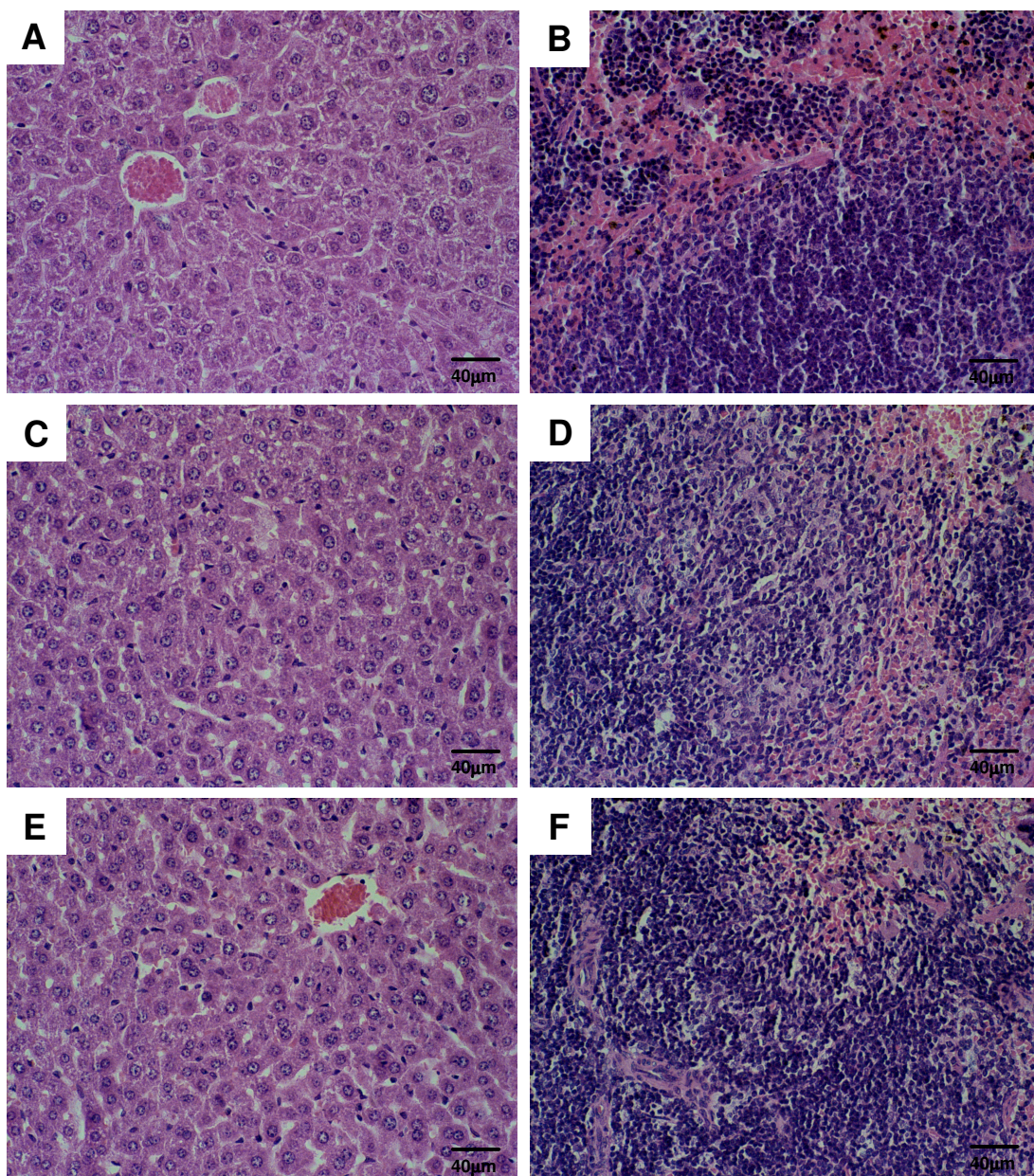


Figura 1.14 - Fotomicrografias do tecido hepático (A, C e E) e esplênico (B, D e F) de camundongos Swiss machos tratados com solução salina (A e B), CDDP livre na dose de 20 mg/kg (C e D) e SpHL-CDDP na dose de 35 mg/kg (E e F). Os animais foram sacrificados quatorze dias após o tratamento. Nenhuma alteração morfológica foi observada nos tecidos hepático e esplênico. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100.

3.2 Discussão

Vários estudos têm demonstrado que os lipossomas são sistemas de liberação de fármacos capazes de modificar a distribuição tecidual, o metabolismo e a eliminação *in vivo* de determinados antineoplásicos em relação à administração do fármaco livre (HARRINGTON *et al.*, 2001; FERRARI, 2005). Uma formulação lipossomal contendo um antineoplásico é projetada com o objetivo de reduzir sua toxicidade e manter ou aumentar sua atividade antitumoral (BOULIKAS, 2007). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram uma menor perfusão da CDDP para o tecido renal após a administração IV de SpHL-CDDP em relação à CDDP livre, sugerindo que o uso de SpHL-CDDP como sistema de liberação da CDDP poderia reduzir a toxicidade induzida pelo fármaco (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Portanto, nessa etapa do trabalho foi realizado o estudo da toxicidade aguda de SpHL-CDDP administrado por via IV em camundongos Swiss machos e fêmeas. Os parâmetros avaliados no estudo de toxicidade aguda por via IV incluíram variação do peso corporal, mortalidade, avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica.

A administração das doses mais baixas de CDDP livre (5 e 7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg) induziu uma resposta semelhante de variação do peso corporal. Em ambos os casos, a redução foi inferior a 15% e nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado. Esses dados associados aos resultados de letalidade permitiram estabelecer a DMT após o tratamento com CDDP livre e SpHL-CDDP, sendo os valores obtidos iguais a 7,5 e 20 mg/kg, respectivamente. Os sinais de toxicidade tornaram-se mais evidentes após a administração de CDDP livre em doses superiores a DL_{50} , a qual foi determinada como 15,9 mg/kg em camundongos machos e 10,8 mg/kg em camundongos fêmeas. Uma grande redução do peso e expressiva mortalidade foram observadas após o tratamento com CDDP livre nas doses de 20 e 15 mg/kg em camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Esses resultados corroboram trabalhos anteriores cujos valores de DMT e DL_{50} estabelecidos para o tratamento com CDDP livre foram iguais a 8 e 15,4 mg/kg, respectivamente (TAMURA *et al.*, 2002c). No entanto, a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada foi capaz de reduzir a toxicidade

induzida pela CDDP, uma vez que aumentou significativamente a DMT (aproximadamente 2,7 vezes maior que aquela estabelecida para CDDP livre), em ambos os sexos. Além disso, a DL₅₀ obtida após o tratamento com SpHL-CDDP foi 2,4 e 1,7 vezes superior àquela obtida após a administração de CDDP livre, em camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Sinais clínicos de toxicidade e uma alta taxa de mortalidade foram somente observados após a administração de SpHL-CDDP em doses superiores à DL₅₀ (27,5 e 25,9 mg/kg para camundongos machos e fêmeas, respectivamente).

Tem sido claramente relatado que o tratamento com CDDP livre induz efeitos tóxicos severos dos quais destacam-se mielotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (ASNA *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2007). No presente trabalho, as alterações hematológicas observadas após a administração de CDDP livre associadas às alterações histopatológicas do tecido ósseo confirmaram o potencial mielossupressor da CDDP. Esses efeitos foram principalmente detectados em doses acima da DL₅₀, sendo observada uma redução significativa no sangue periférico dos parâmetros de série vermelha e branca. A avaliação microscópica da medula óssea desses camundongos demonstrou pronunciada hipocelularidade, com redução de todos os precursores celulares, sugerindo portanto, que essas alterações são decorrentes do efeito mielotóxico do fármaco. Achados semelhantes foram observados em estudos pré-clínicos utilizando uma formulação lipossomal contendo cisplatina, SPI-077, em comparação com o fármaco livre (WORKING *et al.*, 1998). Por outro lado, alterações no número de hemácias, valores do hematócrito e hemoglobina também foram observadas nos grupos tratados com SpHL-CDDP (20 mg/kg). Alguns estudos descrevem efeitos tóxicos indesejáveis na circulação sanguínea decorrente de regimes quimioterápicos utilizando a DMT (OOYAMA, *et al.*, 2008). No entanto, a ausência de toxicidade medular observada nesse grupo sugere que esses resultados apresentam pouco significado clínico.

Com relação à nefrotoxicidade, como já mencionado, o mecanismo de toxicidade induzido pela CDDP provoca lesões iniciais nos túbulos-intersticiais, danificando inicialmente os túbulos proximais, especificamente o segmento S3 da região medular além de alterar as mitocôndrias nos túbulos contorcidos distais (YAO *et al.*, 2007). Nesse trabalho, as alterações histopatológicas do tecido renal de

camundongos tratados com CDDP livre nas doses de 15 e 20 mg/kg associadas à alterações nos níveis de uréia e creatinina (**Figura 1.10**) demonstraram clara evidência de insuficiência renal induzida por esse fármaco. Entretanto, a razão uréia/creatinina não foi alterada em comparação com o grupo controle. Esse fato pode ser explicado por um maior comprometimento do tecido renal, induzindo uma redução significativa na perfusão renal e na taxa de filtração glomerular, aumentando significativamente os níveis plasmáticos de uréia e creatinina. É sabido que em casos de função renal muito baixa, um mecanismo compensatório de secreção de creatinina é ativado. No entanto, a quantidade de creatinina secretada é muito pequena e, conseqüentemente, o que permanece na corrente sanguínea é tão elevado que a razão uréia/creatinina permanece inalterada em relação ao controle. Por outro lado, após o tratamento com SpHL-CDDP nas doses de 25 e 35 mg/kg os níveis sanguíneos de creatinina foram menores que aqueles obtidos após o tratamento com CDDP livre e, conseqüentemente, um aumento no índice uréia/creatinina foi observado. Nesse caso, provavelmente ocorre um início de comprometimento renal, porém o efeito na filtração glomerular é menor do que aquele detectado após a administração de CDDP, uma vez que parte da creatinina ainda está sendo filtrada e secretada. Por outro lado, a avaliação da nefrotoxicidade quatorze dias após o tratamento demonstrou que SpHL-CDDP (20 mg/kg) reduziu significativamente a toxicidade renal quando comparado com a administração de CDDP livre (7,5 mg/kg). Nenhuma alteração nos parâmetros indicativos de toxicidade renal assim como ausência de alterações morfológicas no tecido renal foram observadas no grupo de animais tratados com SpHL-CDDP. Como mencionado anteriormente, estudos prévios de biodistribuição demonstraram que o tratamento com SpHL-CDDP aumentou a área sob a curva no tecido renal em comparação com a administração de CDDP livre, porém, o coeficiente de partição tecido renal/sangue para o tratamento com CDDP livre foi maior do que para o tratamento realizado com SpHL-CDDP (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Diante disso, a menor toxicidade observada nos camundongos tratados com SpHL-CDDP pode ser explicada pela modificação no perfil de biodistribuição obtido após a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, a qual foi principalmente observada mediante a redução da partição da CDDP entre o espaço vascular e o tecido renal.

