



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**PERFIL TÓXICO-FARMACOLÓGICO DA ADMINISTRAÇÃO DA DOXORRUBICINA
EM CÃES COM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL**

Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção

ORIENTADOR: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

ARARAQUARA - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PERFIL TÓXICO-FARMACOLÓGICO DA ADMINISTRAÇÃO DA DOXORRUBICINA
EM CÃES COM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL**

Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa
e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

ARARAQUARA - SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A851p

Assumpção, Juliana Uruguay Corrêa Vidigal

Perfil tóxico-farmacológico da administração da doxorubicina em cães com tumor venéreo transmissível / Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção. — Araraquara, 2015
113 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Mirela Tinucci Costa

1. Tumor de sticker. 2. Farmacocinética. 3. Canina. 4. CLEU. 5. TVT. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Costa, Mirela Tinucci, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Júlia e José, por estar sempre ao meu lado, pelo grande incentivo, compreensão pelas ausências e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus que me colocou nesse caminho, por ter me iluminado e direcionando em todas as etapas da minha vida.

“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar que Deus nela escreva o que quiser”. Santo Agostinho

À professora Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini, minha mãe científica, agradeço todos os ensinamentos passados, pela confiança depositada em mim desde o início do mestrado. Ao longo desses anos tive a oportunidade de aprender o que é fazer pesquisa. Agradeço sobre tudo pela amizade, paciência e pela contribuição no meu crescimento pessoal.

A Professora Dr^a Mirela Tinucci Costa, na posição de co-orientadora, pelo suporte técnico, aprendizado e pela oportunidade de trabalhar junto com sua equipe.

A Professora Dr^a Annelise Camplesi sou imensamente grata por toda ajuda concedida ao longo deste trabalho (conhecimento teórico e prático), pela sua grande disponibilidade e sua contribuição na banca examinadora de qualificação.

A Rafaela Bortoloti, por toda ajuda durante a pesquisa, sem sua dedicação e auxílio não teria concluído este trabalho.

A Aline Araki, pela indispensável ajuda durante todo o trabalho, pelos cafezinhos e pela dedicação ao trabalho.

A Profa Dr.^a Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, pela ajuda nos experimentos, a contribuição com exames laboratoriais sempre com muito carinho.

Ao Fábio Nelson Gava, pela realização do exame de ecocardiograma e o grande apoio durante os experimentos.

Ao Prof.Dr.º Áureo Evangelista, agradeço por ter disponibilizado tão gentilmente seu laboratório para realização dos exames desse estudo.

Ao grupo de pesquisa da Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini, Caroline, Marco, Elias, Pedro, Emiliana e Manuel. Pelo auxílio na execução do projeto e pelos momentos de descontração.

A Martina, pela grande amizade construída durante esses anos, por estar sempre pronta ajudar nos experimentos e companheirismo.

Ao Marcelo Davanço (Tereso) pelo auxílio na elaboração da tese final e realização dos cálculos estatísticos.

Ao Michel Leandro de Campos, sempre presente durante o mestrado e doutorado, agradeço pelas inúmeras ajudas, pelos ensinamentos e pelas observações críticas.

À Kelly Chrystina Pestana agradeço por todo auxílio durante o doutorado, que muito contribuiu nessa pesquisa e principalmente pela amizade.

À Evelin Martin, minha ex- estagiária, agradeço pela ajuda na realização deste trabalho, pela companhia de fim de semana e pela sincera amizade.

À Helen (Berê), pela disponibilidade de ter participado como membro da banca examinadora de qualificação e contribuído na realização desta tese. Agradeço também pela sincera amizade iniciada no começo do mestrado.

À Fabiola Garavello Prezotti, agradeço pela gentil ajuda com a elaboração do abstract e principalmente agradeço para verdadeira amizade iniciada no mestrado.

Às funcionárias da Toxicologia, Maria Aparecida e Valéria agradeço por toda ajuda. E agradeço em especial a Maria, pelos inúmeros conselhos e por ser especial na minha vida.

Agradeço aos funcionários da Bioequivalência, Marcão e Andréia, pelos auxílios, sempre prestados com muito carinho e pelas caronas.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacotécnica, Gustavo, Gisela, Cris, pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto.

À Thalita Formariz Pilon, agradeço por todos os ensinamentos passados desde a época da graduação, que me incentivou a seguir a área acadêmica. Agradeço pela importante ajuda depositada neste trabalho, além da sua amizade.

Aos colegas pós-graduandos, Guilherme, Natália, Tati, Leandro, Juliana, Leidiana, pela amizade e companheirismo.

As amigas Megley, Maria, Ana Cláudia (Livreria) e Amanda (Coringa) agradeço pelo acolhimento carinhoso na república aconchego, tenho certeza que vocês são presente de Deus na minha vida.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário, agradeço pelo companheirismo, amizade e pelas inúmeras orações.

Ao meu querido e sempre presente Tio Carlos Alberto, agradeço por todo carinho, pelos momentos agradáveis, pela preocupação comigo, com o passar do tempo pude perceber que o senhor aprendeu o que é fazer pós-graduação.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária-Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"- UNESP Jaboticabal (Matheus, Douglas, Nathan, Edmilson, Carol, Ana e Rosângela) agradeço pelos ensinamentos, pela ajuda na realização dos exames dos animais, pela dedicação e pela valorosa amizade.

Aos demais Pós- Graduandos da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal que tiveram envolvidos e que de alguma forma ajudaram neste projeto, Amanda Leal, Alexandre, Camila Beatriz e Fernando Rosa.

Aos funcionários do hospital veterinário, principalmente Dona Izilda pela dedicação com a limpeza e cuidado com os animais.

Às funcionárias do Laboratório de Toxicologia da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FMRP/USP), pela ajuda na dosagem da troponina cardíaca.

Aos funcionários da biblioteca pelo apoio na correção das referências bibliográficas.

Aos animais do experimento e os proprietários, sem eles nada seria possível, meu eterno respeito.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), agradeço pela atenção.

Ao CAPES, pela bolsa que permitiu que eu me dedicasse, integralmente, ao longo de todo o doutorado, à minha pesquisa.

À FAPESP, pela concessão do equipamento CLUE que possibilitou a realização desse trabalho.

À todos os meus familiares, agradeço por todo incentivo, carinho.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

PERFIL TÓXICO-FARMACOLÓGICO DA ADMINISTRAÇÃO DA DOXORRUBICINA EM CÃES COM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

A doxorubicina (DOX), quimioterápico da família das antraciclinas, é utilizada no tratamento de diversos tumores sólidos em animais e seres humanos, e é fármaco de segunda escolha para o tratamento, em cães, do tumor venéreo transmissível (TVT) resistente a outros quimioterápicos. Seu uso terapêutico é limitado em decorrência da cardiotoxicidade e mielossupressão, efeitos dose-dependentes. A cardiotoxicidade da DOX já foi constatada em cães hígidos, porém, o perfil farmacocinético e os efeitos tóxicos neste modelo animal submetido ao regime posológico para o tratamento do TVT ainda não foram investigados. Ainda, têm sido propostas novas formulações contendo o quimioterápico com o intuito de melhorar sua eficácia e diminuir a toxicidade. Este trabalho teve como objetivo investigar o perfil farmacocinético da DOX administrada na forma de cloridrato na dose de 30 mg/m² a cada 21 dias, em quatro ciclos, por infusão contínua por 30 minutos, em cães com TVT (n=10) assim como avaliar efeitos tóxicos através de parâmetros bioquímicos, hematológicos e de urinálise de amostras colhidas antes e após a exposição ao quimioterápico. Ainda, neste trabalho, propôs-se avaliar o perfil farmacocinético e toxicidade sistêmica da DOX veiculada em sistema microemulsionado em cães com TVT tratados sob o mesmo regime posológico da DOX cloridrato. Para a investigação do perfil farmacocinético, em ambos os grupos, um método bioanalítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para a determinação de DOX foi desenvolvido e validado. O método bioanalítico apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação na investigação do perfil farmacocinético, com limite de quantificação (LIQ) de 19 ng/ml e limite de detecção (LD) de 9 ng/ml. Os parâmetros farmacocinéticos da DOX calculados a partir da administração da formulação cloridrato, no primeiro e quarto ciclo do tratamento foram, respectivamente: meia vida de eliminação 30,7 e 19,16 horas; volume de distribuição 652,18 e 397,45 L/kg e clearance 0,49 e 0,326 L/min/kg. Não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos no primeiro e no quarto ciclo de quimioterapia. Os exames bioquímicos e hematológicos não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) antes e após os ciclos do quimioterápico, sugerindo baixo risco de toxicidade hematológica, cardíaca, renal e hepática na utilização deste protocolo neste modelo animal com TVT. No entanto, verificou-se que a ecodopplercardiografia deve ser utilizada como teste confirmatório da ausência de dano cardíaco para o prosseguimento da quimioterapia. Esse resultado permite-nos inferir que a manutenção do regime posológico durante todos os ciclos de infusão é adequada para a condução do tratamento e que o protocolo proposto demonstrou-se adequado para o tratamento de cães com TVT, com evidente redução da massa tumoral. Todos os animais que receberam a microemulsão de DOX apresentaram reações anafiláticas, demonstrando que a formulação é bioincompatível com o modelo animal utilizado.

Palavras chaves: Tumor de sticker; TVT, canina; quimioterápico, farmacocinética e CLUE.

ABSTRACT

PROFILE OF TOXIC-PHARMACOLOGIC DOXORUBICIN MANAGEMENT IN DOGS WITH TUMOR TRANSMISSIBLE VENEREAL

Doxorubicin (DOX), the anthracycline family of chemotherapy is used in the treatment of various solid tumors in animals and humans, and is a second-line drug for the treatment of dogs, transmissible venereal tumor (TVT) resistant to other chemotherapeutic agents. Its therapeutic use is limited due to cardiotoxicity and myelosuppression, dose-dependent effects. The cardiotoxicity of DOX has been observed in healthy dogs, however, the pharmacokinetics and toxicity in this animal model subjected to the dosing regimen for the treatment of TVT have not been investigated. Also, there have been proposed new formulations containing the drug with the aim to improve efficacy and decrease toxicity. This study aimed to investigate the pharmacokinetic profile of DOX administered as hydrochloride at a dose of $30 \text{ mg} / \text{m}^2$ every 21 days, in four cycles, by continuous infusion for 30 minutes in dogs with TVT ($n = 10$) as well as assess toxic effects through biochemical, hematological and urinalysis samples taken before and after exposure to chemotherapy. Still, this work proposed to evaluate the pharmacokinetic profile and systemic toxicity of DOX conveyed in microemulsion system in dogs with TVT treated under the same dose of DOX hydrochloride regime. For the investigation of the pharmacokinetic profile in both groups, a bioanalytical method performance liquid chromatography ultra efficiency (CLUE) for determining DOX was developed and validated. The bioanalytical method was appropriate confidence limits for application in the investigation of the pharmacokinetic profile, with limit of quantitation (LLQ) of $19 \text{ ng} / \text{mL}$ and detection limit (LLD) of $9 \text{ ng} / \text{mL}$. Pharmacokinetic parameters of DOX calculated from the administration of the hydrochloride formulation, the first and fourth treatment cycle were: elimination half-life 30.7 and 19.16 hours; volume of distribution 652.18 and 397.45 L/kg and clearance 0.49 and 0.326 L/min/kg . There was no significant difference between the pharmacokinetic parameters obtained in the first and fourth chemotherapy cycle. The biochemical and hematological tests were not significantly different ($p > 0.05$) before and after chemotherapy cycles, suggesting low risk of hematologic, cardiac, renal and hepatic toxicity in the use of this protocol in this animal model with TVT. However, it was found that echocardiography should be used as a confirmatory test for absence of cardiac damage after chemotherapy. This result allows us to infer that the maintenance dosing regimen during infusion every cycle is suitable for conveying treatment and demonstrated that the proposed protocol is suitable for the treatment of dogs with TVT, with evident reduction in tumor mass. All animals receiving doxorubicin microemulsion had anaphylactic reactions, showing that the formulation is bioincompatible with the animal model used.

Keywords: Tumor sticker; TVT, canine; chemotherapy, pharmacokinetics and CLUE.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase
ANP: peptídeo natriurético atrial
AST: aspartato aminotransferase
ATP: adenosina trifosfato
AUC: área sob a curva
BD: bilirrubina direta
BNP: peptídeo natriurético cerebral
BT: bilirrubina total
CAT: catalase
CBR1: carbonil redutase
CHO: colesterol
Cl: clearance
CLUE: cromatografia líquida de ultra eficiência
CK-MB: isoenzima MB da creatina quinase
CK: creatinina quinase
Cp: concentração plasmática
CQD: controle de qualidade de diluição
cTnC: isoforma C
cTnI: troponina isoforma I
cTnT: troponina isoforma T
CV: coeficiente de variação
CYP: citocromo P450 redutase
DAU: daunorrubicina
DOX: doxorrubicina
DE₅₀: dose efetiva em 50 % da população testada
DL₅₀: dose capaz de matar 50% da população testada
DNA: ácido desoxirribonucleico
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FS: fosfatidilcolina de soja

GPx: glutathione peroxidase 1

IAM: infarto agudo do miocárdio

IC: intervalo de confiança

ICC: insuficiência cardíaca congestiva

IV: intravenosa

Kel ou β : constante de velocidade de eliminação

LD: limite de detecção

LDH: lactato desidrogenase

LIQ: limite inferior de quantificação

ME: microemulsão

ME O/A: microemulsão do tipo óleo em água

OS: oleato de sódio

PDI: índice de polidispersão

PEG: propilenoglicol

PI: padrão interno

PK: perfil farmacocinético

PT: proteínas totais

Q: fluxo de sangue

RNA: ácido ribonucléico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOD: superóxido dismutase

SRD: cães sem raça definida

Trig: triglicérides

t_{1/2}: meia-vida

TVT: tumor venéreo transmissível

UPC: razão proteína/creatinina urinária

Vd: volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura molecular das antraciclinas a) DOX e b) DAU.....	20
Figura 2: Animal com massa exuberante, com secreção hemorrágica na região da vulva , transmissível antes da quimioterapia.....	34
Figura 3. Curva analítica da DOX em plasma obtida para a faixa de concentração de 19 a 1250 ng/mL.	61
Figura 4: Cromatograma referente ao LD e LIQ e amostra branco do método de análise de DOX em plasma (n=5).	64
Figura 5. Estudo do efeito residual de interferentes no tempo de retenção do analito (0,84 minutos) e DAU (1,01 minutos).....	66

CAPÍTULO II

Figura 1: Animal apresentando edema e eritema periocular e reação urticariforme por todo o corpo (visível na região cervical).	90
Figura 2: Animal apresentando edema na região da orelha e ocular.	91
Figura 3: Animal apresentando urticária.	92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Dados dos animais grupo DOX-Cl com TVT incluídos no trabalho	35
Tabela 2: Tempos de coleta do material sanguíneo para os exames laboratoriais	37
Tabela 3: Avaliação dos biomarcadores cardíacos cTnI e CK-MB em cães tratados com doxorubicina (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).	45
Tabela 4: Parâmetros bioquímicos de função renal dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).....	48
Tabela 5: Parâmetros bioquímicos da função hepática dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).....	49
Tabela 6: Parâmetros hematológicos de eritrograma e plaquetas dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).	52
Tabela 7: Valores médios dos parâmetros do leucograma dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).....	53
Tabela 8: Frequência de alterações laboratoriais nos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como número de animais e intensidade.	58
Tabela 9: Proteína e creatinina urinária (UPC) dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).....	59
Tabela 10: Precisão e exatidão intra-ensaio do método bioanalítico da DOX em plasma (n=5).	62
Tabela 11: Precisão e exatidão inter-ensaio do método bioanalítico para a determinação da DOX em plasma (n=10).	62
Tabela 12: Limites de detecção e quantificação do método de análise de DOX em plasma (n=5).	63

Tabela 13: Estudo de controle de qualidade de diluição da amostra contendo DOX em plasma (n=5).	65
Tabela 14: Valores de recuperação da DOX em plasma (n=3). Dados apresentados como média e coeficiente de variação (CV %).	65
Tabela 15: Estudo de estabilidade da DOX em plasma. Resultados apresentados como porcentagem de analito no estudo de pós-processamento da amostra, durante 8 horas (n=3).	67
Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial em cães 30 mg/m ² , obtidos após administração por infusão contínua, (n=10 para M1 e n=8 para M3). Dados expressos como mediana, média (IC95).	69

CAPÍTULO II

Tabela 1: Características dos animais incluídos no trabalho	87
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO I.....	19
I. ASPECTOS TÓXICO-FARMACOLÓGICOS DA DOXORRUBICINA	19
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Animais	32
3.2. Protocolo Experimental	35
3.3. Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	36
3.3.1. Determinação da atividade de isoenzima MB da creatinina quinase (CK-MB) e troponina cardíaca I.....	36
3.3.2. Hemograma	37
3.3.3. Bioquímica sérica	37
3.4. Urinálise	38
3.5. Avaliação da proteína urinária	38
3.6. Determinação da Doxorubicina por cromatografia líquida de ultra eficiência -CLUE	39
3.6.1. Sistema cromatográfico	39
3.6.2. Processamento de amostras de plasma	39
3.6.3. Validação do método bioanalítico	40
3.7. Análise Farmacocinética.....	43
3.8. Análise Estatística	44
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Determinação de parâmetros bioquímicos.	45
4.1.1. Atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CK-MB) e troponina I (cTnI).....	45
4.1.2. Determinação de creatinina, ureia, proteínas totais, ALT, AST, ALP, albumina, triglicérides, colesterol, bilirrubina total e indireta	47
4.2. Hemograma	52
4.3. Urinálise	55
4.3.1. Determinação da proteína urinária	59
4.4. Validação do método para determinação de DOX em plasma por CLUE.	61
4.5. Análise Farmacocinética	68
V. CONCLUSÕES	74

CAPÍTULO II	75
I.NOVAS FORMULAÇÕES	75
II. OBJETIVOS	84
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
3.1. Animais	86
3.2. Protocolo Experimental	87
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1. Experiência clínica da administração da microemulsão contendo doxorrubicina.....	89
V. CONCLUSÕES	93
VI. REFERÊNCIAS	94
VII. ANEXOS	106
Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	107
Anexo 2. Aprovação comitê de ética	111
Anexo 3. Parâmetros Farmacocinéticos.	112

INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico da família das antraciclinas em uso clínico desde 1969 e utilizado no tratamento de diversos tumores em animais e seres humanos (VOLKOVA; RUSSELL, 2011). E, embora seja considerada um dos agentes mais potentes em quimioterapia, seu uso é limitado em decorrência de seus efeitos tóxicos (SACCO et al., 2001; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). Entre esses efeitos, a cardiotoxicidade e a mielossupressão induzidas pela DOX são considerados os mais importantes (CARVALHO et al., 2009; COUTO, 2006).

A DOX tem sido utilizada para o tratamento de tumor venéreo transmissível (TVT) refratário aos antitumorais de primeira escolha (TINUCCI-COSTA, 2009) na dose de 30 mg/m² com intervalo de 21 dias (GERARDI, 2009). Esta doença acomete principalmente cães errantes, geralmente sem raça definida. Embora alterações cardíacas pós a administração de DOX em cães adultos normais tenham sido relatadas (Silva et al, 2005; Pereira Neto et al., 2006; Souza et al., 2004 e Souza, 2006), não há informações sobre o perfil farmacocinético e sobre a toxicidade da DOX quando utilizada no tratamento do TVT em cães.

Novas estratégias para a liberação de fármacos já utilizados na clínica tem sido propostas para melhorar a eficácia e diminuir os seus efeitos tóxicos e, entre estas, os sistemas microemulsionados tem apresentado resultados promissores (FORMARIZ, 2008; ASSUMPÇÃO et al., 2012; CANDIDO et al., 2014). Formariz et al. (2008) desenvolveram uma ME lipídica cujo objetivo foi direcionar a DOX para as células tumorais, composta de tensoativos, colesterol e tampão. Esta microemulsão foi capaz de diminuir a toxicidade da DOX e aumentar sua margem de segurança, assim como modificar o seu perfil farmacocinético, diminuindo a distribuição da DOX para o tecido cardíaco (FORMARIZ, 2008; ASSUMPÇÃO, 2012; CANDIDO, 2014).

