

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL CARDIOTOXICIDADE AGUDA DE  
NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS EM RATOS POR ADMINISTRAÇÃO  
INTRAVENOSA**

**RAFAEL FRACASSO**

**Porto Alegre, 2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação da potencial cardiotoxicidade aguda de nanocápsulas  
biodegradáveis em ratos por administração intravenosa**

Dissertação apresentada por **Rafael Fracasso**,  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 27 de abril de 2015, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ruy Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Kuze Rates

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Dallegrove

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

#### CIP - Catalogação na Publicação

Fracasso, Rafael  
Avaliação da potencial cardiotoxicidade aguda de nanocápsulas biodegradáveis em ratos por administração intravenosa / Rafael Fracasso. -- 2015. 95 f.

Orientador: Solainge Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nanotoxicologia. 2. Cardiotoxicidade. 3. Nanocápsulas poliméricas. 4. ECG. 5. Ecocardiograma. I. Garcia, Solainge Cristina, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr. Solange Cristina Garcia no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo projeto FIPE 13.0279. Rafael Fracasso recebeu bolsa de mestrado CAPES.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelos desafios, pela força e perseverança para vencer os obstáculos.

Agradecimento especial à minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia, que ao longo destes 4 anos sempre foi fonte de inspiração e força para desenvolver a ciência e promover a segurança toxicológica de forma humana e para a população que precisa de nossa inovação e conhecimento. Agradeço pela confiança e paciência empregada em mim em um projeto audacioso e inovador que é a nanotoxicologia. Como orientando, pretendo levar em minha jornada profissional sua ideologia e ensinamentos, a fim de sempre promover a ciência e ajudar as pessoas.

À minha Família

- Minha mãe Marli Gubert Fracasso, por ser meu porto seguro e por sempre estar comigo me dando amor e palavras de incentivo, e principalmente pela formação que certamente me trouxe até aqui nesta conquista.
- Meu irmão Cristiano Fracasso, por sempre ser meu parceiro em todos os momentos da vida e sempre desejar e fazer o possível para o meu bem.
- Meu Pai Gilson Antônio Fracasso (*in memoriam*), pelos ensinamentos de humildade e pelo amor sempre presentes.
- Minhas tias Keli, Rejane e Zelci, meus Tios Paulo, Gelson e Elciomar, meus primos Felipe, Eloise, Carine, Aline, André e Vitor, Meus nonos Angelino, Relinda Fracasso e Belmiro e Lezira Gubert, por sempre serem fonte de amor, aconchego e confiança e por serem exemplos da certeza de bons frutos de um trabalho bem feito.

À família LATOX

-Solange Cristina Garcia, Anelise Barth, Gabriela Göethel, Sabrina Nascimento, Mariele Feiffer Charão, Marília Baierle, Elisa Sauer, Bruna Gauer, Rachel Bulcão, Fernando Araujo Freitas, Natália Brucker, Angela Moro, Guilherme Bubols, Johanna Slaski, Louise Altknecht, Caroline Souto, Ingrid Flesch, Bárbara da costa, Gustavo Goelzer, Juliano Durgante, Yuri Monteiro, Bruna Ortmann, por serem mais que colegas e sim minha família científica e amigos para todos os momentos.

Ao Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a administração de Fármacos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial à Karina Paese e Cecilia Michalowski pela formulação das NPs, ajuda científica e amizade.

Aos amigos

-Elias Galvan de Lima, Cristiane Boaretto, Gustavo Machado, Ariel Billig, Adriano Lenz e Cecília Michalowski, por estarem sempre presentes na minha vida, pelo apoio, amizade.

A equipe da Unidade de experimentação animal e HCPA, as veterinárias Tuane Garcez e Fabiola Schons Meyer, enfermeira Marta Giotti Cioato, Michael Andrades e Virgilio, pela ajuda técnica e amizade

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida, à FAPERGS, CNPq, ao Fundo de incentivo a pesquisa e eventos (FIPE-HCPA), à Unidade de Experimentação animal do HCPA, aos Laboratórios de Toxicologia (LATOX) e de Nanotecnologia, presentes durante os experimentos e na elaboração da presente dissertação.



## RESUMO

O crescimento acelerado da nanotecnologia contribuiu para o surgimento de uma nova área do conhecimento que é nanotoxicologia, a qual tem estudado a segurança de nanomateriais. Por outro lado, sabe-se que entre 1998 e 2008, a principal razão para retirada de medicamentos do mercado foi cardiotoxicidade. Adicionalmente, as nanocápsulas poliméricas biodegradáveis vêm sendo demonstradas como potenciais carreadores de fármacos para tratamento de várias doenças. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a potencial cardiotoxicidade de nanocápsulas biodegradáveis de núcleo lipídico (LNC) de poli ( $\epsilon$ -caprolactona). As nanocápsulas foram caracterizadas e a avaliação toxicológica aguda foi realizada utilizando ratos Wistar machos divididos em cinco grupos (n=8-9) recebendo  $28,7 \times 10^{12}$ ;  $57,5 \times 10^{12}$  e  $115 \times 10^{12}$  de LNCs por mililitro com fluxo 2 mL/h. A pressão sanguínea foi avaliada por pletismografia caudal. As medidas eletrocardiográficas (ECG) e ecocardiográficas foram tomadas após anestesia dos ratos previamente ao tratamento e após 14 dias. O sangue foi coletado 24 horas após o tratamento através de punção do plexo retro-orbital. Do tratamento até o 14º dia os animais foram observados e pesados. No 14º foram anestesiados com isoflurano e sacrificados. O sangue total foi coletado para as análises laboratoriais. Durante os 14 dias de avaliação não foram observadas mortes. A pressão caudal pós-tratamento (24h e 14 dias) quando comparada ao pré-tratamento, nos diversos grupos aumentou significativamente, sugerindo poder estar relacionada ao volume infundido. Os níveis sanguíneos de marcadores de dano periférico e o hemograma demonstraram estar dentro dos valores de referência estabelecidos para ratos, exceto o grupo LNC-3, que demonstrou alterações significativas. O ECG e o ecocardiograma não apresentaram alterações significativas para cardiotoxicidade na avaliação do intervalo QT e fração de ejeção. Adicionalmente, não foram observadas alterações nos cortes histopatológicos cardíacos. Assim, a avaliação aguda por infusão intravenosa lenta demonstrou, através dos seus resultados, potencial segurança para efeitos cardiotóxicos.

**Palavras-chave:** nanotoxicologia, nanocápsulas poliméricas, cardiotoxicidade



## ABSTRACT

The rapid growth of nanotechnology has contributed to the creation of the new area of knowledge represented by nanotoxicology, which aims to study the safety of nanomaterials, especially towards human exposures. Besides, from 1998 to 2008 the main reasons for withdrawal of drugs from market were cardiotoxicity. In addition, biodegradable polymeric nanocapsules have been indicated as potential drug carriers applicable to treating several pathologies. Therefore, the objective of this study is to evaluate the potential cardiotoxicity of biodegradable lipid-core nanocapsules (LNC) containing poly ( $\epsilon$ -caprolactone). Nanocapsules were characterized and the acute toxicity evaluation was conducted with 5 groups of male Wistar rats (n=8-9) treated doses:  $28.7 \times 10^{12}$ ,  $57.5 \times 10^{12}$ , and  $115 \times 10^{12}$  LNC per milliliter at 2 mL/h flow. Blood pressure measures were performed by caudal plethysmography. The electrocardiographical (ECG) and ecocardiographical analyses were carried out in rats after anesthesia previously to treatment and after 14 days. Blood was collected 24 hours after treatments by retro-orbital plexus puncture. From treatment until the 14th day, animals were observed and weighed. At day 14, animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed. Whole blood were collected for laboratorial analyses. During the evaluation period, no deaths and weight loss were observed. Post-treatment systolic pressures (24h and 14 days) were significantly increased in comparison to pre-treatment in both control groups and treated groups, suggested as a possible consequence of the infused volume. Peripheral damage markers and hemograms were within reference values established for rats, excepted LNC-3 group that had significant alterations. ECG and echocardiogram showed no indications of cardiotoxicity at QT interval and ejection fraction assessment. Additionally, cardiac histopathology also demonstrated no alterations. Therefore, the present results of the acute evaluation after slow intravenous infusion showed potential safety once no cardiotoxic effects by ECG, ecocardiography, arterial pressure, biochemical and histopathological analyses were found.

**Keywords:** nanotoxicology, polymeric nanocapsules, cardiotoxicity.



## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de uma publicação a ser submetida à revista Toxicology Research e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão da Literatura, Artigo presente no Capítulo I, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências e Anexos.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências pertinentes à publicação específica encontram-se dentro do Capítulo I.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Semelhanças anatômicas e eletrofisiológicas de roedores ao coração humano.....	35
<b>Figura 2:</b> Arritmia torsade de pointes .....	36
<b>Figura 3:</b> Estudos clínicos em nanomedicina cadastrados no Instituto Americano de Saúde.....	64





## LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransaminase
ALP	Fosfatase alcalina
CkMB	Isoenzima MB da creatina quinase
cTnl	Troponina I
DDVE	Diametro Diatólico do Ventriculo Esquerdo
ECG	Eletrocardiograma
EPA	United States Environmental Protection Agency
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutationa reduzida
HE	Hematoxicilina e eosina
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LNC	Nanocapsulas de núcleo lipidico
LVEF	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
PI	Coloração Picro Sirius
NPs	Nanopartículas
NCs	Nanocápsulas
NIH	<i>U.S. National Institutes os Health</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NTCPU	Nanotubos de Carbono de Parede Única
LDH	Lactato desidrogenase
LNC	Nanocápsulas de núcleo lipídico
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos.....	27
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
1. Nanotecnologia, nanotoxicologia e cardiotoxicidade.....	31
2. Cardiotoxicidade de nanopartículas.....	40
<b>CAPÍTULO 1: Artigo</b> .....	<b>45</b>
Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable nanocapsules in rats by intravenous infusion	
<b>DICUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>61</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>91</b>







A nanotecnologia vem crescendo de forma acelerada nos últimos quarenta anos, devido às suas múltiplas aplicações e envolvimento multidisciplinar de diversas áreas do conhecimento (Devalapally, Chakilam e Amiji, 2007). Dentro deste cenário, o Brasil é um grande produtor de conhecimento científico e inovação em nanotecnologia (Kay e Shapira, 2011).

Juntamente com os avanços promissores na nanomedicina, a nanotoxicologia representa uma ciência emergente, uma vez que se propõe a garantir a segurança dos materiais nanoestruturados tanto para os seres humanos quanto ao meio ambiente (Durán, Guterres e Alves, 2014). As nanopartículas (NPs) possuem características físico-químicas distintas das substâncias químicas classicamente estudadas, necessitando de um olhar diferenciado, levando em consideração as individualidades de cada tipo de NPs (Warheit, 2008). Neste sentido, o estudo toxicológico das NPs é uma etapa importante para o uso seguro na saúde humana. Para tanto, são necessários estudos pré-clínicos com atenção especial aos órgãos e alvos suscetíveis aos efeitos, para a partir, destas informações, poder se melhorar a tecnologia deste nanomaterial a fim de se obter NPs seguras para o uso humano (Oberdörster, Stone e Donaldson, 2007).

Na área farmacêutica, as NPs vêm demonstrando vantagens importantes para o transporte de fármacos devido às suas características físico-químicas. Nesse sentido, as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) têm se mostrado promissoras por possuírem características físico-químicas que permitem a liberação lenta de fármacos encapsulados, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Fontana *et al.*, 2009; Venturini *et al.*, 2011). Recentes estudos nanotoxicológicos *in vivo* agudo e subcrônico com nanocápsulas (NCs) de poli-ε-caprolactona têm demonstrado a segurança do uso dessas LNC pelas vias intraperitoneal e intradérmica (Bulcão *et al.*, 2013; Bulcão *et al.*, 2014), possibilitando investigações mais específicas de segurança para o uso em humanos, tais como a avaliação de cardiotoxicidade.





**OBJETIVOS**

---



## **1. Objetivo geral**

Avaliar os potenciais efeitos agudos de cardiotoxicidade das nanocápsulas biodegradáveis de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em ratos através de administração intravenosa lenta.

## **2. Objetivos específicos**

- ❖ Avaliar sinais e sintomas da intoxicação aguda por administração i.v. de nanocápsulas de núcleo lipídico de poli-( $\epsilon$ -caprolactona);
- ❖ Avaliar potenciais alterações eletrofisiológicas;
- ❖ Avaliar a função cardíaca;
- ❖ Avaliar a pressão sanguínea arterial;
- ❖ Avaliar as alterações cardíacas macroscópicas e microscópicas;
- ❖ Avaliar marcadores periféricos de dano cardíaco.



**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 1. Nanotecnologia, nanotoxicologia e cardiotoxicidade

Essencialmente, o conceito de nanotecnologia pode ser definido como a tecnologia utilizada para a criação e manipulação de materiais na escala de 1 a 100 nm (Initiative, 2001; Iso.229, 2012). Trata-se da manipulação de materiais em tamanhos moleculares para o desenvolvimento de novas partículas, que podem ter diâmetro entre 100 e 500 nm de acordo com os constituintes presentes na formulação (Arora, Rajwade e Paknikar, 2012). A nanotecnologia engloba diversas áreas do conhecimento como física, química, matemática, biologia e suas especialidades, como engenharia, medicina e farmácia (Devalapally, Chakilam e Amiji, 2007; Porter e Youtie, 2009). Esta nova tecnologia vem ganhando destaque no século 21 devido às suas inúmeras aplicações (Jones, 2011; Pearce, 2012). Atualmente, diversos materiais contendo nanotecnologia estão presentes em produtos de consumo, tais como fibras de carbono em automóveis, microcondutores em microchips, contrastes em exames por imagem, tintas anti-mofo, aditivos para combustíveis, coletes à prova de balas, janelas auto limpantes, painéis antiaderentes, aditivos alimentares, desinfetantes, entre outros (O'connell, 2006; Iso.229, 2012).

Normalmente, nanopartículas (NPs) têm tamanhos que variam entre 10 e 1000 nm (Soppimath *et al.*, 2001), podendo estar presentes no ambiente provenientes da poluição, ou serem manufaturadas, isto é, serem criadas pelo homem (Xia *et al.*, 2006), possuindo tamanhos e características físico-químicas diversas (Oberdörster, Stone e Donaldson, 2007). Nanomateriais têm sido usados na engenharia de tecidos, tais como os nanotubos de carbono, para o diagnóstico por imagem através do uso de NPs metálicas, bem como para o carreamento de fármacos, utilizando NPs poliméricas (Soppimath *et al.*, 2001; O'connell, 2006).