No que diz respeito à toxicidade hepática, alguns estudos têm demonstrado que a administração de CDDP na dose de 7,5 mg/kg induz lesão hepática caracterizada por elevação significativa da atividade de AST e GGT (ZICCA *et al.*, 2002). No presente trabalho, aumentos significativos dos níveis de AST, FA e proteínas foram observados após a administração de CDDP livre na dose de 7,5 mg/kg, demonstrando o início de um comprometimento hepático. Por outro lado, o tratamento com SpHL-CDDP não induziu alterações bioquímicas indicativas de hepatotoxicidade em relação ao grupo controle tratado com solução salina, sugerindo que a encapsulação promove maior proteção do tecido hepático. O estudo de biodistribuição também demonstrou que a concentração de CDDP no tecido hepático foi 2,7 vezes maior após a administração de CDDP livre em relação à administração de SpHL-CDDP (CARVALHO-JÚNIOR, 2007a). No entanto, apesar das alterações observadas no sangue periférico, nenhum comprometimento tecidual foi detectado.

Diante disso, pode-se dizer que o tratamento IV com SpHL-CDDP mostrou ser mais seguro em relação à administração de CDDP livre, no que se refere à mielotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Os resultados sugerem que a utilização de SpHL-CDDP pode representar uma vantagem terapêutica no tratamento de tumores sólidos, uma vez que um dos principais problemas da terapia com CDDP consiste na não adesão do paciente à terapia em função da toxicidade induzida pelo fármaco.

PARTE 3

ESTUDO COMPARATIVO DA TOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR CDDP LIVRE E SpHL-CDDP ADMINISTRADOS POR VIA INTRAPERITONEAL E INTRAVENOSA

1 ESTUDO COMPARATIVO DA TOXICIDADE AGUDA INDUZIDA PELA CDDP LIVRE E SpHL-CDDP CONSIDERANDO A VIA DE ADMINISTRAÇÃO UTILIZADA

Sabe-se que para desenvolver um novo medicamento vários estudos pré-clínicos devem ser conduzidos, entre eles, o estudo de toxicidade, o qual permite selecionar, por exemplo, formulações de CDDP menos nefrotóxicas em relação às formulações convencionais. No desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, um dos principais objetivos do estudo de toxicidade é estabelecer uma dose inicial segura e um esquema de dose escalonada, a fim de alcançar uma DMT eficaz com benefícios máximos para o paciente. Além disso, definir a dose limite de toxicidade e seus órgãos-alvo potenciais para suportar os estudos clínicos de fase I (EMEA, 1998). Os fármacos antitumorais estão entre os agentes mais tóxicos administrados em humanos e, normalmente, os pacientes em estudos clínicos apresentam a doença, muitas vezes em estágio avançado. Conseqüentemente, esquemas de doses maiores são utilizados na clínica e, na maioria das vezes, o sucesso significa selecionar uma dose inicial elevada, reduzindo o número de administrações necessárias para alcançar uma dose biologicamente efetiva em seres humanos (MIRSALIS *et al.*, 2003). Vários estudos de terapia antitumoral têm utilizado o direcionamento de fármacos por meio de sistemas carreadores com o objetivo de assegurar um tempo de circulação sanguínea prolongado com acúmulo reduzido nos tecidos normais, o que pode favorecer a diminuição do número de doses administradas e a redução da toxicidade. Nesta etapa do trabalho, nós comparamos os possíveis efeitos tóxicos *in vivo* de uma formulação lipossomal contendo CDDP administrada em dose única por via IP e IV.

Os resultados desse estudo demonstraram que a administração de SpHL-CDDP em dose única em camundongos Swiss machos e fêmeas foi bem tolerada tanto por via IP e quanto por via IV se comparado com o tratamento de CDDP livre. No entanto, foi detectada uma diferença marcante no perfil de toxicidade após injeção IP e IV de SpHL-CDDP, sendo que essa formulação mostrou-se menos tóxica após o tratamento por via IP do que por via IV. A DL₅₀ variou de 45,4 - 47,5 mg/kg e 25,9 - 27,5 mg/kg em camundongos tratados por via IP e IV, respectivamente. Por outro

lado, a DMT foi igual ou superior a 30 mg/kg após a administração IP e igual a 20 mg/kg após o tratamento por via IV. Esses dados correspondem a um aumento de aproximadamente 75% na DL₅₀ e 50% na DMT quando a via IP foi utilizada, demonstrando que a injeção de doses mais altas foi necessária para alcançar o mesmo grau de toxicidade obtida por via IV em doses mais baixas. Por outro lado, a DL₅₀ variou de 14,9 - 16,8 mg/kg e de 10,8 - 15,9 mg/kg em camundongos tratados com CDDP livre por via IP e IV, respectivamente, enquanto a DMT foi inferior a 10 mg/kg e igual a 7,5 mg/kg após o tratamento IP e IV, respectivamente. Esses resultados demonstram que praticamente não houve diferença na DL₅₀ e na DMT em função da via de administração quando a CDDP foi administrada na forma livre. No que diz respeito à redução do peso corporal, um dos parâmetros utilizado como indicador de toxicidade aguda, nenhuma diferença significativa foi observada entre a administração IP e IV para doses iguais ou próximas à DMT.

Efeitos sobre os parâmetros hematológicos devido à administração de CDDP foram anteriormente documentados em modelos experimentais (BOULIKAS, 2004; NEWMAN *et al.*, 1998). No presente trabalho, uma redução no sangue periférico dos parâmetros de série vermelha e série branca foi observada após a administração de 10 mg/kg de CDDP livre por via IP, enquanto reduções de série vermelha e no número de plaquetas foram observadas nos animais tratados com 10 mg/kg de CDDP livre administrada por via IV. No entanto, nenhuma alteração histopatológica foi detectada na medula óssea. Uma diminuição na contagem de hemácias e no hematócrito de camundongos machos e fêmeas e nos níveis de hemoglobina em fêmeas foi detectada após a administração IV de SpHL-CDDP na dose de 20 mg/kg. Embora em quantidade reduzida, as hemácias apresentavam-se normocíticas e normocrômicas. Possivelmente essas alterações sejam consequência de uma leve anemia hemolítica relacionada mais com um efeito citotóxico periférico do que com uma mielotoxicidade, uma vez que nenhuma alteração histopatológica na medula óssea desses animais foi observada. Alguns estudos clínicos têm relatado o desenvolvimento de anemia hemolítica normocítica e normocrômica após quimioterapia com CDDP, e o mecanismo proposto para explicar esse efeito envolve a formação de um complexo entre um anticorpo antiglobulina e a CDDP ligada à membrana da hemácia (LEVI *et al.*, 1981; MALOISEL *et al.*, 1995). Por outro lado, o tratamento IP com 30 mg/kg de SpHL-

CDDP não induziu alteração hematológica significativa, além disso, nenhum comprometimento medular foi observado nesse grupo de animais.

O principal efeito tóxico limitante da quimioterapia com a CDDP é a nefrotoxicidade. Para minimizar a toxicidade renal e permitir o escalonamento de doses da CDDP, protocolos de hidratação são rotineiramente empregados, possibilitando uma redução da exposição renal ao fármaco, não só pela diluição do mesmo, mas também pela diminuição do tempo de trânsito pelos túbulos renais (KINTZEL, 2001). Estudos realizados em pacientes com câncer epitelial do ovário têm demonstrado menor incidência de toxicidade após administração IP em relação à administração IV. Como a cavidade peritoneal é o principal sítio de disseminação do carcinoma ovariano, a via IP oferece maior possibilidade de alcançar concentrações loco-regionais elevadas da CDDP e reduzir a disseminação sistêmica (ARMSTRONG *et al.*, 2006; MARKMAN *et al.*, 2006). Considerando os valores de DMT, alterações significativas nos níveis de uréia e no índice uréia/creatinina de camundongos fêmeas e nos níveis de uréia de camundongos machos, indicativas de toxicidade do tecido renal, foram observadas após a administração IV de CDDP livre. Por outro lado, o tratamento IP induziu aumento dos níveis de uréia apenas no grupo de camundongos fêmeas. Essa diferença nos resultados de toxicidade renal induzida pela CDDP pode ser claramente explicada pela diferença obtida no perfil de biodistribuição. Estudos anteriores demonstraram que o coeficiente de partição tecido renal/sangue determinado após a injeção IV e IP foi igual a 6,7 e 3,8, respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a), demonstrando que concentrações mais elevadas de CDDP, potencialmente nefrotóxicas, são alcançadas após a administração IV. Uma redução mais evidente dos efeitos nefrotóxicos foi observada após a administração de SpHL-CDDP e uma menor toxicidade foi detectada após o tratamento IP em comparação com o IV. Na avaliação de toxicidade por via IP, elevações nos níveis de uréia foram detectadas após a administração de SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg, porém nenhuma alteração nos níveis de creatinina e no índice uréia/creatinina foi observada. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de uréia, creatinina e no índice uréia/creatinina após a injeção IV de SpHL-CDDP na dose de 20 mg/kg. Além disso, não foi detectada alteração morfológica do tecido renal sugestiva de nefrotoxicidade após o tratamento com SpHL-CDDP pelas vias de administração

investigadas. No entanto, a avaliação histológica do tecido renal dos animais tratados com SpHL-CDDP nas doses de 25 mg/kg em fêmeas e 35 mg/kg em machos, sacrificados três dias após o tratamento, mostrou clara evidência de insuficiência renal com áreas de necrose coagulativa do epitélio tubular, demonstrando o maior comprometimento renal após a administração IV em comparação com a administração IP. Essa diferença no perfil de toxicidade pode ser explicada pela menor retenção de CDDP no tecido renal, evidenciada pelo coeficiente de partição tecido renal/sangue, após administração IP de SpHL-CDDP em comparação com a administração IV. Estudos prévios de biodistribuição realizados em camundongos portadores de tumor sólido e ascítico de Ehrlich, tratados com SpHL-CDDP na dose de 6 mg/kg por via IV e IP, respectivamente, demonstraram que o coeficiente de partição nos rins foi igual a 4,8 e 1,8 (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Portanto, a retenção no tecido renal de SpHL-CDDP foi 2,7 vezes maior após o tratamento por via IV comparado com o tratamento IP.