Com base nestas informações, a proposta do presente trabalho foi investigar as características disposicionais e de toxicidade da DOX em cães com TVT sob o regime posológico atualmente adotado na clínica (capítulo 1) e avaliar a aplicabilidade clínica do sistema microemulsionado desenvolvido por Formariz (2008), tendo em vista os resultados promissores obtidos até o presente (capítulo 2).

CAPÍTULO I

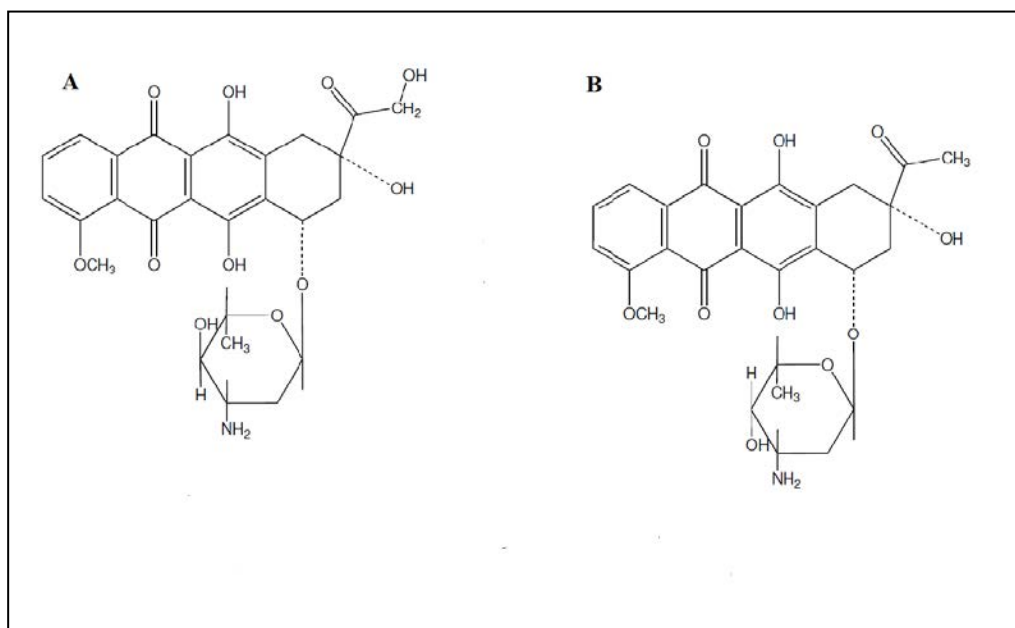
I. ASPECTOS TÓXICO- FARMACOLÓGICOS DA DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DOX) pertence à classe das antraciclinas, as quais foram sintetizadas no ano de 1950, por um grupo italiano (ARCAMONE et al., 1969). Neste grupo, destaca-se também a daunorrubicina (DAU), que também possui efeito antineoplásico (ARCAMONE et al., 1969; Di MARCO; GAETANI; SCARPINATO, 1969).

A DOX é um agente antibiótico-quimioterápico da família das antraciclinas isolados de cultura de bactéria *Streptomyces peucetius* var *caesis* (BONADONNA; MONFARDINI; FOSSATI-BELLANI, 1969). Este fármaco foi aprovado pelo FDA para uso clínico em 1969, sendo utilizado no tratamento de tumores sólidos, como câncer da mama, de pulmão, mieloma múltiplo, sarcoma e doenças hematológicas como leucemia e linfoma tanto em seres humanos quanto em animais (VOLKOVA; RUSSELL, 2011).

Ambos os compostos, DOX e DAU, apresentam em sua estrutura molecular um anel tetraciclina hidrofóbico e um grupo açúcar de daunosamina, ligados a um dos anéis por ligação glicosídica. O núcleo quinônico é responsável e transferência eletrônica para gerar radicais livres (LOWN, 1993). A estrutura molecular está representada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura molecular das antraciclinas a) DOX e b) DAU.



ASSUMPÇÃO, 2011.

As antraciclinas interferem na replicação do DNA, sendo que a DOX é capaz de inibir a ação de topoisomerase I e II, enzimas responsáveis pela separação da dupla hélice da fita de DNA. Esta ação desencadeia a inibição de DNA e RNA e também a síntese de proteínas, com consequente morte celular (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

A DOX pode ser encontrada na forma de pó liofilizado (10 e 50 mg), forma farmacêutica comercial em quimioterapia, que deve ser dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9% ou água para injetáveis. A dose utilizada em humanos é 60-75 mg/m², com intervalos de 21 dias (GOODMAN; GILMAN, 2012). Para cães a dose de DOX preconizada é 30 mg/m², durante 21 dias (LANORE; DELPRAT, 2004; RODASKI; DE NARDI, 2004).

Durante o tratamento com DOX deve-se evitar o extravasamento, visto que pode desencadear ação vesicante local e necrose tecidual (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Os avanços na área farmacêutica tem impulsionado o surgimento novos sistemas contendo quimioterápicos, tornados os mais eficazes e menos tóxicos, devido ao direcionamento para o tecido alvo, entre eles destacam-se microemulsão, nanopartículas, microcápsulas, lipossomas, micelas poliméricas e associada a anticorpos (KOROLKOVAS, 2009; BRISTISH, 2010). No Brasil, a doxorubicina liposomal está disponível sob o nome Caelyx® (Schering Plough).

O perfil farmacocinético (PK) da DOX comercial tem sido estudado em muitas espécies para estimar e prever a concentração do fármaco no tecido alvo e não alvo, e os cães são modelos animais constantemente utilizados (OOSTERBAAN et al., 1984).

O protocolo de quimioterapia pode-se basear na administração por infusão contínua ou IV bolus. Muitos estudos tem mostrado que a DOX apresenta disposição multicompartmental (bicompartimental ou tricompartmental) após administração endovenosa (OOSTERBAAN et al., 1984).

Em humanos este composto tem apresentado disposição linear e multicompartmental. A primeira fase da disposição cinética persiste em torno de 11 minutos, com rápida distribuição para fígado, pulmões, coração, rins e baço. A doxorubicina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. A segunda fase da disposição cinética apresenta um declínio lento das concentrações plasmáticas com meia-vida de eliminação de aproximadamente 30 horas, após administração intravenosa (PRATT et al., 1994).

Em cão, após administração de DOX na dose 30 mg/m² (durante 3-4 semanas, com intervalo de 21 dias), observou-se meia vida de distribuição em torno 10 minutos,

apontando a rápida distribuição aos tecidos (rins, fígado, pulmão e coração) (SUSANECK, 1983).

A DOX é metabolizada no tecido hepático pelas enzimas aldoceto redutase e glicosidases microsossomais para originar doxorrubicinol - que apresenta algum efeito antitumoral - agliconas e outros derivados (SUSANECK, 1983; CHABNER; CALABRESI, 2001). Grande parte do fármaco é excretada na bile (5 a 7 dias depois do tratamento), apenas 5 a 12% se encontram na urina durante o mesmo período, 3% é encontrado na urina como doxorrubicinol. Após 24 horas, 10 a 20% do fármaco é encontrado nas fezes (ZHENG et al., 2006). Ainda, a DOX pode ser excretada pelo leite, com pico de concentração nas 24 horas após administração (CHABNER; CALABRESI, 2001).

O clearance plasmático estimado da DOX em humanos é de 17 ± 8 mL/min.kg e é menor em pacientes que apresentam cirrose hepática e obesidade (CHABNER; CALABRESI, 2001).

Recomenda-se a redução da dose de 50% na dose inicial de doxorrubicina em pacientes com disfunção hepática (CHABNER; CALABRESI, 2001)

Segundo o FDA, a DOX é considerada um dos agentes mais potentes em quimioterapia, uma vez que apresenta benefícios em relação à progressão da doença e sobrevivência (CARVALHO et al., 2009). Porém, seu uso é limitado devido aos efeitos tóxicos em células não alvos, efeitos dose-dependentes (SACCO et al., 2001; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Os efeitos adversos mais comuns decorrentes do uso de DOX são: náuseas, vômitos, distúrbios gastrintestinais, alopecia (GOODMAN; GILMAN, 2012), estomatite, distúrbios neurológicos como alucinações, vertigem e tontura (TACAR;

SRIAMORNSAK; DASS, 2012), cardiotoxicidade cumulativa e mielossupressão (SACCO et al., 2001).

A cardiotoxicidade induzida pela DOX passou a ser relatada no final de 1969 e no início de 1970 e é considerado o efeito tóxico mais pronunciado das antraciclinas (CARVALHO et al., 2009).

A cardiotoxicidade pode manifestar-se de forma aguda, subaguda, crônica ou tardia. A cardiotoxicidade aguda ocorre durante ou logo após administração de DOX, principalmente quando se administra de forma rápida (IV bolus), em que se observa vasodilatação, hipotensão e arritmias. A forma subaguda é incomum e manifesta-se geralmente 3 dias após o fim da quimioterapia, resultando em pericardite e/ou miocardite. A forma crônica ocorre depois de semanas a meses do término do tratamento, caracterizada como cardiomiopatia dilatada, com consequente disfunção contrátil e insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Um dos maiores determinantes para o desenvolvimento ICC é a dose acumulativa de DOX. A forma tardia, semelhante à crônica, pode manifestar-se depois de anos do término da quimioterapia (WOJTACKI; LEWICKA-NOWAK; LESNIEWSKI-KMAK, 2000).

A DOX atua nos cardiomiócitos, podendo alojar-se na membrana das mitocôndrias do tecido cardíaco em decorrência de sua elevada afinidade pelo fosfolípido cardiolipina (WALLACE 2007; ZHANG et al., 2009). Pesquisas recentes sugerem que a cardiotoxicidade da DOX está relacionada ao estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas químicas contendo oxigênio e a sua reatividade é consequência da presença de elétrons desemparelhados para formar radicais, que são formados durante o metabolismo normal do oxigênio por enzimas endógenas ou exógenas, principalmente nas mitocôndrias. A produção destes radicais

em excesso desencadeia o estresse oxidativo, com consequente desequilíbrio das espécies antioxidantes (DEAVALL et al., 2012).

A DOX pode sofrer redução por uma série de enzimas oxidorreduções celulares, incluindo NADH desidrogenase, citocromo P450 redutase (CYP), xantinas oxidase e óxido nítrico sintase. O processo consiste em transferir um elétron a partir do nucleotídeo reduzido, o qual converte a molécula de antraciclina a um radical semiquinona e, ao reagir com oxigênio molecular, irá formar radical superóxido, (DAVIES; DOROSHOW, 1986; CARVALHO et al., 2009).

Outro mecanismo de cardiotoxicidade induzida pela DOX é mediado pelo ferro, elemento que possui grande importância na respiração celular como transportador de elétrons. Entretanto esse metal na forma íon ferroso (Fe^{2+}) reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), originando radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). O radical $\cdot\text{OH}$ é extremamente reativo e não pode ser neutralizado por enzimas antioxidantes. Assim, o $\cdot\text{OH}$ reage com ácidos graxos poliinsaturados com consequente peroxidação lipídica e destruição da membrana celular (MINOTTI et al., 2004).

O principal metabólito da DOX - doxorubicinol - não é capaz de gerar ROS, porém está envolvido com o desequilíbrio da homeostase do ferro, prejudicando a contração e o relaxamento do coração. Alguns estudos apontam que este metabólito parece ser o mais provável responsável pela cardiomiopatia crônica (CARVALHO et al., 2009).

A maior sensibilidade do coração à DOX pode ser explicada pelo fato desse órgão apresentar maior quantidade de mitocôndrias (35% a mais que em outros órgãos), e os mecanismos de defesa antioxidantes serem menos efetivos no coração (CARVALHO et al., 2009).

Em estudo realizado por Timour et al. (1988), a concentração plasmática de DOX em plasma de cão foi $82,9 \pm 11,4$ ng/ml e no coração, após biópsia foi 4066 ± 306 ng/mg. Isso mostra a alta concentração de DOX no coração em relação ao plasma. A eliminação total ocorre depois de 21 dias, isso reafirma a forte afinidade da DOX pelo tecido cardíaco.

A cardiotoxicidade pode ser acompanhada por alterações no pelo exame de eletrocardiograma. Porém, alterações nesses exames não são específicas para diagnosticar cardiotoxicidade induzida pela DOX. A mensuração dos biomarcadores no soro e plasma, como troponina cardíaca T, I, peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético atrial (ANP) e CK-MB são ferramentas importantes para verificar lesão cardíaca irreversível e necrose dos cardiomiócitos (RAJ; FRANCO; LIPSHULTZ, 2014).

Silva et al. (2005), Pereira Neto et al. (2006), Souza et al. (2004) e Souza (2006), tem reportado de forma detalhada a indução de alterações cardíacas após a administração de DOX em cães adultos normais (dose cumulativa de $180 - 240$ mg/m², com intervalo de 21 dias). Estes autores, através da avaliação ecocardiográfica, observaram aumento do diâmetro e do volume do ventrículo esquerdo e diminuição nas frações de encurtamento e de ejeção, com alteração na função sistólica e diastólica cardíaca. Assim, concluíram que o tratamento crônico com DOX é capaz de induzir cardiomiopatia, mesmo nas doses terapêuticas.

O fígado acumula grande quantidade de DOX devido ao seu metabolismo, e este órgão é um dos mais afetados por essa antraciclina (LEE et al., 1980). O mecanismo primário de hepatotoxicidade da DOX é mediado pelo NADPH citocromo P450 redutase (CPR) (MORDENTE et al., 2001; PAWLOWSKA et al., 2003) e carbonil

redutase (CBR1). A DOX é capaz de parar o ciclo celular dos hepatócitos, inibindo sua auto-regeneração (KASSNER et al., 2008).

A segunda principal causa de toxicidade da DOX sobre fígado é o estresse oxidativo, causado pela redução de ROS e formação de semiquinona, que reage com o oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KASSNER et al., 2008). Os ROS podem levar à ativação de IK β quinase (IKK), que fosforila o inibidor IK β , que, por sua vez, conduz à expressão de citocinas inflamatórias, desencadeando a morte celular (LU et al., 2005).

A literatura científica relata que a produção de ROS induzida por DOX está relacionada com o aumento da peroxidação lipídica a partir da diminuição da atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase 1 (GPx), causando danos ao DNA e diminuição dos níveis de antioxidantes naturais, e que estas ações relacionam-se aos danos sobre os hepatócitos (ODOM et al., 1992; THAYER, 1988; ORTIZ et al., 2008)

Existem vários mecanismos para proteger o organismo do ROS, como ácido ascórbico, vitamina E, glutathione peroxidase, enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPX). O aumento de ROS oprime o sistema de defesa, permitindo danos celulares. As células tumorais tem altos níveis de ROS e levam ao estresse oxidativo ou danos ao DNA em neoplasias (DEAVALL et al., 2012).

Outro efeito adverso da DOX é supressão da medula óssea, dose-dependente e reversível, aumentando a chance de infecção bacteriana. A toxicidade hematológica constitui o efeito da quimioterapia, com necessidade de suspensão temporária ou permanente do tratamento, esta toxicidade atinge menos de 30% dos cães tratados com DOX (COUTO, 2006).

O efeito de mielossupressão como leucopenia (principalmente em granulócitos), neutropenia, trombocitopenia e anemia (MANCUSO et al., 2006) pode aparecer após a segunda semana de tratamento, levando de 14 a 21 semanas para a recuperação. Esse efeito depende da dose administrada e da capacidade de regeneração medular (CARVALHO et al., 2009).

A neutropenia é um efeito adverso limitante da dose, podendo evoluir para sepse com risco de morte para o animal, e atinge de 45 a 73% dos animais tratados com DOX (AHAUS; COUTO E VALERIUS., 2000; KENT et al., 2004; SORENMO et al., 2004). O momento de maior alteração de neutropenia nesse tipo de tratamento (nadir) ocorre de 7 a 14 dias com recuperação em 21 dias após a quimioterapia (LANORE; DELPRAT, 2004; RODASKI; DE NARDI, 2004).

A trombocitopenia se manifesta de maneira menos agressiva que a neutropenia, e, na maior parte dos relatos, a contagem de plaquetas permanece em torno de 50×10^3 células/ μL (COUTO, 2006).

A quimioterapia pode levar a diminuição à níveis limítrofes do hematócrito, da hemoglobina e dos eritrócitos em cães, sem relatos de anemia (BADYLAK et al., 1985; SILVA et al., 2004). O mecanismo de alteração na morfologia dos eritrócitos parece estar relacionado com os ROS, com a peroxidação lipídica, as alterações no transporte de cálcio, no equilíbrio eletrolítico intracelular e na inibição da bomba de sódio-potássio, dependente de ATP (BADYLAK et al., 1985; O'KEEFE; SCHAEFFER, 1992). O doxorubicinol pode agir sobre o metabolismo energético dos eritrócitos como de NADPH e contribuir para a diminuição dos níveis de antioxidantes (MISITI et al., 2003).

Na administração de DOX observa-se neutropenia seguida de trombocitopenia. A anemia induzida por quimioterapia é incomum, porém pode ser observada 4 meses

após o término do tratamento (COUTO, 2006). A mielossupressão pode ser influenciada por fatores relacionados ao animal, tais como idade avançada, desnutrição, quimioterapia anterior, fatores relacionados ao tumor, infiltração de medula óssea e presença de metástase (CANCADO; CHITIATONE, 2002; COUTO, 2006).

A toxicidade hematológica em cães é observada de maneira semelhante em humanos, assim, os cães são utilizados como modelo de hematotoxicidade (REAGAN et al., 1993).

A nefrotoxicidade após a administração de DOX também tem sido relatada. Vários estudos apontam que a DOX interfere nos podócitos glomerulares, células do epitélio visceral dos rins e formam um importante componente da barreira de filtração glomerular. Porém, o efeito mais pronunciado é a proteinúria grave. A estrutura do néfron é alterada, facilitando a liberação de proteínas e ocorre a glomeruloesclerose focal, que pode evoluir para insuficiência renal. A glomeruloesclerose focal é uma doença glomerular caracterizada por marcada proteinúria (OKUDA et al., 1986; WANG et al., 2000; LEBRECHT et al., 2004).

Outros efeitos importantes observados, embora em menor escala de intensidade, são lesões glomerulares extensas, dilatação tubular, fibrose intersticial e inflamação (OKUDA et al., 1986). Esses sinais são observados com aumento nos níveis de creatinina e uréia plasmática e hipoalbuminemia (OKUDA et al., 1986; WANG et al., 2000; ROOK et al., 2005), dislipidemia (GRECO; BREYER, 1997), hipercoagulabilidade (DE BOER et al., 1999) e aumento do tamanho dos rins (OKUDA et al., 1986; WANG et al., 2000).

Os mecanismos pelos quais a DOX induz nefrotoxicidade ainda não estão muito bem elucidados, porém acredita-se que esteja relacionado com a formação de um complexo ferro-antraciclina, o qual produz radicais livres capazes de induzir lesões

oxidativas em componentes celulares (MIMNAUGH; TRUSH; GRAM, 1986; DEMAN et al., 2001).

No trabalho de Lebrecht et al. (2004), relatou-se que o dano nos néfrons é devido ao dano mitocondrial causado pela DOX a partir de formação de radicais livres. Okuda et al. (1986) confirmaram que a DOX produz ROS e aumenta a atividade da citrato sintase e triglicérides. A peroxidação lipídica e a diminuição dos níveis de antioxidantes podem ser também uma das causas da nefropatia após a quimioterapia com DOX (MANSOUR; EL-KASHEF; AL-SHABANAH, 1999). Em alguns casos o animal pode apresentar alteração na função renal e nos valores normais de creatinina, o que torna importante a realização de exames de função renal durante cada ciclo de quimioterapia (BURMEISTER et al., 2007).