De acordo com Owens e Peppas (2006), o carreamento de fármacos utilizando NPs pode revolucionar o tratamento de doenças, tendo como vantagem o carreamento de fármacos ao sítio de ação almejado, liberação controlada do fármaco, diminuição de doses, diminuição da frequência de administrações, diminuição da toxicidade sistêmica e carreamento de fármacos com alto potencial terapêutico (Hans e Lowman, 2002; Kingsley *et al.*, 2006; Owens e Peppas, 2006; Rawat *et al.*, 2006). As NPs poliméricas podem ser compostas de polímeros como

ácido poli-D,L-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA), ácido poliláctico (PLA) e poli-ε-caprolactona (PCL) (Soppimath *et al.*, 2001; Rawat *et al.*, 2006).

As NCs possuem um polímero em conjunto com um surfactante em sua superfície, como o monosterato de sorbitano. O núcleo é composto por uma dispersão de um lipídeo sólido como um tensoativo de baixo peso molecular, como o polissorbato 80, e um lipídeo líquido. O fármaco fica retido no interior das LNC, sendo liberado controladamente (Soppimath *et al.*, 2001). O polímero poli-(ε-caprolactona) possui boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo que sua degradação ocorre por hidrólise (Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010; Venturini *et al.*, 2011). As LNC têm se mostrado promissoras no carreamento de fármacos (Venturini *et al.*, 2011; Ganta *et al.*, 2014).

Estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* utilizando NCs poliméricas vêm demonstrando vantagens como a diminuição da toxicidade de fármacos com índice terapêutico estreito, como os quimioterápicos (Jain *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013) e melhora dos efeitos terapêuticos de fármacos possibilitando o uso de menores doses (Haas *et al.*, 2009; Dimer *et al.*, 2014; Friedrich *et al.*, 2014) e consequentemente menores efeitos adversos. Além disso, foram observados efeitos cardiotoxicos reduzidos *in vivo* após administração de halofantrina associado à nanocápsulas de PCL, havendo menor aumento do intervalo QT por halofantrina e aumento da DL50 em ratos Wistar machos (Leite *et al.*, 2007). Da mesma forma, a diminuição dos efeitos cardiotoxicos, como alteração do ECG, de marcadores periféricos como a lactato desidrogenase, troponina I, CkMB e das alterações histopatológicas, como os achados de degeneração dos miócitos, miocardite, fibrose e necrose da fibra muscular foi observada em resposta ao uso da Doxorubicina nanoencapsulada em NCs poliméricas em comparação a Doxorubicina livre (Injac e Strukelj, 2008; Cai *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2011; Kaminskas *et al.*, 2012).

Para a Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (EPA), somente NPs manufaturadas são consideradas nanopartículas de estudo nanotecnológico, e posteriormente de interesse nanotoxicológico para estudos sobre impactos saúde humana e meio ambiente. NPs oriundas do ambiente, tais como poeira, resíduos da queima de combustíveis fósseis, vírus, entre outras, não são incluídas (Morris, Willis e Gallagher, 2007; Epa, 2008). A nanotecnologia é um desafio para a avaliação toxicológica. Nesse aspecto, a *International Organization for Standardization* (ISO)



cita a falta de padrões e ferramentas para a exposição e entrega de NPs necessários para garantir a segurança à saúde e meio ambiente, bem como a falta de regulamentação e ética na nanotecnologia (ISO/299).

A nanotoxicologia é uma ciência emergente, oriunda da necessidade do conhecimento das interações de NPs com os sistemas biológicos (Durán, Guterres e Alves, 2014). As NPs possuem características físico-químicas distintas das substâncias químicas classicamente estudadas, sendo necessária a atenção às individualidades de cada tipo de NPs (Warheit, 2008). O estudo toxicológico das NPs é uma etapa fundamental para a o uso seguro na saúde humana. Para tanto, são necessários estudos pré-clínicos com atenção especial aos órgãos e alvos suscetíveis aos efeitos para, a partir destas informações, poder se melhorar a tecnologia deste nanomaterial a fim de se obter NPs seguras para o uso humano (Oberdörster, Stone e Donaldson, 2007).

Segundo o documento (FDA-2010-D-0530) do departamento de segurança americano *Food and Drug Administration* (FDA), as metodologias atuais para assegurar a segurança de substâncias químicas devem ser utilizadas para classificar a segurança de nanomateriais. Porém, a aplicação da nanotecnologia pode resultar em atributos ao produto que diferem dos produtos fabricados convencionalmente, merecendo metodologias de investigações clássicas, modificadas ou novas (Guidance, 2011). Além disso, diversos grupos de estudos em nanotoxicologia consideram de extrema importância a observação das características físico-químicas e sua interação com as metodologias atuais de avaliação de toxicidade, a fim de se evitar o erro científico (Warheit, 2008).

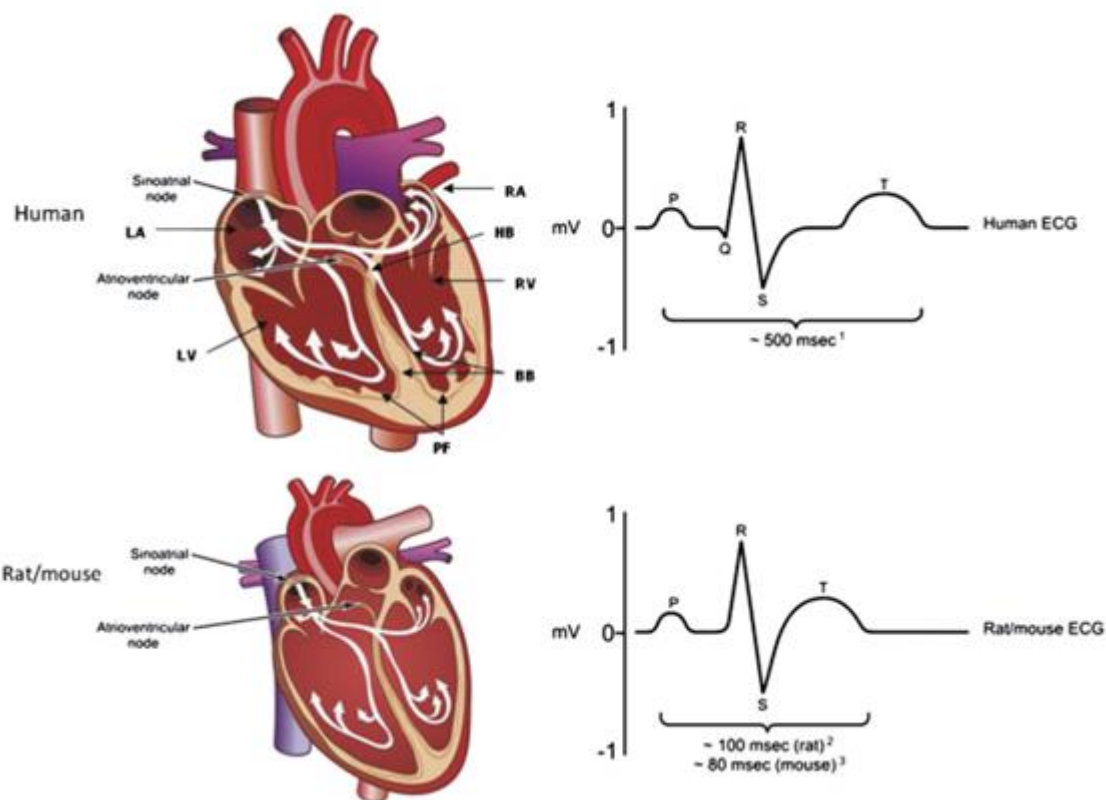
As NPs se diferenciam da maior parte das moléculas químicas classicamente estudadas pelas atuais metodologias toxicológicas, sendo que seus mecanismos toxicológicos estão ligados às suas características físico-químicas e moleculares inerentes à partícula como o tamanho, forma, propriedades de superfície e solubilidade (Donaldson e Poland, 2013; Fu *et al.*, 2014).

A *Organization for Economic Cooperation and Development* (Oecd), em suas diretrizes para testes de nanomateriais, recomenda a completa caracterização das NPs, com atenção para a interação das NPs com objetos utilizados durante o experimento e a primordialidade do bem estar dos animais durante e após a administração das NPs (Oecd, 2012).

LNCs poliméricas vem se mostrando seguras em estudos *in vivo*, após administrações agudas e sub-crônicas (25-28 dias) em diversas vias de administração, não sendo atribuídas a elas alterações toxicológicas severas. Ademais, há relatos de alterações na massa relativa corporal, alterações morfológicas nos órgãos e morfopatológicas no coração após administração de micelas de monometoxi(poli(etilenoglicol) poli( $\epsilon$ -caprolactona), achado histopatológico de processo granulomatoso ao corpo estranho com LNCs de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em roedores e malformações na medula espinal, edema no pericárdio e alterações no embrião em peixes nas maiores doses toxicológicas de estudo (Garcia *et al.*, 2014).

Estudos toxicológicos pré-clínicos *in vivo* são essenciais para garantir a segurança de substâncias químicas, fornecendo informações sobre dose letal, metabolismo, excreção, acumulação e dados de toxicidade (Oecd, 2010). Inicialmente, recomenda-se o estudo de toxicidade com dose aguda, que fornece referências para a escolha de doses nos estudos subcrônicos e crônicos com doses repetidas, e proporciona a identificação preliminar de órgãos alvos de toxicidade. Além disso, os resultados obtidos podem servir para a determinação da *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) (Fda, 1996; Parasuraman, 2011). Normalmente, os testes toxicológicos *in vivo* avaliam eventos adversos específicos, tais como a cardiotoxicidade e a carcionogênese (Parasuraman, 2011).

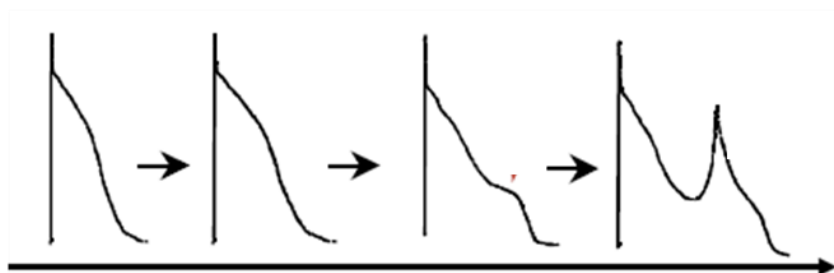
Substâncias cardiotoxícas podem promover alterações eletrofisiológicas no coração, sendo o ECG o registro temporal destas mudanças elétricas. Na toxicologia, o ECG é uma ferramenta importante para triagem de anormalidades cardíacas e para identificar alterações cardíacas inerentes a metodologia experimental, como o efeito de anestésicos (Poole e Leslie, 1989). Entre os mamíferos, existe boa correlação inter-espécies entre as ondas do ECG sendo modelos fidedignos para a avaliação de cardiotoxicidade comparada (Figura 1) (Gad, 2014). A frequência cardíaca está ligada ao aumento ou diminuição do tempo dos intervalos, sendo recomendado que o intervalo QT seja avaliado com sua correção pela frequência cardíaca (QTc) (Luo *et al.*, 2004; Farraj, Hazari e Cascio, 2011).



**Figura 1:** Semelhanças anatômicas e eletrofisiológicas de roedores ao coração humano (Farraj, Hazari e Cascio, 2011).

O uso do ECG para avaliação toxicológica fornece dados sobre a alteração de frequência cardíaca, deformações de onda, alterações súbitas na repolarização ventricular, alterações no intervalo QT e arritmias (Poole e Leslie, 1989; Kalil Filho *et al.*, 2011). As alterações temporais do intervalo e condução elétrica estão ligados a presença de eventos isquêmicos, disfunções em canais iônicos e repolarização heterogênia (Farraj, Hazari e Cascio, 2011). As alterações no intervalo QT predizem um tipo de arritmia polimórfica associada à morte súbita. Esta arritmia é denominada Torsade de Pointes (Figura 2), e está relacionada a alterações na repolarização do ventrículo esquerdo, sendo utilizada como prerrogativa para retirada de medicamentos do mercado (Wood e Roden, 2004; Gad, 2014). O ritmo do ECG mostra as mudanças da frequência cardíaca e irregularidades no ritmo dos batimentos, estas alterações tem repercussão na hemodinâmica que influencia em processos de consolidação de danos (Farraj, Hazari e Cascio, 2011). A Variabilidade da frequência cardíaca tem como significado clínico a alteração do balanço autônomo simpático e para simpático do coração (Farraj, Hazari e Cascio, 2011).

Alterações na onda P indicam alterações na despolarização atrial, como no crescimento da câmara e arritmia atrial (Hampton, 2013). Além disso, alterações na despolarização ventricular, identificadas por um atraso no complexo QRS, podem representar hipertrofia e bloqueio da condução elétrica (Pelliccia, Di Paolo e Maron, 2002; Feldman e Goldwasser, 2004; Hampton, 2013).



**Figura 2:** Arritmia torsade de pointes. Alteração da despolarização ventricular provocada pelo aumento do intervalo QT. (Wood e Roden, 2004)

Vários são os motivos pelos quais os fármacos podem exercer cardiotoxicidade, por exemplo, citotoxicidade à célula cardíaca, desenvolvimento de fibrose e alterações na condução elétrica (Reagan *et al.*, 2013). Estas alterações podem ser mediadas através da interação de fármacos com canais e receptores celulares do tecido cardíaco, como na inibição de canais de sódio, inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem, inibição de canais rápidos de potássio, bloqueio da bomba sódio potássio ATPase e bloqueio de receptores do sistema autônomo, como os receptores beta adrenérgicos a receptores hormonais, pela ação agonista alfa 2-adrenergica (Wood e Roden, 2004; Force, Krause e Van Etten, 2007; Lionte, Bologna e Sorodoc, 2012). Além disso, a ligação a canais de potássio por NPs de ouro *in vitro* já foi relatada (Leifert *et al.*, 2013; Chin, 2014). Esta potencial alteração sobre os receptores de canais iônicos demonstra a importância da avaliação elétrica cardíaca.