Com relação às avaliações bioquímicas da atividade das enzimas hepáticas, aumentos nos níveis de AST e ALT foram detectados em camundongos fêmeas e aumento nos níveis de GGT foram observados nos camundongos machos submetidos ao tratamento por via IP com SpHL-CDDP na dose de 30 mg/kg. Por outro lado, apenas alterações nos níveis de AST foram observados após a administração IV de 20 mg/kg de SpHL-CDDP. Entretanto, nenhuma alteração histológica foi observada após a administração de SpHL-CDDP por ambas as vias. Vale destacar ainda que CDDP livre é hepatotóxica quando administrada em doses altas. Nesse trabalho, elevações séricas dos marcadores de toxicidade hepática foram observadas após a administração IV de baixas doses de CDDP livre (7,5 mg/kg) e somente após a administração IP de doses altas de CDDP (20 mg/kg). O comportamento farmacodinâmico da CDDP observado após a injeção IV e IP pode explicar esses resultados. Uma maior retenção de CDDP no fígado (aproximadamente 8,7 vezes) foi observada após a administração por via IV em comparação com a via IP, utilizando uma dose equivalente do fármaco na forma livre (ARAÚJO *et al.*, 2008; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Com base nesses dados, seria necessário administrar doses mais elevadas por via IP para atingir concentrações semelhantes do fármaco no tecido hepático capazes de induzir

alterações. Por outro lado, quando administrado na forma lipossomal, o coeficiente de partição tecido hepático/sangue determinado após o tratamento IV foi superior apenas 1,3 vezes em relação ao valor obtido por via IP, sugerindo que a administração de uma dose mais alta por via IP (30 mg/kg) comparada com 20 mg/kg de SpHL-CDDP administrados por via IV poderia acarretar maior concentração tecidual e, conseqüentemente maior complicação hepática, conforme demonstrado nesse estudo. No entanto, essas alterações ocorreram em níveis de doses não-letais e não foram consideradas dose-limitante para a terapia.

Entretanto, independente da via administrada, SpHL-CDDP apresentou um perfil de toxicidade favorável em comparação com a toxicidade induzida pela CDDP livre, demonstrando seu potencial para aplicações clínicas. Duas formulações lipossomais contendo CDDP foram submetidas a estudos clínicos, a saber: SPI-077 e Lipoplatin®. SPI-077, uma formulação lipossomal de circulação prolongada constituída por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol e DSPE-mPEG2000 mostrou-se ineficaz em estudos clínicos de fase II para tratamento de câncer de cabeça e pescoço em fase avançada, sendo essa ineficácia atribuída à não liberação do fármaco a partir das vesículas de maneira suficiente para induzir resposta farmacológica. Lipoplatin®, outra formulação lipossomal também de circulação prolongada, constituída dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-mPEG2000 tem apresentado resultados satisfatórios nos estudos clínicos de fase III. Esses estudos estão sendo conduzidos em pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço e em pacientes com carcinoma de células pequenas de pulmão e os resultados têm demonstrado menores efeitos mielotóxico, neurotóxico e nefrotóxico nos esquemas terapêuticos utilizando Lipoplatin® em relação à CDDP livre. SpHL-CDDP difere do Lipoplatin® por apresentar uma propriedade importante que é a pH-sensibilidade, conferida pela associação na bicamada lipídica de derivados da PE e lípides carboxilados que se apresentam carregados negativamente em pH fisiológico, e são protonados em pH ácido, como é o caso do pH tumoral, o que resulta na liberação sítio-específica da CDDP.

Um dos esquemas típicos de administração IV de CDDP, como agente único, envolve a administração de 50 mg/m² em regime de infusão a cada 3 ou 4 semanas

(MARTINDALE, 2005), enquanto por via IP, a CDDP é normalmente administrada em associação com outros quimioterápicos em doses que variam de 50 a 100 mg/m² (ARMSTRONG *et al.*, 2006, MARKMAN *et al.*, 2006). De acordo com as orientações do *International Conference on Harmonisation* (2008), se o esquema proposto para uso humano envolve a aplicação do antineoplásico a cada três semanas, o estudo pré-clínico preconizado para dar suporte ao estudo clínico de fase I inclui apenas a administração em dose única. Além disso, alguns estudos relatam que, para fármacos antineoplásicos, a determinação da DL₁₀ em roedores e DMT em espécie não-roedora permite estabelecer uma boa correlação com a DMT em humanos quando essas doses são ajustadas para mg/m² e o esquema de administração é semelhante ao utilizado no estudo pré-clínico (FDA, 2005). Considerando que a média da DL₁₀ em camundongos machos e fêmeas determinada após a administração de SpHL-CDDP por via IP e IV é igual a 22,5 mg/kg e 18,5 mg/kg, respectivamente, a dose inicial recomendada para estudos clínicos seria aproximadamente de 125 mg/m² e 100 mg/m², respectivamente. Portanto, levando em consideração as doses de CDDP livre comumente utilizadas, SpHL-CDDP poderia ser administrado tanto em pacientes portadores de tumor sólido como em pacientes com carcinomatose peritoneal, uma vez que o comportamento toxicológico da CDDP foi significativamente alterado após sua encapsulação em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada. Além disso, a toxicidade renal, principal fator limitante da aplicação clínica desse fármaco, foi significativamente reduzida com a utilização de SpHL-CDDP. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento permitem estimar uma dose inicial para estudos clínicos com esquemas terapêuticos utilizando a administração de CDDP em intervalos de três semanas. No entanto, diversos protocolos terapêuticos utilizam a CDDP semanalmente em três ou mais ciclos de acordo com a progressão da doença e com o tipo de câncer a ser tratado. Nesses casos, estudos pré-clínicos de toxicidade repetida deverão também ser conduzidos. E ainda, considerando as diferenças fisiológicas entre camundongos e humanos, estudos de toxicidade pré-clínica em modelos não roedor também deverão ser realizados permitindo assim selecionar a espécie mais apropriada para determinação da dose máxima inicial recomendada para a condução dos estudos clínicos.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SpHL-CDDP ADMINISTRADO EM CAMUNDONGOS SWISS PORTADORES DE TUMOR SÓLIDO DE EHRlich

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Embora apresente atividade antitumoral comprovada contra vários tipos de tumores sólidos, como já relatado, a utilização clínica da CDDP é limitada em função da toxicidade sistêmica e da resistência clínica adquirida. A fim de evitar esses inconvenientes, diferentes formulações de liberação controlada têm sido propostas (BOULIKAS, 2004; HARRINGTON *et al.*, 2001; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007b; KUMAGAI *et al.*, 1996; MORENO *et al.*, 2009; NISHIYAMA *et al.*, 2003; TAMURA *et al.*, 2002a,b,c). Esses sistemas são delineados principalmente com o objetivo de reduzir/eliminar a toxicidade, aumentar a concentração efetiva do fármaco no tumor e ainda prolongar seu tempo de contato com as células tumorais. Melhorar a eficiência de liberação de compostos platinados, como a CDDP, permite que doses mais altas do fármaco sejam administradas, aumentando conseqüentemente a sua eficácia terapêutica (BOULIKAS, 2007). Alguns estudos mostraram que o mecanismo primário responsável pela atividade antitumoral da CDDP envolve a formação de ligações cruzadas com a molécula de DNA e a indução de apoptose (GONZALEZ *et al.*, 2001).

Carvalho-Júnior (2008) demonstrou que SpHL-CDDP tem um tempo de residência na circulação sanguínea prolongado, o que contribuiu para uma maior concentração do fármaco no tecido tumoral. Além disso, o estudo de distribuição de CDDP no tumor, mediante a determinação de seu coeficiente de partição tumor/sangue, revelou que a formulação de SpHL-CDDP apresenta maior afinidade pelo tecido tumoral em comparação com a CDDP livre, o que poderia levar à uma maior eficácia terapêutica. Entretanto, o estudo de atividade antitumoral de SpHL-CDDP em modelo experimental de camundongo portador de tumor sólido de Ehrlich demonstrou semelhança no perfil do crescimento tumoral após o tratamento com SpHL-CDDP e CDDP livre quando administrados na dose de 8 mg/kg, dose próxima à DMT estabelecida para a CDDP livre (CARVALHO-JÚNIOR, 2008). Além disso, a atividade de SpHL-CDDP foi comparada com uma formulação lipossomal não pH-sensível (NSpHL-CDDP) e, esta mostrou ser menos efetiva no controle do crescimento tumoral em relação àquela. Considerando a limitação do aumento de doses da CDDP livre devido à sua toxicidade, a melhora da quimioterapia com o

uso de SpHL-CDDP certamente poderia ser observada com o uso de doses mais altas desse sistema carreador de CDDP. Diante disso, nessa etapa do trabalho, foi realizado um estudo de avaliação da atividade antitumoral dos SpHL-CDDP administrados em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich em dose próxima a DMT dos SpHL-CDDP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPE, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). CHEMS foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A CDDP foi adquirida da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). HEPES e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

O metanol, acetato de etila e a dimetilformamida, todos os solventes grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Ohio, Estados Unidos). Clorofórmio P.A. e éter etílico P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio P.A. e o isopropanol foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e destilada.

2.2 Preparação e Caracterização dos Lipossomas

SpHL e SpHL-CDDP foram constituídos de DOPE, CHEMS e DSPE-MPEG₂₀₀₀ (concentração lípidica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente). NSpHL-CDDP e lipossomas brancos não pH-sensíveis de longa circulação (NSpHL) foram constituídos de DOPC, CHEMS e DSPE-MPEG₂₀₀₀ (concentração lípidica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente). A preparação de todas as formulações lipossomais foi realizada pelo método de evaporação em fase reversa, como descrito anteriormente por Carvalho-Júnior e colaboradores (2007a). Todas as formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro, potencial zeta e teor de encapsulação, seguindo os protocolos descritos anteriormente no Capítulo 1.

2.3 Preparo e inoculação das células tumorais

O preparo das células tumorais incluiu processos de lavagem, contagem das células e a determinação da viabilidade celular. Células de tumor ascítico de Ehrlich (2×10^6 células), derivadas de adenocarcinoma mamário de camundongos, foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos Swiss fêmeas (25 ± 2 g). Oito dias após a inoculação, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e ketamina (60 mg/kg) e o líquido ascítico contendo as células tumorais foi coletado. Esse fluido foi centrifugado a 3000 rpm por cinco minutos, numa temperatura de 5 °C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em solução salina 0,9% (p/v) e novamente centrifugadas. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de um líquido denso e claro, com o mínimo possível de fibrinas e hemácias. Em seguida foi realizada a contagem e a determinação da viabilidade celular. A contagem das células tumorais foi realizada com o uso de microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer e uma solução de azul de Tripán 0,4% (p/v) como corante. As células coradas pelo azul de Tripán foram consideradas inviáveis e as células translúcidas foram consideradas viáveis. A viabilidade celular variou de 96 a 98%. Uma suspensão de células viáveis foi então preparada em uma densidade média de 1×10^7 células/mL. Essas células foram implantadas por via subcutânea (SC) no flanco direito de camundongos fêmeas (0,2 mL/camundongo).