A DOX tem sido utilizada para o tratamento de tumor venéreo transmissível (TVT) refratário aos antitumorais de primeira escolha (TINUCCI-COSTA, 2009). O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) ou linfossarcoma de Sticker - uma neoplasia contagiosa transmitida pelo coito - frequentemente acomete os cães, de ambos os sexos, geralmente errantes (COHEN, 1985; SOUSA et al., 2000; AMARAL et al., 2004; FLORENTINO et al., 2006; TINUCCI-COSTA, 2009). Esse tumor possui baixo potencial metastático, porém, em animais imunocomprometidos, pode evoluir para metástase (DAS; DAS, 2000; PETERSON; COUTO, 2003; AMARAL et al., 2004; TINUCCI-COSTA, 2009). Acomete predominantemente a região genital (vaginal ou peniana) e, em alguns casos, pode desenvolver-se na região nasal, pele, baço, rins, linfonodos, fígado, pulmões, tonsila e globo ocular (COHEN, 1985; DAS; DAS, 2000; AMARAL et al., 2004).

O diagnóstico do TVT consiste da análise epidemiológica, clínica e citológica. A presença de secreção sanguinolenta vaginal ou peniana com hematúria, em geral, são

sinais precoces da doença. A confirmação diagnóstica é feita por meio exame citológico de material de biópsia (DAS; DAS, 2000; SOUSA et al., 2000).

O tratamento pode ser feito por excisão cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e/ou quimioterapia, sendo esta última a mais frequentemente utilizada (DAS; DAS, 2000). Em geral, a expectativa de cura é alta – cerca de 90% dos casos – no entanto o sucesso terapêutico é dependente do estágio em que se encontra a neoplasia quando se inicia o tratamento (FLORENTINO et al., 2006).

Os antineoplásicos mais utilizados para o tratamento de tumores sólidos e leucemias são sulfato de vincristina, a doxorubicina (DOX), e a ciclofosfamida, com ou sem associação ao metotrexato. Segundo Tinucci Costa (2009) os veterinários oncologistas sugerem que a terapia mais eficaz para o TVT é a quimioterapia citotóxica com sulfato de vincristina na dose de 0,5 mg/m² a cada sete dias, sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento. Cerca de 90% dos cães respondem a esta quimioterapia, mas uma porcentagem destes é resistente a este tratamento. Utiliza-se a DOX na dose de 30 mg/m² por via venosa, a cada 21 dias, principal alternativa para o tratamento de TVT resistentes ao sulfato de vincristina (GERARDI, 2009).

A posologia da DOX proposta para este tratamento, 30 mg/m² com intervalo de 21 dias (GERARDI, 2009) tem sido aplicada sem o conhecimento do perfil farmacocinético e da toxicidade da DOX nestes animais.

II. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o perfil farmacocinético após administração do quimioterápico DOX na forma cloridrato e avaliar toxicidade sistêmica por meio de hemograma, provas bioquímicas e urinálise em cães com TVT.

Específicos:

- Validar o método bioanalítico por CLUE para a determinação de DOX em plasma;
- Avaliar o perfil farmacocinético da DOX administrada na forma farmacêutica comercial (Cloridrato de Doxorrubicina, Eurofarma, Brasil), por via intravenosa em dose única (30 mg/m^2), na 1^a e 4^a sessão, com intervalos de vinte e um dias, em cães com TVT;
- Avaliar cardiotoxicidade da DOX nos animais, através dos parâmetros bioquímicos CK-MB e troponina I.
- Avaliar parâmetros hematológicos, de urinálise (exame físico, químico, sedimentoscopia), relação proteína creatinina urinária e os parâmetros bioquímicos: fosfatase alcalina, ureia, creatinina, bilirrubina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), triglicérides, albumina, proteínas totais e colesterol antes e após cada sessão de quimioterapia.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias primas, reagentes e solventes

- Acetonitrila J.T. Baker, HPLC; USA;
- Ácido fosfórico, Synth, Brasil;
- Ácido perclórico, Merck, Brasil;
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- Cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma, Brasil (50 mg de Cloridrato de doxorrubicina, 200 mg de manitol e 250 mg de lactose);
- Daunorrubicina, Pfizer, Brasil;
- EDTA, Vetec, Brasil;
- Kits labtest: (ALT ref 108); (AST ref 109); (creatinina ref 35); (uréia ref 104); (fosfatase alcalina ref 79); (proteínas totais ref 99); (albumina ref 19); (triglicérides ref 87); (colesterol ref 76); (CK-MB ref 118), (bilirrubina total ref 31) e (bilirrubina direta ref 93), Sensiprot (ref 36);
- Metanol J. T. Baker, HPLC, USA;
- Mini Vidas Biomériux (kit cTnI), USA;
- Reagente ABX Vetpack, France;
- Tris HCl, In Lab, Brasil.

3.1 Animais

Foram incluídos no estudo 10 cães sem raça definida (SRD) com peso variando entre 5-25 Kg, fêmeas, diagnosticados com TVT (Figura 2) (Tabela 1), com confirmação citológica, sem metástases clinicamente detectáveis ou quimioterapia prévia. Estes animais foram alojados ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Hospital Veterinário da FCAV – Jaboticabal- SP, UNESP, onde receberam

ração e água “ad libitum e foram mantidos em canis individuais. O proprietário ou responsável de cada animal foi devidamente informado sobre o projeto de pesquisa - conforme o termo de consentimento livre (Anexo 1) – autorizando sua inclusão formalmente. Os animais somente foram incluídos no estudo após o consentimento (por escrito) de seu proprietário/ responsável.

Para a inclusão dos animais no estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: hemograma completo, ALT, creatinina e avaliação da função cardíaca por ecodopplercardiografia. Foram critérios de exclusão, além de alterações nos parâmetros acima investigados, a presença de outros tumores além do TVT, quimioterapia prévia e doenças infecciosas.

O protocolo experimental deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), órgão assessor da Congregação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, e registrado sob o número 025175/12 (Anexo 2).

Figura 2: Animal com massa exuberante ulcerada, com secreção hemorrágica na região da ulva, transmissível antes da quimioterapia.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 1: Dados dos animais grupo DOX-Cl com TVT incluídos no trabalho

Animal	Peso (Kg)	Idade estimada (anos)	Gênero
A1G1	10,5	6	fêmea
A2G1	15,2	3	fêmea
A3G1	20	3	fêmea
A4G1	10,8	5	fêmea
A5G1	4,5	2	fêmea
A6G1	6,8	9	fêmea
A7G1	7	4	fêmea
A8G1	8,2	8	fêmea
A9G1	16	2	fêmea
A10G1	25,5	6	fêmea

A- animal ; G - grupo

3.2. Protocolo Experimental

A solução de fármaco- DOX comercial (Cloridrato de doxorubicina, Eurofarma, Brasil) foi preparada em soro fisiológico, na concentração 2mg/mL e administrada por infusão contínua durante 30 minutos, dose única (30 mg/m^2), em 04 ciclos, com intervalo de 21 dias para cada administração.

O protocolo experimental proposto neste estudo incluiu 10 animais tratados com doxorubicina cloridrato ($n=10$, 30 mg/m^2)

Os animais receberam a formulação comercial de DOX por infusão contínua lenta durante 30 minutos, taxa de infusão de $1 \text{ mg/m}^2/\text{min}$, em 04 ciclos, com intervalo de 21 dias. Foram realizadas coletas de sangue nos tempos: 15 e 30 minutos durante a infusão e 15, 30, 45, 90, 180, 360, 720 e 1400 minutos após o final da infusão (1ª e 4ª

sessão). Anteriormente a cada ciclo de quimioterapia, foram obtidos os valores basais dos exames bioquímicos relacionados à função renal, função hepática e marcadores cardíacos, além do hemograma completo e urinálise. Todos os exames foram novamente realizados a cada ciclo. Foram coletados 5,0 mL de sangue a cada tempo, com anticoagulante (EDTA), para o estudo de farmacocinética e 5,0 mL de sangue sem anticoagulante para a realização do hemograma.

Vinte minutos antes da administração do quimioterápico, foi administrado o anti-histaminico difenidramina (1mg/kg) com o objetivo de prevenir reação anafilática decorrente da grande sensibilidade causada pela DOX (DALECK et al., 2009).

Todos os exames de hemograma, bioquímicos e urinálise foram feitos no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária- Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Hospital Veterinário da FCAV – Jaboticabal- SP, UNESP.

3.3. Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

3.3.1. Determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CK-MB) e troponina cardíaca I.

A CK-MB e as troponinas cardíacas apresentam especificidade para o tecido do miocárdio e auxiliam na investigação de danos cardíacos.

A determinação da atividade sérica de CK-MB foi realizada através de método cinético pela reação otimizada por Szasz et al. (1976).

A isoenzima creatina quinase-MB foi determinada através do Kit Labtest® (ref:118-2/30) - método cinético UV.

A dosagem da Troponina I (cTnI) foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Unidade de Emergência do Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto vinculado a Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (FMRP/USP)

Para determinação da troponina I cardíaca, utilizou-se aparelho Mini Vidas Biomérieux, com limite inferior para dosagem de 0,01µg/L. Utilizou-se 200 µL de soro de cães para determinação da Troponina I.

3.3.2. Hemograma

Para a realização do hemograma utilizou-se 3,0 mL de sangue com EDTA, após punção da veia jugular, com auxílio de vacutainer. A coleta de sangue para o hemograma foi realizada nos tempos M0, M1, M2, M3 e M4, mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Tempos de coleta do material sanguíneo para os exames laboratoriais

M ₀ (basal)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Antes da 1ª sessão	Antes da 2ª sessão	Antes da 3ª sessão	Antes da 4ª sessão	21 dias após 4ª sessão

A contagem do número total de hemácias, taxa de hemoglobina, hematócrito e contagem total de leucócitos foram realizados por contador automático de células ABX. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por esfregaço sanguíneo, corado com Rosenfeld modificado.

3.3.3. Bioquímica sérica

Os exames bioquímicos realizados para avaliar as condições dos animais foram: ALT, AST, creatinina, ureia, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, triglicérides, colesterol, CK-MB, bilirrubina total e bilirrubina direta.

Para estas análises foram colhidos sangue (3,0 mL) em vacutainer sem anticoagulante. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm, durante 5 minutos para a obtenção do soro e analisadas utilizando Kit LabTest® através do equipamento Labquest- LabTest®. A coleta de sangue para a avaliação bioquímica foi realizada nos mesmos tempos da avaliação do hemograma, demonstrado na Tabela 2.

3.4. Urinálise

A coleta da urina foi realizada por cistocentese ou micção espontânea. Utilizou-se a primeira urina da manhã, descartando o primeiro jato, após a higiene do local. Foram coletados 5-10 mL de urina de cada animal, acondicionada em frasco limpo.

O exame de urina foi dividido em análise de aspecto físico: volume, cor, odor, aspecto e densidade urinária, mensurada com a utilização de refratômetro digital; exame químico realizado com auxílio de tira reagente para verificar: pH, sangue oculto, glicose e corpos cetônicos, proteína, bilirrubina, urobilinogênio e sedimentoscopia.

A avaliação do sedimento foi feita após a centrifugação da amostra por 5 minutos, desprezando o sobrenadante e adicionando-se uma gota (20 µL) do sedimento sobre uma lâmina, cobrindo em seguida com uma lamínula e analisando ao microscópio óptico, para a pesquisa de células, cilindros e outros achados.

3.5. Avaliação da proteína urinária

Para a determinação da proteína urinária (UPC) utilizou Kit Sensiprot (Kit Labtest®). O sobrenadante da urina foi recolhido após a centrifugação por 5 minutos a 2.500 rpm.

A perda de proteína na urina pode ser determinada pelo cálculo da razão proteína/creatinina urinária (UPC). Para determinação da UPC utilizou-se a formula:

$$\text{UPC} = \frac{\text{proteína urinária}}{\text{creatinina urinária}}$$

A coleta de urina foi realizada nos mesmos tempos da avaliação do hemograma, mostrado na Tabela 2.

3.6. Determinação de Doxorrubicina por cromatografia líquida de ultra eficiência-CLUE

3.6.1. Sistema cromatográfico

A determinação de DOX foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência - CLUE. A separação dos compostos foi realizada em coluna C18 CSH Waters[®] (2.1 x100 mm, 1.7 µm) à temperatura ambiente e fase móvel composta por 40% de acetonitrila e 60% de água na presença de ácido fórmico (0,1%), com fluxo de 0,4 mL/min, em modo isocrático, e padrão interno Daunorrubicina 100 µg/mL em metanol (DAU- Pfizer, Brasil), com detector de fluorescência operando em comprimento de onda de excitação de 480 nm e 560 nm de emissão. Os cromatogramas foram processados através do software Empower[®].

3.6.2. Processamento das amostras de plasma

A 400 µL de plasma foram adicionados 50 µL da solução de DAU, 50 µL de tampão Tris-HCL e 1,0 mL de acetato de etila agitando-se em vortex por 15 segundos.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 15 minutos a 20°C. Retirou-se 800 µL do sobrenadante evaporando-se a 40 °C no evaporador concentrador-Mivac até a secura. Em seguida as amostras foram ressuspensas com 50 µL de fase móvel e 5 µL de ácido perclórico a 35%. Cinquenta microlitros do ressuspendido foram filtrados com auxílio de membranas de polipropileno (0,22µm) e 5 µL foram introduzidos no sistema cromatográfico.

3.6.3. Validação do método bioanalítico

O processo de validação do método bioanalítico envolveu os procedimentos necessários para a determinação dos seus limites de confiança, segundo as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RDC nº 899, de 29 de maio de 2003 e RDC 27, de maio de 2012). Os parâmetros de validação determinados foram: linearidade, limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão intra e inter ensaios, recuperação, estabilidade, efeito residual e controle de qualidade de diluição (CQD).

Estudos de Linearidade - Curva analítica em plasma

A avaliação da linearidade foi realizada através da análise de amostras de plasma adicionadas de diferentes concentrações no intervalo de 19 a 1250 ng/mL, utilizando-se um “pool” de plasma branco. O método foi considerado linear até a maior concentração analisada com coeficiente de variação menor que 15% e o critério de aceitação para linearidade foi o coeficiente de correlação superior a 0,99. As amostras foram analisadas em triplicata.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ foi considerado como a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Deve ser no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco. O critério de aceitação utilizado foi o coeficiente de variação de 20 % para a precisão e exatidão de 80-120%. Este parâmetro foi estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando-se 5 replicatas.

Limite de Detecção (LD)

O LD é definido como a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo e estabelecido por meio da análise de amostras adicionadas do analito em concentrações conhecidas e decrescentes, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base ou ruído de fundo quando se analisa o branco de amostra.

Precisão intraensaio (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade)

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação da análise de replicatas de amostras de plasma, em 3 níveis de concentração e avaliou-se a precisão do LIQ 19 ng/mL ; 39 ng/ mL; 156 ng/mL e 1000 ng/mL de DOX, em três replicatas, durante 2 dias consecutivos (interensaios) e em 5 replicatas em um mesmo ensaio (intraensaio) e o critério de aceitação foi coeficiente de variação menor que 15%.

Exatidão

A exatidão (% de erro sistemático) foi obtida pela concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores teóricos do fármaco na amostra. Foram analisadas amostras de plasma adicionadas de DOX nas concentrações de LIQ 19 ng/mL; 39 ng/mL; 156 ng/mL e 1000 ng/mL durante 2 dias consecutivos (interensaios) e em 5 replicatas em um mesmo ensaio (intraensaio) e critério de aceitação de 85-155%.

Recuperação

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não-extraídas, que representam 100% de recuperação. Foram utilizadas as concentrações de 39; 156 e 1250 ng/mL para o estudo de recuperação, em triplicata.

Estabilidade

O estudo de estabilidade consiste em avaliar se o analito sofre alterações em um período específico de armazenamento pré e pós-processamento (CHANG, 2002).

Neste estudo foi realizado apenas o estudo de Estabilidade Pós-Processamento, os demais estudos de estabilidade preconizado RDC- 899/2009 foram descrito no artigo de ASSUMPÇÃO et al. (2012).

Alíquotas de plasma foram preparadas nas concentrações de 39 e 1000 ng/mL, em triplicata.

- Para estudo de estabilidade pós-processamento a análise das amostras foram processadas e mantidas sob condições de análise para o estudo. O período de análise de ser superior ao tempo de preparo da amostra e o final da corrida mais longa.

As amostras foram processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo.

Efeito residual

Para realização do estudo de efeito residual devem ser realizadas, no mínimo 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas da concentração de 1250 ng/mL. Para análise dos resultados foram comparadas com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ.

Caso haja picos interferentes no tempo de retenção do analito, devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ.

Controle de qualidade de diluição (CQD)

As amostras de controle de qualidade de diluição (amostra de CQD) foram adicionadas a matriz do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (10.000 ng/mL), e os resultados devem ser analisados por proporção de diluição pré-definidos e especificados pelo laboratório bioanalítico.

3.7. Análise Farmacocinética

A disposição cinética da DOX foi avaliada após a administração por infusão contínua por 30 minutos na dose de 30mg/m².

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática versus tempo.

A constante de eliminação (Kel) foi calculada através da equação $k_{el} = \ln 2 / t_{1/2}$ e a meia vida de eliminação foi determinada pelo método gráfico considerando a curva de

concentração plasmática após o fim da infusão. Para o cálculo de volume aparente de distribuição (Vd) foi utilizada a equação a seguir:

$$Vd = \frac{Q \times (1 - e^{-kel.t})}{Cp \times kel}$$

em que: Vd é o volume de distribuição, Q é a taxa de infusão, kel é a constante de eliminação, Cp é a concentração plasmática encontrada em determinado tempo (t).

Para o cálculo de clearance total foi utilizada a equação $Cl = Vd \times Kel$.

3.8. Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram apresentados através das medianas, médias e IC 95. Para avaliação das diferenças de bioquímica sérica, hemograma, urinálise, após a administração da formulação de DOX-Cl foi aplicado teste de Wilcoxon, utilizando-se o software GraphPad InStat® (GADDIS et al., 1990).

Os cálculos das curvas analíticas e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin®.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de parâmetros bioquímicos

4.1.1. Atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CK-MB) e troponina I (cTnI)

Os resultados obtidos na avaliação da atividade de cTnI e CK-MB nos animais estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação dos biomarcadores cardíacos cTnI e CK-MB em cães tratados com doxorubicina (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

Momentos	CK-MB (U/L)	Troponina I (cTnI) (µg/L)
M0	63	0,01
	65,30	0,01
	(48,37 - 82,23)	(0,01 - 0,02)
M1	72,5	0,01
	99,1	0,02
	(43,09 - 155,10)	(0,01 - 0,02)
M2	52,50	0,01
	60	0,05
	(20,06 - 99,94)	(-0,03 - 0,13)
M3	35	0,01
	88,5	0,02
	(19,57 - 157,43)	(0,001 - 0,03)
^{1,2} Referência	11-38	0-0,07

¹Referência CK-MB – Sctokman e Scotti (2008)

²Referência cTnI – Neuwald (2009)

Os animais desse estudo não apresentaram alterações nos valores de cTnI após a quimioterapia com DOX-Cl, conforme observado Tabela 3. Os valores de média de cTnI foram iguais que 0,01 ug/L, e não houve diferença estatística entre os momentos ($p > 0,05$). Porém, devido à meia vida curta de 2-6 horas e excreção renal (RAMOS; MAGALHÃES, 2000) e a dificuldade de determinar o momento ideal de amostragem após a quimioterapia com DOX, o diagnóstico de lesão cardíaca pode ser dificultado, como relatado por Lipshultz et al. (1997).