O acompanhamento da pressão arterial pode ser necessário durante o estudo toxicológico, porém, o comportamento da pressão arterial é bastante dinâmico (Gad, 2014). Alterações na frequência cardíaca, estresse, atividade locomotora, ciclo circadiano e temperatura interferem na aferição da pressão (Irvine, White e Chan, 1997). Ademais a pressão arterial sofre influência do sistema autônomo e pode ser definida pela fórmula: Pressão arterial = Débito cardíaco x resistência vascular

periférica, onde o débito cardíaco é influenciado pela frequência cardíaca e pelo volume sistólico (Guyton *et al.*, 2006). O aumento da pressão sanguínea aumenta o trabalho cardíaco e, cronicamente, essa sobrecarga causa remodelamento por dilatação de câmaras e hipertrofia (Mill e Vassallo, 2001). A ação sobre os receptores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, receptores alfa e beta adrenérgicos, receptores nicotínicos e receptores colinérgicos promovem alteração na pressão arterial, que também pode estar aumentada como reflexo de danos renais e pulmonares e transtornos endócrinos (Rang *et al.*, 2012).

A medida da pressão caudal com o animal desperto tem como vantagem a aferição mais próxima da realidade, com possibilidade de múltiplas medidas em tempo real por método não invasivo, porém, por outro lado, exige a ambientação dos animais e um rígido controle nas variantes ambientais para obter resultados factíveis (Krege *et al.*, 1995; Irvine, White e Chan, 1997). Também existem métodos de medida de pressão direta arterial, os quais são invasivos e requerem anestesia.

Em estudos toxicológicos, alterações ecocardiográficas são marcadoras de alterações, principalmente estruturais, sendo possível quantificar o remodelamento do músculo cardíaco de forma não invasiva (Tan e Scherrer-Crosbie, 2012). Alterações de medidas de diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) são marcadores de remodelamento cardíaco com aumento de câmara (Gimenes *et al.*, 2015). A fração de ejeção é um marcador da função cardíaca e a sua diminuição pode estar associada a cardiotoxicidade por administração de antraciclina em pacientes em tratamento de câncer (Jassal *et al.*, 2009; Kalil Filho *et al.*, 2011). A diminuição da fração de ejeção é um dos critérios para a categorização da insuficiência cardíaca, pois está associada a incapacidade do coração em bombear de forma eficiente o sangue (Witteles e Telli, 2012).

A fração de encurtamento é também um marcador de desempenho cardíaco, representando a capacidade de mudança de diâmetro cardíaco da diástole para a sístole. A cardiotoxicidade induzida por fármacos cardiotóxicos é representada pela diminuição da função cardíaca (Kalil Filho *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014; Ozkanlar *et al.*, 2014; Polegato *et al.*, 2015). Além disso, diversos estudos evidenciaram a proteção da função cardíaca com o nanoencapsulamento da doxorubicina em NCs poliméricas (Injac e Strukelj, 2008; Park *et al.*, 2009; Cai *et al.*,

2010; Jain *et al.*, 2011; Kaminskas *et al.*, 2012; Pramanik *et al.*, 2012). Pode-se então, considerar a fração de encurtamento como um bom marcador para cardiotoxicidade induzida por fármacos.

Dentre os marcadores de dano periférico liberados à circulação após lesão ao tecido cardíaco, a troponina I (cTnI) destaca-se por ser uma proteína específica dos cardiomiócitos, sendo 13 vezes mais abundante no citoplasma do cardiomiócito do que a CkMB (Ajmal *et al.*, 2014), e por desempenhar importante função no controle da contração muscular (Guyton *et al.*, 2006). A cTnI é considerada um marcador padrão ouro para avaliação de cardiotoxicidade aguda (O'brien, 2008), uma vez que possui pico de liberação após 24 horas da lesão celular, podendo ser mensurada até sete dias após o pico (Greene e Harris, 2008). Sua liberação na corrente sanguínea ocorre em casos de danos reversíveis, irreversíveis ou alterações de membranas dos cardiomiócitos (Martins, 2009). Diversos estudos relatam a liberação de cTnI após eventos como inflamação tecidual do miocárdio, lesão mecânica direta, toxicidade por quimioterápicos, vasoconstrição coronária ou secundária a ação alfa-adrenérgica, hipotensão arterial, necrose e apoptose celular cardíaca, taquicardia, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca, ação de citocinas tóxicas, hipóxia cardíaca, alterações hemodinâmicas associadas a trombos, toxinas bacterianas, diminuição do volume de ejeção e da massa ventricular e isquemia (Martins, 2009).

A isoenzima MB da creatina quinase (CkMB) é uma enzima presente em tecidos com alta necessidade energética como no músculo cardíaco, sendo que no coração representa 20% da quantidade total da enzima creatina quinase. Quando há dano celular, o pico de concentração plasmática ocorre após 24 horas, podendo ser detectada até 3 dias após a lesão cardíaca como no caso de infarto (Thaler, 2008; Ajmal *et al.*, 2014; Bonow *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Ajmal *et al.*, 2015). A Mioglobina é uma proteína responsável pelo aporte de oxigênio no tecido muscular estriado, devido ao seu baixo peso molecular é o primeiro biomarcador de dano celular presente durante um infarto, podendo ser quantificado nas primeiras quatro horas, porém, possui pouca especificidade (Li *et al.*, 2014). A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática envolvida no metabolismo energético celular, liberada após o dano celular de membrana em processos de necrose e apoptose.

No entanto, pode ser encontrada em diversos órgãos e por isso é considerada um marcador cardíaco inespecífico (Ajmal *et al.*, 2014; Ajmal *et al.*, 2015).

A AST, por sua vez, está presente no fígado, coração, cérebro, músculo esquelético, rins e hemácias (Collinson, Garrison e Christenson, 2014). Após a lesão cardíaca, seu pico de concentração plasmática ocorre em 48 horas (Saad, Najjar e Al-Rikabi, 2001; Greene e Harris, 2008). Adicionalmente, a AST é considerada um marcador inespecífico para dano aos cardiomiócitos, porém, de relevância para avaliação da toxicidade sistêmica (Ajmal *et al.*, 2014).

Dentre os distúrbios eletrolíticos relacionados às alterações cardiovasculares, variações dos níveis de potássio estão associadas ao funcionamento cardíaco. A hipocalcemia é relacionada à morte súbita pela perda da função cardíaca com aumento do intervalo QT (Kjeldsen, 2010; Bielecka-Dabrowa *et al.*, 2012). Já o distúrbio de hipercalemia promove o encurtamento do intervalo PR e do intervalo QT, alongamento do QRS e onda T apiculada, que podem ser observados no ECG, com alteração da condução do estímulo elétrico sinoatrial, podendo levar ao desenvolvimento de arritmia (Parham *et al.*, 2006; Montague, Ouellette e Buller, 2008).

O aumento das concentrações de sódio, por sua vez, é relacionado ao aumento da pressão sanguínea, tendo como desfecho efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular, tais como o remodelamento cardíaco por hipertrofia com fibrose ventricular e fibrose perivascular das artérias coronárias, além de disfunção diastólica (Whelton *et al.*, 2012).

A análise histopatológica fornece dados importantes sobre a resposta celular tecidual à cardiotoxicidade, sendo que os achados são dependentes do tempo de resposta biológica ao agente estressor, podendo ser reversíveis ou não (Kalil Filho *et al.*, 2011; Kumar, 2011). Em resposta a cardiotoxicidade, podem ser observados fibrose perivascular e intersticial, congestão, hemorragia, infiltrado de leucócitos, vacuolização e degeneração nos miócitos (Bertinchant *et al.*, 2003; Abdelhalim, 2011).

Congestão no tecido cardíaco é consequência do aumento local de volume sanguíneo devido à alteração do fluxo sanguíneo tecidual, que resulta no acúmulo de hemácias e hemoglobina (Kumar, 2011). A cronificação da congestão tem por

consequência edema e isquemia tecidual, seguida de alteração tecidual por eventos de cicatrização (Kumar, 2011).

A fibrose perivascular ocorre quando há deposição de colágeno em vasos, tornando-os mais rígidos e diminuindo a capacidade de complacência, o que contribui para a isquemia (Frohlich, 2001). Já a fibrose intersticial ocorre quando há um aumento de colágeno entre os cardiomiócitos, sendo parte de um processo de remodelamento. Esta, por sua vez, promove a perda de função contrátil afetando o bombeamento sanguíneo, ocorrendo em resposta à morte celular, sobrecarga de pressão e após eventos isquêmicos na cardiomiopatia hipertrófica (Ismail *et al.*, 2012).

Outras alterações comuns são a presença de vacúolos intracelulares podendo indicar processos de autofagia de organelas celulares durante a necrose, atrofia muscular ou armazenamento de toxinas (Kumar, 2011). Adicionalmente, o aumento dos núcleos já foi relatado em processos onde os miócitos aumentam a produção proteica, como na fibrose e na hipertrofia (Kumar, 2011).

## **2. Cardiotoxicidade de nanopartículas**

Em um estudo com NPs de ouro foi demonstrado bioacumulação no tecido cardíaco, com uma relação especial ao tamanho inferior a 50 nm, após infusão intravenosa (De Jong *et al.*, 2008). Em outro estudo, foram observados danos após 3 e 7 dias de administração intraperitoneal de 50 µL de suspensão contendo NPs, sendo observada desordem no músculo cardíaco, com infiltrado de células inflamatórias crônicas com pequenos linfócitos, regiões hemorrágicas com extravasamento de hemácias, vacuolização citoplasmática, vasos sanguíneos dilatados e congestão. Esses desarranjos citoplasmáticos representam a incapacidade dos cardiomiócitos em compensar o dano oxidativo gerado pelas NPs. Além disso, o dano foi proporcional ao maior número de administrações e pelo menor tamanho das NPs (Abdelhalim, 2011). Além disso, alterações no ECG foram observadas em um estudo com NPs ultrapequenas de ouro, onde ratos mostraram alterações eletrofisiológicas com aumento do intervalo QT e momentos de aferição compatíveis com arritmia Torsade Points. Neste estudo, também foi investigado *in*



*vitro* o receptor hERG, responsável pela saída rápida de potássio na despolarização ventricular, observando-se o bloqueio irreversível do mesmo (Leifert *et al.*, 2013).

Em outro estudo com NPs de prata, testou-se os efeitos cardiotoxícos no modelo alternativo *zebrafish*, que é considerado modelo para regeneração cardíaca (Dickover *et al.*, 2013), utilizando-se NPs com tamanho médio entre 5 e 20 nm e tratamentos de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL. Foram observados danos dose-dependentes nas maiores concentrações, além de alterações como arritmias cardíacas, edema pericárdico e alterações vasculares com redução de fluxo sanguíneo e deformações no desenvolvimento normal. Além disso, houve deposição de NPs no cérebro, coração, sangue e ovos (Kaewamatawong *et al.*, 2012).

Quando avaliadas NPs de óxido de titânio comumente presentes na poluição, em um estudo *in vivo*, após administração traqueal com NPs de tamanhos entre 25-30 nm, relatou-se a agregação entre as NPs de tamanhos inferiores a 100 nm. Neste estudo, após a administração de 2 mL/Kg de NPs, foram relatadas alterações na excitabilidade cardíaca, com aumento da velocidade de condução cardíaca e da excitabilidade do tecido, resultando em uma tendência aumentada para eventos arrítmicos, além de danos ao DNA dos cardiomiócitos e aumento na produção de EROs (Savi *et al.*, 2014).

Em um estudo com nanotubos de carbono de parede única com 0.7 – 1.5 nm de diâmetro e comprimento menor que 1 µm, após instilação traqueal de 10-40 µg/rato, as NPs promoveram toxicidade cardiovascular com produção de danos na parede íntima vascular, comprometendo a homeostasia vascular. Além disso, foi observada a deposição de nanotubos e formação de aglomerados, porém, os autores afirmam que, provavelmente, os danos não ocorreram por ação direta ao sistema cardiovascular, mas sim, levou à aceleração de processos ateroscleróticos já existentes, na parede íntima vascular, ocorrendo depleção da glutathiona reduzida (GSH), além de dano ao DNA mitocondrial (Li *et al.*, 2007).

Em outro estudo com nanotubos de carbono de parede única com diâmetro de 0.8–1.2 nm e comprimento de alguns micrômetros em células endoteliais da aorta (RAECs), foi relatada toxicidade dose-dependente, sendo que doses maiores do que 100 µg/mL levaram a dano oxidativo, aumento da GSH, dano mitocondrial e ao DNA internucleosomal, além de ativação da caspase 3. Estes achados, somados aos resultados obtidos pelo teste de Anexina e microscopia eletrônica, como a

condensação da cromatina, evidenciam sinais de apoptose de células endoteliais da aorta (Cheng *et al.*, 2011). Em outro estudo com estas células, os nanotubos induziram adesão de neutrófilos à monocamada do endotélio, com expressão aumentada de ICAM-1 e VCAM-1 e moléculas de adesão celulares, com aumento da GSH e lactato desidrogenase (LDH), indicando o dano celular aos nanotubos (Zhiqing *et al.*, 2010). O sistema autônomo de controle do coração também sofreu alterações após a administração de nanotubos de carbono, onde pela avaliação do barorreflexo foi observada redução das sequências de barorreflexos em ratos após exposição pulmonar, podendo contribuir para eventos cardíacos, tais como arritmia (Legramante *et al.*, 2012).

As NPs de sílica são aprovadas pelo FDA para o uso como aditivo alimentar, sendo a sua biocompatibilidade e capacidade de degradação promissoras para a utilização para fins farmacêuticos (Barnes *et al.*, 2008; Benezra *et al.*, 2011). NCs de sílica com 10 nm, após administração intravenosa, promoveram leves mudanças hemodinâmicas e, estudos *in vitro* mostram sua segurança, uma vez que não afetam a viabilidade nem danificam a integridade da membrana plasmática. Outra vantagem das NPs de sílica é a degradação, onde o metabolismo forma o ácido silícico, que é hidrofílico e eliminado por via renal (Galagudza *et al.*, 2010). Porém, já foi relatada a bioacumulação no tecido cardíaco, sendo dose e tamanho dependentes, após administração intravenosa de NPs de sílica com tamanhos entre 20 e 80 nm, sendo que, as NPs de 20 nm foram encontradas em maior concentração do que as de 80 nm no tecido cardíaco, sendo que sete dias após a administração, as quantidades encontradas das NPs de 80 nm já eram mínimas. Já as de 20 nm se mantiveram acumuladas até a última medida do estudo, com bioacumulação após 30 dias. Porém, apesar da bioacumulação, não foram encontradas alterações cardíacas teciduais e não foram avaliadas alterações eletrofisiológicas ou de função do coração neste estudo (Xie *et al.*, 2010).