2.4 Avaliação da atividade antitumoral

Após 15 dias da implantação, os tumores apresentavam-se palpáveis com diâmetro de aproximadamente 9 e 10 mm. Os animais foram então aleatoriamente divididos em 5 grupos experimentais os quais receberam CDDP livre (8 mg/kg), SpHL-CDDP (16 mg/kg), NSpHL-CDDP (16 mg/kg), SpHL (a dose de lípide foi igual àquela administrada nos animais tratados com SpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg), NSpHL (a dose de lípide foi igual àquela administrada nos animais tratados com NSpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg). A administração das diferentes formulações foi

realizada por via IV, perfazendo um total de 3 administrações com intervalos de 7 dias entre as doses. O primeiro dia de administração foi considerado o dia 0 do estudo e, as formulações foram, portanto, administradas nos dias 0, 7 e 14 (**Figura 2.1**).

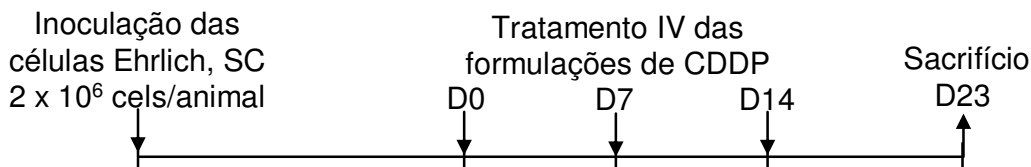


Figura 2.1 - Esquema representativo do protocolo experimental para o estudo de atividade antitumoral.

A atividade antitumoral foi avaliada em termos de volume do tumor mediante a medida dos três diâmetros ortogonais (d_1 , d_2 e d_3 , os quais representam largura, comprimento e profundidade, respectivamente) com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, MIP/E-103) e, de acordo com a seguinte fórmula:

$$V = \frac{\pi (d_1 \times d_2 \times d_3)}{6}$$

O crescimento do tumor e o peso dos animais foi monitorado durante 23 dias. No final do período experimental, o volume relativo do tumor (VRT) foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{VRT} = \frac{\text{volume do tumor no dia 23}}{\text{volume do tumor no dia 0}}$$

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

$$ICT = 1 - \frac{(\text{VRT do grupo tratado com a formulação contendo CDDP})}{\text{VRT do grupo controle}} \times 100$$

No final do experimento, os animais foram sacrificados, o tumor foi removido e, posteriormente fixado em formaldeído a 10% (v/v). Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e, posteriormente, corados pelo método hematoxilina-eosina. Além disso, os órgãos alvo de toxicidade, rim e medula óssea, foram removidos para avaliação histopatológica.

2.5 Avaliação histomorfométrica

Em secções histológicas do tumor sólido de Ehrlich, utilizando objetiva de 40x, foram determinados a porcentagem de áreas de neoplasia, necrose e inflamação. Para determinação dessas variáveis foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptado a um microscópio Olympus BX-40 e o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. A análise das imagens foi realizada utilizando o Corel DRAW[®] versão 7.468 e a contagem foi determinada em um total de 15 campos, abrangendo toda a área da secção histológica. Foram determinados 25 pontos equidistantes no campo da imagem, contabilizando 375 pontos por lâmina examinada.

2.6 Análise estatística

Para a verificação da normalidade e homocedasticidade da variância utilizou-se os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados pela equação: $y = \log(\text{variável} + 1)$. A avaliação do crescimento tumoral ao longo do tempo de investigação foi realizada por análise de regressão. A diferença entre os grupos experimentais no parâmetro peso do tumor e nos parâmetros histomorfométricos foi analisada por teste de Tukey. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

3.1.1 Caracterização físico-química dos lipossomas

A **Tabela 2.1** apresenta as características físico-químicas das diferentes formulações lipossomais contendo ou não CDDP. SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP, SpHL e NSpHL apresentaram um diâmetro médio variando entre 120 e 135 nm e as populações das vesículas são monodispersas ($IP < 0,3$). Todas as formulações exibiram um potencial zeta próximo da neutralidade com valores médios variando entre -1,6 e -2,8 mV. A quantidade de CDDP encapsulada foi similar em SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP (23 e 22%, respectivamente).

Tabela 2.1 - Características físico-químicas de diferentes formulações lipossomais

Formulações	Diâmetro médio (nm) \pm DP ^a	Índice de Polidispersão \pm DP	Potencial Zeta (mV) \pm DP	Porcentagem Encapsulação de CDDP (%) \pm DP
SpHL-CDDP	130 \pm 7	0,07 \pm 0,02	-1,6 \pm 0,9	23 \pm 5
NSpHL-CDDP	121 \pm 14	0,09 \pm 0,02	-2,7 \pm 0,5	22 \pm 4
SpHL	135 \pm 4	0,08 \pm 0,03	-2,4 \pm 1,0	-
NSpHL	120 \pm 10	0,10 \pm 0,06	-2,8 \pm 1,6	-

^a Cada valor representa a média \pm desvio padrão (n = 3).

3.1.2 Atividade antitumoral

Os dados da avaliação antitumoral, no que diz respeito à curva de crescimento tumoral, de camundongos Swiss fêmeas portadores de tumor sólido de Ehrlich tratados com SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e CDDP livre assim como os grupos controle SpHL e NSpHL, estão apresentados na **Figura 2.2 A**. Os dados individuais dos animais submetidos aos diferentes tratamentos estão discriminados no Apêndice A. Os dados foram posteriormente avaliados por análise de regressão e,

os diferentes modelos utilizados estão apresentados na **Figura 2.2 B**. A administração de CDDP livre na dose de 8 mg/kg/semana durante três semanas, reduziu significativamente o crescimento tumoral em comparação com os grupos controle (**Figura 2.2 A e B**). Entretanto, o tratamento com SpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg administrado semanalmente durante três semanas resultou em uma atividade antitumoral significativamente maior em relação ao tratamento com CDDP livre (8 mg/kg/semana durante três semanas) ($P < 0,0001$). Pode-se observar que a administração de SpHL-CDDP inibiu de maneira significativa o crescimento tumoral, resultando praticamente na ausência de alteração do volume tumoral durante todo o período experimental (**Figura 2.2 A**). A análise de regressão nesse grupo experimental permitiu definir um coeficiente de correlação (r) igual a 0,596. No entanto, alguns estudos descrevem que para ensaios *in vivo* a regressão é aceita quando o valor de r é igual ou maior que 0,8 (TAVARES, 2004). Por esse motivo, nenhum modelo de regressão foi aplicado nesse grupo experimental, portanto, ele não foi representado na **Figura 2.2 B**. No grupo de camundongos tratados com NSpHL-CDDP (16 mg/kg/semana durante três semanas) também foi observado maior inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo tratado com CDDP. A análise de regressão demonstrou diferença estatística significativa entre NSpHL-CDDP e CDDP livre ($P < 0,05$), porém essa formulação mostrou ser menos efetiva no controle do crescimento tumoral quando comparada com a formulação SpHL-CDDP (**Figura 2.2 A**). Considerando os valores médios do volume tumoral obtidos até o nono dia de investigação pôde-se observar que NSpHL-CDDP mostrou o mesmo perfil de inibição observado para SpHL-CDDP. Entretanto, após esse intervalo, SpHL-CDDP mostrou ser mais efetivo no controle do volume do tumor do que NSpHL-CDDP. O valor de ICT determinado no D23 para os grupos tratados com SpHL-CDDP, NSpHL-CDDP e CDDP livre foi igual a 83%, 73% e 55%, respectivamente. Convém ainda destacar que o tratamento dos animais com SpHL-CDDP foi capaz de promover a cura de dois animais (13%). A análise de regressão não demonstrou diferença significativa entre os grupos controle ($P > 0,05$).

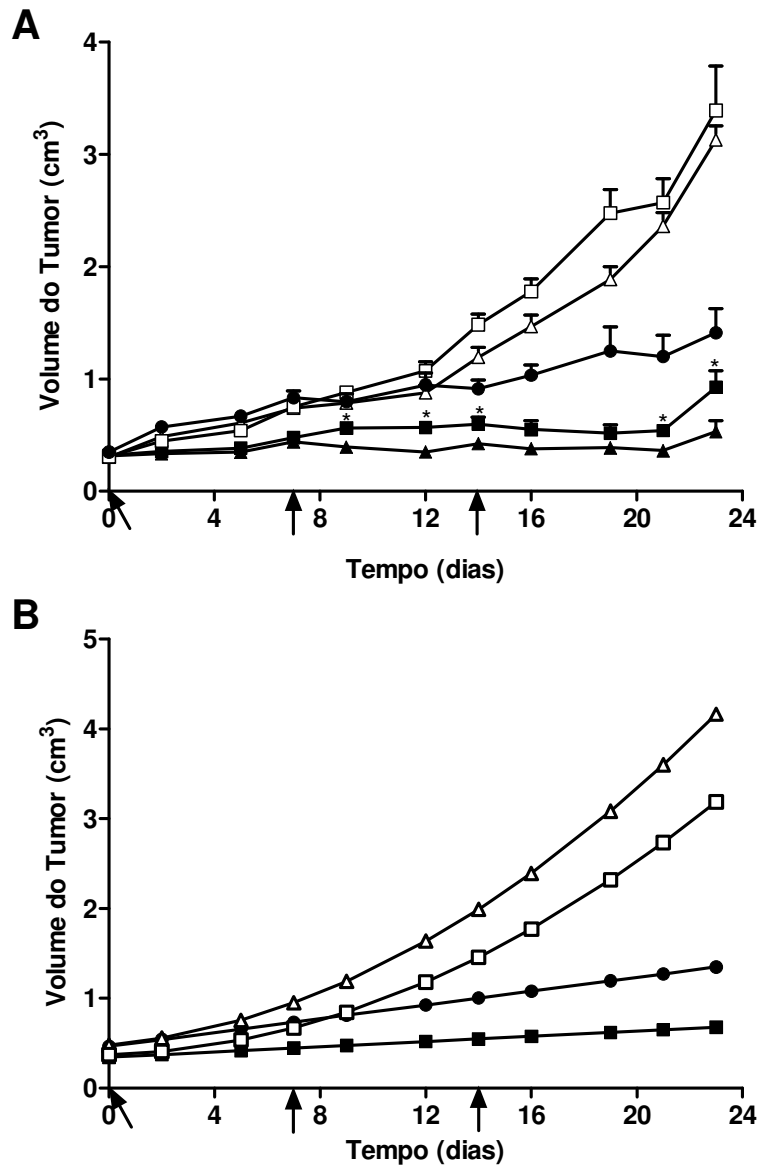


Figura 2.2 - Efeito antitumoral (A) de CDDP livre na dose de 8 mg/kg (●), SpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg (▲), NSpHL-CDDP na dose de 16 mg/kg (■), SpHL (Δ) e NSpHL (□) administrados em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich. Em B, os valores foram calculados usando as equações obtidas na análise de regressão para os diferentes tratamentos. Os valores de r das curvas CDDP, NSpHL-CDDP, SpHL e NSpHL foram 0,979, 0,851, 0,988 e 0,990, respectivamente. Nenhum modelo de regressão pôde ser aplicado no grupo tratado com SpHL-CDDP portanto ele não está representado em B. As setas indicam os dias de tratamento. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP.