Em trabalho realizado por Neuwald (2009) determinou-se cTnI em cães tratados com DOX, com dose acumulativa de 150 mg/m^2 , e a concentração média foi de 0,13 mg/ mL. Observou-se degeneração dos cardiomiócitos e necrose, sem sinais clínicos da doença. A liberação de cTnI na circulação parece estar envolvida com áreas de necrose, com o rompimento das proteínas contráteis intracelulares por isquemia (VAN EYK et al., 1998; HESSEL et al., 2008).

Os valores médios de CK-MB não evidenciaram aumento progressivo no valor deste parâmetro após a quimioterapia com DOX-Cl ($p > 0,05$) (Tabela 3). Os valores de CK-MB podem ser alterados pelo sexo, lesão muscular, idade, atividade física e tamanho da área cardíaca infartada. Segundo Sctokham e Scotti (2008), o valor de referência para CK-MB em cães é 11-38 U/L. Os animais estudados apresentaram valores superiores à essa faixa anteriormente à exposição porém não houve alteração significativa após a exposição à DOX, sugerindo que não ocorreu alteração cardíaca detectável por este parâmetro.

Henderson et al. (1982) relataram aumento de CK-MB em cães após administração de DOX, com dose cumulativa de 240 mg/m^2 .

Os biomarcadores cardíacos utilizados para o diagnóstico de dano cardíaco em medicina veterinária estão relacionados com as condições clínicas. (THARWAT; AL-SOBAYIL; AL-SOBAYIL, 2013).

Embora os valores de referência para os biomarcadores sejam significativamente menores daqueles apresentados pelos animais no M0, os valores obtidos após todas as sessões de quimioterapia não apresentaram diferença significativa. Assim, concluímos que os animais submetidos à quimioterapia com DOX, que receberam dose cumulativa de 120 mg/m^2 , não apresentaram alterações cardíacas indicadas pelos biomarcadores CK-MB e cTnI.

4.1.2. Determinação de creatinina, uréia, proteínas totais, ALT,AST,ALP,albumina, triglicérides, colesterol, bilirrubina total e indireta

Tabelas 4 e 5 estão expressos os parâmetros bioquímicos de creatinina, ureia, e proteína totais analisados dos cães do grupo DOX-Cl nos momentos avaliados. Dados expressos como mediana, média (IC95).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos de função renal dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

	Creatinina sérica	Ureia sérica	PT
M0	0,8	28	7,3
	0,81	30,2	7,2
	(0,67 - 0,95)	(23,20 - 37,20)	(6,05- 8,35)
M1	1	32,5	7,5
	0,94	32,9	7,91
	(0,77- 1,11)	(27,56 - 38,24)	(6,88 - 8,94)
M2	1,04	33,5	8,1
	1	36,5	7,43
	(0,94 - 1,14)	(28,32 - 44,69)	(6,06 - 8,80)
M3	1	30	7,8
	0,97	29	7,51
	(0,86 - 1,08)	(21,39 - 36,61)	(6,84 - 8,18)
M4	1	29	7,2
	0,94	31,22	7,33
	(0,80 - 1,09)	(25,03 - 37,42)	(6,92 - 7,75)
¹ Referência	0,5 - 1,5 (mg/dL)	15 - 65 (mg/dL)	5,8 - 7,9 (g/dL)

PT- proteínas totais

¹Valores de referência de acordo com o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária-Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Unesp Jaboticabal.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos da função hepática dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

	ALT	AST	ALP	Albumina	Trig	Colesterol	BT	BI
M0	20	26	62	2,36	62	187	0,11	0,06
	26	26,2	62	2,33	64,4	201,2	0,12	0,05
	(16,52 - 35,49)	(17,60 - 34,80)	(45,28 - 78,73)	(2,04 - 2,62)	(53,00 - 75,79)	(165,06 - 237,34)	(0,10 - 0,15)	(0,03 - 0,07)
M1	28,5	23	49	2,8	64	222,5	0,13	0,05
	43,5	23,5	52,7	2,88	66,1	216,8	0,13	0,06
	(15,52 - 71,48)	(18,10 - 28,90)	(39,25 - 66,15)	(2,46 - 3,30)	(56,22 - 75,99)	(186,66 - 246,94)	(0,11 - 0,15)	(0,04 - 0,08)
M2	41	36	55,5	2,98	65,5	196,5	0,14	0,05
	48,1	38,2	52,5	2,90	66,1	204,4	0,17	0,06
	(33,09 - 63,12)	(27,31 - 49,09)	(38,05 - 66,35)	(2,56 - 3,23)	(57,08 - 75,12)	(156,74 - 252,06)	(0,11 - 0,22)	(0,03 - 0,08)
M3	31	25,5	51	2,97	72	190	0,14	0,05
	38,33	26,2	54,6	3,07*	82,3	244,8	0,18	0,07
	(25,99- 50,67)	(18,07 - 34,33)	(43,45 - 65,75)	(2,69 - 3,46)	(38,54 - 126,06)	(111,33 - 378,27)	(0,11 - 0,24)	(0,04 - 0,10)
M4	36	24	50	3,07				
	50,11 *	23,22	50,55	3,02*				
	(27,57 - 72,65)	(17,33 - 29,11)	(38,35 - 62,76)	(2,71 - 3,33)	-	-	-	-
¹ Referência	10 - 88 (U/L)	10 - 88 (U/L)	20 - 150 (U/L)	2,6 - 4,0 (g/dL)	27 - 115 (mg/dL)	125- 270 (mg/dL)	0,1 - 0,5 (g/dL)	0,06 - 0,1 (g/dL)

Tig- Triglicérides ALP- fosfatase alcalina BT- bilirrubina total BI- bilirrubina indireta

*Diferença estatística significativa em relação a M0, p < 0,05

¹Valores de referência de acordo com o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária-Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Unesp Jaboticabal.

Nas Tabelas 4 e 5 pode ser observado que os animais submetidos à quimioterapia com DOX-Cl apresentaram alterações em alguns parâmetros bioquímicos na dose 30 mg/m² (dose cumulativa 120 mg/m²), durante 63 dias, porém os valores ainda se encontram dentro da faixa de referência para a espécie.

Alterações nos níveis de creatinina e uréia podem ocorrer quando há comprometimento do tecido renal em 70%. Desta forma os resultados inalterados de creatinina e ureia sérica reafirmam a ausência de lesão renal (JULICHER et al., 1988). Esses resultados concordam com o estudo realizado por Nakage e Santana (2008) em cães, após administração de DOX na dose 30 mg/m², com intervalo de 21 dias, no qual não foi observada elevação nos níveis de creatinina sérica e uréia.

Pode-se verificar alterações com diferença estatística entre os momentos M4 em relação a M0 ($p < 0,05$) na enzima ALT. No entanto, os valores encontrados no estudo estão dentro da normalidade, sem significado clínico.

A ausência de alterações enzimáticas hepáticas pode ser explicada pela ausência de lesão extensa no parênquima hepático. Quando o órgão é lesado em 80% ocorre comprometido na função hepática. Além disso, os hepatócitos constituem células de grande potencial para regeneração (COLES, 1986).

Silva e colaboradores (2004) observaram aumento dos níveis séricos AST após administração de DOX em cães na dose 30 mg/m², com intervalo de 21 dias, durante 147 dias, atingindo dose cumulativa de 240 mg/m². O aumento dos níveis dessa enzima foi indicativo de injúria miocárdica, o que não ocorreu no presente estudo.

A albumina apresentou-se aumentada depois do terceiro ciclo de quimioterapia, permanecendo em M4, porém novamente esses valores estão dentro da normalidade (2,6 - 4,0 g/dL).

A DOX pode causar diminuição dos níveis de albumina. Essa alteração foi relatada no trabalho de Neuwald (2009), após administração de DOX na dose 30 mg/m², com intervalo de 21 dias. A hipoalbuminemia pode estar relacionada com perda renal ou intestinal, ou ainda, falha na síntese de albumina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Os exames bioquímicos sugerem que os animais submetidos quimioterapia com DOX cloridrato não apresentaram alterações de função renal e hepática na dose cumulativa de 120 mg/m² utilizada.

4.2. Hemograma

Na Tabela 6 estão demonstrados os parâmetros hematológicos dos cães do grupo DOX-Cl, antes e após as sessões de quimioterapia.

Tabela 6: Parâmetros hematológicos de eritrograma e plaquetas dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

Momentos	Hematócrito (%)	Hemácia ($\times 10^6 \text{ mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas ($\times 10^3 \text{ uL}$)
M0	41,65	6295	13,85	197,5
	41,39	5710,49	13,85	229,7
	(34,53 - 48,25)	(3930,5 - 7490,5)	(12,03 - 15,67)	(159,02- 300,38)
M1	43,75	6535	15,1	252
	43,36	61049,43	14,73	261,3
	(38,02- 48,70)	(4399,8 - 7819,1)	(13,07 - 16,40)	(203,47 - 319,13)
M2	38,3	6280	14,2	186,5
	37,64	5632,45	13,73	226,9
	(31,55 - 43,73)	(3902,6 - 7362,3)	(12,26 - 15,20)	(155,80- 289,00)
M3	45,9	7065	15,15	267,5
	45,43	6412,54	15,2	306
	(41,30 - 49,57)	(4765,5 - 8059,5)	(13,68 - 16,72)	(215,16 - 396,84)
M4	41,3	6610	15,11	307
	42,22	6471,11	14,66	275,22
	(38,89 - 45,46)	(5965,3 - 6976,9)	(13,214 - 16,09)	(219,30 - 331,14)
¹ Referência	37,0 - 55,0	5,5 - 8,5	12, - 18,0	180 – 400

¹Valores de referência de acordo com o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária-Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Unesp Jaboticabal.

Na Tabela 7 estão demonstrados os parâmetros leucocitários dos cães do grupo DOX-Cl, antes e após as sessões de quimioterapia.

Tabela 7: Valores médios dos parâmetros do leucograma dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

Momentos	Leucócitos	Neutrófilos (Segmentado)		Linfócitos (%)	Monócitos (%)
	(células/ μ L)	Eosinófilos (%)	(%)		
M0	7350	4	79	10	4
	7620,53	5	80,6	10	4,5
	(2999,6 - 12241)	(2,84 - 7,16)	(76,97 - 84,24)	(6,59- 13,41)	(1,88 - 7,12)
M1	6050	8	69,5	15	5,5
	7323,66	10,8	67,6*	15,8	5,8
	(2767,2 - 11880)	(4,20 - 17,40)	(57,21 - 77,99)	(7,38 - 24,22)	(2,99 - 8,62)
M2	4850	6,5	70	11	5
	5140,37	8,3	70,2	14,7	5,6
	(3061,1 - 7219,6)	(4,06 - 12,54)	(63,07 - 77,33)	(7,63 - 21,77)	(3,57 - 7,63)
M3	7300	10	70,5	14,5	2
	7720,64	10,8	68,5	16,6	3,1
	(4727,2 - 10714)	(6,02 - 15,58)	(60,71 - 76,29)	(8,56 - 24,64)	(1,61 - 4,59)
M4	66000				
	7211,11				
	(5232,1 - 9190,1)	-	-	-	-
¹ Referência	6000-18000	2,0 - 10,0	60,0 - 77,0	13,0 - 30,0	3,0 - 10,0

*Diferença estatística significativa em relação a M0, $p < 0,05$

¹Valores de referência de acordo com o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária-Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Unesp Jaboticabal.

Nas Tabelas 6 e 7 pode-se observar que os animais submetidos à quimioterapia com DOX-Cl não apresentaram alterações no hemograma, na dose 30 mg/m². No leucograma foram observadas diferenças estatísticas significativas nos neutrófilos segmentados entre M1 e M0, porém encontram-se ainda nos valores de referência. A neutropenia é o efeito que pode limitar o tratamento, com evolução de sepse com risco para cães (COUTO, 2006)

Silva et al. (2004), observaram leucopenia e neutropenia transitória após administração DOX na dose de 30 mg/m², com intervalo de 21 dias, com dose cumulativa 240 mg/m². A diminuição dos níveis de leucócitos e neutrófilos aconteceu a 17^a, 20^a e 23^a semanas, houve recuperação dos níveis anteriormente ao próximo ciclo de quimioterapia. Silva et al. (2004) relataram diminuição significativa do número de hemácias.

A toxicidade hematológica decorrente da quimioterapia com DOX é um importante efeito, observado através de leucopenia, neutropenia, anemia e trombocitopenia em vários graus. A leucopenia ocorre principalmente no nadir, com recuperação durante 21 dias (SUSANECK, 1983; CHABNER; CALABRESI, 2001). A toxicidade hematológica em cães é semelhante em humanos e os cães são usados como modelo de hematotoxicidade no desenvolvimento de fármacos (REAGAN et al., 1993).

Após administração de DOX pode ocorrer diminuição do hematócrito, hemoglobina e eritrócitos em cães, sem caracterização de anemia, ou seja, em níveis limítrofes. O mecanismo de toxicidade aos eritrócitos não está bem esclarecido, acredita-se que esteja relacionado à produção de ROS com resultante peroxidação lipídica, inibição da bomba de sódio e potássio dependente de ATP (BADYLAK et al., 1985; O'KEEFE; SCHAEFFER, 1992). Ainda, o doxorubicinol pode alterar o

metabolismo energético dos eritrócitos, através da produção de NADPH. A diminuição dos antioxidantes pode contribuir para o acúmulo de ROS (MISITI et al., 2003).

A trombocitopenia também pode ser encontrada durante a exposição à DOX, embora com efeitos de menor intensidade quando comparada aos outros elementos sanguíneos (COUTO, 2006). Neste estudo, não foram encontradas alterações nos valores de plaquetas após a quimioterapia.

Caso haja supressão significativa dos elementos sanguíneos durante o tratamento com DOX, é indicada a suspensão temporária ou permanente do tratamento (COUTO, 2006). Ahaus; Couto e Valerius. (2000) afirmaram que a toxicidade hematológica não é um efeito adverso impeditivo para uso em cães, uma vez que a incidência é inferior a 30% (LANORE; DELPRAT 2004). A anemia induzida pela DOX é incomum e pode ocorrer em 3 a 4 meses após o tratamento. Em alguns casos não se observa alterações na contagem de plaquetas (COUTO, 2006).

Assim, pode-se concluir que a quimioterapia com DOX-Cl na dose cumulativa de 120 mg/m², causou alterações na produção de algumas células da linhagem branca. Porém os níveis encontrados ainda estiveram dentro dos valores de referência e, portanto, não representaram neutropenia significativa.

4.3. Urinálise

A urinálise é um exame comum, que pode ser denominado também como exame químico da urina, e em geral solicitado com hemograma e parâmetros bioquímicos. A urinálise permite investigar o trato urinário superior e inferior (GONZÁLEZ; SILVA, 2008).

A cor da urina está relacionada com a concentração de urocromo e depende do estado do animal, podendo variar entre amarelo, amarelo claro a incolor, amarelo ouro a

âmbar, amarelo avermelhado a vermelho. A cor da urina não deve ser utilizada como parâmetro determinante de gravidade específica (NAVARRO-GARCIA, 1996).

Todos os animais deste estudo apresentaram aspecto urinário de límpido à semi-turvo. Alterações no aspecto urinário não representam sinais de alteração patológica, e podem ser devido à presença de partículas suspensas na urina, tais como células epiteliais, hemácias e leucócitos, cristais, bactérias, muco, sêmen, provenientes de órgãos urinários ou genitais contaminação fecal (ROSA et al., 2008).

A densidade urinária encontrada nos cães deste trabalho, após administração de DOX, foi 1,03-1,05, considerada normal, valor de referência (1,018 – 1,045) de acordo com Hendrix (2006).

A densidade específica da urina mede a quantidade de soluto presente na urina e de forma indireta, a capacidade renal de concentração da urina. Em urinas hipertônicas ou muito concentradas a densidade se encontra alta, oligúria, e no caso de urina diluída ou hipotônica, pode ser devido à poliúria. O aumento da densidade indica diminuição da filtração glomerular, e ou/aumento de reabsorção de água, os quais podem levar a oligúria (NAVARRO-GARCIA, 1996). Valores de densidade podem ser influenciados por alterações fisiológicas, em geral transitórias, ou patológicas (KERR, 2003).

O exame químico da urina compreende a determinação do pH e a pesquisa de corpos cetônicos, proteínas, cetonas, bilirrubina, urobilinogênio, sangue oculto, hemácias, hemoglobina, nitritos. Essas substâncias são normalmente ausentes ou estão presentes em pequenas quantidades. Esse exame de rotina é considerado qualitativo e semi-quantitativo (NAVARRO-GARCIA, 1996).

O pH está relacionado com a função renal de eliminação de álcalis e ácidos não voláteis, que ajuda a manter o equilíbrio ácido/base. Os animais submetidos à quimioterapia com DOX apresentaram pH de 6,0 a 7,0. O pH pode ser influenciado

pela dieta e pelo metabolismo dos animais. Em animais que se alimentam com dieta rica em carnes e cereais a urina pode ser ácida. Dietas ricas em carboidratos, como nos herbívoros, resultam em aumento no valor do pH urinário (NAVARRO-GARCIA, 1996).

Os animais do estudo (100 %) apresentaram resultado negativo para glicose e urobilinogênio. Os animais normais não apresentam glicosúria (DIBARTOLA, 2000). Quando presente, a glicose pode ser relacionada com hiperglicemia ou lesão de túbulo proximal renal. A urina normal é livre de corpos cetônicos, e também não foi relatada a presença destes elementos no exame químico dos animais estudados (HENDRIX, 2006). Na tabela 8 está relatada a frequência de alterações laboratoriais nos animais tratados com DOX-Cl com relação à urinálise (n=10).

Observou-se proteinúria em 9 dos 10 animais avaliados (90 - 100%), porém o exame UPC (razão proteína/creatinina urinária) descartou a possibilidade de lesão renal (Tabela 9). As proteínas encontradas podem ser principalmente albumina.

Observou-se a presença de nitrito na urina apenas em um animal avaliado, porém não houve nenhum outro indicativo de infecção de vias urinárias.

A sedimentoscopia da urina foi realizada a fim verificar células presentes na urina tais como, vaginais, uretrais, pelve renal, vesicais, epitélio renal, hemácias, leucócitos, além de cristais, cilindros (hialinos, eritrocitários, leucocitários, epiteliais, granuloso), bactérias e fungos.

Tabela 8: Frequência de alterações laboratoriais nos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como número de animais e intensidade.

Alterações laboratoriais	Nº animais	Intensidade
Proteinúria ($\geq +$)	9	2 +
Sangue oculto ($\geq +$)	6	1 +
Hemácias ($\geq +$)	9	1+
Leucócitos ($\geq +$)	4	1+
Bactérias ($\geq +$)	2	raros
Cilindros granulosos	0	raros
Cristais ($\geq +$)	2	1+

Todos os animais 10 animais (100%) apresentaram células transicionais raras, as quais são células do epitélio da bexiga que representam uma descamação normal. As células as epiteliais podem ser encontradas no sedimento urinário, porém representam pouco significado clínico (DIBARTOLA, 1997).

Os resultados de leucócitos na urina variaram entre raros à 1 por campo, em 4 animais avaliados (40%). A presença de leucócitos da urina pode ser indicativa de lesão inflamatória ao longo do trato urinário (OSBORNE et al.1995).

Foi observado em 2 animais a presença de cristais de raro à 1 por campo, sem significado clínico.

Os cilindros hialinos são produtos de mucoproteínas e proteínas e podem ser aumentados em algumas doenças (REINE; LANGSTON, 2010). A presença de cilindros granulosos grossos e finos pode indicar degeneração de células tubulares, com indicio de doença renal glomerular ou tubular. Nesse estudo observou-se cilindros raros, indicando a ausência de lesão renal.

4.3.1 Determinação da proteína urinária

Na Tabela 9 estão expressas as relações de proteína/creatinina urinária dos cães do grupo DOX-Cl nos momentos avaliados. Dados expressos como mediana, média (IC95).