Em um estudo com NPs poliméricas de 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimide administradas intravenosamente não foram observados danos celulares pela liberação de troponina I, nem danos histopatológicos após 10 semanas para a maior concentração testada (100 µg/mL) (Cai *et al.*, 2010). Em outro estudo usando lipossomas poliméricos de methoxy PEG 40 cabono diesteroligofosfatidiletanolamina e dendrimeros de polilisina não foi observado

nenhuma alteração histopatológica no coração dos animais testados (Kaminskas *et al.*, 2012). Da mesma forma, em outro estudo com NPs de curcumina e polímero NVA622 não houve alterações morfológicas e de função cardíaca, avaliadas pelo ecocardiograma, bem como, não houve alterações histopatológicas após infusão intravenosa das NPs (Pramanik *et al.*, 2012).

De fato, características como biodegradabilidade e biocompatibilidade são atribuídas às NPs, podendo estas serem fatores importantes no entendimento dos processos de desenvolvimento de dano ou inflamação, uma vez que as características físico-químicas estão diretamente ligadas ao desenvolvimento da toxicidade (Aillon *et al.*, 2009; Wattamwar *et al.*, 2011). Em estudos anteriores do grupo, já foram avaliados no tecido cardíaco marcadores de dano oxidativo, como a catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e o malondialdeído (MDA), além da avaliação de marcadores inflamatórios como a IL-6, os quais não indicaram dano (Bulcão *et al.*, 2015). Estes resultados possibilitam a avaliação específica da segurança cardiovascular pelas avaliações eletrofisiológicas, por eletrocardiograma (ECG); alterações de função, pela medida da fração de ejeção e pressão arterial; alterações de ritmo, pela medida dos batimentos cardíacos; e danos agudos de lesão ao tecido cardíaco, através de marcadores bioquímicos como a troponina I.



**CAPÍTULO I (ARTIGO):**  
**Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable  
nanocapsules in rats by intravenous infusion**

Artigo submetido para publicação na revista *Toxicology Research*

---





## Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable nanocapsules in rats by intravenous infusion

Rafael Fracasso<sup>ab</sup>, Marília Baieler<sup>ab</sup>, Anelise Barth<sup>ab</sup>, Sabrina Nascimento<sup>ab</sup>, Fernando Freitas<sup>a</sup>, Gabriela Goëthel<sup>ab</sup>, Louise Altknecht<sup>a</sup>, Virgilio Olsen<sup>c</sup>, Karina Paese<sup>bd</sup>, Vinicius da Silva<sup>e</sup>, Iran Castro<sup>f</sup>, Michael Andrades<sup>c</sup>, Nadine Clausell<sup>c</sup>, Adriana Pohlmann<sup>bg</sup>, Sílvia Guterres<sup>bd</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>ab\*</sup>

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

The nanotoxicology aims to study the safety of nanomaterials, especially towards human exposures. Biodegradable polymeric nanocapsules have been indicated as potential drug carriers applicable for treating several pathologies. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential cardiotoxicity of biodegradable lipid-core nanocapsules (LNC) containing poly( $\epsilon$ -caprolactone). Nanocapsules were characterized and the acute toxicity evaluation was conducted in Wistar rats. Two control groups (saline and tween/glycerol) were utilized, and three treated groups were chosen for low, intermediate and high doses:  $28.7 \times 10^{12}$  (LNC-1),  $57.5 \times 10^{12}$  (LNC-2) and  $115 \times 10^{12}$  (LNC-3), expressed as number of nanocapsules *per milliliter*. Blood pressure measures were performed in non-anesthetized animals by caudal plethysmography. The electrocardiographical (ECG) and ecocardiographical analyses were carried out after anesthesia by isoflurane in two moments, previously to treatment and after 14 days. Blood was collected 24 hours and 14 days after treatment. Biochemical and histopathological analyses were performed. During the evaluation period, no deaths, weight loss or clinical signs were observed. Post-treatment systolic pressures (24h and 14 days) were significantly increased in comparison to pre-treatment in both control groups and treated groups, suggested as a possible consequence of the infused volume. Serum sodium, potassium, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase, as well as, hematological parameter were within reference values established for rats. ECG showed no indications of cardiotoxicity. Despite of the echocardiograms, no alterations in the ejection fraction were found as indicators of cardiotoxicity. Cardiac histopathology also demonstrated no alterations. Therefore, the present results on acute evaluation after i.v. administration, by slow infusion, showed potential safety once no cardiotoxic effects by ECG, ecocardiography, arterial pressure, biochemical and histopathological analyses were found.

**Keywords:** nanotoxicology, biodegradable polymeric nanocapsules, cardiotoxicity, ECG, ecocardiography.

### Introduction

Cardiotoxicity consists in events that leads to total or partial loss, with reversible or irreversible consequences in cardiac function that might progress to heart failure and cardiovascular death.<sup>1, 2</sup> From 1988 to 2008 cardiotoxicity was the main responsible for recalls of the pharmaceutical industry, putting at risk the public health and thus impairing financially the pharmaceutical industry.<sup>3</sup>

Biomedical nanotechnology is a promise to reduce the toxicity, since nanodelivery systems promote specific target for drugs, decrease of doses and number of administrations. This is especially helpful in cancer therapy, where new molecules developed with high technology, specificity and low solubility can be delivered and act directly in tumor cells.<sup>4, 5</sup> On the other hand, the potential risk promoted by the unknown interactions of nanoparticles (NPs) should be investigated.<sup>6, 7</sup>

NPs toxicity is related to the physicochemical characteristics of the particle such as size, shape, surface charge (zeta potential), solubility, surface modifications, release of ions, contamination, besides the ability of deposition and translocation to others sites.<sup>6, 8</sup> Moreover, it is known that the composition of NPs also plays an important role in the level of toxicity. Metal NPs have a tendency to bioaccumulation,<sup>9-11</sup> while carbonaceous NPs might induce an inflammatory response.<sup>12</sup> Toxicity may result from the metabolism of the components used in the composition of NPs, which can eventually generate ROS.<sup>13</sup> For this reason, studies evaluating the behavior of different kinds of NPs, such as polymeric, are needed.

<sup>a</sup> Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analysis, Pharmacy Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGCF), Federal University of Rio Grande do Sul, 90610000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Division of Cardiology (Cardiolab), Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Federal University of Rio Grande do Sul, 90035003, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Department of Production and Control of Drugs, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Pathology, Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619900, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>f</sup> Institute of Cardiology, University Cardiology Foundation, 90620000, Porto Alegre, Brazil.

<sup>g</sup> Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501970, Porto Alegre, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to Solange C. Garcia;  
E-mail: solange.garcia@ufrgs.br

Currently, nineteen clinical trials with nanotechnological products are occurring in the world according to data of U.S. National Institutes of Health,<sup>14</sup> clearly demonstrating the interest of the pharmaceutical industry on this new technology. These trials mainly focused on respiratory systems, coronary stenosis, hormonal reposition, cancer and neurodegenerative disease.

Although the use of NCs is promising, there is a need for toxicological safety assessment. Some of the biomedical NPs developed to date have showed a dose-dependent toxicological response, generally causing more harmful effects at high doses.<sup>15,16</sup> According to the document FDA-2010-D-0530,<sup>17</sup> the FDA considers that the current methodologies to ensure the safety of chemicals are sufficient to classify the safety of nanomaterials, however, it emphasizes that the application of nanotechnology can result in different attributes from those of conventionally manufactured products, requiring new or modified methodologies.

Due to their advantages and physicochemical characteristics, polymeric lipid-core nanocapsules (NCs) have shown to be promising for drug delivery<sup>18</sup> and studies using these NCs have shown their ability to slow the release of encapsulated drugs, biocompatibility and biodegradability.<sup>19,20</sup> *In vivo* studies with lipid-core nanocapsules of poly( $\epsilon$ -caprolactone) demonstrated non-toxic results in acute and subchronic toxicological tests by intraperitoneal and intradermal administration,<sup>21,22</sup> requiring more specific investigations, such as the assessment of cardiotoxicity.

Regarding the route of administration in the development of toxicity it is noteworthy that oral, intradermal and intraperitoneal routes have a limited absorption by their nature. The LNCs absorption by the intraperitoneal route may take days and by oral can have large losses due to interaction with gastro-intestinal tract.<sup>23</sup> So, the intravenous route allows immediate availability of the NPs in the bloodstream at a known and controlled rate, being a good model for the assessment of acute and systemic toxicity.<sup>24</sup>

Nowadays there was an increase in nanotoxicology studies<sup>25</sup>. Classical cardiotoxicity of drugs is depending of number of administration, high doses, infusion rate, of multiple drugs, and kidney and liver preexisting disease.<sup>1</sup> In this line, it is important to investigate if polymeric NPs can interact and produce cardiotoxicity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acute cardiotoxicity of biodegradable lipid-core nanocapsules of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in Wistar rats after IV administration.

## Materials and methods

### Chemical and reagents

Span 60<sup>®</sup> (sorbitan monoesterate), poly( $\epsilon$ -caprolactone) and glycerol were supplied by Sigma-Aldrich (Strasbourg, France), Caprylic/capric triglyceride (CCT) and Polysorbate 80 were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other solvents and chemical used were analytical grade.

### Lipid-core nanocapsules preparation

Lipid-core NCs were prepared as previously described.<sup>26</sup> Briefly, an organic phase containing poly( $\epsilon$ -caprolactone) (0.1 g),

caprylic/capric triglyceride (0.16 g), sorbitan monostearate (0.038 g) was dissolved in acetone (27 mL) and stirred at 40°C until dissolution of all components. The organic phase was injected into an aqueous phase containing polysorbate 80 (0,078 mg) dispersed in ultrapure water (53 mL) using a funnel and magnetic stirred for 10 minutes. After, the acetone solvent and water excess were evaporated under reduced pressure rotatory evaporator at 40 °C, then 0,245 g of glycerol were added and the volume was completed to 10 mL.

### Physicochemical characterization of the lipid-core nanocapsules

Particle size distribution, z-average, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH were determined as previously described.<sup>20</sup> Z-average, polydispersity index and zeta potential of the formulation were determined using a Zetasizer<sup>®</sup>nano-ZS ZEN 3600 model (Malvern, UK). The samples were diluted (500x) without previous treatment in water (MilliQ<sup>®</sup>) (particle size) or in 10 mmol•L<sup>-1</sup> NaCl aqueous solution (zeta potential). Mean particle size distribution and specific area were determined by laser diffraction (LD), analyzed by Mastersizer<sup>®</sup> 2000 (Malvern Instruments, UK). Diameters were expressed by the corresponding volume of the sphere  $D[4,3]$  and volume distribution diameter by the span value previously described were  $\text{Span} = d(0.9) - d(0.1)/d(0.5)$  and  $d(0.9)$ ,  $d(0.1)$  and  $d(0.5)$  diameter are 90%, 10% and 50% of the cumulative distribution of diameter, respectively.<sup>26</sup>

Superficial area was obtained with relation of specific area and volumetric fraction of nanocapsules suspension. Particle number density was determined by turbidimetry according.<sup>26</sup> The suspension was analyzed using a Cary 50 UV-Vis spectrophotometer (Varian, USA) with wavelength (395 nm). The pH value of the formulation was directly determined without sample treatment using a potentiometer (Micronal B-474). All experiments were conducted with 3 batch for each sample.

### Animals

A total of 43 male Wistar rats weighing  $305 \pm 28$  g and aged 6-8 weeks were conditioned in propylene cages, being 4 to 5 animals per cage. In order to reduce stress and mimic the natural habitat, the boxes contained 1 metallic igloo  $18 \times 9 \times 19$  cm<sup>27,28</sup>. The temperature was controlled between  $22 \pm 2$  °C, light / dark cycle of 12 hours (07 AM to 7 PM) and relative humidity around 60%. All procedures were approved by the local Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) register No.130279. The protocol used in the experimental design were based on Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD)<sup>24,29</sup> and previous work from the group<sup>21,22</sup>. This study followed the recommendation of Canadian Council on Animal Care,<sup>30</sup> and Brazilian law 11.794/08 from Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.<sup>31</sup>

### Experimental

The animals were anesthetized with isoflurane 2.5% at a 0.5 L/min constant O<sub>2</sub>.<sup>32</sup> The tail vein was cannulated using a flexible 22G catheter and the infusion was performed using an infusion pump Infusomat<sup>®</sup> Compact B. Braun (Melsungen, Germany) with a flow



rate of 2 mL/hour. The animals received intravenous 0.9% saline (saline group), Tween solution with glycerol (PS80 group). The nanocapsules biodegradable lipid-core (LNC) were administered in different volumes of infusion: 2.5 mL/kg (LNC1 group), 5 mL/kg (LNC2 group) and 10 mL/kg (LNC3 group). All animals received a final infusion volume of 10 mL/kg which was completed with saline when necessary<sup>33</sup>. The experimental design of this study, represented in Figure 1, shows the moments that the biochemical analysis, echography, electrocardiogram (ECG) and pressure evaluations were performed.

#### Determining dose

The dose choices, showed in Table 1, followed recommendations of European Federation of Pharmaceutical Industries Associations (EFPIA) and European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).<sup>33</sup>

#### Behavior, clinical signs and mortality

After single dose administration all animals were observed and the follow signals were noted: pain, piloerection, droopy eyelid, activity in cage, anxiety, tone, seizures, tremor, paralysis of limbs, eye color, tears, salivation, urination, defecation, diarrhea, respiratory rate and death. Animals were observed for 1 min at 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360 min and 24 and 48 hours after infusion. After 24 hours, body temperature was also measured.

#### Body and heart weight

The body weights were noted each 24 h for 15 days. At 15th day, the rats were euthanized under anesthesia (isoflurane 80%, 0.5 L/min) and were also necropsied. Blood was drawn from the vena cava for hematology and laboratorial analyses with potassium EDTA and without anticoagulation, respectively. After euthanasia, the heart was removed, washed in cold saline and weighed. The relative heart weight was calculated as follows: relative organ weight = (organ weight/body weight x 100).<sup>21</sup>

#### Heart damage markers in blood

The measure of cardiac damage was assessed by the laboratory biomarkers troponin I, which was evaluated by chemiluminescence Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown U.S.A.), sodium and potassium, determined by ion selective electrode ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown U.S.A.), aspartate transaminase (AST) assessed by kinetic UV ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown U.S.A.) and alkaline phosphatase evaluated by kinetic colorimetric ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown U.S.A.). The biochemical parameters were assessed in serum 24 hours and 14 days after the infusion of LNCs.