A análise macroscópica do tumor de Ehrlich revelou a presença de uma massa tumoral esbranquiçada, de formato irregular, consistência borrachóide e superfície lisa e, às vezes, infiltrado em tecidos adjacentes. Os tecidos tumorais foram cortados longitudinalmente e uma área esbranquiçada na região central, indicativa de necrose, também foi observada. Esse aspecto foi observado em todos os grupos experimentais, independente do tratamento aplicado. A avaliação microscópica do tumor dos camundongos de todos os grupos experimentais confirmou uma área de necrose coagulativa localizada na região central, e células neoplásicas com intenso pleomorfismo celular, hipercromatismo nuclear, núcleos bizarros com cromatina condensada e, às vezes, células gigantes evidenciando uma intensa atipia celular (**Figura 2.3 A**).

Na avaliação histomorfométrica do tumor sólido de Ehrlich, não foi detectada diferença significativa na quantificação das áreas neoplásicas, necrose e inflamação entre os diferentes grupos avaliados (**Tabela 2.2**). Entretanto, os dados apontam uma tendência para um aumento de áreas neoplásicas nos grupos tratados com as formulações contendo CDDP em relação aos grupos controle. No grupo de camundongos tratados com SpHL-CDDP pode-se observar uma diminuição nas áreas de necrose e inflamação em comparação com o grupo controle SpHL. Embora o grupo tratado com SpHL-CDDP tenha apresentado menor crescimento tumoral (**Figura 2.2**), os dados de histomorfometria demonstram uma maior extensão de tecido neoplásico viável em comparação com o grupo controle. Esse fato pode ser atribuído ao pequeno volume do tumor no grupo tratado com SpHL-CDDP, que torna o suprimento sanguíneo suficiente para as células se manterem viáveis, no entanto, pode-se sugerir que o índice proliferativo dessas células é extremamente reduzido em relação ao grupo controle. Por outro lado, os animais dos grupos controle tratados com SpHL e NSpHL apresentaram um maior volume do tumor o que torna o suprimento sanguíneo insuficiente para as células localizadas na região central do tumor fazendo com que as mesmas morram por um mecanismo de necrose, o que justifica portanto maiores áreas de células inviáveis nesses grupos experimentais. Entretanto, vale destacar que esse foi um estudo preliminar e estudos posteriores utilizando um número maior de animais deverá ser conduzido. Uma figura representativa das três variáveis analisadas na avaliação histomorfométrica está apresentada na **Figura 2.3**.

Tabela 2.2 - Variáveis Morfométricas avaliadas no tumor sólido de Ehrlich de camundongos Swiss fêmeas submetidos a diferentes tratamentos

Tratamento*	Neoplasia (%)	Necrose (%)	Inflamação(%)
SpHL	36 ± 4	46 ± 8	18 ± 7
SpHL-CDDP	57 ± 7	38 ± 6	5 ± 2
CDDP	51 ± 6	46 ± 5	3 ± 1
NSpHL	42 ± 6	43 ± 7	15 ± 4
NSpHL-CDDP	46 ± 5	43 ± 9	10 ± 4

Dados expressos com a média ± erro padrão da média (n = 3).

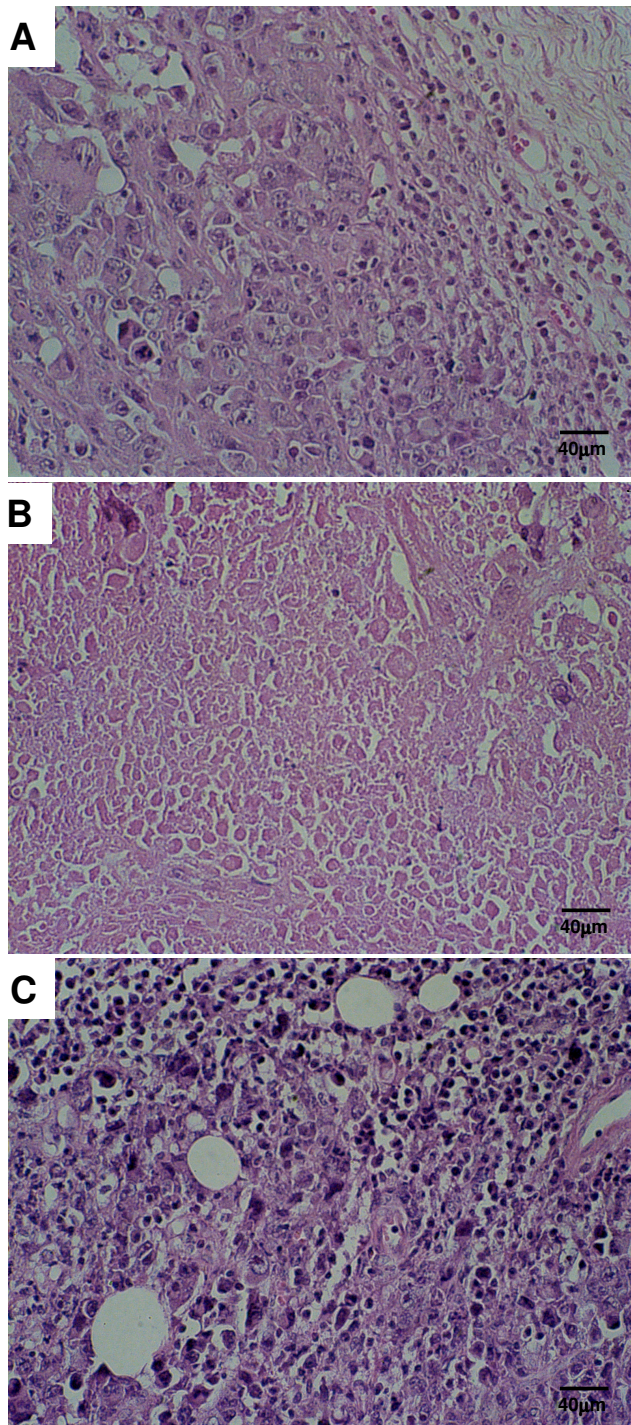


Figura 2.3 - Fotomicrografias do tumor sólido de Ehrlich representativas das diferentes variáveis avaliadas no estudo histomorfométrico: neoplasia (A), necrose (B) e inflamação (C). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 100.

Na **Figura 2.4** está representada a variação do peso corporal dos camundongos acometidos com tumor sólido de Ehrlich e tratados com as diferentes formulações contendo CDDP e com os controles. Independente da formulação contendo CDDP administrada, foi observada uma perda de peso significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,05$). No entanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados com CDDP livre, SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP. Vale destacar que a dose de SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP administrada foi duas vezes superior à dose de CDDP livre e, ainda assim, a perda de peso induzida pelas duas formulações, foi semelhante àquela observada após a administração do fármaco livre. Considerando os resultados obtidos para o perfil de toxicidade aguda das formulações de CDDP livre (7,5 mg/kg) e SpHL-CDDP (20 mg/kg) em camundongos Swiss, pode-se sugerir que a menor redução do peso dos animais tratados com SpHL-CDDP (16 mg/kg) seja decorrente do menor volume tumoral observado após este tratamento em comparação com a administração de CDDP livre (8 mg/kg) (**Figura 2.2**). Nos grupos controle foi observado um pronunciado ganho de peso em todos os dias avaliados, sugerindo que esse aumento seja decorrente do crescimento tumoral. Além disso, uma taxa de mortalidade de 20% foi observada nos grupos tratados com CDDP livre e NSpHL-CDDP, enquanto nenhuma morte foi observada no grupo tratado com SpHL-CDDP.

Como observado no estudo de toxicidade, os principais órgãos-alvo de toxicidade foram a medula óssea e os rins. Portanto, nesse experimento esses órgãos também foram removidos e avaliados microscopicamente quanto às possíveis alterações induzidas pelas diferentes formulações. No que diz respeito à toxicidade da medula óssea, a análise histopatológica demonstrou uma discreta hipoplasia caracterizada por redução dos precursores eritrocíticos, mielocíticos e megacariocíticos com aumento do material intercelular após o tratamento com CDDP livre, NSpHL-CDDP e SpHL-CDDP. Por outro lado, a análise microscópica do tecido renal de camundongos submetidos ao tratamento com as diferentes formulações demonstrou ausência de alterações características de toxicidade (dados não mostrados).