Tabela 9: Proteína e creatinina urinária (UPC) dos animais tratados com DOX-Cl (n=10). Dados expressos como mediana, média (IC95).

M0	M1	M2	M3	*Referência
0,08	0,093	0,08	0,08	
0,09 (0,06 - 0,12)	0,13 (0,05 - 0,20)	0,10 (0,05 - 0,14)	0,25 (-12823 - 0,62)	<0,5

*Referência (International Renal Interest Society – IRIS (2006))

A avaliação da proteinúria se faz importante, a fim de determinar lesão renal. Nas doenças glomerulares a proteinúria é constantemente observada (GREGORY, 2005; GRAUER, 2009)

Não foi observado quadro de proteinúria nos animais tratados com DOX-Cl. A Sociedade Internacional de Interesse Renal (*International Renal Interest Society* – IRIS) (2006), estabelece critério de classificação segundo os valores de UPC. Valores entre zero a 0,2 são classificados como não proteinúricos. Valores de 0,2 a 0,4 apresentam caráter reservado e acima de 0,5 são classificados como proteinúricos. Em cães normais preconiza-se valor de UPC menor 0,5. Valores acima de 1,0 são classificados como anormais ou patológicos, com suspeita de lesão glomerular (FINCO, 1995; WARE,

2006; GRAUER, 2009). Desta forma, os animais não apresentaram proteinúria significativa (Tabela 9).

Nagake e Santana (2008) avaliaram a função renal em cães expostos à DOX, e neste estudo foi demonstrado que a DOX causou lesão glomerular, hipoproteinemia e proteinúria, evidenciando lesão nos néfrons, mesmo com os valores de creatinina e ureia dentro da normalidade. Pacientes com alterações renais podem apresentar creatinina normal, isso justifica a necessidade de se realizar exames de rotinas para acompanhar a função renal (BURNMEISTER et al., 2007).

Segundo Jacob et al. (2003), a relação proteína pela creatinina urinária deve ser menor que 1,0, indicando ausência de proteinúria.

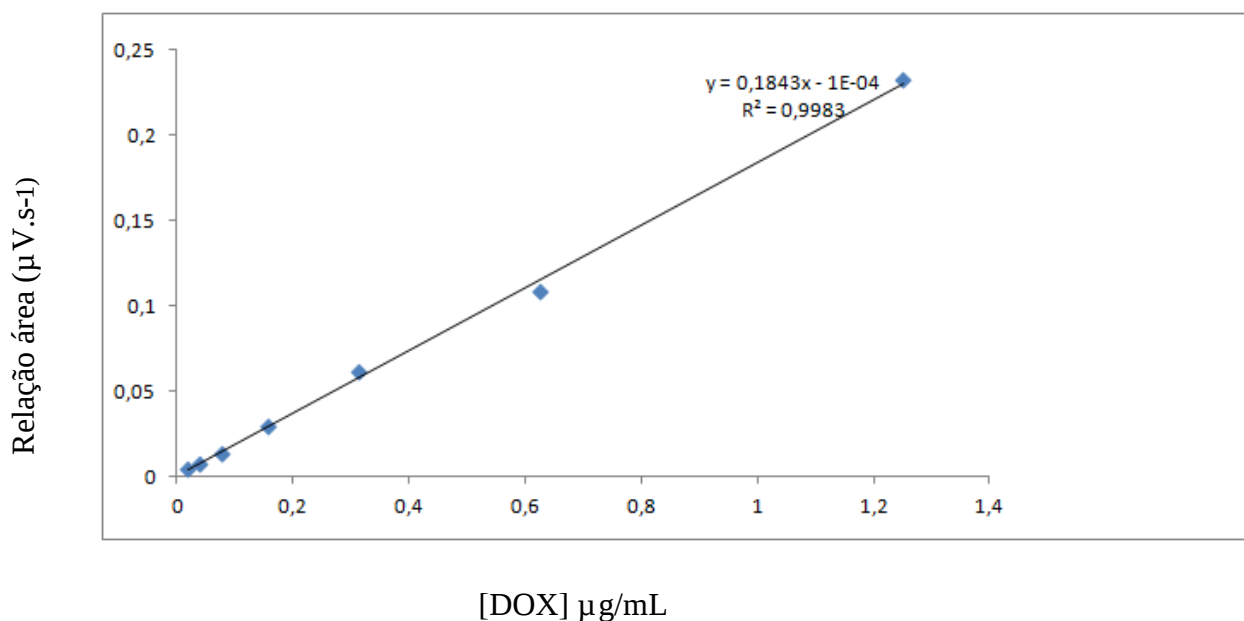
Os animais desse estudo não apresentaram alterações significativas no exame de urinálise após a quimioterapia com DOX na dose cumulativa de 120 mg/m² utilizada.

Embora as avaliações de hemograma, bioquímicas e de urinálise não tenham demonstrado alterações significativas após exposição sucessiva ao fármaco, o exame de ecodopplercardiografia apontou alterações significantes em dois animais, com diminuição da fração de encurtamento e fração de ejeção. Esses animais não puderam prosseguir com o quarto ciclo de quimioterapia. Este fato demonstra que as avaliações laboratoriais isoladamente são insuficientes para detectar o risco para o uso terapêutico da DOX e que devem ser acompanhadas de ecodopplercardiografia para garantir a segurança do uso continuado do quimioterápico.

4.4. Validação do método para a determinação de DOX em plasma por CLUE

A curva analítica da DOX em plasma foi construída na faixa de concentração de 19 a 1250 ng/mL, e apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99 (Figura 3). A curva analítica foi analisada pelo método de regressão dos mínimos quadrados para verificar sua linearidade e o coeficiente de correlação foi de 0,999. A equação da reta obtida foi $y=0,1843x-0,0001$. A equação da reta foi utilizada para quantificação do fármaco nas amostras de cães que receberam o fármaco por infusão contínua.

Figura 3. Curva analítica da DOX em plasma obtida para a faixa de concentração de 19 a 1250 ng/mL.



Os resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão intra e interensaios estão descritos nas Tabelas 10 e 11, e apresentaram valores adequados de CV (precisão) demonstrando repetibilidade e reprodutibilidade satisfatória para a aplicação do método no estudo em farmacocinética, uma vez que os valores de CV% foram inferiores a 15%.

Tabela 10: Precisão e exatidão intra-ensaio do método bioanalítico da DOX em plasma (n=5).

Concentração (ng/mL)	Precisão (CV%)*	Exatidão
19	14	110,7
39	10,9	87,87
156	14,6	85,59
1000	6,9	93,9

* CV= coeficiente de variação

Tabela 11: Precisão e exatidão inter-ensaio do método bioanalítico para a determinação da DOX em plasma (n=10).

Concentração (ng/mL)	Precisão (CV%)*	Exatidão
19	12,04	115
39	12,83	92,06
156	11,4	88,73
1000	12,73	84,8

* CV= coeficiente de variação

Na Tabela 12 e Figura 4 estão apresentados os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação da DOX na matriz biológica através da aplicação do método

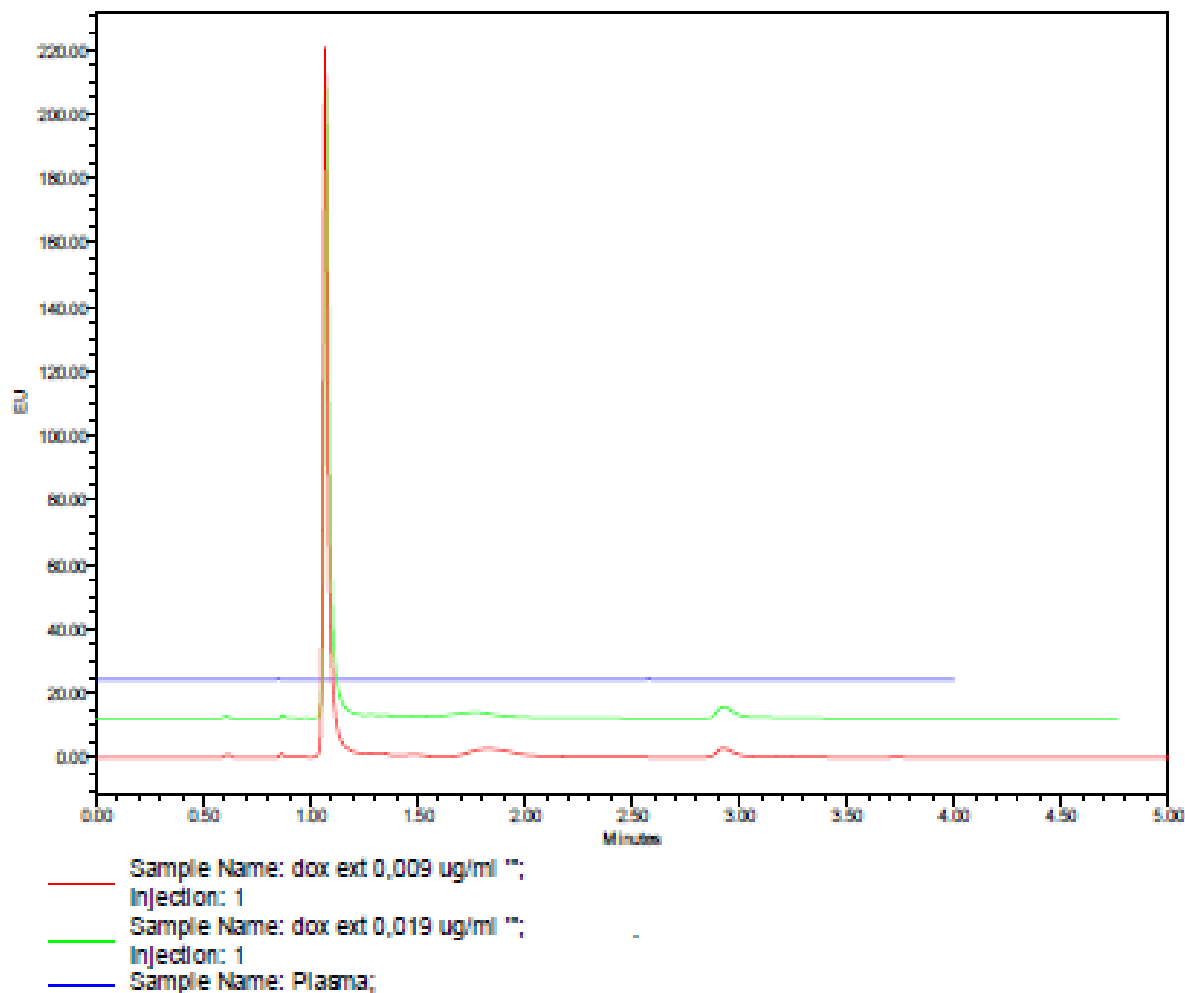
bioanalítico desenvolvido neste estudo. O limite de quantificação obtido (19 ng/mL), foi considerado satisfatório para a aplicação do método no protocolo experimental proposto para estudo em farmacocinética.

Tabela 12: Limites de detecção e quantificação do método de análise de DOX em plasma (n=5).

Limite de quantificação (ng/mL)	19
Precisão (CV) (%)	4
Exatidão	115
Limite de detecção (ng/mL)	9
Precisão (CV) (%)	6,85
Exatidão	186

*CV= coeficiente de variação

Figura 4: Cromatograma referente ao LD, LIQ e amostra branco do método de análise de DOX em plasma (n=5).



Controle de qualidade de diluição (CQD)

O estudo de controle de qualidade de diluição (CQD), para o processamento da amostra, foi feito através da adição do analito na matriz em concentração acima da maior concentração da curva de calibração e diluído em 10 vezes em amostra de branco. Na Tabela 13 está demonstrado o estudo de controle de qualidade de diluição.

Tabela 13: Estudo de controle de qualidade de diluição da amostra contendo DOX em plasma (n=5).

Concentração ng/mL	Precisão (CV)*	Exatidão
9340	13,7414	103,21
8780		
10890		
12400		
10120		
*CV= coeficiente de variação		

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados do estudo de recuperação da DOX no fluido biológico após o processamento pelo método desenvolvido neste estudo. Os valores ideais de recuperação para um método bioanalítico são aqueles próximos à totalidade, indicando que o analito foi completamente recuperado da matriz durante o procedimento de extração.

Tabela 14: Valores de recuperação da DOX em plasma (n=3). Dados apresentados como média e coeficiente de variação (CV %).

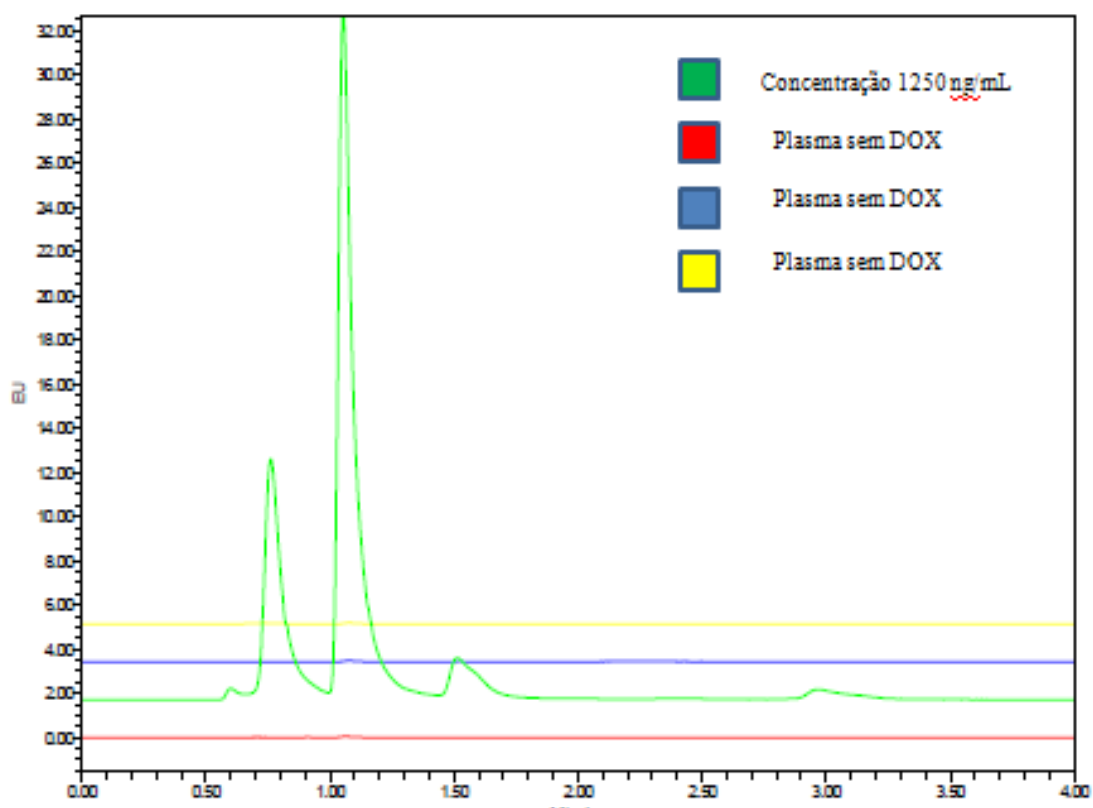
Concentração teórica (ng/mL)	Recuperação	Precisão (CV%)*
39	93,08	3,83
156	118,03	12,51
1250	95,86	6,1
* CV= coeficiente de variação		

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Efeito residual

O resultado desse ensaio demonstrou que não houve efeito residual de DOX após análise de uma amostra em alta concentração do analito (Figura 5).

Figura 5. Estudo do efeito residual de interferentes no tempo de retenção do analito (0,84 minutos) e DAU (1,01 minutos),



A cor verde representa a concentração de 1250 ng/mL e as outras análises são as amostras de plasma branco (vermelho antes da DOX, azul e amarelo após a DOX). Indicando que não houve interferentes no tempo de retenção dos analito e do PI.

A estabilidade do analito na matriz biológica limita o tempo de seu processamento e de análise e, assim, conhecer esta limitação é importante para a obtenção de resultados confiáveis.

Na Tabela 15 estão demonstrados os resultados do estudo de estabilidade de 8 horas pós-processamento da DOX.

Tabela 15: Estudo de estabilidade da DOX em plasma. Resultados apresentados como porcentagem de analito no estudo de pós-processamento da amostra, durante 8 horas (n=3).

Concentração (ng/mL)	Pós processamento 8h (%)
39	100
1000	100

Resultados apresentados como porcentagem de analito nas diferentes situações de exposição da amostra.

Os resultados obtidos mostram que não houve degradação do analito no estudo pós-processamento durante 8 horas a temperatura de 10°C. Isso significa que a DOX apresenta estabilidade durante o todo processamento das amostras e o tempo total de análise no sistema cromatográfico.

Os resultados da validação demonstraram que o método desenvolvido e validado apresentou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação de DOX-Cl nos estudos de farmacocinética.

4.5. Análise Farmacocinética

Os estudos de farmacocinética pré-clínica permitem prever efeitos toxicológicos, a taxa e a extensão da exposição do organismo à substância (SMYTH; HOTTENDORF, 1980; MARSH; RIAUKA; MCQUARRIE, 2008). Os modelos animais oferecem condições para determinar a farmacocinética e a farmacodinâmica (ANDES; CRAIG, 2002). Assim, os estudos de farmacocinética em doses terapêuticas são usados como ferramentas para estimar e prever concentrações alvo e relacioná-los aos achados clínicos.

Os parâmetros de farmacocinética do grupo DOX-Cl estão representados na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial em cães 30 mg/m², obtidos após administração por infusão contínua, (n=10 para M1 e n=8 para M3). Dados expressos como mediana, média (IC95).

Momentos			
Parâmetros	M1	M3	p
Kel (min⁻¹)	0,0006 0,0006 (0,0003 - 0,0009)	0,0008 0,0012 (0,0003 - 0,0021)	0,213 (NS)
t_{1/2} (h)	17,88 30,65 (6,99 - 54,31)	15,25 19,16 (4,98 - 33,33)	0,424 (NS)
Vd (L/Kg)	504,57 652,18 (370,51 - 933,86)	413,64 397,45 (187,78 - 607,12)	0,237 (NS)
Cl (L/min/Kg)	0,301 0,49 (0,134 - 0,847)	0,156 0,327 (-0,043 - 0,676)	0,8286 (NS)

NS – diferença estatística não significativa

O parâmetro clearance plasmático ou total (Cl) é utilizado para descrever a depuração ou remoção de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. O Cl pode ser expresso em volume por unidade de tempo (mL/min; L/h e L/Kg), uma vez que está relacionado com os processos que resultam na eliminação do fármaco do organismo. O Cl total é resultado da biotransformação hepática somada à excreção renal da substância (TOZER; ROWLAND, 2009). Ainda, o Cl é um parâmetro importante em farmacocinética clínica para o cálculo da dose necessária para manter a concentração plasmática média no estado de equilíbrio em regimes de doses múltiplas (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

Os valores médios de Cl encontrados neste trabalho foram (0,49 L/min/Kg, em M1 e 0,327 L/min/Kg em M4) superior ao estudo realizado por Gabizon; Barenrolz; Bialer (1993), em que o Cl médio encontrado foi de 0,0155 L/min/Kg.

Observou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para os valores de Cl, confirmando que não houve alteração na eliminação de DOX após exposições sucessivas ao fármaco.

O Cl pode sofrer a influência de dois fatores fisiológicos: perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca do mesmo para eliminar o fármaco. Desta forma o Cl é produto do fluxo sanguíneo (Q) e a da taxa de extração (E), e pode ser calculado a partir da equação:

$$Cl = Q \times E$$

Onde E é um valor numérico entre 0-1 e pode ser considerado como a porcentagem de fármaco eliminado (0-100%) durante uma única passagem pelo órgão eliminador e Q é o fluxo sanguíneo (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

A perfusão sanguínea possui relação com o débito cardíaco, o qual é definido como a quantidade de sangue bombeada pelo coração em litro/minuto, e é expresso pela relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca, esses fatores estão intimamente ligados às características anatômicas e funcionais do organismo (GUYTON; HALL, 2006).