#### Hematological analyses

The markers selected were red blood cell count (RBC), hemoglobin, hematocrit (PVC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet

count (PLT), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), white blood cell count (WBC), granulocytes, lymphocytes and monocytes that were assessed using ABX Micros 60 (ABX Diagnostics, Montpellier, France) after 14 days of the single dose infusion.

#### Histopathological examination

After euthanasia the heart and aorta were dissected out and fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. The slices were stained with hematoxylin and eosin stain (HE), Picro Sirius stain (PI) and Peals on service of pathology of HCPA. To get better details of structures a polarized light microscope Zeiss Axioskop 40 was used (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, USA).

#### Echocardiographic assessment

The evaluation of cardiac remodeling by echocardiography was performed before the administration and after 14 days of the single dose infusion. It was assessed *in vivo* under anesthesia using an echocardiograph machine (EnVisor, Philips Systems - Andover, USA), with a transducer 12-3MHz and depth of 2cm. Images from left parasternal window (longitudinal and transverse) were taken. The linear measurements taken from images obtained by M-mode were: LV diameters at end-diastole (LVEDD) and end-systole (LVESD).<sup>34</sup> The ejection fraction (%) (LVEF) was calculated using the equation:  $LVEDD^3 - LVSD^3 / LVEDD^3 \times 100$ . Shortening fraction (%) was estimated by the equation:  $(LVEDD - LVESD) / LVESD \times 100$ .<sup>35</sup> The echocardiographic operator was blind to the groups.

#### Electrocardiogram (ECG)

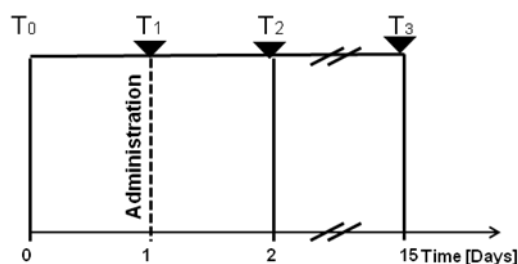
The measurements were performed using the Biopac MP100 (Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, USA) device with software for signal capture (AcqKnowledge 4.1 Biopac Systems, Inc., Holliston, USA), and later analysis of the measures by ADInstruments LabChart 7 for ECG software Adinstruments (Sydney, Australia). Gold-plated acupuncture needles were used to get the better electrical signals in previously described ECG points.<sup>36</sup> The ECG captures were performed prior to the infusion of single dose (basal), and the last measure was captured in the day before the euthanasia (14 days). The acquisition time was 5 minutes. The QT-interval duration (QTc) was corrected by formula  $QT/(RR/100)$ .<sup>36</sup>

#### Blood pressure assessment

Heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP) were determined by tail cuff plethysmography (Insight®, Ribeirão Preto, Brazil). Before the experiments all animals were acclimatized four times. Three measurements of blood pressure were made the day prior to infusion and 24 hours and 14 days after the infusion. HR, SBP, and DBP were recorded by the device's software after each measurement.

#### Statistical analyses

The data were analyzed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 18) and GraphPad Prism (GraphPad Software,



**Figure 1. Experimental design for acute administration.** Chronological graphic of experimental design of this study: Initially, the basal measures of echography, ECG and pressure were performed ( $T_0$ ) before intravenous administration ( $T_1$ ). Vital signals were observed during 24h after the administration ( $T_1$ - $T_2$ ). At the end of 24 hours blood pressure was measured as well as temperature, after rectal anesthesia. Moreover, the first blood sampling was collected, by orbital plexus, for biochemical analysis at 24 hours post-administration ( $T_2$ ). Blood pressure, ECG and echography were evaluated again at fifteenth day ( $T_3$ ). Finally, the last blood sample for biochemical and hematological analysis was collected and euthanasia was performed, being heart removed, weighed and fixed to histopathology.

**Table 1. Amount of LNC administrated by i.v. continuous infusion (single dose).**

	Saline	PS80	LNC1	LNC2	LNC3
<b>Volume injected</b>					
LNCs	-	-	2.5 mL/kg	5 mL/kg	10 mL/kg
Saline	10 mL/kg	-	7.5 mL/kg	5 mL/kg	-
PS80	-	10 mL/kg	-	-	-
<b>Number of NCs injected</b>					
LNC/kg	-	-	$28.7 \times 10^{12}$	$57.5 \times 10^{12}$	$115 \times 10^{12}$
<b>Superficial area received</b>					
$m^2/kg$	-	-	3.40	6.80	13.6

\*Male Wistar rats weighting  $305 \pm 28g$

\*\*Amount of LNC per milliliter  $11.5 \times 10^{12}$

\*\*\* Superficial area per  $m^2/mL$   $1.36 \pm 0.01$

Inc.). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. For troponin I and hematology analysis it was used one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. To analyse the alterations of biochemical analysis, body and heart weight, blood pressure, echocardiogram and ECG, the Generalized Estimating Equations (GEE) was used. Correlation tests were performed according to Pearson's or Spearman's rank following the variables distribution. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### Preparation and characterization of lipid-core nanocapsules

The nanocapsules formulations were prepared as previously reported<sup>26</sup> and the physicochemical characterization is briefly demonstrated (Table 2). After preparation, the z-average was

$181.13 \pm 2.8$  nm. The suspensions showed monomodal size distributions and the SPAN was around 1.3 indicating narrow size distributions (Fig. 2). The zeta potential value was  $-7.8 \pm 1.4$  mV and the pH values were around  $5.82 \pm 0.2$ . The number of particles was  $1.15 \pm 4.21 \times 10^{13}$  particles per  $cm^3$ . The LNC surface area was  $0.869 \pm 0.07 \times 10^4$   $cm^2 \cdot ml^{-1}$ . The specific area was  $45.66 m^2/g$  and pH was maintained at 5.82.

### Observations of clinical and physiological signs

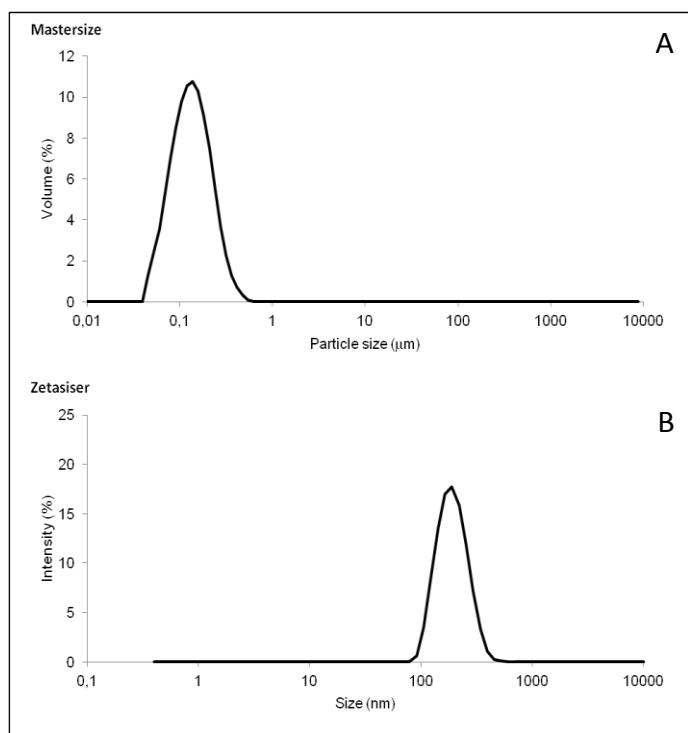
No changes were observed in clinical signs as well as in body temperature after 24h of the treatment ( $p > 0.05$ ).

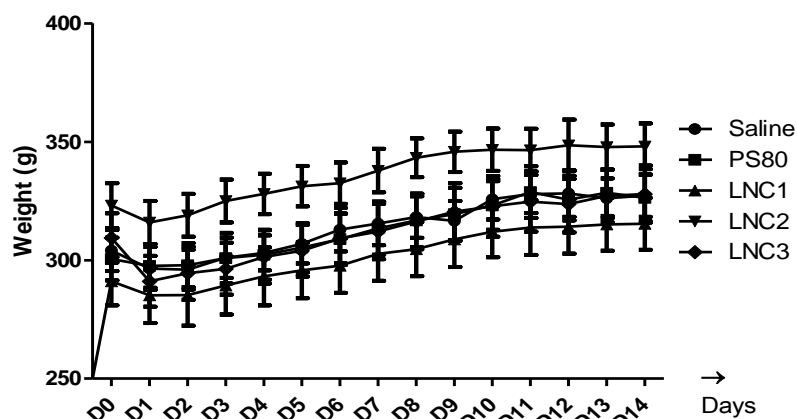
### Body and heart weight

No changes were observed in body weight and relative heart weight after the administration of the treatments as showed in Fig. 3 and Table 3, respectively.

**Table 2** Physicochemical Characterization of Nanocapsules

Characteristics	
d[4,3] (nm)	158.77 ± 1.53
SPAN	1.34 ± 0.01
Z- average (nm)	181.13 ± 2.83
PDI	0.09 ± 0.02
Zeta Potential mV	- 7.84 ± 1.44
Superficial area (m <sup>2</sup> /mL)	1.36 ± 0.01

**Figure 2.** Nanocapsules distribution. (A) Granulometric profile (laser diffraction) and (B) Polydispersity (dynamic light scattering).



**Figure 3. Body weight gain during the single dose experiment.** No statistical difference was observed among the groups 14 days after infusion ( $p > 0.05$ ). Data were analyzed by GEE.

**Table 3. Relative heart weight in rats treated with LNC or vehicle by i.v. route.**

Group	Heart weight (%)
Saline	$0.29 \pm 0.01$
PS80	$0.29 \pm 0.01$
LNC1	$0.28 \pm 0.01$
LNC2	$0.29 \pm 0.01$
LNC3	$0.28 \pm 0.01$

No statistical difference was found between groups ( $p > 0.05$ ).

The results are showed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by ANOVA Oneway.

### Biochemical markers

All groups of treated Wistar rats presented normal cTnI levels, being  $0.01 \pm 0.01$  ng/mL in saline group,  $0.01 \pm 0.01$  ng/mL in PS80 group,  $0.02 \pm 0.02$  ng/mL in LNC1 group,  $0.02 \pm 0.01$  ng/mL in LNC2 group and  $0.03 \pm 0.03$  ng/mL in LNC3 group without statistical difference ( $p > 0.05$ ; Fig. 4). As shown in Fig. 5, the levels of potassium were within the reference values for Wistar rats<sup>37</sup> and were decreased in the group LNC 3 compared to saline, PS80 and LNC1 group at 24 hours. On the other hand, LNC 2 group showed reduced potassium levels compared only to PS80. AST, ALP and sodium showed no statistical difference among the groups, but AST was above the reference values at 24 hours while ALP and sodium were in accordance to references values for rats at the two moments of measure.<sup>37</sup>

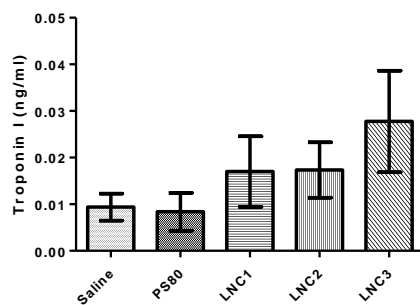
When compared the biochemical markers between 24 hours and 14 days after the treatment has been done, it was possible to observe a reduction in AST and ALP levels in all study groups ( $p < 0.05$ ). Also, a decrease in the potassium levels in PS80, LNC1 and LNC2 group was found within this time interval ( $p < 0.05$ ).

### Hematological analyses

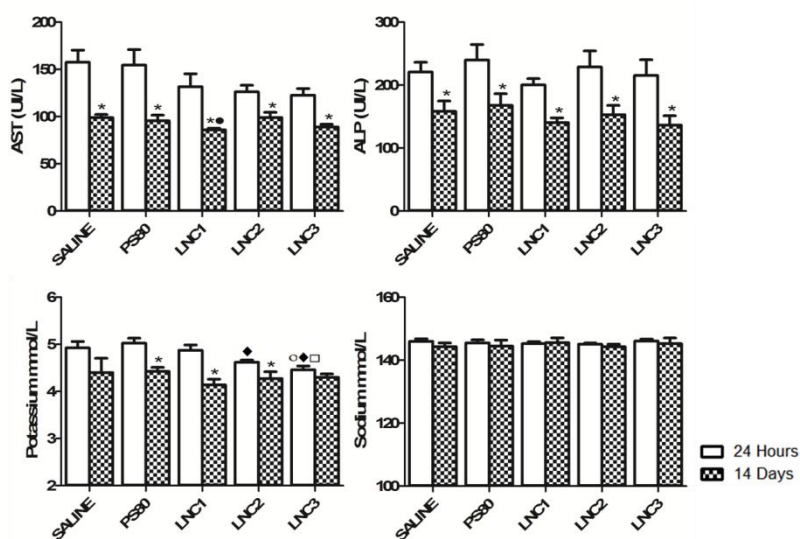
Representative hematological results are presented in Table 4. It was found significant difference to RBC parameter in the LNC3 group versus saline and LNC2 groups. Moreover, HCT values were significant lower in the LNC3 group than LNC2 group ( $p < 0.05$ ). Additionally, no significant alterations were observed in WBC, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDWCV, RDWSD, PLT, MPV, PDW, PCT, PLCC and CSFP. All results were within the reference values for rats, except the HCT and MPV.<sup>37</sup>

### Macroscopic and histopathological evaluations

The macroscopic observation of the heart and aorta showed normal morphology, color and size. No signs of ischemia or other pathological processes were found. The HE staining showed no heart remodeling process, but rather normal morphology. However, at 400x magnification small spaces between cells were noted in the groups PS80, LNC1, LNC2 and LNC3, especially in outlying heart tissue near to blood vessels (Fig. 6). But it was not fibrosis process, which was confirmed by PI staining and no hemorrhagic sign were observed by Prussian blue staining.



**Figure 4.** Troponin I evaluated after 24 hours. No statistical difference was found among groups ( $p > 0.05$ ). The results are showed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by ANOVA Oneway.



**Figure 5.** Heart damage markers in blood measured at 24 hours and 14 days after the infusion treatment. \*  $p < 0.05$  compared to values of 24 hours of its own group;  $\circ$   $p < 0.05$  compared to Saline group 24 hours;  $\bullet$   $p < 0.05$  compared to Saline group 14 days;  $\blacklozenge$   $p < 0.05$  compared to PS80 group 24 hours;  $\square$   $p < 0.05$  compared to LNC1 group 24 hours. Reference values: AST: 39 to 111 U/L; ALP: 16 to 302 U/L; Sodium: 135 to 146 mmol/L; Potassium: 4 to 5.9 mmol/L.<sup>27</sup> Data were analyzed by GEE.