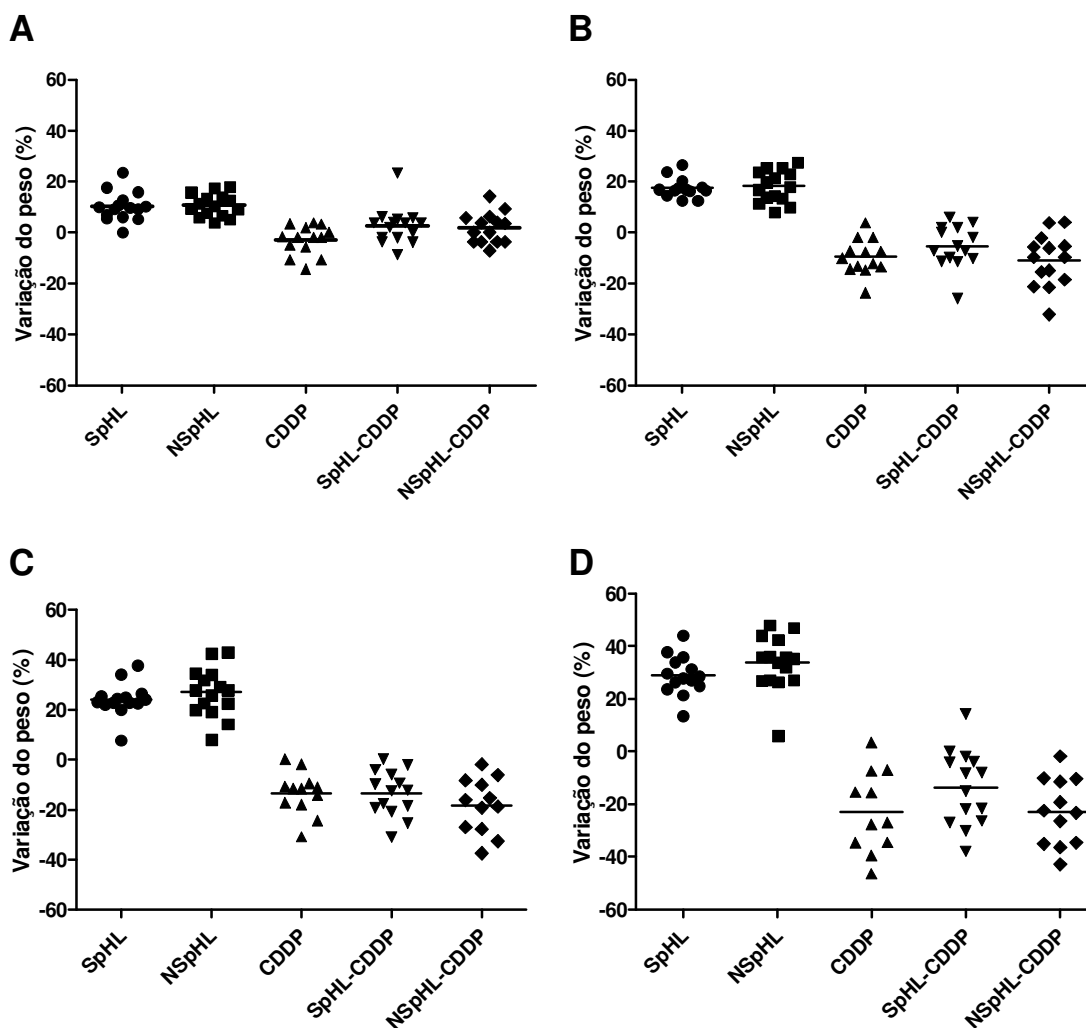


Figura 2.4 - Perfil de variação do peso corporal de camundongos Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich e submetidos a diferentes tratamentos. Os gráficos A, B, C e D representam a variação de peso observada nos dias 7, 14, 19 e 23, respectivamente, após o início do tratamento. Os dados foram apresentados como valores individuais de variação em cada animal comparado ao dia inicial do tratamento. Os traços horizontais indicam a média da variação do peso. CDDP, SpHL-CDDP e NSpHL-CDDP apresentaram diferença significativa em relação à SpHL e NSpHL ao nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$).

3.2 Discussão

Estudos prévios demonstraram a capacidade dos SpHL-CDDP promoverem uma maior concentração no sítio tumoral. Além disso, foi constatado que a atividade antitumoral *in vivo* da CDDP não foi alterada após sua encapsulação em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada. No entanto, nenhuma diferença no efeito antitumoral foi observada após a administração de CDDP e SpHL-CDDP em baixas doses (8 mg/kg) (CARVALHO-JÚNIOR, 2008). Sabe-se que uma grande limitação na quimioterapia com CDDP é a dificuldade do aumento de doses em função de sua elevada nefrotoxicidade e, nesse trabalho, foi demonstrado que a encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP reduziu significativamente os efeitos tóxicos induzidos por esse agente antineoplásico. Diante disso, um esquema terapêutico utilizando SpHL-CDDP em doses mais elevadas poderia contribuir para uma melhor eficácia terapêutica em relação à CDDP livre. Nesse contexto, nessa etapa do trabalho, o efeito antitumoral de SpHL-CDDP administrado em camundongos Swiss portadores de tumor sólido de Ehrlich em uma dose duas vezes superior a CDDP livre foi investigado.

Os resultados desse estudo confirmaram que a encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada não altera a atividade antitumoral desse fármaco, como demonstrado anteriormente por Carvalho-Júnior (2008). Foi demonstrado também que SpHL-CDDP (16 mg/kg/semana, 3 semanas) teve um maior efeito antitumoral comparado com as demais formulações contendo CDDP. Em comparação com o tratamento com CDDP livre (8 mg/kg/semana, 3 semanas), a administração de SpHL-CDDP inibiu significativamente tanto o crescimento do tumor sólido de Ehrlich de camundongos Swiss bem como o volume tumoral. Esses resultados demonstraram que SpHL-CDDP permitiu administrar doses mais elevadas do fármaco, melhorando significativamente a atividade antitumoral. Entretanto, como os tumores são heterogêneos por natureza e são compostos, normalmente, por áreas de edema e necrose, muitas vezes, medidas de volume do tumor não é considerado um marcador preciso de eficácia antitumoral. Para melhorar avaliação da atividade antitumoral é recomendado também a análise microscópica dos tumores (VASSILEVA *et al.*, 2007). Neste contexto, embora não

tenha sido observada diferença significativa nos parâmetros avaliados por histomorfometria, detectou-se uma maior tendência à diminuição na área de necrose e no processo inflamatório e aumento das células neoplásicas no grupo tratado com SpHL-CDDP em comparação com o grupo controle e CDDP livre. Esses achados associados à redução do volume tumoral sugerem um comprometimento da proliferação celular e da apoptose induzida pela CDDP. Possivelmente, uma menor taxa proliferativa seja decorrente da concentração aumentada de CDDP na região tumoral quando administrada sob a forma de SpHL-CDDP em comparação com a administração de CDDP livre, como demonstrado anteriormente (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Além disso, alguns estudos sugerem diferenças no mecanismo de indução de apoptose entre CDDP livre e CDDP associada a nanopartículas, sendo que níveis significativamente mais elevados foram observados após a administração de nanopartículas poliméricas de CDDP (MORENO *et al.*, 2009). Boulikas (2007) também demonstrou que o Lipoplatin[®] induz morte celular por apoptose tanto em células neoplásicas como em células endoteliais da musculatura vascular da região tumoral, sugerindo também um papel antiangiogênico dessa formulação. Por outro lado, o tratamento com SpHL-CDDP também foi mais eficaz na inibição do crescimento tumoral do que NSpHL-CDDP, sugerindo portanto que a composição lipídica tem um papel importante no aumento da resposta antitumoral. A presença de DOPE na bicamada confere propriedades fusogênicas às vesículas lipídicas e, possivelmente, a característica de pH-sensibilidade conferida pela associação entre DOPE e CHEMS garante uma liberação preferencial da CDDP na região tumoral.

Com relação à toxicidade, SpHL-CDDP mostrou ser menos tóxico que CDDP livre e NSpHL-CDDP visto que a administração de CDDP livre e NSpHL-CDDP induziu 20% de morte dos camundongos e nenhuma morte foi observada no grupo tratado com SpHL-CDDP. Além disso, ausência de alteração morfológica do tecido renal foi observada após a injeção das diferentes formulações, demonstrando que mesmo após três administrações de uma dose duas vezes superior à CDDP livre, SpHL-CDDP foi capaz de prevenir a toxicidade induzida pela CDDP. No entanto, uma discreta mielotoxicidade foi detectada após o tratamento com as diferentes formulações contendo CDDP. Efeitos sobre os parâmetros hematológicos devido à administração repetida de uma formulação lipossomal contendo CDDP bem como

ausência de toxicidade renal foram anteriormente documentados em modelos experimentais (BOULIKAS, 2004). Esses resultados demonstram que a encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis reduz a toxicidade renal mesmo quando administrada em modelos experimentais acometidos com tumor sólido de Ehrlich.

Diante do exposto, pode-se concluir que SpHL-CDDP é uma alternativa potencial para o tratamento de tumores sólidos que respondem a terapia com CDDP. O uso dessa formulação poderá possibilitar o ajuste de doses, permitindo alcançar melhor eficácia terapêutica e menor toxicidade comumente induzida pela CDDP.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram diferenças importantes no perfil toxicológico e na atividade antitumoral dos SpHL-CDDP em relação à CDDP livre, permitindo concluir que:

✓ A encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada reduz a toxicidade induzida pela CDDP em comparação com a sua forma livre, aumentando significativamente a DL_{50} e a DMT após a administração IP e IV.

✓ SpHL-CDDP induziu menos alterações hematológicas que a CDDP livre e nenhum comprometimento da medula óssea foi detectado após quatorze dias de investigação, demonstrando que SpHL-CDDP é menos mielotóxico que a CDDP livre tanto após administração IP quanto IV.

✓ Uma redução significativa da toxicidade renal foi observada após a administração de SpHL-CDDP por via IP e IV em comparação com a administração de CDDP livre. Essa menor nefrotoxicidade foi evidenciada tanto pelos parâmetros bioquímicos quanto pela avaliação histopatológica e foi atribuída à menor retenção de CDDP no tecido renal após o tratamento com SpHL-CDDP em relação ao tratamento com a CDDP livre.

✓ Alterações pouco expressivas nos parâmetros indicativos de toxicidade hepática foram detectadas após o tratamento com SpHL-CDDP e nenhuma alteração morfológica foi observada após administração por ambas as vias investigadas.

✓ O tratamento com SpHL-CDDP tanto por via IP quanto por via IV mostrou ser mais seguro em relação à administração de CDDP livre, no que se refere à mielotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, demonstrando os efeitos benéficos dessa formulação e sua potencialidade para aplicação clínica.

✓ SpHL-CDDP permitiu administrar doses mais elevadas do fármaco, melhorando significativamente a atividade antitumoral em modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich em comparação com a CDDP livre.

✓ Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial dos SpHL-CDDP para aplicação terapêutica em pacientes com tumores malignos que respondem ao tratamento com CDDP, visto que SpHL-CDDP poderão contornar problemas limitantes da terapia tais como a dificuldade de ajuste de doses e principalmente a nefrotoxicidade induzida pela CDDP.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se propor algumas perspectivas, a saber:

- ✓ Avaliar a toxicidade de SpHL-CDDP em esquemas de doses repetidas.
- ✓ Avaliar a toxicidade de SpHL-CDDP em modelo não roedor.
- ✓ Avaliar, por técnicas imunoistoquímicas, o índice proliferativo e apoptótico das células neoplásicas do tumor sólido de Ehrlich tratado com SpHL-CDDP e CDDP livre.
- ✓ Estudar a atividade antitumoral em esquemas terapêuticos utilizando a DMT para os SpHL-CDDP, acompanhando os animais por um maior período de tempo.
- ✓ Avaliar a eficácia antitumoral de SpHL-CDDP em outros modelos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, D. S.; MARKMAN, M.; MUGGIA, F.; OZOLS, R. F.; ELDERMIRE E.; BOOKMAN, M. A.; CHEN, T.; CURTIN, J.; HESS, L. M.; LIEBES L.; YOUNG, R. C.; TRIMBLE, E. Proceedings of a GOG workshop on intraperitoneal therapy for ovarian cancers. **Gynecol. Oncol.**, v. 103, p. 783-792, 2006.