O débito cardíaco pode influenciar o Cl em condições fisiológicas normais de eliminação e o valor limite de Cl será próximo do valor do débito cardíaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

O débito cardíaco pode ser calculado pela equação:

$$\text{Débito cardíaco (mL/min/Kg)} = 180 \times \text{massa corpórea}^{-0,19}$$

Assim, o débito cardíaco médio encontrado nos animais deste estudo foi de 115,57 mL/min/Kg (mínimo de 101,88 e máximo de 132,58), considerando peso médio dos cães de 10,21 Kg. O fluxo sanguíneo direcionado ao tecido hepático e renal pode ser considerado como a metade do valor do débito cardíaco, e neste caso, será então de 57, 785 mL/min/Kg.

O valor de Cl encontrado para a DOX (490 ml/min/Kg em M1 e 326 ml/min/kg em M3) é superior ao débito cardíaco destinado a fígado e rins, o que sugere eliminação (metabolismo e excreção) também por outros órgãos.

O volume de distribuição é definido como o volume necessário para conter a quantidade de fármaco no organismo em uma concentração igual a encontrada no plasma. O Vd é expresso em volume por peso (mL/kg ou L/kg). Muitos autores denominam como volume aparente, uma vez que o volume distribuição não é fisiologicamente verdadeiro. A principal aplicação do Vd é permitir suporte para o cálculo de dose de ataque (primeira dose em regime de dose múltipla) para alcançar concentrações alvo. Vale ressaltar que a distribuição do fármaco para os tecidos depende de vários fatores: solubilidade em componentes lipofílicos (distribuição para o tecido adiposo), ligação a proteína plasmática, em especial à albumina para os fármacos ácidos e à glicoproteína α_1 -ácida para fármacos básicos e afinidade por componentes de outros tecidos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

Os valores de Vd encontrados neste estudo foram de (652,181 L/Kg em M1 e 397,451 L/Kg em M3), sem diferença estatística ($p > 0,05$). O volume de distribuição pode ser relacionado com o volume sanguíneo. De acordo com Caldwell et al.(2004), o

Vd é classificado como baixo, se for menor ou igual ao volume total de sangue. Para os animais deste estudo o volume de sanguíneo médio foi de cerca de 0,714 L e o Vd da DOX (33.528 L). Este Vd pode, então, ser considerado alto para o modelo animal e sugere acúmulo extravascular do fármaco.

A meia vida ($t_{1/2}$) de eliminação é o tempo necessário para que a concentração plasmática caia pela metade, sendo considerado um importante parâmetro na clínica. A unidade da ($t_{1/2}$) pode ser expressa em horas ou minutos. Esse parâmetro permite calcular intervalo de doses em regimes de dose múltiplas, o grau de flutuação das concentrações, acúmulo do fármaco, tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio em doses múltiplas ou na infusão contínua, e tempo para o fármaco ser totalmente eliminado do organismo (denominado de wash-out que corresponde a 10 $t_{1/2}$) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

A $t_{1/2}$ é um parâmetro híbrido, dependente do clearance e da extensão de distribuição (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004), uma vez que está relacionada diretamente com o Vd e inversamente com a depuração. Assim, quanto maior o volume de distribuição, maior será a meia vida de eliminação; e quanto maior for a depuração, menor será a meia vida de eliminação.

A $t_{1/2}$ encontrada neste trabalho foi (17,875 em M1 e 15,245 em M3), e não foi observado diferença estatística entre os dois momentos ($p > 0,05$). Gabizon e Martin (1993) encontraram valores 25-30 horas, já Gustafson et al. (2002) observaram valores de 19, 8 horas.

Não foi observada diferença estatística nos parâmetros farmacocinéticos no primeiro ciclo, em comparação com o quarto ciclo de quimioterapia, e isso demonstra que nas exposições sucessivas ao fármaco não há desenvolvimento de mecanismos de indução ou inibição enzimática sobre os processos farmacocinéticos, que levem a

diminuição ou aumento das concentrações plasmáticas. Esse resultado permite-nos inferir que a manutenção do regime posológico durante todos os ciclos de infusão é adequada para a condução do tratamento.

É importante ressaltar que esse estudo de farmacocinética foi realizado em cães SRD portadores de TVT, o que pode acarretar maiores variações nesses parâmetros (ZORAN; RIEDESEL; DYER, 1993).

As observações clínicas realizadas em projetos simultâneos a este estudo demonstraram que os animais portadores de TVT que receberam DOX na forma cloridrato apresentaram significativa redução da massa tumoral. Esses resultados, aliados aos parâmetros avaliados neste estudo, demonstram que o esquema posológico adotado (30 mg/m^2 em quatro ciclos com intervalos de 21 dias) apresentou eficácia e segurança adequadas ao tratamento do TVT em cães.

V. CONCLUSÕES

- O método bioanalítico desenvolvido por CLUE demonstrou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação da DOX -Cl em amostras de plasma para a avaliação do seu perfil farmacocinético;
- Os exames bioquímicos e hematológicos realizados nos animais que receberam a DOX-Cl na dose de 30 mg/m^2 , em 4 ciclos de quimioterapia (dose cumulativa de 120 mg/m^2) não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem baixo risco de toxicidade hematológica, cardíaca, renal e hepática na utilização deste protocolo neste modelo animal com TVT. No entanto, verificou-se que a ecodopplercardiografia deve ser utilizada como teste confirmatório da ausência de dano cardíaco para o prosseguimento da quimioterapia.

Ainda, embora o foco deste trabalho não tenha sido a observação da evolução clínica decorrente do tratamento, ressaltamos que todos os animais tratados com a DOX-Cl apresentaram cura ou melhora significativa do quadro clínico. Este fato, aliado ao investigado neste trabalho, permite-nos inferir que o protocolo utilizado apresenta relativa segurança e é eficaz para o tratamento de cães com TVT.

CAPÍTULO II

I.NOVAS FORMULAÇÕES

A inovação incremental tem sido utilizada nos últimos anos, pela indústria farmacêutica, como principal estratégia para introduzir novos produtos no mercado e pode ser descrita como o processo de aplicação dos conhecimentos relacionados à medicamentos já existentes no mercado para melhorar suas qualidade, eficácia e segurança. Este tipo de inovação inclui a reformulação de medicamentos para diminuir os seus efeitos tóxicos e/ou melhorar suas características farmacocinéticas (BERNDT, 2006).

Atualmente a busca por tratamentos mais eficazes e dotados de menor toxicidade tem impulsionado a pesquisa de novas formulações e sistemas que possam carrear fármacos e modular suas características farmacológicas e toxicológicas. Por exemplo, uma molécula de polietilenoglicol (PEG) foi inserida na molécula interferon ($IFN\alpha$) com o objetivo de otimizar seu perfil farmacocinético. Com esta estratégia obteve-se concentrações plasmáticas constantes e mantidas por um tempo superior quando comparadas às concentrações plasmáticas da molécula não peguilada (NPEG), permitindo regimes posológicos simplificados com grande potencia antiviral (GLUE et al., 2000; TAGLIAFERRI, 2005). Outro exemplo é a forma lipossomal do doxorrubicina (DOX) e as nanopartículas carregadas de paclitaxel. Estes produtos demonstraram melhores efeitos terapêuticos em diversos estudos clínicos, o que permitiu a ampliação de suas aplicações terapêuticas (IWAMOTO, 2013).

As antraciclinas podem ser veiculadas a partir de sistemas lipossomais, que começaram a ser estudados em 1980. Atualmente, esses sistemas estão disponíveis para comercialização na forma Myocet- lipossoma não peguulado, aprovado em 1995 pelo FDA, e em 2003 pela União Européia (formulações peguuladas, Doxil[®] comercializado nos EUA e Caelyx[®]) (SOLOMON; GABIZON, 2008). O encapsulamento em lipossoma peguulado foi projetado para modificar a liberação do fármaco para os tecidos alvos, resultando em aumento de tempo na circulação. A concentração plasmática pode aumentar em 95%, a AUC (área sob a curva) em 1000 vezes, com consequente diminuição do volume de distribuição (SOLOMON; GABIZON, 2008).

Os sistemas constituídos de lipídeos anfifílicos (fosfolipídios propilenoglicol (PEG), dispersos em água, permitem incorporar o fármaco em vesículas. O fármaco pode ficar retido na bicamada ou na fase aquosa (SOLOMON; GABIZON, 2008). Os lipossomas estabilizados com PEG tem a capacidade de permanecer mais tempo na circulação, uma vez que esses sistemas conseguem diminuir a fagocitose mononuclear (MPS). Outra vantagem é o aumento da concentração na região tumoral e na região inflamatória (GABIZON; MARTIN, 1997).

A desvantagem desses sistemas são os efeitos adversos, os quais diferem da forma DOX cloridrato ou forma livre. Esses efeitos são sobre a mucosa oral, como mucosite (estomatite) e esofagite. A eritrodisestesia palmo-plantar pode ocorrer após 2 ou mais ciclos de quimioterapia com formas peguuladas de DOX (SOLOMON; GABIZON, 2008), e caracteriza-se pela síndrome de mão e pés inflamados após a quimioterapia, com dores nas mãos e na região plantar dos pés, disestesia (distúrbios neurológicos que ocasionam alteração na sensibilidade), eritema, bolhas e ulcerações. Em casos mais graves aconselha-se a interrupção do tratamento (SIMÃO et al., 2012).

A mielossupressão também foi relatada após o uso desses sistemas contendo DOX, caracterizada com leucopenia e neutropenia. A trombocitopenia e anemia também são frequentes (SOLOMON; GABIZON, 2008).

As nanopartículas oferecem um novo tipo de tratamento para o câncer por meio de sistema de liberação do fármaco para o alvo, que permite direcionar o quimioterápico para o ambiente tumoral. As formulações de liberação modificada apresentam um aumento na DL_{50} e aumento no índice terapêutico, caracterizando diminuição dos efeitos tóxicos (HALLEY; FRENKEL, 2008).

Esses sistemas nanoestruturados utilizam vetores para direcionar o fármaco até o endotélio tumoral. As células tumorais necessitam de nutrientes para o seu crescimento e angiogênese, assumindo característica de um processo não ordenado com áreas de necrose, má vascularização e menor difusão do fármaco nessas áreas. O interstício do tumor é composto de colágeno e gel fluido, que oferecem resistência ao quimioterápico até o interior das células. O transporte de fármaco para o tumor depende da pressão intersticial, da difusão do fármaco, do tamanho da partícula, da natureza hidrofóbica e da carga elétrica (HALLEY; FRENKEL, 2008).

Dentre os novos sistemas desenvolvidos, destacam-se as microemulsões (ME), as quais são alternativas para compartimentalizar o componente terapêutico de característica lipofílica e/ou hidrofílica. Essas formulações apresentam características tais como transparência, alta estabilidade e tamanho de gotícula reduzido (ABOOFAZELI; BARLOW; LAWEWNCE, 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Outra característica desses sistemas é o aumento da solubilidade do fármaco lipofílico e a proteção contra hidrólise enzimática, conferidos por tensoativos lipídicos (D'CRUZ; UCKEEN, 2001).

A formação de MEs depende do balanço hidrofílico e lipofílico dos tensoativos, que sofrem influência da temperatura, força iônica, presença de co-tensoativos e estrutura química. As MEs são constituídas dos seguintes componentes: água, óleo, tensoativos e co-tensoativos (LAWRENCE; RESS, 2000; D' CRUZ; UCKUN, 2001).

O diâmetro das gotículas da fase interna e a viscosidade do sistema estão relacionados com a liberação e difusão do fármaco (CORREA et al., 2005).

As MEs podem ser administradas pela via oral, ocular (GARTI; ASERIN, 1996), tópica, dérmica (D'CRUZ; UCKUN, 2001), transdérmica, parenteral (LI et al., 2002), pulmonar, vaginal, retal (D'CRUZ; UCKUN, 2001) e nasal (LI et al., 2002). As formulações parenterais devem ser estéreis, apirogênicas, isotônicas, atóxicas, estáveis e o tamanho de gotícula não deve exceder 1 mm, a fim de evitar o risco de embolia (TROTТА; PATTARINO; IGNONI, 2002).

Existem MEs do tipo lipídicas que são alternativas para liberação de fármacos, principalmente quimioterápicos (MARANHÃO et al., 1995, 1996; MITRA et al., 2001; OWENS; BAILLIE; HALBERT, 2001; FORMARIZ et al., 2006). A sua estrutura é composta por um lipídio neutro na região interna, que possui a capacidade de solubilizar substâncias lipofílicas no domínio hidrofóbico da fase interna oleosa (LUNDBERG MORTIMER; REDGRAVE, 1996). A sua liberação acontece de forma lenta e contínua (GARTI; ASERIN, 1996).

Considerando os aspectos promissores desses sistemas, Formariz et al. (2008) desenvolveram uma ME lipídica, rica em colesterol na fase interna, para direcionar a DOX para as células tumorais. A ME lipídica foi composta de 17% de tensoativos (Eumulgin/fosfatidilcolina de soja/Oleato de sódio) (35:35:30 p/p), 3% de colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2, representando 80% de fase aquosa. A concentração de colesterol foi de 3%, ideal para formar um sistema

translúcido, já que o aumento na concentração de colesterol dificulta a liberação de DOX devido à formação de estruturas rígidas ou ocorrência de cristalização do colesterol, causando maior retenção de DOX (FORMARIZ, et al., 2006).

Formariz et al. (2006) determinaram o tamanho de gotícula da fase interna oleosa. Os testes foram realizados com ME contendo DOX e não contendo o fármaco (vazia). O tamanho de gotículas e o índice polidispersão (PDI), foram determinados por Light Scattering, que fornece informação sobre o movimento translacional das gotículas da ME e determina o tamanho da gotícula (ABOOFAZELI; BARLOW; LAWEWNCE, 2000).

A ME vazia apresentou tamanho de gotícula 62-168 nm e, após a incorporação do fármaco, o sistema apresentou gotículas de 96-215 nm. O aumento de tamanho das gotículas na fase interna foi devido ao efeito hidrofóbico da DOX em óleo, aumentando o volume (FORMARIZ et al., 2006).

No mesmo estudo observou-se aumento da DL_{50} aguda da DOX veiculada pelo sistema microemulsionado em animais que receberam a formulação pela via intraperitoneal (25,39 mg/Kg para ratos e 54,65mg/Kg para camundongos). O mesmo parâmetro, para a DOX cloridrato, foi de 9,05 mg/Kg em ratos e 12, 25 mg/Kg em camundongos. Isso significa que a nova formulação aumentou a DL_{50} em 2,8 vezes para ratos e em 6 vezes para camundongos (FORMARIZ, 2008).

No trabalho de Formariz (2008), a avaliação do potencial de dano cardíaco da DOX foi realizada através da determinação do biomarcador cardíaco (CK-MB) pelo método cinético Kit Labtest[®] pré e pós-tratamento dos animais (ratos e camundongos), com o fármaco veiculado em ME e livre na forma de cloridrato. A atividade da enzima se mostrou aumentada em 2,70 vezes no grupo que recebeu DOX cloridrato ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle em ambas as espécies. O grupo DOX-ME apresentou

diminuição de 1,79 vezes na atividade isoenzima, quando comparado com a forma cloridrato (FORMARIZ, 2008).

Assim, esse sistema microemulsionado reduziu a cardiotoxicidade da DOX, avaliada através da atividade da CK-MB, quando comparada ao produto comercial disponível no mercado (pó liofilizado na forma de cloridrato), além de aumentar a DL₅₀ em ratos wistar e camundongos, e manter a DE₅₀, aumentando a margem de segurança do produto (FORMARIZ, 2008).

A cardiotoxicidade do sistema microemulsionado contendo DOX também foi avaliada por Assumpção et al. (2012), pela atividade da CK-MB e observou-se que 12 horas após a administração de DOX, em dose única na forma cloridrato, em ratos wistar, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nesse biomarcador cardíaco em relação aos valores basais, anteriores à exposição do fármaco. Os animais que receberam DOX ME não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos valores basais. Assim, os resultados obtidos no grupo tratado com DOX cloridrato apontam para possível cardiotoxicidade. A ausência de cardiotoxicidade no grupo DOX-ME pode ser explicada pela composição lipídica do sistema, que proporciona modificação na liberação do fármaco para os tecidos, conferindo menor distribuição para o miocárdio e consequentemente diminuição dos efeitos tóxicos.

O dano hepático causado pela DOX foi avaliado através da determinação sérica das enzimas ALT e AST, e observou-se que no grupo de ratos wistar que recebeu DOX-ME houve uma diminuição de 2,71 vezes na ALT e 3,16 vezes na AST, comparado com a DOX cloridrato. Esses achados apontam que a microemulsão foi capaz de diminuir os efeitos adversos encontrados com a DOX livre (FORMARIZ, 2008).

A atividade antitumoral “*in vivo*” da DOX veiculada pelo sistema microemulsionado foi avaliada em camundongos com tumor ascítico de Erlich por

Formariz (2008), através da determinação do peso relativo do tumor (%) em função das doses administradas (2,5; 5). A DOX-ME diminuiu o peso relativo do tumor em 3,84 vezes, em relação ao grupo salina e a menor dose administrada foi capaz de apresentar o mesmo efeito que o fármaco não encapsulado. Observou-se, assim, a potencialização da atividade citotóxica da DOX quando incorporada na ME (FORMARIZ, 2008). A incorporação na DOX nas gotículas da fase oleosa pode justificar a alteração no volume de distribuição e alteração da permeabilidade celular e, com isso, o aumento da atividade antitumoral.

Em estudo realizado por Assumpção et al. (2012) avaliou-se a farmacocinética da DOX em rato wistar após administração IV bolus na dose de 6 mg/Kg, na forma livre cloridrato e veiculada a partir do sistema microemulsionado. Os perfis farmacocinéticos obtidos neste estudo foram diferentes entre as duas formulações, com diferenças estatísticas significativas entre as concentrações plasmáticas de DOX.

A concentração plasmática nos animais que receberam DOX-ME foi maior que nos animais que receberam DOX-Cl, indicando que a DOX permanece em maiores concentrações no sangue circulante quando veiculada pelo sistema microemulsionado, o que possibilita menor distribuição para os tecidos não alvos, principalmente o miocárdio (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

O parâmetro volume de distribuição da DOX quando veiculada na formulação microemulsionada foi inferior, quando comparada a forma livre (38,23 L/Kg vs 68,85 L/Kg). Esta diferença foi importante para a menor distribuição de fármaco até os tecidos não desejados, como o coração, uma vez que a DOX ficou retida na fase interna-oleosa da ME. Esta característica é extremamente importante para diminuição da cardiotoxicidade inerente a este composto (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

O clearance médio das formulações contendo DOX não apresentou diferença estatística significativa, indicando que a nova formulação não altera a remoção do fármaco pelo sistema enzimático do metabolismo (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

O valor médio da meia vida de eliminação para a DOX veiculada na formulação foi inferior e significativamente diferente ao da DOX livre (9,2 h vs 16,5h). Isto pode ser justificado pela diminuição do V_d da DOX, observado no sistema microemulsionado, com consequente menor acúmulo periférico (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

Desta forma os resultados pré-clínicos de perfil farmacocinético da DOX contida na ME apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação ao perfil da DOX livre em ratos wistar e camundongos swiss, com diminuição da cardiotoxicidade. Esses resultados sugeriram que a composição lipídica da ME proporciona maior captação do fármaco pelas células tumorais.