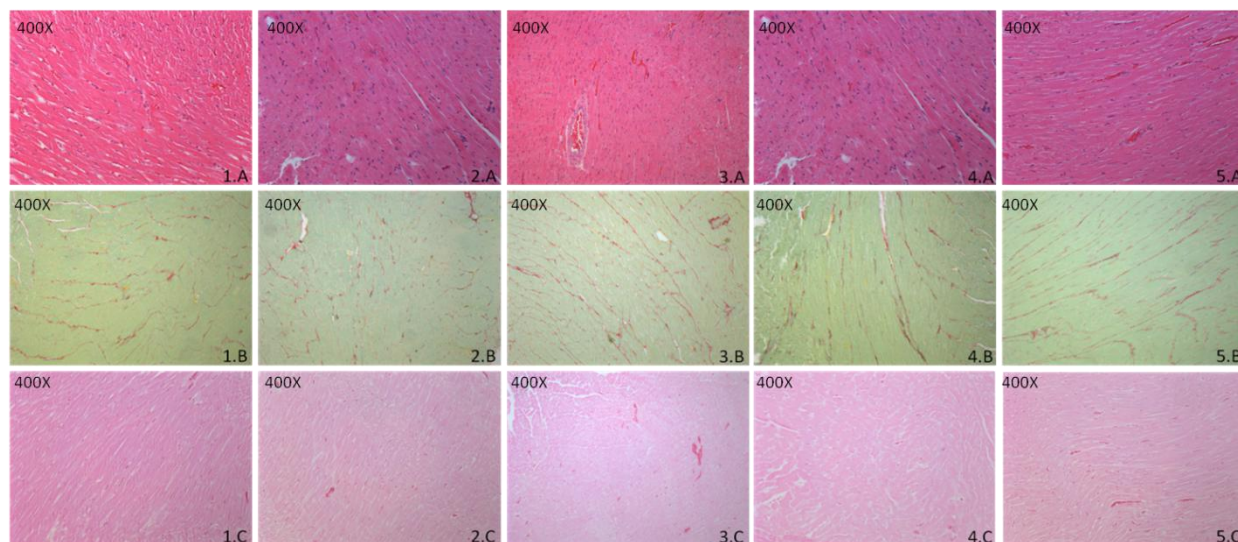
**Table 4.** Hematological parameters at 14 days after the infusion treatment.

Parameter	Saline (n=8)	PS80 (n=8)	LNC1 (n=9)	LNC2 (n=9)	LNC3 (n=8)	Reference <sup>27</sup>
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	9.04 ± 0.69	8.90 ± 0.38	9.14 ± 0.55	8.87 ± 0.35	9.59 ± 0.84	1.96 – 8.25
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	7.37 ± 0.07	7.08 ± 0.12	7.04 ± 0.11	7.33 ± 0.04	6.84 ± 0.08 <sup>○▲</sup>	7.62 – 9.99
HGB (g/dL)	13.97 ± 0.15	13.60 ± 0.21	13.72 ± 0.12	14.02 ± 0.12	13.49 ± 0.15	13.7 – 17.6
HCT (%)	37.89 ± 0.39	36.94 ± 0.68	37.31 ± 0.46	38.34 ± 0.43	35.89 ± 0.45 <sup>▲</sup>	39.6 – 52.5
MCV (fL)	51.41 ± 0.28	52.19 ± 0.51	53.10 ± 0.59	52.33 ± 0.67	52.48 ± 0.55	48.9 – 57.9
MCH (pg)	18.97 ± 0.20	19.18 ± 0.18	19.53 ± 0.21	19.14 ± 0.18	19.73 ± 0.21	17.1 – 20.4
MCHC (g/dL)	36.89 ± 0.26	36.85 ± 0.27	36.77 ± 0.32	36.58 ± 0.25	37.60 ± 0.27	32.9 – 37.5
RDW (%)	12.54 ± 0.17	12.76 ± 0.43	12.57 ± 0.20	12.51 ± 0.13	12.43 ± 0.09	11.1 – 15.2
PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	713.29 ± 11.75	720.75 ± 27.39	694.33 ± 20.86	757.89 ± 35.49	713.75 ± 26.75	638 – 1177
MPV (fL)	5.53 ± 0.09	5.63 ± 0.12	5.63 ± 0.07	5.59 ± 0.11	5.64 ± 0.08	6.2 – 9.4
PDW	14.89 ± 0.05	14.88 ± 0.05	14.93 ± 0.03	14.86 ± 0.05	14.94 ± 0.05	11.1 – 15.2
PCT (%)	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.40 ± 0.01	-
PLCC (10 <sup>9</sup> /L)	38.29 ± 2.81	40.13 ± 3.79	39.33 ± 2.46	41.22 ± 1.93	40.38 ± 2.17	-
PLCR (%)	5.39 ± 0.44	5.64 ± 0.58	5.68 ± 0.35	5.62 ± 0.50	5.71 ± 0.42	-

○ p < 0.05 compared to Saline group.

▲ p < 0.05 compared to LNC2 group.

The results are showed as mean ± SEM and were analyzed by ANOVA Oneway.



**Figure 6.** Histopathological morphology of heart tissue. (A) HE staining; (B) PI staining; (C) Peals staining; (1) Saline; (2) PS80; (3) LNC1; (4) LNC2; (5) LNC3. Discrete congestion process was observed in the groups PS80, LNC1, LNC2 and LNC3 (400x).

#### Echocardiographic findings

In the echocardiographic evaluation, the changes were assessed prior to the infusion (basal) and after 14 days of the administration (Table 5). There was an increase in systolic

diameter after 14 days compared to baseline in the LNC3 group (p < 0.05). The same happened to diastolic diameter in saline, LNC1 and LNC3 groups. In addition, after 14 days the measures of diastole and systole left ventricle anterior wall thickness have

changed only in LNC1 group. The systole left ventricle posterior wall thickness (LVPWTs) had significant increase in the PS80 and LNC3 groups after 14 days treatment compared to basal levels, but when analyzing the diastole left ventricle posterior wall thickness (LVPWTd) only LNC1 group presented significant increase. However, the ejection fraction was higher only in the saline group after 14 days of the infusion ( $p < 0.05$ ), and do not indicate classical cardiotoxicity. Similarly, the shortening fraction was significant higher after 14 days from treatment in the saline and LNC2 groups.

### Electrocardiogram (ECG)

Electrocardiogram parameters were collected before and 14 days after the infusion. Administration of PS80 and LNC2 caused a slight delay in heart electrical conductance, since larger QRS times could be seen in both groups at day 14th. ST segment decreased in the saline and LNC1 groups ( $p < 0.05$ ), while other parameters had no significant differences (Table 6).

### Blood Pressure

Regarding blood pressure, particularly systolic pressure, differences were found only in the times 24 hours and 14 days after the infusion in comparison with basal time of the saline, PS80, LNC1, and LNC3 groups. In addition, the heart rate decreased in the LNC1 and LNC2 groups after 14 days compared to basal time measure (Fig. 7). However, there were no differences between groups comparing them at the same moment of measurement.

### Discussion

Recent studies evaluating the cardiotoxicity of nanomaterials have reported close relationship between the composition, size, dose, permeation ability and bioaccumulation to cardiotoxicity events.<sup>38-40</sup> Metal nanoparticles such as gold NPs, especially with sizes smaller than 50nm, have permeation and bioaccumulation in cardiac tissue,<sup>10</sup> causing cardiac congestion, blood viscosity changes, bleeding and vacuolization<sup>40</sup> and QT interval prolongation.<sup>41</sup> Single wall carbon nanotubes have been reported to induce aortic intima and mitochondrial DNA damage, being responsible for caspase-3 activation, the worsening of atherosclerotic plaques and increase in expression of inflammatory genes and adhesion molecules.<sup>15, 42</sup> Since the damage has occurred, even in other organs, there is a release of cytokines that can reach the heart by the systemic circulation, inducing cardiotoxicity<sup>38</sup> through vascular dysfunction, thrombotic events<sup>15, 42</sup> and changes in the control of the autonomous system by decreasing the number of sequences baroreflex.<sup>43</sup> Indeed, there are no studies of cardiotoxicity of biodegradable lipid-core nanocapsules of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in the literature, only existing a study using therapeutic doses in drug delivery systems.<sup>44</sup>

The LNCs used in this study are similar to those previously studied by our group<sup>21</sup> with the same chemical composition differing only by having glycerol as isotonicizing

agent, with a relatively smaller size and a larger number of NCs per milliliter. This study, in turn, intends to elucidate one scenario of total availability of the formulation through intravenous infusion, characteristic of this route.

Classic cardiotoxicity induced by anthracyclines through repeated doses in short time or high single doses, as used in this study, is initially characterized by symptoms like tiredness, fatigue and digestive symptoms such as anorexia, abdominal distension and diarrhea.<sup>1, 45</sup> In the present study, within first 24 hours vital signs were observed without any events of diarrhea, altered motor behavior or fever. Likewise, all groups had weight gain during the fourteen days of experiment, without signs of anorexia.

In the present study, the hematological parameter, leukocyte count (WBC) did not differ among the studied groups. This finding is unlike from that found in a previous study with intraperitoneal (i.p.) administration,<sup>21</sup> which showed an increase of monocyte count in all LNC-treated groups in acute treatment, probably demonstrating a sign of proinflammatory exposure. However, regarding the red series it was found a significant reduction in red blood cell count (RBC) in the group treated with the greatest number of NCs (LNC3) compared to the saline group, but it was in the range of normal values and did not indicate any disturbance. This difference can be explained by the inherent characteristics of the i.v. administration, once the direct contact between NCs and red cells may lead to a discreet hemolysis.<sup>46</sup> Bender et al. related *in vitro* hemolytic findings after addition of 10% of LNC (v.v) in blood.<sup>46</sup>

Regarding the biochemical results, the AST and ALP values were increased in all groups after 24 hours of the infusion compared to values observed at 14 days, possibly associated to cell damage caused by the infusion. After 14 days, the AST and ALP values tended to a common baseline to all groups meaning that the damage was acute and reversible. In the previous study with LNC, alterations on AST and ALP were not found after 14 days of experiment.<sup>21</sup>

Furthermore, despite certain fluctuations in the levels of troponin I among the experimental groups, there was no significant difference for this parameter that is a specific marker for cardiac injury, considered the gold standard for the evaluation of cardiotoxicity.<sup>47, 48</sup> Besides, studies evaluating the cardiotoxicity of doxorubicin found TnI concentrations higher than 0.07 ng/mL.<sup>49</sup> In addition, studies of cardiotoxicity in rabbits and rats without any evidences of heart diseases found serum baseline levels of 0,033 ng/mL to rats<sup>50</sup> and 0,03 ng/mL to rabbits.<sup>51, 52</sup>

Parameter	Saline (n=8)		PS80 (n=8)		LNC1 (n=9)		LNC2 (n=9)		LNC3 (n=8)	
	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days
Diastolic diameter (mm)	0.67 ± 0.06	0.74 ± 0.07*	0.73 ± 0.05	0.74 ± 0.03	0.69 ± 0.05	0.74 ± 0.06*	0.74 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.67 ± 0.03	0.78 ± 0.03*
Systolic diameter (mm)	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.08	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.08	0.30 ± 0.11	0.38 ± 0.05	0.37 ± 0.09	0.32 ± 0.10	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.06*
LVAWTd (mm)	0.19 ± 0.09	0.22 ± 0.08	0.18 ± 0.11	0.22 ± 0.08	0.14 ± 0.03	0.24 ± 0.07*	0.21 ± 0.08	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.06	0.22 ± 0.09
LVAWTs (mm)	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.07	0.19 ± 0.07	0.17 ± 0.09	0.22 ± 0.07	0.13 ± 0.04*	0.18 ± 0.07	0.16 ± 0.09	0.17 ± 0.06	0.18 ± 0.08
LVPWTd (mm)	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02*	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01
LVPWTs (mm)	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.08	0.26 ± 0.02	0.29 ± 0.03*	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.04*
Ejection fraction (%)	86.65 ± 3.52	91.64 ± 4.49*	91.00 ± 2.22	88.29 ± 7.03	90.45 ± 7.91	86.58 ± 3.88	86.93 ± 7.79	91.66 ± 5.63	88.85 ± 4.71	90.11 ± 4.48
Shortening fraction (%)	49.18 ± 4.29	57.69 ± 8.53*	55.46 ± 3.72	53.01 ± 10.42	57.30 ± 13.47	49.26 ± 5.03	50.99 ± 10.12	58.77 ± 11.27*	52.60 ± 6.75	54.72 ± 7.00

**Table 5.** Eocardiogram findings prior (Basal) and after 14 days of the infusion in the different treated groups.

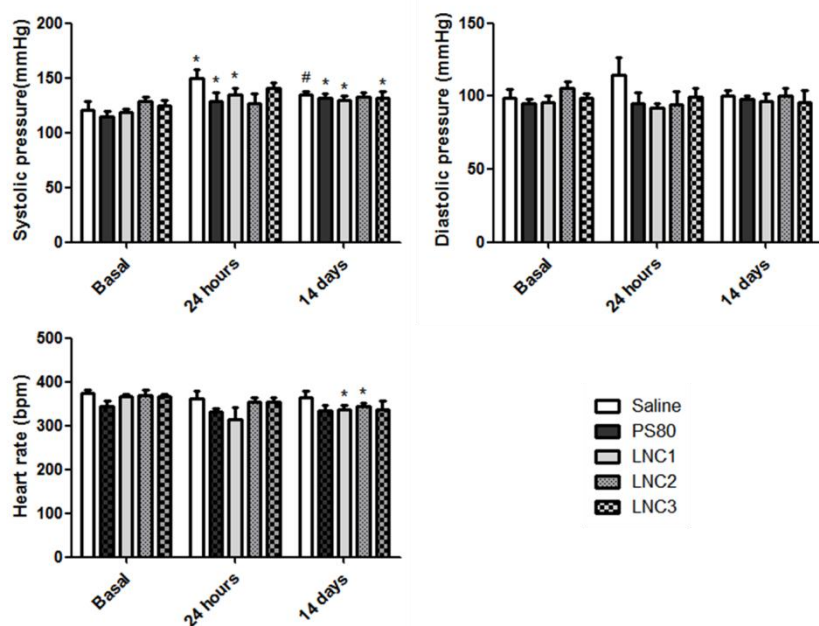
\*  $p < 0.05$  compared to basal values of its own group. (LVAWTd) diastolic left ventricle anterior wall thickness; (LVAWTs) systolic left ventricle anterior wall thickness; (LVPWTd) diastolic left ventricle posterior wall thickness; (LVPWTs) systolic left ventricle posterior wall thickness. The data were analyzed by GEE.