ALLEN, T. M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. **FEBS Lett.**, v. 223, p. 42-46, 1987.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1068, p. 133-141, 1991.

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. **Quim. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ARAÚJO, J. G. V. C.; MOTA, L. G.; CARDOSO, V. N.; COELHO, L. G. V., SAVASSI-ROCHA, P. R.; PEREIRA, M. T.; DE OLIVEIRA, M. C. Tissue distribution of long-circulating pH-sensitive liposomal and free cisplatin in Ehrlich ascitic tumor bearing mice after intraperitoneal administration. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS, 7. 2008. Guarujá. **Anais do VII Encontro da SBPMAT**. Guarujá, 2008. 1 CD-ROM.

ARMSTRONG, D. K.; BUNDY, B.; WENZEL, L.; HUANG, H. Q.; BAERGEN, R.; LELE, S.; COPELAND, L. J.; WALKER, J. L.; BURGER, R. A. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 34-43, 2006.

ASNA, N.; LEWY, H.; ASHKENAZI, I. E.; DEUTSCH, V.; PERETZ, H.; INBAR, M.; RON, I. G. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. **Life Sci.**, v. 76, p. 1825-1834, 2005.

BAIREY, O.; BISHARA, J.; STAHL, B.; SHAKLAI, M. Severe tissue necrosis after cisplatin extravasation at low concentration: possible "immediate recall phenomenon". **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p. 1233-1234, 1997.

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

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.**, v. 234, p. 466-468, 1959.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, p. 167-179, 2007.

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

BOULIKAS, T. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. **Cancer Ther.**, v. 5, p. 349-376, 2007.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). **Oncol. Rep.**, n. 10, p. 1663-1682, 2003.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro-Filho, G. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 175-236.

BURGER, K. N.; STAFFHORST, R. W.; VIJLDER, H. C.; VELINOVA, M. J.; BOMANS, P. H.; FREDERIK, P. M.; DE KRUIJFF, B. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity, **Nat. Med.**, v. 8, p. 81-84, 2002.

CARVALHO-JÚNIOR, A. D. Avaliação Pré-Clínica de Lipossomas pH-Sensíveis de Longa Circulação contendo Cisplatina. 2008. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

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

CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; VIEIRA, F. P.; MELO, V. J. M.; LOPES, M. T. P.; SILVEIRA, J. N.; RAMALDES, G. A.; GARNIER-SUILLEROT, A.; PEREIRA-MAIA, E. C.; DE OLIVEIRA, M. C. Preparation and cytotoxicity of cisplatin loaded liposomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1149-1157, 2007b.

CHAUFFERT, B.; FAVOULET, P.; POLYCARPE, E.; DUVILLARD, C.; BELTRAMO, J. L.; BICHAT, F.; RAT, P.; GENNE, P.; BENOIT, L. Rationale supporting the use of vasoconstrictors for intraperitoneal chemotherapy with platinum derivatives. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 12, p. 835-848, 2003.

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

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 97-103, 1992.

DEKANT, W.; VAMVAKAS, S. Biotransformation and membrane transport in nephrotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 26, p. 309-334, 1996.

DE 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-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1372, p. 301-310, 1998.

DEVARAJAN, P.; TARABISHI, R.; MISHRA, J.; MA, Q.; KOURVETARIS, A.; VOUGIOUKA, M.; BOULIKAS, T. Low renal toxicity of Lipoplatin compared to cisplatin in animals. **Anticancer Res.**, v. 24, p. 2193-2200, 2004.

EHRlich, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v. 1, p. 78-80, 1906.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products – CPMP/SWP/997/96. 1998. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/099796en.pdf>> Acesso em: 06 maio 2009.

FAVOULET, P.; MAGNIN, G.; GUILLAND, J. C.; BELTRAMO, J. L.; OSMAK, L.; BENOIT, L.; RAT, P.; DOUVIER, S.; DUVILLARD, C.; CHAUFFERT, B. Pre-clinical study of the epinephrine-cisplatin association for the treatment of intraperitoneal carcinomatosis. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 27, p. 59-64, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Guidance for Industry and Reviewers – Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM078932.pdf>>. Acesso em: 10 dezembro 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Guidance for Industry - Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals. 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>>. Acesso em: 06 maio 2009.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 161-171, 2005.

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

GABIZON, A.; PAPAHADJOPOULOS, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1103, p. 94-100, 1992.

GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Is cisplatin induced cell death always produced by apoptosis? **Mol. Pharmacol.**, v. 59, p. 657–663, 2001

GORE, M.; DU, B. A.; VERGOTE, I. Intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer remains experimental. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, p. 4528-4530, 2006.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Lett.**, v.14, p.95-99, 1971.

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

GYTON, A. C.; HALL, J. E. Os líquidos corporais e os rins. In:____. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 179-244.

HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther.**, v. 1, p. 47-61, 2003.

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

HARRINGTON, K. J.; LEWANSKI, C. R.; STEWART, J. S. W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 1: preclinical development. **Clin. Oncol.** v. 12, p. 2-15, 2000.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, p. 208-210, 2002.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. 2008. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4917.pdf>> Acesso em: 28 abril 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA. 2009. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091124.pdf>> Acesso em: 24 novembro 2009.

JAIN, N.; LAM Y. M.; PYM, J.; CAMPLING, B. G. Mechanisms of resistance of human small cell lung cancer lines selected in VP-16 and cisplatin. **Cancer** v. 77, p. 1797-1808, 1996.

KINTZEL, P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders. **Drug Saf.**, v. 24, p. 19-38, 2001

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMAL, K.; TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS Lett.**, v. 268, p.235-237, 1990.

KODAMA, M.; KODAMA, T. Enhancing effect of hydrocortisone on hematogenous metastasis of Ehrlich ascites tumor in mice. **Cancer Res.**, v. 35, p.1015-1021, 1975.

KONDAGUNTA, G. V.; BACIK, J.; DONADIO, A.; BAJORIN, D.; MARION, S.; SHEINFELD, J.; BOSL, G. J.; MOTZER, R. J. Combination of paclitaxel, ifosfamide and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 6549-6555, 2005.

KRAMER, J. W.; HOFFMAN, W. E. Clinical Enzymology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. California: Academic Press, 1997. p. 303-325.

KUMAGAI, S.; SUGIYAMA, T.; NISHIDA, T.; USHIJIMA, K.; YAKUSHIJI, M. Improvement of intraperitoneal chemotherapy for rat ovarian cancer using cisplatin-containing microspheres. **Jap. J. Cancer Res.**, v. 87, p. 412-417, 1996.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEVI, J. A.; ARONEY, R. S.; DALLEY, D. N. Haemolytic anaemia after cisplatin treatment. **Br. Med. J.**, v. 282, p. 2003-2004, 1981.

LITCHFIELD J. T.; WILCOXON F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-113, 1949.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J.Control. Release**, v. 65, p. 271-84, 2000.

MALOISEL, F.; KURTZ, J. E.; ANDRES, E.; GORODETSKY, C.; DUFOUR, P.; OBERLING, F. Platin salts-induced hemolytic anemia: cisplatin- and the first case of carboplatin-induced hemolysis. **Anticancer Drugs**, v. 6, p.324-326, 1995.

MARKMAN, M.; WALKER, J.L. Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer: a review, with a focus on practical aspects of treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, p. 988-994, 2006.

MARTINDALE: **The Extra Pharmacopoeia**. 34 ed. London: The Pharmaceutical Press, 2005. p. 538-539.

MATTHEOLABAKIS, G.; TAOUFIK, E.; HARALAMBOUS, S.; ROBERTS, M. L.; AVGOUSTAKIS, K. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. **Eur. J.Pharm.Biopharm.**, v. 71, p. 190-195, 2009.

MEYER, O.; SVENDSEN, O. Animal Models in Pharmacology and Toxicology. In: HAU, J.; VAN HOOSIER, G. L. **Handbook of laboratory animals science**, 2. ed. New York: CRC Press, 2003, cap. 2.

MILLER, O. Bioquímica do Sangue - Substâncias não eletrolíticas. In: MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o Clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 3-31

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. Bioquímica do Sangue - Enzimas. In: _____. **Laboratório para o Clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 55-65.

MIRSALIS, J. C.; SCHINDLER-HORVAT, J.; HILL, J. R.; GREEN, C. E.; MITOMA, C.; TOMASZEWSKI, J. E.; TYSON, C. A.; DONOHUE, S. J. Toxicity of a quinorcarmycin analog, DX-52-1, in rats and dogs in relation to clinical outcome. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 51, p. 193-201, 2003.

MIZUMURA, Y.; MATSUMURA, Y.; HAMAGUCHI, T.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K.; KAWAGUCHI, T.; HRUSHESKY, W. J.; MORIYASU, F.; KAKIZOE T. Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 92, p. 328-336, 2001.

MONTI, E.; GARIBOLDI, M.; MAIOCCHI, A.; MARENGO, E.; CASSINO, C.; GABANO, E.; OSELLA, D. Cytotoxicity of cis-platinum(II) conjugate models. The effect of chelating arms and leaving groups on cytotoxicity: a quantitative structure-activity relationship approach. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 857-866, 2005.

MORENO, D.; ZALBA, S.; NAVARRO, I.; TROS DE ILARDUYA, C.; GARRIDO, M. J. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, doi:110.1016/j.ejpb.2009.10.005, 2009.

MUGGIA, F. M.; FOJO, T. Platins: extending their therapeutic spectrum. **J. Chem.**, v. 16, p. 77-82, 2004.

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 Chemother. Pharmacol.**, v. 43, p. 1-7, 1999.

NISHIYAMA, N.; OKAZADI, S.; CABRAL, H.; MIYAMOTO, M.; KATO, Y.; SUGIYAMA, Y.; NISHIO, K.; MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Novel cisplatin incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. **Cancer Res.**, v. 63, p. 8977-8983, 2003.

OOYAMA, A.; OKA, T.; ZHAO, H.; YAMAMOTO, M.; AKIYAMA, S.; FUKUSHIMA, M. Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. **Cancer Lett.**, v. 267, p. 26-36, 2008.