Candido et al. (2014), investigaram a distribuição da DOX em tecido cardíaco e tumoral em camundongos Swiss fêmeas, nas quais foi inoculado e desenvolvido o tumor de Ehrlich. Esses animais receberam, por via intraperitoneal e em dose única (10 mg/Kg), a DOX veiculada pela microemulsão (DOX-ME) ou na forma de cloridrato (DOX-Cl). Quinze minutos após a administração a massa tumoral total e o coração foram coletados. A concentração média de DOX encontrada no tecido cardíaco foi de 1,8 ng/mg e 0,92 ng/mg, e em tecido tumoral 0,47 ng/mg e 0,85 ng/mg para a DOX-Cl e DOX-ME, respectivamente. Neste estudo constatou-se que a distribuição da DOX veiculada pela ME em tecido cardíaco apresentou valores significativamente inferiores com relação à distribuição da DOX-Cl, e que as concentrações de DOX no tecido tumoral não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). A diminuição da disponibilidade de fármaco para o tecido cardíaco observada por Candido et al.

(2004) demonstra que o sistema microemulsionado foi capaz de diminuir a cardiotoxicidade da DOX e manter o efeito terapêutico, tendo em vista a distribuição direcionada ao tecido alvo. Estes resultados obtidos reforçam que o uso destes sistemas de veiculação podem restringir o acesso do fármaco, bloqueando possíveis ações inespecíficas e indesejáveis como aquelas observadas sobre o miocárdio na administração da formulação convencional do cloridrato de DOX.

Esses resultados promissores incentivaram a condução de estudos clínicos para avaliar as características da disposição cinética da DOX veiculada pela ME na presença de tumores, avaliar a eficácia terapêutica, assim como os efeitos sobre o tecido cardíaco através da investigação de biomarcadores.

II. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o perfil farmacocinético da DOX contida na microemulsão administrada por infusão contínua na dose de 30 mg/m^2 e avaliar toxicidade sistêmica por meio de hemograma, provas bioquímicas e urinálise em cães com TVT.

Específicos:

- Avaliar o perfil farmacocinético da DOX incorporada na ME, administrada por via intravenosa em dose única (30 mg/m^2), na 1^a e 4^a sessão, com intervalos de vinte e um dias, em cães com TVT;
- Avaliar a cardiotoxicidade da DOX nesses animais através dos parâmetros bioquímicos CK-MB e troponina I.
- Avaliar parâmetros hematológicos, de urinálise (exame físico, químico, sedimentoscopia), relação proteína creatinina urinária e os parâmetros bioquímicos: fosfatase alcalina, ureia, creatinina, bilirrubina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), triglicérides, albumina, proteínas totais e colesterol antes e após cada sessão de quimioterapia.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias primas, reagentes e solventes

- Ácido oléico, Synth, Brasil;
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- Cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma, Brasil (50 mg de Cloridrato de doxorrubicina, 200 mg de manitol e 250 mg de lactose);
- Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- Kits labtest: (ALT ref 108); (AST ref 109), (creatinina ref 35); (uréia ref 104); (fosfatase alcalina ref 79); (proteínas totais ref 99); (albumina ref 19); (triglicérides ref 87); (colesterol ref 76); (CK-MB ref 118), (bilirrubina total ref 31) e (bilirrubina direta ref 93), Sensiprot (ref 36)
- Oleato de sódio, Sigma-Aldrich, USA;
- Óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (Eumulgin[®] HRE40), Pharma Special, Brasil;
- Mini Vidas Biomériux (kit cTnI), USA;
- Reagente ABX Vetpack, France;
- Tween 20, AUDAS Farmacopéia Fina, Brasil.

3.1 Animais

Foram incluídos no estudo 5 cães sem raça definida (SRD) com peso variando entre 8 a 15,8 Kg, sendo 1 fêmea e 4 machos, diagnosticados com TVT (Figura 1 e Tabela 1), com confirmação citológica, sem metástases clinicamente detectáveis ou quimioterapia prévia. Estes animais foram alojados ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Hospital Veterinário da FCAV – Jaboticabal- SP, UNESP, onde receberam ração e água “*ad libitum*” e foram mantidos em canis individuais. O proprietário de cada animal foi devidamente informado sobre o projeto de pesquisa - conforme o termo de consentimento livre (Anexo 1) – autorizando sua inclusão formalmente. Os animais somente foram incluídos no estudo após o consentimento (por escrito) de seu proprietário ou responsável.

Para a inclusão dos animais no estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: hemograma completo, ALT, creatinina e avaliação da função cardíaca por ecodopplercardiografia. Foram critérios de exclusão, além de alterações nos parâmetros acima investigados, a presença de outros tumores além do TVT, quimioterapia prévia e doenças infecciosas.

O protocolo experimental deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), órgão assessor da Congregação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, e registrado sob o número 025175/12 (Anexo 2).

Tabela 1: Características dos animais incluídos no trabalho

Animal	Peso (Kg)	Idade estimada (anos)	Gênero
A1G2	15,2	3	fêmea
A2G2	15	2	macho
A3G2	15,6	8	macho
A4G2	9	6	macho
A5G2	8	3	macho

3.2. Protocolo Experimental

A formulação de DOX-ME foi preparada dissolvendo-se Eumulgin/FS/OS (35:35:30 p/p) na fase oleosa (CHO) em proporção previamente estabelecida (17% Eumulgin:FS:OS), 3% de CHO e 80% tampão fosfato PBS, pH 7,3. O sistema foi submetido à ultrassom de haste (Sonicador, Sonics®, Vibra-Cell), para a homogeneização da mistura, operando em modo descontínuo, por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após homogeneização, a DOX foi adicionada até atingir a concentração final de 2,0 mg/mL e o sistema foi centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos, a fim de eliminar o resíduo de titânio provenientes da haste do sonicador.

A formulação final apresentou pH próximo de 8,5, o qual foi ajustado com ácido fosfórico 1 mM até o pH 7,0-7,3.

A formulação foi levada para capela de fluxo laminar após a limpeza do local com álcool 70%, filtrada em membrana RS 0,22 µm e envasada em frasco de vidro estéril. Este procedimento garantiu a esterilidade da ME.

O protocolo experimental proposto neste estudo incluiu 5 animais tratados com microemulsão contendo doxorubicina ($n=5$, 30 mg/m^2) por infusão contínua lenta durante 30 minutos, taxa de infusão de $1 \text{ mg/m}^2/\text{min}$, em 04 ciclos, com intervalo de 21 dias. Vinte minutos antes da administração do quimioterápico, foi administrado o anti-histaminico difenidramina (1mg/Kg) com o objetivo de prevenir reação anafilática decorrente da grande sensibilidade causada pela DOX (DALECK et al., 2009)

Todos os exames de hemograma, bioquímicos e urinálise foram feitos no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária- Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”- Hospital Veterinário da FCAV – Jaboticabal- SP, UNESP.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experiência clínica da administração da microemulsão contendo doxorubicina

A anafilaxia é uma reação de hipersensibilidade aguda que pode ser fatal devido à liberação de mediadores como a histamina.

No presente estudo, todos os animais 5 animais (100%) selecionados para a administração da DOX-ME apresentaram reação anafilática minutos após o início da infusão contínua, o que levou à interrupção da administração aos 10 minutos de infusão.

Durante a infusão observou-se o quadro de hipersensibilidade, por meio dos sintomas: urticária, eritema, edema, náusea, diarreia e vômito. As Figuras 2, 3, 4 ilustram o quadro de anafilaxia durante administração da ME.

Em seguida, administrou-se cortisona e anti-histamínico, a fim de reduzir o quadro de anafilaxia.

Após estes sintomas a ME passou por adequações em sua composição, como a substituição de Emulgin[®] por Tween 20. Segundo a literatura o Eumulgin[®] pode ser responsável por reações de anafilaxia (LORENZ et al., 1982; FRUITIER-POLLOTH, 2005). Em um segundo momento, desenvolveu-se uma ME sem oleato de sódio, uma vez que esse componente poderia ter um potencial tóxico para administração endovenosa. O tamanho de gotículas adequadas e PDI foram mensurados por Light Scattering em todas as formulações desenvolvidas, a fim de garantir a segurança.

Após as modificações propostas para a ME, foram selecionados animais hígidos para administração das formulações vazias (não contendo doxorubicina, apenas a

microemulsão base). Em todas as administrações, os diferentes animais apresentaram reações anafiláticas minutos após o início da infusão.

Desta forma constatou-se que o sistema microemulsionado proposto não é biocompatível com este modelo animal, mesmo após as adaptações sugeridas, o que inviabilizou a avaliação do perfil farmacocinético da DOX a partir da administração da ME no presente estudo.

Figura 1: Animal apresentando edema e eritema periocular e reação urticariforme por todo o corpo (visível na região cervical).



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2: Animal apresentando edema na região da orelha e ocular.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 3: Animal apresentando urticária.



V. CONCLUSÕES

- O uso clínico da ME-DOX proposta não foi possível em decorrência da bioincompatibilidade com o modelo animal estudado, tendo como consequência reações alérgicas, observadas em todos os cães que a receberam.

VI. REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J. Particle size analysis of concentrated.Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.2, n. 3, p.1-10, 2000.
- AHAUS, E.A.; COUTO, C.G.; VALERIUS, K.D. Hematological toxicity of doxorubicin-containing protocols in dogs with spontaneously occurring malignant tumors. **Journal of The Americal Animal Hospital Association**, v.36, n.5, p.422-426, 2000.
- AMARAL, A.S; GASPAR, L.F.J.; SILVA, B.S.; ROCHA; N.S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003), **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.551, p.167-171, 2004.
- ANDES, D.; CRAIG, W.A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: A critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, n.4, p. 261-268, 2002.
- ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from Biotechnology and Bioengineering, v.6, n.67, p. p.704-713, **Biotechnology Bioengineering**. 2000.
- ASSUMPÇÃO, J.U.C.V. **Farmacocinética pré-clínica e cardiotoxicidade da doxorubicina veiculada por sistema microemulsionado**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- ASSUMPÇÃO, J.U.C.V.; LEANDRO, M.C.; NOGUEIRA, M.A.F.F.; PESTANA, K.C.; BALDAN, H.M.; PILON, T.P.F.; OLIVEIRA, A.G.; PECCININI, R.G. Biocompatible microemulsion modifies the pharmacokinetic profile and cardiotoxicity of doxorubicin. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v.102, n.1, p. 289-296, 2012.
- BADYLAK, S.F.; VAN VLEET, J.F.; HERMAN, E.H.; FERRANS, V.J.; MYERS, C.E. Poikilocytosis in dogs with chronic doxorubicin toxicosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.2, p. 505-508, 1985.
- BERNDT, E.R; COCKBURN, I.M.; GRÉPIN, K.A. The impact of incremental innovation in biopharmaceuticals: drug utilisation in original and supplemental indications. **Pharmacoeconomics**, 24 Suppl 2, p.69-86, 2006.
- BONADONNA, G.; MONFARDINI,S.; DE LENA, M.; FOSSATI-BELLANI, F. Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumour antibiotic. **British Medical Journal**, v.3, p.503–506, 1969.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Disponível em: <HTTP://anvisa.gov.br>. Acesso em 20 julh. 2012.

BP. BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Her Majesty Stationery Office, 2010 p. 1533-1534.

BURMEISTER, J.E.; AGNOLIN, R.; COSTA, M. G.; MILTERSTEINER, D. R.; CAMPOS, B.M. Does normal serum creatinine means normal renal function? **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 51, n. 2, p.114- 120, 2007.

CALDWELL, G.W.; MASUCCI, J.A.; YAN, Z.; HAGEMAN, W. Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: Can human CL, Vss and $t_{1/2}$ be predicted from *In-vivo* Rat Data? **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v.29, n.2, p.133-143, 2004.

CANCADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia da doença crônica. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v.24, n.2, p. 127-136, 2002.

CANDIDO, C.D.; CAMPOS, M.L.; ASSUMPÇÃO, J.U.C.V; PESTANA, K.C.; PADILHA, E.C.; ZEPPONE, I.; PECCNINI, R.G. Biocompatible microemulsion modifies the tissue distribution of doxorubicin. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v.103, n.10, p.3297-3301, 2014.

CARVALHO, C.; SANTOS, R.X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P.J.; SANTOS, M.S.; MOREIRA, P.I. Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. **Current Cardiology Reviews**, v.16, n.25, p.3267-3285, 2009.

CHABNER, A.; CALABRESI, P. Chemotherapy neoplastic diseases. In: GOODMAN e GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10th ed. USA: The McGraw-Hill Companies, 2001. cap.25, p.1381-1459.

CHANG, K.H. **Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida**. 2002. 188f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: A unique result of the tumor progression. **Advances in Cancer Research**, v. 23, n.75, p.43-75, 1985.

COLES, E. H. Liver function. In: Veterinary Clinical Pathology. 4ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1986. p. 129-150.

CORREA, M.A.; SCARPA, M.V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.4, n.2, p.108-114, 2005.

COUTO, C.G. Complicações da quimioterapia do câncer. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Manual de medicina interna de pequenos animais**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 80, p. 829-832.

D'CRUZ, J.O.; UCKUN, F.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v.64, n.2, p.113-123, 2001.

DAS, U.; DAS, A.K. Review of Canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v.24, p. 545-556, 2000.

DAVIES, K.J.; DOROSHOW, J.H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.5, p.3060-3067, 1986.

DEAVALL, D.G.; MARTIN, E.A. HORNER, J.M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, p.13, v.2012.

DE BOER, E.; NAVIS, G.; TIEBOSCH, A.T.; DE JONG, P.E.; DE ZEEUW, D. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, n.11; p.2359-2366, 1999.

DEMAN, A.; CEYSSENS, B.; PAUWELS, M.; ZHANG, J.; HOUTE, K.V.; VERBELEN, D.; VAN DEN BRANDEN, C. Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.16, n.1, p.147-150, 2001.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DIBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da afecção renal. In: ETIINGER, S. J. FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p. 2355-2373.

DI MARCO, A.; GAETANI, M.; SCARPINATO, B. Adriamycin (NSC-123 127) a new antibiotic with antitumor activity. **Cancer Chemotherapy Reports**, v 53, n.1, p. 33-7, 1969.

FINCO, D.R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C.A., FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1995. p.216-29.

FLORENTINO, K.C.; NICACIO, F.D.; BATISTA, J.C.; COSTA, J.L.O; BISSOLI, E. D.'A.G. Tumor venéreo transmissível cutâneo canino-relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.3, n. 7, 2006.

FORMARIZ, T.P.; WANCZINSKI, B.J.; JÚNIOR-SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito

terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v.16, n.1, p-2.44-57, 2004.

FORMARIZ, T.P.; SARMENTO, V.H.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; OLIVEIRA, A.G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.51, n.1, p.54-61, 2006.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. 2008. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

FRUITIER-POLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**, v. 214, n.1-2, p. 1-38, 2005.
GLUE, P.; FANG, J.W.; ROUZIER-PANIS, R.; RAFFANEL, C.; SABO, R.; GUPTA, S.K.; SALFI, M.; JACOBS, S. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.68, n.5, p.556-67, 2000.

GADDIS, G.M.; GADDIS, M.L. Introduction to biostatistics: Part 5, statistical interference techniques for hypothesis testing nonparametric data. **Annals of Emergency Medicine**, v.19, n.9, p.1054-1059, 1990.

GABIZON, A.A.; BARENHOLZ, Y.; BIALER, M. Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.5, p.703-708, 1993.

GABIZON A, MARTIN F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. **Drug**, v.54, (suppl 4), p.15-21, 1997.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In: **Drug and the pharmaceutical science**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.73, cap.15, p.412-519.

GRAUER, G. F. Diagnosis, management of hypertension, proteinúria in dogs with chronic renal disease. DVM Newsmagazine, Clevelanland, Ohio-USA, April 2009. Disponível em: <<http://veterinarynews.dvm360.com/dvm/Medicine/Diagnosismanagementofhypertensionproteinuriae/ArticleStandard/Article/detail/591639?contextCategoryId=45705>>. Acesso em 01 junho de 2009.

GERARDI, D. G. Mecanismos de resistência aos quimioterápicos. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 10, p. 179-194.

GONZÁLEZ, F.D; SILVA, S.C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. 2008. 343 f. Especialização em análises clínicas veterinárias (Especialização em Análises Clínicas Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GRAUER, G. F. Diagnosis, management of hypertension, proteinuria in dogs with chronic renal disease. DVM Newsmagazine, Clevenland, Ohio-USA, April 2009. Disponível em: < <http://veterinarynews.dvm360.com/dvm/Medicine/Diagnosis-managementofhypertensionproteinuria/ArticleStandard/Article/detail/591639?contextCategoryId=45705> >. Acesso em 01 junho de 2009.

GRECO, B.A; BREYER, J.A. Cholesterol as a predictor of progression in nondiabetic chronic renal disease. **Contributions to nephrology**, v. 120, p.48- 61, 1997.

GREGORY, F. G. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 35, p. 281-296, 2005.

GUSTAFSON, D.L.; RASTATTER, J.C.; COLOMBO, T.; LONG, M.E. Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.91, n.6, p.1488-501, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HALLEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic oncology**, v.26, n.1 p.57-64, 2008.

HENDERSON, B.M.; DOUGHERTY, W. J.; JAMES, V. C.; TILLEY, L. P.; NOBLE, J. F. Safety assessment of a new anticancer compound, mitoxantrone, in beagle dogs: comparison with doxorubicin. I. Clinical observations. **Cancer Treatment Reports**, v.66, n.5, p.1.139-1.143, 1982.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos Laboratoriais Para Técnicos Veterinários** . 4ed. São Paulo: ROCA, 2006. p.568.

HELSEL, M.H.M.; MICHIELSEN, E.C.H.J.; ATSMAN, D.E.; SCHALIJ, M.J.; VAN DER VALK, E.J.M.; BAX, W.H.; HERMENS, W.T.; VAN DIEIJEN-VISSER, M.P.; VAN DER LAARSE, A. Release kinetics of intact and degraded troponin I and T after irreversible cell damage. **Experimental and Molecular Pathology**, v.85, p.90–95, 2008.

IWAMOTO, T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. **Biological Pharm Bull**, v.36, n.5, p. 715-718, 2013.:

JACOB, F.; POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; NEATON, J.D.; LEKCHAROENSULK, C.; ALLEN, T.A; KIRK, C.A.; SWANSON, L.L. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.222, n.3, p.322-329, 2003.

JULICHER, R. H. M; STERREMBERG, L; HAENEN, G.R.M.M; BAST, A.; NOORDHOEK, J. The effect of chronic adriamycin treatment on heart kidney and liver tissue of male and female rat. **Archives of Toxicology**, v. 61, n. 4, p. 275-281, 1988.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.932.

KASSNER, N.; HUSE, K.; MARTIN, H.J.; GÖDTEL-ARMBRUST, U.; METZGER, A.; MEINEKE, I.; BROCKMÖLLER, J.; KLEIN, K.; ZANGER, U.M; MASER, E.; WOJNOWSKI, L. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v.36, n.10, p. 2113-21120, 2008.

KENT, M.S.; STROM, A.; LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dog. **Journal of veterinary internal medicine**, v.18, n. 4, p.540-544, 2004.

KERR, M. G. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – **Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed.. São Paulo: Rocca, 2003. p. 421.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A. **Dicionário terapêutico guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008-2009. 721 p.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo, SP: Roca; 2004, 191p.

LAWRENCE, M. J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, n.1, p. 89–121, 2000.

LEBRECHT, D.; SETZER, B.; ROHRBACH, R.; WALKER, U.A. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis. **Nephrology dialysis transplantation**, v.19, n. 2, p.329-336, 2004.

LEE, Y.T; CHAN, K.K; HARRIS, P.A.; COHEN, J.L. Distribution of adriamycin in cancer patients: tissue uptakes, plasma concentration after IV and hepatic IA administration **Cancer**, v.45, n.9, p.2231-2239, 1980.

LIPSHULTZ, S.E.; RIFAI, N.; SALLAN, S.E.; LIPSITZ, S.R.; DALTON, V.; SACKS,D.B.; OTTLINGER, M.E. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. **Circulation**, v.96, p.2641-2648, 1997.