**Table 6.** Electrocardiogram changes evaluated prior (Basal) and after 14 days of the infusion in the different treated groups.

Parameter	Saline (n=8)		PS80 (n=8)		LNC1 (n=9)		LNC2 (n=9)		LNC3 (n=8)	
	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days	Basal	14 days
RR Interval (ms)	148.13 ± 13.81	132.41 ± 54.19	146.71 ± 17.80	154.29 ± 8.53	150.88 ± 12.21	153.50 ± 5.57	145.05 ± 17.41	160.21 ± 14.51	150.93 ± 11.19	154.90 ± 11.12
Heart Rate (BPM)	408.26 ± 37.48	398.23 ± 25.54	414.41 ± 51.19	390.15 ± 21.01	400.14 ± 2.06	391.33 ± 14.18	418.38 ± 44.56	377.46 ± 32.73	399.51 ± 27.85	389.31 ± 28.15
Segment PR (ms)	42.57 ± 3.32	36.80 ± 15.03	42.96 ± 2.55	43.36 ± 4.47	46.52 ± 5.95	44.67 ± 4.37	43.97 ± 3.36	45.42 ± 5.10	43.08 ± 3.47	40.80 ± 3.68
P Wave (ms)	15.53 ± 2.23	12.96 ± 5.42	16.10 ± 3.19	17.68 ± 4.84	16.65 ± 3.51	17.41 ± 3.99	15.31 ± 3.78	17.57 ± 4.01	15.49 ± 3.80	16.33 ± 4.67
QRS Complex (ms)	19.06 ± 1.44	18.09 ± 7.37	18.65 ± 1.89	20.24 ± 1.75*	19.72 ± 1.59	20.48 ± 0.63	20.26 ± 1.60	21.78 ± 1.17*	18.99 ± 1.46	19.85 ± 0.76
QT interval (ms)	53.54 ± 8.98	45.97 ± 18.79	56.29 ± 12.01	55.77 ± 8.31	58.25 ± 13.68	56.30 ± 6.92	59.59 ± 9.84	55.01 ± 2.94	55.60 ± 13.55	57.52 ± 8.67
T peak (ms)	26.91 ± 10.40	14.60 ± 6.35*	26.44 ± 15.70	22.03 ± 10.64	28.76 ± 10.31	22.54 ± 5.48*	24.36 ± 6.60	20.40 ± 3.24	26.46 ± 16.28	23.06 ± 9.70
ST segment (volts)	-0.18 ± 0.50	-0.52 ± 0.27*	-0.02 ± 0.78	-0.16 ± 0.43	0.27 ± 0.51	-0.16 ± 0.27*	0.13 ± 0.62	-0.24 ± 0.45	-0.20 ± 0.37	-0.24 ± 0.39
T wave (volts)	0.38 ± 0.37	0.17 ± 0.27	0.50 ± 0.81	0.38 ± 0.50	0.79 ± 0.50	0.39 ± 0.18	0.71 ± 0.57	0.39 ± 0.24	0.27 ± 0.42	0.33 ± 0.36
QTc (ms)	44.12 ± 7.72	42.77 ± 3.10	46.66 ± 9.98	44.97 ± 7.02	47.44 ± 10.90	45.43 ± 5.40	49.87 ± 9.66	43.56 ± 2.83	45.57 ± 12.34	46.29 ± 7.07

\*  $p < 0.05$  compared to basal values of its own group. The data were analyzed by GEE.





**Figure 7.** Blood pressure evaluation at three moments: Before the treatment (Basal), 24 hours and 14 days after the infusion. \*  $p < 0.05$  compared to basal values of its own group. #  $p < 0.05$  compared to values of 24 hours of its own group. The data were analyzed by GEE.

With respect to potassium levels, the PS80, LNC1 and LNC2 groups, presented higher values 24 hours after infusion compared to their results at 14 days, when the values reached the same level to all groups. It was also observed that the group whose potassium concentrations remained at baseline levels was the LNC3 group, which received only LNCs during the infusion. However, these values were within the reference values. Further studies are needed, nevertheless, this finding suggests that the poly( $\epsilon$ -caprolactone) LNC infusion did not affect the potassium electrolyte balance.

In this line, the histological analysis showed no characteristic cardiotoxic damage on heart tissue after 14 days of the acute exposure. Just a discrete congestion process on heart tissue was noted, mainly on minor peripheral vessels, without any response or consolidated damage. Studies with induced cardiotoxicity often find cardiomyocellular vacuolation, perivascular and interstitial fibrosis, congestion, hemorrhage, infiltration of leukocytes, degeneration in myocytes and nuclear material clumping.<sup>40, 49, 52, 53</sup>

The international cardiology society guidelines cite the importance of identification of the left ventricular ejection fraction (LVEF) that is the most common method to screening of toxic effects on the heart.<sup>2</sup> The LVEF near to 90% represents a normal function of heart and when decreased to less than 50% indicates cardiac insufficiency.<sup>54</sup> Additionally, the guidelines of the Brazilian Society of Cardiology define as cardiotoxic effect a decrease of 10-20% in ejection fraction after administration of acute dose or high doses.<sup>1</sup> According to the present results, the echocardiographic alterations do not mean damaged or expressive cardiac remodeling of ventricles during the experiments of this study. Moreover, the heart weight was similar to all groups, which is consistent with histopathological findings showing absence of fibrosis or remodeling processes.

On the other hand, the heart tissue is peculiar, the most part of internal structures, as ventricles, are directly irrigated by circulating blood.<sup>55</sup> Thereby, the size of NCs is directly proportional to the input capacity in cardiac tissue, thus, gold nanoparticles with size less than 50nm have been found on heart after i.v. infusion, while nanoparticles bigger than 100 nm, like polymeric NCs used in this study, were rarely detected.<sup>10</sup> Further nanotoxicological studies are needed to verify possible methodological interferences, however, *in vitro* models need recreate the complex geometric structure to simulate the heart tissue and generate reliable results.<sup>56, 57</sup>

Drugs with high ability to induce cardiotoxicity promote electrophysiological changes, especially after acute administration and in high concentrations.<sup>1, 58</sup> Physiologically the electrophysiological changes occur in the ventricular repolarization in greater proportion, due to interaction of drugs, hormones, cytokines and peptides.<sup>59</sup> When this occurs, it is usually observed a ventricular fibrillation, sinus tachycardia and QT interval prolongation.<sup>58</sup> Gold nanoparticles have been related to interact with ventricle ionic channels causing QT interval prolongation.<sup>41</sup> Therefore, the QT interval corrected for heart rate (QTc) is the most appropriate parameter to evaluate this type of change.<sup>60</sup> In this study, no electrophysiological changes consistent with classic cardiotoxicity were observed when compared the measures obtained 14 days after the infusion to basal measures. Additionally, it is known that arrhythmias in intoxications are dependent, in most of cases, of abnormal impulse conduction, abnormal impulse formation and triggered activity, besides to be influenced by acid-base and electrolyte imbalances hypotension and hypoxia conditions<sup>61</sup>, events that were not related in this study.

Increase in systolic blood pressure without diastolic pressure alterations are related to physiopathological changes in the vascular intima, particularly in the aortic diameter and aortic knuckle.<sup>62</sup> The

mechanism of this process is related to breakage of elastin fibers present in the vessels<sup>62</sup> and it has been found usually in aging and diseases in which there is increased stiffness of the arterial wall.<sup>63, 64</sup> In the present study the blood pressure results were within the reference values for rats<sup>25</sup> and the increase in average systolic pressure at the different times maybe could be related to the large volume infused in the animals, since most of the groups showed an increase in the values. Therefore, further studies with larger assessment of hemodynamic and biochemical markers are needed.

## Conclusions

In acute cardiotoxicity evaluation, during the whole observation period, the rat treated groups with LNC did not demonstrate alteration on electrocardiographical and ecocardiographical analyses compared with control groups. Additionally, did not found significant difference on biochemical and hematological analysis, as well as, by histopathological evaluation. Thus, from the cardiac viewpoint the present findings support the conclusion that biodegradable lipid-core nanocapsules of poly( $\epsilon$ -caprolactone) are safe in Wistar rats, after acute single intravenous administration.

## Acknowledgements

This work was supported by FAPERGS, CNPQ and FIPE-HCPA. R. Fracasso is the recipient of a CAPES master scholarship; and S.C. Garcia, S.S. Guterres, N. Clausell and A.R. Pohlmann are recipients of CNPq Research Fellowship.

## Conflict of interest

All authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- R. Kalil Filho, L. Hajjar, F. Bacal, P. Hoff, M. d. P. Diz and F. Galas, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2011, **96**, 01-52.
- R. Altena, P. J. Perik, D. J. Van Veldhuisen, E. G. De Vries and J. A. Gietema, *The lancet oncology*, 2009, **10**, 391-399.
- M. J. Killeen, *Cardiac Drug Safety: A Bench to Bedside Approach*, World Scientific, 2011.
- G. Mattheolabakis, B. Rigas and P. P. Constantinides, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 1577-1590.
- R. Singh and J. W. Lillard, *Experimental and molecular pathology*, 2009, **86**, 215-223.
- K. Donaldson and C. A. Poland, *Current opinion in biotechnology*, 2013, **24**, 724-734.
- L. M. Bimbo, L. Peltonen, J. Hirvonen and H. A. Santos, *Current drug metabolism*, 2012, **13**, 1068-1086.
- P. P. Fu, Q. Xia, H.-M. Hwang, P. C. Ray and H. Yu, *Journal of food and drug analysis*, 2014, **22**, 64-75.
- A. M. Studer, L. K. Limbach, L. Van Duc, F. Krumeich, E. K. Athanassiou, L. C. Gerber, H. Moch and W. J. Stark, *Toxicology letters*, 2010, **197**, 169-174.
- W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips and R. E. Geertsma, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1912-1919.
- J. Xu, H. Shi, M. Ruth, H. Yu, L. Lazar, B. Zou, C. Yang, A. Wu and J. Zhao, *PLoS one*, 2013, **8**, e70618.
- E.-J. Park, J. Roh, S. N. Kim, M.-S. Kang, B.-S. Lee, Y. Kim and S. Choi, *PLoS one*, 2011, **6**, e25892.
- M. A. K. Abdelhalim and B. M. Jarrar, *Lipids Health Dis*, 2011, **10**, 133.
- NIH. and U. N. I. o. Health., search for: Nanotechnology, <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=nanotechnology&Search=Search>, (accessed 10 Jan, 2015).
- W. W. Cheng, Z. Q. Lin, B. F. Wei, Q. Zeng, B. Han, C. X. Wei, X. J. Fan, C. L. Hu, L. H. Liu and J. H. Huang, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2011, **43**, 564-572.
- C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones and J. J. Schlager, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 13608-13619.
- D. Guidance, *Biotechnology Law Report*, 2011, **30**, 613-616.
- C. Mora-Huertas, H. Fessi and A. Elaissari, *International journal of pharmaceutics*, 2010, **385**, 113-142.
- M. Fontana, K. Coradini, S. Guterres, A. Pohlmann and R. Beck, *Journal of biomedical nanotechnology*, 2009, **5**, 254-263.
- C. G. Venturini, E. Jäger, C. P. Oliveira, A. Bernardi, A. M. Battastini, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, **375**, 200-208.
- R. P. Bulcão, F. A. de Freitas, C. G. Venturini, E. Dallegrave, J. Durgante, G. Göethel, C. T. S. Cerski, P. Zielinsky, A. R. Pohlmann and S. S. Guterres, *Toxicological sciences*, 2013, **132** (1), 162-176.
- R. P. Bulcão, F. A. de Freitas, E. Dallegrave, C. G. Venturini, M. Baierle, J. Durgante, E. Sauer, C. Cassini, C. T. Cerski and P. Zielinsky, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, **86**, 167-177.
- D. Fleisher, R. Bong and B. H. Stewart, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, **19**, 115-130.
- OECD, *Guidelines for the Testing of Chemicals 417*, Organization for Economic, 2010.
- E. Demir, S. Aksakal, F. Turna, B. Kaya and R. Marcos, *Journal of hazardous materials*, 2015, **283**, 260-266.
- F. S. Poletto, L. A. Fiel, M. V. Lopes, G. Schaab, A. M. Gomes, S. S. Guterres, B. Rossi-Bergmann and A. R. Pohlmann, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 2012, **1**, 89-98.
- I. A. S. Olsson and K. Dahlborn, *Laboratory animals*, 2002, **36**, 243-270.
- G. Laviola, M. Rea, S. Morley-Fletcher, S. Di Carlo, A. Bacosi, R. De Simone, M. Bertini and R. Pacifici, *European Journal of Neuroscience*, 2004, **20**, 1655-1664.
- OECD 401. *Acute Oral Toxicity*, Organisation for Economic Cooperation and Development,, Paris, 1987.
- E. D. Olfert, B. M. Cross and A. A. McWilliam, *Guide to the care and use of experimental animals*, Canadian Council on Animal Care Ottawa, 1993.
- CONCEA, *Journal*, 2013, **11.794**.
- K. Deckardt, I. Weber, U. Kaspers, J. Hellwig, H. Tennekes and B. van Ravenzwaay, *Food and chemical toxicology*, 2007, **45**, 1709-1718.
- K. H. Diehl, R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J. M. Vidal and C. V. D. Vorstenbosch, *Journal of Applied Toxicology*, 2001, **21**, 15-23.
- A. P. Peron, R. M. Saraiva, E. L. Antonio and P. J. F. Tucci, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2006, **86**, 105-112.
- J.-L. Vandebossche, B. L. Kramer, B. M. Massie, D. L. Morris, J. S. Karliner, C. Anderson and D. Loge, *Journal of the American College of Cardiology*, 1984, **4**, 1195-1206.
- A. K. Farraj, M. S. Hazari and W. E. Cascio, *Toxicological sciences*, 2011, **121**, 11-30.
- M. Giknis and C. Clifford, *Charles River Laboratories*, 2008.
- Z. Li, T. Hulderman, R. Salmen, R. Chapman, S. S. Leonard, S.-H. Young, A. Shvedova, M. I. Luster and P. P. Simeonova, *Environmental health perspectives*, 2007, 377-382.
- M. Savi, S. Rossi, L. Bocchi, L. Gennaccaro, F. Cacciani, A. Perotti, D. Amidani, R. Alinovi, M. Goldoni and I. Aliatis, *Particle and fibre toxicology*, 2014, **11**, 63.
- M. Abdelhalim, *Lipids Health Dis*, 2011, **10**, 233.
- A. Leifert, Y. Pan, A. Kinkeldey, F. Schiefer, J. Setzler, O. Scheel, H. Lichtenbeld, G. Schmid, W. Wenzel and W. Jahn-