PHILLIPS, W. T.; MEDINA, L. A.; KLIPPER, R.; GOINS, B. A novel approach for the increased delivery of pharmaceutical agents to peritoneum and associated lymph nodes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p. 11-16, 2002.

PRATIBA, R.; SAMEER, R.; RATABOLI, P. V.; BHIWGADE, D. A.; DHUME, C.Y. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 532, p. 290-293, 2006.

RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat. Rev.**, v. 33, p. 9-23, 2007.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

SCHRIJVERS, D. L. Extravasation: a dreaded complication of chemotherapy. **Ann. Oncol.**, v. 14 (supplement 3) iii26-iii30, 2003

SIMÕES S.; MOREIRA, J. M.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 947– 965, 2004.

STATHOPOULOS, G. P.; BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M.; DELICONSTANTINOS, G.; RIGATOS, S.; DARLI, E.; VILIOU, V.; STATHOPOULOS, J. G. Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. **Oncol. Rep.**, v. 13, p. 589-595, 2005.

STEERENBERG, P. A.; STORM, G.; DE GROOT, G.; CLAESSEN, A.; BERGERS, J. J.; FRANKEN, M. A.; VAN HOESEL, Q. G.; WUBS, K. L.; DE JONG, W. H. Liposomes as drug carrier system for cis-diamminedichloroplatinum (II). II: Antitumour activity in vivo, induction of drug resistance, nephrotoxicity and Pt distribution. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 21, p. 299–307, 1988.

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

TAMURA, T.; IMAI, J.; MATSUMOTO, A.; TANIMOTO, M.; SUZUKI, A.; HORIKIRI, T.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H.; IKE, O. Organ distribution of cisplatin after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 54, p. 1-7, 2002a.

TAMURA, T.; IMAI, J.; TANIMOTO, M.; MATSUMOTO, A.; SUZUKI, A.; HORIKIRI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H. Relation between dissolution profiles and toxicity of cisplatin-loaded microspheres. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, p. 241-247, 2002b.

TAMURA, T., FUJITA, F., TANIMOTO M., KOIKE, M., SUZUKI, A., FUJITA, M., HORIKIRI, Y., SAKAMOTO, Y., SUZUKI, T., YOSHINO, H. Anti-tumor effect of intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres to human tumor xenografted nude mice. **J. Cont. Release**, v. 80, p. 295-307, 2002c.

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

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Roca: São Paulo, 2007.

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

UEHARA, T.; WATANABE, H.; ITOH, F.; INOUE, S.; KOSHIDA, H.; NAKAMURA, M.; YAMATE, J.; MARUYAMA, T. Nephrotoxicity of a novel antineoplastic platinum complex, nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats. **Arch. Toxicol.**, v. 79, n. 8, p. 451-460, 2005.

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

VASSILEVA, V.; GRANT, J.; SOUZA, R.; ALLEN, C.; PIQUETTE-MILLER, M. Novel biocompatible intraperitoneal drug delivery system increases tolerability and therapeutic efficacy of paclitaxel in a human ovarian cancer xenograft model. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 60, p. 907-914, 2007.

VELINOVA, M. J.; STAFFHORST, R. W. H. M.; MULDER, W. J. M.; DRIES, A. S.; JANSEN, B. A. J.; KRUIJFF, B.; KROON, A. I. P. M. Preparation and stability of lipid-coated nanocapsules of cisplatin: anionic phospholipid specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1663, p.135-142, 2004.

VIEIRA, F. P. Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de cisplatina: aspectos farmacotécnicos e avaliação da atividade antitumoral. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

XU, P.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J.; ZHAN, Y.; ISAAK, D. D.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 829-835, 2006.

YAO, X.; PANICHPISAL, K.; KURTZMAN, N.; NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am. J. Med. Sci.**, v. 334, p. 115-124, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Handbook – Non Clinical Safety Testing. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-non-clinical-safety-testing/pdf/safety_handbook.pdf>. Acesso em: 06 mai 2009.

WORKING, P. K.; NEWMAN, M. S.; SULLIVAN, T.; BRUNNER, M.; PODELL, M.; SAHENK, Z.; TURNER N. Comparative intravenous toxicity of cisplatin solution and cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes in cynomolgus monkeys. **Toxicol. Sci.**, v. 46, p. 155-165, 1998.

ZICCA, A.; CAFAGGI, S.; MARIGGIO, M.; VANNOZI, M. O.; OTTONE, M.; BOCCHINI, V.; CAVIGLIOLI, G.; VIALE, M. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 442, p. 265-272, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados individuais de volume do tumor de camundongos Swiss fêmeas portadores de tumor sólido de Erlich submetidos a diferentes tratamentos.

Grupo SpHL

Animais	D0	D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16	D19	D21	D23
1	350	498	617	806	1066	1289	1529	1576	2665	2917	3215
2	291	443	517	536	850						
3	345	657	584	804	810	736	1436	1813	1956	2595	3087
4	298	443	712	823	622	759	912	1406	1484	2105	2911
5	353	424	667	695	638	653	846	924	1715	1961	2482
6	262	366	530	487	648	696	840	1123	1300	1866	2669
7	236	420	618	714	727	1010	1448	1711	2321	2295	3339
8	307	411	579	719	858	634	991	1320	1638	1971	2823
9	362	633	746	1049	1119	1434	1812	2023	2523	2925	3373
10	312	529	589	640	454	740	974	1257	2100	2377	3588
11	262	513	710	971	820	1092	1638	2271	2206	3345	4089
12	329	560	635	902	824	876	1150	1410	1810	2385	2301
13	236	491	528	810	1002	779	1124	1456	1811	2248	3407
14	345	396	494	654		968	1244	1245	1452	1946	3342
15	297	472	582	497	565	613	765	1006	1405	2130	3168
Média	306	484	607	741	786	877	1193	1467	1885	2362	3128
Erro Padrão	11	23	20	44	51	67	88	102	114	118	125

Grupo NSpHL

Animais	D0	D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16	D19	D21	D23
1	334	630	646	1003	1012	1376	1528	1611	2801	3176	3794
2	280	392	560	733	911	1146	2009	2567	2478	2995	4684
3	346	462	429	694	1020	1189	1747	2129	2189	2221	4549
4	333	431	674	805	891	1397	1813	2159	3065	2676	4297
5	270	308	390	692	587	878	1203	1232	1906	1499	1960
6	318	366	399	640	884	839	1781	2275	2419	2407	2513
7	330	414	826	1160	1180	1799	2092	1587	4617	4094	5500
8	326	486	526	664	589	813	1149	1234	1480	2164	1686
9	325	515	546	761	935	756	1005	1707	2099	2428	3172
10	271	498	450	939	840	1095	1212	1477	1747	1972	2332
11	339	413	682	764	703	872	1166	1533	2306	1398	4486
12	288	441	399	592	680	775	1252	1380	1500	1339	1984
13	325	533	452	490	918	870	1221	1985	2339	1702	2339
14	231	460	583	754	1166	1269	1712	2221	3634	3447	4847
15	314	369	554	577	886	1005	1345	1586	2533	2593	3781
Média	309	448	541	751	880	1072	1482	1779	2474	2407	3462
Erro Padrão	9	21	34	46	48	79	93	110	212	212	396

Grupo CDDP

Animais	D0	D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16	D19	D21	D23
1	376	492	669	905	691	550	655		908	1173	1420
2	492	792	871	1354	1310	1751	1245	1469	1594	2714	2419
3	435	475	607	644	815	733	887	996	1405	893	1111
4	446	494	745	1063	914	895	906	1400	968	1156	1371
5	369	668	912	755	558	640	734	652	392	409	603
6	459	621	567	800	812	544	669	972	687		
7	374	595	687	885	732						
8	391	495	492	764	669	550	626	933	751	626	925
9	371	566	593	416	426						
10	426	582	789	1046	896	1263	1290	744	864	579	736
11	319	659	880	835	1093	839	1064	1022	3539	1749	2630
12	346	590	563	596	622	959	632	768	819	519	583
13	377	436	569	841	647	910	1036	828	991	1050	1013
14	425	702	634	965	1251	1662	1491	1756	2254	2309	2923
15	391	433	428	630	537	1022	622	848	1115	883	1189
Média	400	573	667	833	798	948	912	1032	1249	1200	1410
Erro Padrão	12	28	39	60	69	106	78	90	214	188	215

Grupo SpHL-CDDP

Animais	D0	D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16	D19	D21	D23
1	264	229	317	387	470	415	608	587	771	645	1062
2	408	343	380	403	444	374	272	337	239	162	181
3	310	345	368	540	546	498	639	480	583	590	563
4	310	264	393	419	278	414	483	388	440	331	453
5	326	358	359	622	401	330	607	497	490	435	746
6	359	422	474	476	401	252	318	148	116		
7	327	386	483	548	421	272	395	297	266	279	207
8	250	388	348	489	292	302	302	354	332	477	716
9	289		259	410	451	368	392	462	389	291	333
10	264	302	293	323	273	243	213	128	181	116	153
11	351	395	378	466	509	506	579	630	714	578	1307
12	331	318	323	376	397	232	258	215	153	179	140
13	317	372	386	528	332	313	444	344	294	237	357
14	320	201	143	268							
15	304	330	311	358	311	384	414	422	362	388	672
Média	315	332	348	441	395	350	423	378	388	362	530
Erro Padrão	10	17	21	25	23	24	38	40	51	46	97

Grupo NSpHL-CDDP

Animais	D0	D2	D5	D7	D9	D12	D14	D16	D19	D21	D23
1	315	282	417	526	770	696	909	843	794	698	1653
2	353	369	242	241	331	355	353	357	372	357	
3	354	427	376	550	429	515	603	1152	336	377	657
4	268	338	371	530	674	578	372	546	578	526	692
5	306	301	372	538	757	863	814	694	657	598	729
6	217	293	260	269	452	435	607	311	197	399	412
7	280	340	374	504	588	549	614	560	546	538	556
8	357	379	422	469	740	899	1124	912	921	803	1844
9	336	390	423	823	613	679	463	522	656	622	810
10	267	461	483	606	670	443	440	364	440	392	467
11	426	353	360	443	403	321	421	321	214	330	
12	300	336	460	487	527	399	373	224	225	325	
13	266	344	451	266	409	361	571	535	331	329	547
14	334	343	383	498	464	411	778	563	746	647	914
15	421	335	357	439	715	551	533	455	691	691	1225
Média	320	353	383	479	569	537	598	557	514	509	875
Erro Padrão	15	13	18	40	41	50	62	78	74	50	143

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](#)