LORENZ, W.W, SCHMAL, A.; SCHULT, H.; LANG, S.; OHMANN, C.H.; WEBER, D.; KAPP,B.; LOBEN, L.; DOENICKE, A. Histamine release and hypotensive reactions in dogs by solubilizing agents and fatty acids: Analysis of various components in cremophor El and development of a compound with reduced toxicity. **Agents and Actions**, v. 12, n.1-2, p.64-80, 1982.

LOWN, J.W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. **Pharmacology & Therapeutics**, v.60, n.2, p. 185-214, 1993.

LU, H.; ZHU, Z.G.; YAO, X.X.; ZHAO, R.; YAN, C.; ZHANG, Y.; LIU, B.Y.; YIN, H.R.; LIN, Y.Z. Hepatic preconditioning of doxorubicin in stop-flow chemotherapy:

NF-kappaB/IkappaB-alpha pathway and expression of HSP72. **World Journal Gastroenterology**, v.14, n.11, p.2136-2141. 2005.

LUNDBERG, B.B.; MORTIMER, B.-C.; REDGRAVE, T.G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. **International journal of pharmaceutics**, v.134, n.1-2, p. 119-127, 1996.

MANCUSO, A.; MIGLIORINO, M.; DE SANTIS, S.; SAPONIERO, A.; DE MARINIS, F. Correlation between anemia and functional/cognitive capacity in elderly lung cancer patients with chemotherapy. **Annals of Oncology**, v.17, n.1 p.146-150, 2006.

MANSOUR, M.A; EL-KASHEF, H.A; AL-SHABANAH, O.A. Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats. **Pharmacology Research**, v.39, n.3, p.233-237, 1999.

MARANHÃO, R.C.; GRAZIANI, S.R.; BRANDIZZI, L.L.; COELHO, I.J.; OLIVIRA, M.A.; HEGG, R.; PINOTTI, J.A.; PILLEGGI, F.; MENEGUETTI, C. A microemulsion resembling low-density protein may be used as a vehicle of chemotherapeutic agents in mammary carcinoma. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v.6, p.227c, 1995.

MARANHÃO, R.C.; HUNGRIA, V.T.M.; CHAMONE, D.A.F.; CHIANOTE, C.S. Microemulsions that bind to LDL receptors (LDE) as vehicles for anticancer drugs: A phase I/Phase II study of complex LDE-carmustina in multiple myeloma patients. **International journal of hematology**, v.64, p.127, 1996.

MARSH, R.E.; RIAUKA, T.A; McQUARRIE, S.A. A review of basic principles of fractals and their application to pharmacokinetics. **A Journal on Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.52, n.3, p.278-288, 2008.

MIMNAUGH, E.G.; TRUSH, M.A.; GRAM, T.E. A possible role of membrane lipid peroxidation in anthracycline nephrotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, v.35, n.23, p.4327- 4335, 1986.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological reviews**, v.56, n.2, p.185-229, 2004.

MISITI, F.; GIARDINA, B.; MORDENTE, A; CLEMENTI, M.E. The secondary alcohol and aglycone metabolites of doxorubicin alter metabolism of human erythrocytes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.12, p.1643-1651, 2003.

MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P.C.; MAITRA, A.N. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal of Controlled Release**, v.74, n.1-3, p. 317-323, 2001.

MORDENTE, A.; MEUCCI, E.; MARTORANA, G.E.; GIARDINA, B.; MINOTTI, G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. **IUBMB Life**, v.52, n.1-2, p.83-88, 2001.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Hepatic and renal evaluation of dogs exposed to antineoplastic doxorubicin. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 371-379, 2008.

NAVARRO-GARCIA, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo: Varela, 1 ed. 1996.p. 89,

NEUWALD, E.B. **Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ODOM, A.L.; HATWIG, C.A.; STANLEY, J.S.; BENSON, A.M. Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n.4, p.831-836, 1992.

OLIVEIRA, A.G.; CHIVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: SONGJUN, LI. (Ed.). **Current focus on colloids and surfaces**. Kerala, India: Transworld Research Network, 2009. p.57-84.

O'KEEFE, D.A.; SCHAEFFER, D.J. Hematologic toxicosis associated with doxorubicin administration in cats. **Journal of veterinary internal medicine**, v.6, n.5, p.276-282, 1992.

OKUDA S.; OH, Y.; TSURUDA, H.; ONOYAMA, K.; FUJIMI, S.; FUJISHIMA, M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular diseases. **Kidney international**, v.29, n.2, p.502-510. 1986.

ORTIZ, C.; CAJA, L.; SANCHO, P.; BERTRAN, E.; FABREGAT, I. Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cytotoxic effects of doxorubicin in rat hepatoma cells: Role of reactive oxygen species production and glutathione depletion. **Biochemical pharmacology**, v.75, n.10, p.1935-1945, 2008.

OOSTERBAAN, M.J.; DIRKS, R.J.; VREE, T.B.; VAN DER KLEIJN, E. Pharmacokinetics of anthracyclines in dogs: evidence for structure-related body distribution and reduction to their hydroxy metabolites. **Pharmaceutical Research**, v.1, n.1, p. 33-38, 1984.

OSBORNE, C.A.; STEVENS, J.B.; LULICH, J.P.; ULRICH, L.K.; BIRD, K.A.; KOEHLER, L.A.; SWANSON, L.L. A clinician's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. Canine and feline nephrology and urology. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p.136-205.

OWENS, D.M.; BAILLIE, G.; HALBERT, G.W. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. **International journal of pharmaceutics**, v.228, n.1-2, p.109-117, 2001.

PEREIRA NETO, G. B. ANDRADE, J. N. B.; SOUSA, M. G.; CAMACHO, A. A.. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, 2006.

PETERSON, J.L.; COUTO, C.G. Tumores cutâneos e subcutâneos. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, cap. 28, p.24. 2003.

PAWLOWSKA, J.; TARASIUK, J.; WOLF, C.R.; PAINE, M.J.; BOROWSKI, E. Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase. **Oncology Research**, v.13, n.5, p. 245-252, 2003.

PRATT, W. B. RUDDON, R.W.; ENSMINGER, W.D. MAYBAUM, J.; Noncovalent DNA-binding drugs. In **Anticancer drug**. : New York :Oxford University Press; 1994. p. 155-182.

RAJ, S.; FRANCO, V.I.; LIPSHULTZ, S.E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Current treatment options in cardiovascular medicine**, v.16, n.6, p.1-14, 2014.

REAGAN, W.J.; HANDY, V.; MCKAMEY, A.; BLOOWM, J.C.; DELDAR, A.; STEVENS, C.; CHAN, T.C.K. Effets of doxorubicin on the canine erythroide and myeloid progenitor cells and bone marrow microenviment. **Comparative Haematology International**, v.3, n.2, p.96-101, 1993.

REINE, N. J.; LANGSTON, C. E. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. **Clinical Thechniques in Small Animal Practice**, v. 20, p. 2-10, 2010.

RODASKI, S.; DE NARDI, R.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: Editora Maio, 2004, 307 p.

ROOK, M.; LELY, A.T.; KRAMER, A.B.; VAN GOOR, H.; NAVIS, G. Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin-induced renal damage. **Nephrology dialysis transplantation**, v.20, n.1, p. 59-64,2005.

ROSA, B.T.; CAMPOS, C.P.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; DALLA PALMA, G.; MARTINS,I.S.; FERREIRA, M.M.G.; AVANTE, M.L. Urinálise na medicina veterinária. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.11, 2008.

SACCO, G.; BIGIONI, M.; EVANGELISTA, S.; GOSO, C; MANZINI, S.; MAGGI, C.A. Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme

inhibitor, on doxorubicin- induced cardiotoxicity in the rat. **European journal of pharmacology**, v.414, n.1, p.71-78, 2001.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A.; NAKAGE, A.P.M.; . SANTANA, A.E; CANOLA, J.C. Cardiovascular, hematological and biochemical effects of chronic experimental treatment with doxorubicin in dogs. **Ars veterinária**, v.20, n.2, p. 185-194, 2004.

SILVA, C. E. V.; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 57, n.3, p. 300-306, 2005.

SIMÃO, D.A.S; LIMA, E..D.R.P.; SOUZA, R.S.; FARIA, T.V.; AZEVEDO, G.F. Hand-foot syndrome induced by chemotherapy: a case study. **Revista Brasileira de Enfermagem** , v.65, n.2, p. 374-378, 2012.

SMYTH, R.D.; HOTTENDORF, G.H. Application of pharmacokinetics and biopharmaceutics in the design of toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.52, n.2, p.179-195, 1980.

SORENMO, K.U.; BAEZ, J.L.; CLIFFORD, C.A.; MAULDIN, E.; OVERLEY, B.; SKORUPSKI, K.; BACHMAN, R.; SAMLUK, M.; SHOFER, F. Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 18, v.2, p. 209-213, 2004.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A.B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; BACILA, M. A survey on the incidence and the therapeutic procedures of the canine transmissible venereal tumor, the sticker's lymphosarcoma. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.41-48, 2000.

SOUZA, M.G.; PAULINO-JUNIOR, D.; PASCON, J. P. E.; PEREIRA NETO, G. B.; CARARETO, R.; CAMACHO, A. A. Assesment of the TEI index of myocardial performance in dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, p. 53-58, 2014.

SOUZA, R. C. A.; CAMACHO, A. A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n.8, p. 1319-1325, 2006.

SOLOMON, R.; GABIZON, A.A. Clinical pharmacology of liposomal anthracycline: focus on pegylated liposomal doxorubicin. **Clinical Lymphoma & Myeloma**, v.8, n.1, p.21-32, 2008.

STOCKMAM, S. L.; SCHOTT, M. A. Ed. Guanabara Koogan. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária** . Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 729 p, 2012.

SUSANECK, S. J. Doxorubicin therapy in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.182, n.1, p. 70-72, 1983.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal Pharmacy and Pharmacol**, v.65, n.2, p.157-170, 2013.

TAGLIAFERRI, P.; CARAGLIA, M.; BUDILLON, A.; MARRA, M.; VITALE, G.; VISCOMI, C.; MASCIARI, S.; TASSONE, P.; ABBRUZZESE, A.; VENUTA, S. New pharmacokinetic and pharmacodynamic tools for interferon-alpha (IFN-alpha) treatment of human cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, n.1, p.1-10, 2005.

THARWAT, M; AL-SOBAYIL, F.; AL-SOBAYIL, K.. The cardiac biomarkers troponin I and CK-MB in nonpregnant and pregnant goats, goats with normal birth, goats with prolonged birth, and goats with pregnancy toxemia. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1500-1507, 2012.

THAYER, W.S. Evaluation of tissue indicators of oxidative stress in rats treated chronically with adriamycin. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n.11, p. 2189-2194, 1988.

TIMOUR, Q.; NONY,P.; LANG, J.; LAKHAL, M.; TRILLET, V.; FAUCON, G. Doxorubicin concentrations in plasma and myocardium and their respective roles in cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.1, n.5, 559-560, 1988.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 34, p. 540-551.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Volume of distribution. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v.27, n.6, p. 441-453, 2004c.

TOZER, T.N; ROWLAND, M. (Ed.). Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica. **As bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.601.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.53, n.2, p.2063-208, 2002.

VAN EYK, J.E.; POWERS, F.; LAW,W.; LARUE, C.; HODGES, R.S.; SOLARO, J. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. **Circulation Research**, v.82, p.261-71, 1998.

VOLKOVA, M.; RUSSEL, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Current Cardiology Reviews**, v.4, n.7, p.214-220, 2011.

ZHANG, Y-M.; SHI, J.; LI, Y-J.; WEI, L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.57, n.6, p.435-445, 2009.

ZHENG, Z.; PAVLIDIS, P.; CHUA, S.; D'AGATI, V.D.; GHARAVI, A.G. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n.7, 1796-1800, 2006.

ZORAN, D.L.; RIEDESEL, D.H.; DYER, D.C. Pharmacokinetics of propofol in mixed breed dogs and greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.5, p.755-760, 1993.

WALLACE, K.B. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. **Cardiovascular toxicology**, v.7, n.2, p.101-7, 2007.

WANG, Y.; WANG, Y.P.; TAY, Y.C; HARRIS, D.C. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. **Kidney International**, v.58, n.4, p.1797-1804, 2000.

WARE, W. A. Distúrbios do Trato Urinário. In: NELSON R. W.; COUTO C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.575-81.

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

VII. ANEXOS

Anexo 1 -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: ASPECTOS TÓXICO-FARMACOLÓGICOS DA DOXORRUBICINA CONTIDA EM MICROEMULSÃO EM CÃES PORTADORES DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

Pesquisadora: Doutoranda Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara – SP.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara.

Pesquisadora: Mestranda Rafaela Bortolotti Viêra – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP – Jaboticabal – SP.

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi.

Responsável clínico: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa/ Unesp – Jaboticabal – SP.

Observações: Projeto Integrado da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, UNESP e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

Objetivo da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo avaliar se a nova formulação de doxorubicina terá o mesmo efeito antitumoral da doxorubicina já utilizada na terapêutica sem causar efeitos danosos sobre o coração.

Este produto foi estudado em camundongos e ratos de laboratório e mostrou, nesses modelos animais, ter eficácia antitumoral sem o aparecimento de danos ao coração.

Justificativa: O dano sobre o coração é o principal efeito tóxico da doxorubicina, o que restringe seu uso no tratamento de tumores. Com o objetivo de minimizar este efeito, foi desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP uma nova formulação contendo doxorubicina.

O presente estudo pretende avaliar a eficácia antitumoral do novo produto em casos de Tumor Venéreo Transmissível de cães assim como verificar se há ocorrência de efeitos tóxicos sobre o coração, o que frequentemente ocorre com a formulação atualmente utilizada na terapêutica após uso cíclico do produto.

Procedimento: Os pacientes serão divididos em 2 grupos (cada grupo com 10 animais): um grupo receberá doxorubicina na forma comercial já disponível no mercado e o segundo receberá a nova formulação de doxorubicina. Os animais receberão as formulações por infusão

continua lenta durante 30 minutos, com intervalo de 21 dias para cada aplicação. Durante todo o período de tratamento do TVT serão realizadas coletas de sangue anteriormente à administração do fármaco e 10 dias após cada sessão, repetindo o mesmo procedimento durante as 4 sessões. Serão obtidos os valores dos exames bioquímicos relacionados à função renal, função hepática e à cardiotoxicidade, além do hemograma completo.

Nesse período os animais serão mantidos no Hospital Veterinário-Unesp Jaboticabal para observação e receberão alimento de boa qualidade, sob os cuidados da equipe do projeto.

Transtornos ou riscos aos animais: A doxorrubicina é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica humana e veterinária, podendo atuar não somente nas células tumorais como nas células saudáveis, dessa forma mesmo com a nova formulação os animais poderão apresentar os efeitos tóxicos principalmente sobre o coração, assim como diminuição das células vermelhas e brancas do sangue.

Benefício: ao participar desta pesquisa os animais receberão tratamento com quimioterápico para a diminuição do tumor, sem custos para o proprietário, insenção dos custos de diagnósticos e exames antes e após a administração dos compostos. Estes animais serão mantidos em observação durante todo o período de tratamento, monitorado pela equipe veterinária sob a supervisão da Profa. Dra Mirela Tinucci Costa. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o comportamento do fármaco no organismo e sobre os efeitos tóxicos relacionados ao produto. Os pesquisadores se comprometerão a divulgar os resultados obtidos ao proprietário do animal incluído no estudo assim como se comprometem a manter sigilo sobre a identidade dos proprietários.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Declaro que em/...../2013 concordei voluntariamente com a participação de meu cão, RGHV nº....., no projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes pelo pesquisador responsável que:

- O estudo implica que meu animal será submetido a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, cujos eventuais riscos me foram explicados;
- O animal ficará internado no Hospital Veterinário durante todo o período de tratamento;

- O medicamento utilizado - doxorrubicina - poderá produzir efeitos tóxicos ao músculo cardíaco e danos graves à medula óssea que causarão extensa diminuição das células sanguíneas.

- O animal poderá apresentar diarreia, vômito, colite hemorrágica, necrose perivascular, alopecia, nefrotoxicidade e reações anafiláticas.

- A nova formulação tende a apresentar diminuição dos efeitos tóxicos em comparação com a formulação comercial, entretanto a nova formulação está em fase de teste clínico, podendo apresentar efeitos tóxicos ainda não relatados. Todavia, se o animal vier a óbito agudamente, sem demonstrar alterações clínicas detectáveis, autorizo meu animal a passar por exame necroscópico.

- Meu animal não é obrigado a continuar participando do projeto e ele poderá, a qualquer momento, ser excluído da pesquisa por minha decisão, sem que isso impeça-o de receber o tratamento convencional.

- A pesquisa não será feita se houver risco para o meu animal. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, os pesquisadores se comprometem a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato a participação do animal como paciente.

Assim declaro que fui informado (a) sobre todos os procedimentos que meu animal irá receber durante a pesquisa, de forma clara e objetiva e todas as informações serão mantidas em sigilo.

Declaro que fui informado que posso retirar o(s) animal(is) a qualquer momento do estudo.

Nome por extenso do proprietário do animal:

Assinatura: _____

RG: _____

Nome por extenso do pesquisador responsável:

Assinatura: _____

RG: _____

Nome por extenso do médico veterinário, carimbo ou nome legível com CRMV

Assinatura: _____

RG: _____

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Telefone dos pesquisadores responsáveis:

Juliana Uruguay C. V. Assumpção - (16) 3301-6989 e (16) 9734-2058

Rafaela Bortolotti Viéra - (16) 9394-5176

Jaboticabal, 28 de Junho de 2013.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 025175/12 do trabalho de pesquisa intitulado "Aspectos tóxico-farmacológico da doxorrubicina contida em microemulsão em cães portadores de Tumor Venéreo Transmissível", sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de novembro de 2012.

Jaboticabal, 08 de novembro de 2012.


Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Av. da Adulção Prof. Paulo Donato Castellani, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel: (16) 3208-3900 - Fax: (16) 3202-4275 - www.fav.unesp.br

Anexo 3- Parâmetros farmacocinéticos

Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial em cães 30 mg/m², obtidos após administração por infusão contínua, (n=10 para M1).

Parâmetros	A1G1	A2G1	A3G1	A4G1	A5G1	A6G1	A7G1	A8G1	A9G1	A10G1	Média
Kel (min-1)	0,0006	0,0005	0,00013	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0008
Meia vida (h)	19,25	23,1	8,9	12,83	57,75	115,5	28,87	15,61	16,5	8,19	30,65
Vd (L)	2984,72	6978,36	25837,6	1934,39	2336,67	2581,98	6501,43	5837,5	5837,5	12491,83	7332,2
Vd (L/Kg)	284,26	459,1	1291,89	1291,89	519,26	379,7	928,77	711,89	1277,96	489,87	763,46
Cl (L/min/Kg)	0,17	0,3	1,68	0,16	0,1	0,08	0,38	0,527	0,9	0,691	0,5
Cl (mL/min/Kg)	170,56	229,55	1679,44	161,2	103,85	75,94	371,51	526,8	894,57	690,72	490,41

Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial em cães 30 mg/m², obtidos após administração por infusão contínua, (n=8 para M3).

Parâmetros	A1G1	A2G1	A3G1	A4G1	A5G1	A7G1	A8G1	A9G1	Média
Kel (min-1)	0,0002	0,0006	0,0008	0,0007	0,0033	0,0008	0,0005	0,00243	0,0012
Meia vida (h)	57,75	19,25	14,45	16,04	3,5	14,43	23,1	4,75	19,16
Vd (L)	4097,42	3714,37	4127,66	4900,4	438756	782,02	6869,98	8993,95	59030,24
Vd (L/Kg)	388,52	244,37	206,28	490,04	438,77	11,72	837,80	562,12	397,45
Cl (L/min/Kg)	0,078	0,15	0,165	0,35	43,88	0,09	0,42	1,36	5,81
Cl (mL/min/Kg)	77,70	146,70	165,11	352,83	0,15	89,38	418,9	1365	326,96