- Dechent, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**, 8004-8009.
- 42 L. Zhiqing, X. Zhuge, C. Fuhuan, Y. Danfeng, Z. Huashan, L. Bencheng, Z. Wei, L. Huanliang and S. Xin, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2010, **10**, 8562-8574.
- 43 J. M. Legramante, S. Sacco, P. Crobeddu, A. Magrini, F. Valentini, G. Palleschi, M. Pallante, R. Balocchi, I. Iavicoli and A. Bergamaschi, *Journal of Nanomaterials*, 2012, **2012**, 1.
- 44 E. A. Leite, A. Grabe-Guimarães, H. N. Guimarães, G. L. L. Machado-Coelho, G. Barratt and V. C. Mosqueira, *Life sciences*, 2007, **80**, 1327-1334.
- 45 F. S. Carvalho, A. Burgeiro, R. Garcia, A. J. Moreno, R. A. Carvalho and P. J. Oliveira, *Medicinal research reviews*, 2014, **34**, 106-135.
- 46 E. A. Bender, M. D. Adorne, L. M. Colomé, D. S. Abdalla, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann, *International journal of pharmaceuticals*, 2012, **426**, 271-279.
- 47 P. J. O'Brien, *Toxicology*, 2008, **245**, 206-218.
- 48 S. Cai, S. Thati, T. R. Bagby, H.-M. Diab, N. M. Davies, M. S. Cohen and M. L. Forrest, *Journal of Controlled Release*, 2010, **146**, 212-218.
- 49 W. J. Reagan, M. York, B. Berridge, E. Schultze, D. Walker and S. Pettit, *Toxicologic pathology*, 2013, 0192623313482056.
- 50 P. O'Brien, D. Smith, T. Knechtel, M. Marchak, I. Pruiboom-Brees, D. Brees, D. Spratt, F. Archer, P. Butler and A. Potter, *Laboratory animals*, 2006, **40**, 153-171.
- 51 K. Ajmal, B. T. Khan, R. Hashim and S. Bakhtiar, *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 2014, **64**.
- 52 K. Ajmal, M. Sharif, A. Afzal, B. T. Khan and M. Ajmal, *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 2015, **4**, 278-283.
- 53 J. Bertinchant, A. Polge, J. Juan, M. Oliva-Lauraire, I. Giuliani, C. Marty-Double, J. Burdy, P. Fabbro-Peray, M. Laprade and J. Bali, *Clinica Chimica Acta*, 2003, **329**, 39-51.
- 54 K. Sharma and D. A. Kass, *Circulation research*, 2014, **115**, 79-96.
- 55 R. O. Bonow, D. L. Mann, D. P. Zipes and P. Libby, *Philadelphia: Saunders*, 2014.
- 56 S. C. Garcia, S. S. Guterres, G. B. Bubols, R. P. Bulcão, M. F. Charão and A. R. Pohlmann, in *Nanotoxicology*, Springer, 2014, pp. 299-324.
- 57 F. Guilak, D. L. Butler, S. A. Goldstein and F. Baaijens, *Journal of biomechanics*, 2014.
- 58 A. J. Wood and D. M. Roden, *New England Journal of Medicine*, 2004, **350**, 1013-1022.
- 59 M. S. THALER, *Journal*, 2008.
- 60 S. Luo, K. Michler, P. Johnston and P. W. Macfarlane, *Journal of electrocardiology*, 2004, **37**, 81-90.
- 61 Lionte, C. Bologa and L. Sorodoc, *Toxic and drug-induced changes of the electrocardiogram*, INTECH Open Access Publisher, 2012.
- 62 M. F. O'Rourke and W. W. Nichols, *Hypertension*, 2005, **45**, 652-658.
- 63 M. F. O'Rourke and J. Hashimoto, *Journal of the American College of Cardiology*, 2007, **50**, 1-13.
- 64 J. E. Wagenseil and R. P. Mecham, *Journal of cardiovascular translational research*, 2012, **5**, 264-273.



**DICUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

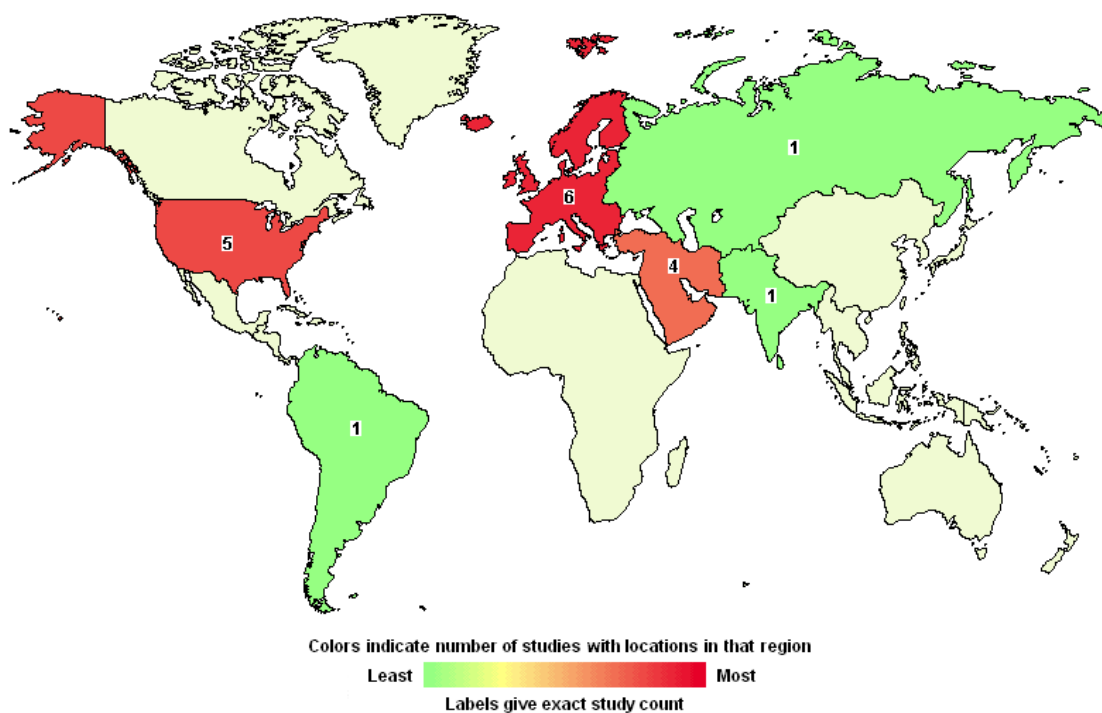


Devido principalmente as diferentes características físico-químicas, a avaliação toxicológica das NPs precisa ser vista de uma forma diferente, na literatura estudos têm mostrado a relação entre a cardiotoxicidade e as características como composição, tamanho, dose, capacidade de permeação e bioacumulação (Li *et al.*, 2007; Abdelhalim, 2011; Savi *et al.*, 2014). NPs metálicas compostas por ouro, prata e titânio são relacionadas à alteração cardiovascular, sendo o mecanismo de toxicidade associado ao tamanho e à capacidade de bioacumulação (De Jong *et al.*, 2008; Kaewamatawong *et al.*, 2012; Leifert *et al.*, 2013; Savi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Conforme demonstrado em um estudo prévio, NPs de ouro conseguiram permear e bioacumular no tecido cardíaco (De Jong *et al.*, 2008), causando congestão celular, alterações na viscosidade sanguínea, hemorragia e vacuolização (Abdelhalim, 2011), além de prolongar o intervalo QT (Leifert *et al.*, 2013). Além disso, tem sido reportado que nanotubos de carbono de parede única (NTCPU) induzem dano à parede íntima do vaso aórtico, além de causarem danos ao DNA mitocondrial promovendo a ativação de vias de apoptose, como a ativação da caspase-3. Adicionalmente, colaboram para a piora dos processos ateroscleróticos, aumentando a expressão de genes inflamatórios envolvidos no processo e induzindo a produção de moléculas de adesão (Zhiqing *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011). O dano em outros órgãos pode levar à toxicidade indireta no coração, pela liberação de citocinas na circulação sistêmica, que podem causar alterações induzindo eventos de cardiotoxicidade (Li *et al.*, 2007), através da disfunção vascular e eventos trombóticos (Zhiqing *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011). Além disso, NTCPU promoveram alterações no controle do sistema autônomo da pressão sanguínea com diminuição do número de sequências de barorreflexo (Legramante *et al.*, 2012).

Recentemente, NPs de sílica foram aprovadas pelo FDA para uso como aditivo em alimentos. Porém, bioacumulação em tecido cardíaco foi observada após 30 dias de tratamento utilizando NPs de sílica de 30 nm (Xie *et al.*, 2010). Até o presente momento, não existem na literatura estudos investigando a cardiotoxicidade de LNCs poliméricas biodegradáveis contendo o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona). Porém, existem alguns estudos com essas NPs utilizando doses terapêuticas como sistema de *drug delivery* (Leite *et al.*, 2007).

Atualmente, dezenove ensaios clínicos utilizando produtos nanotecnológicos estão em andamento, de acordo com o *U.S. National Institute of Health* NHI (2015),

demonstrando claramente o interesse da indústria farmacêutica nesta nova tecnologia (Figura 3). As aplicações destes estudos envolvem o uso de nanomateriais para tratamentos do sistema respiratório, estenose coronariana, reposição hormonal, câncer e doenças neurodegenerativas (Nih. e Health., 2015). Ao mesmo tempo, os métodos clássicos de avaliação toxicológica não são capazes de suprir todas as necessidades analíticas das diferentes características físico-químicas dos nanomateriais, requerendo o uso de novas metodologias ou metodologias modificadas (Guidance, 2011).



**Figura 3:** Estudos clínicos em nanomedicina cadastrados no Instituto Americano de Saúde (Nih. e Health., 2015).

Ao mesmo tempo em que o uso de NCs é promissor, existe a necessidade de avaliação da sua segurança a partir de estudos toxicológicos adequados. Muitas NCs de interesse biomédico desenvolvidas até o momento mostraram resposta toxicológica dependente de dose, geralmente observada nas maiores doses (Carlson *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011). De acordo com o documento do FDA-2010-D-0530 (Guidance, 2011), as metodologias atuais para garantir a segurança de substâncias químicas são consideradas suficientes para avaliar os nanomateriais (Guidance, 2011). No entanto, as NCs devem ser avaliadas de forma diferenciada,



levando em consideração as características físico-químicas, e quando necessário devem ser desenvolvidas novas metodologias ou adaptadas as existentes.

As LNCs utilizadas no presente estudo são similares às utilizadas em estudo prévio do grupo de pesquisa (Bulcão *et al.*, 2013), com a mesma composição química, porém utilizando agente isotônico glicerol, com nanocápsulas menores, possuindo um maior número de NCs por mililitro. A dose e velocidade de infusão seguiu as recomendações da OECD para testes de nanomateriais *in vivo*, não apresentando nenhum tipo de sofrimento para os animais. Os animais receberam um número de LNCs de  $115 \times 10^{12}$  NCs por kg e uma área superficial de 13,6 m<sup>2</sup>/kg no grupo com a maior concentração de LNC. Em um estudo prévio do grupo, utilizando LNCs de poli(ε-caprolactona) administradas via intraperitoneal por *bolus*, cuja dose máxima foi de 12 mL/kg com, observou-se a presença de aglomerados de LNCs na cavidade intraperitoneal após 3 dias da administração (Bulcão *et al.*, 2013). Esta deposição formou uma resposta ao corpo estranho no fígado com processo inflamatório granulomatoso, o qual foi caracterizado pelos cortes histológicos em estudo agudo de 14 dias (Bulcão *et al.*, 2013). Porém, o mesmo não foi observado no presente estudo agudo, devido provavelmente às características de total disponibilidade na circulação inerentes da via i.v. por infusão contínua.

Classicamente, a cardiotoxicidade pode ser relacionada a múltiplas administrações em um curto período de tempo ou a altas doses únicas, sendo relatados sintomas como fraqueza, fadiga, diarreia, distensão abdominal e anorexia (Kalil Filho *et al.*, 2011). Neste estudo, foram acompanhados os sinais vitais dos animais nas primeiras 24 horas, não sendo observado nenhum evento de diarreia, alteração motora ou febre. No décimo primeiro dia, foi avaliado o consumo de ração e água, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos de animais avaliados. Além disso, durante os quatorze dias após o tratamento, observou-se que os animais ganharam peso, sem sinais de anorexia.

Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve diferença significativa entre os grupos para a série branca. Por outro lado, no estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa, houve aumento na contagem dos monócitos em todos os grupos tratados com LNC durante a administração aguda, representando uma provável indução de inflamação nos grupos tratados (Bulcão *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo, foi observada uma diminuição significativa na contagem de células

vermelhas no grupo tratado com o maior número de NCs (LNC3) quando comparado ao grupo controle negativo (salina). Apesar dessas alterações, os valores estão dentro dos valores de referência para ratos. As diferenças encontradas podem estar relacionadas às características da via de administração intravenosa, onde o contato direto das NCs com as células vermelhas pode ter gerado uma discreta hemólise (Bender *et al.*, 2012).

A respeito dos valores bioquímicos, AST e ALP estiveram aumentados em todos os grupos quando comparados aos valores observados no final do estudo, possivelmente associado ao dano celular causado pela infusão. Os valores de AST elevados indicam que ocorreu algum tipo de lesão à membrana celular com extravasamento desta enzima, podendo o dano ter ocorrido ao coração e às hemácias. Após os 14 dias de administração, os valores de AST e ALP tenderam a valores basais comuns a todos os grupos, demonstrando a reversibilidade do dano, assim como os resultados encontrados nos estudos anteriores não houve aumento de AST.

A troponina I é considerada marcador padrão ouro para avaliação de cardiotoxicidade aguda (O'brien, 2008). Em relação à flutuação nos valores de troponina I entre os grupos testados, houve tendência ao aumento do dano cardíaco nas maiores concentrações de LNCs quando comparados ao grupo controle. Porém, não houve diferenças significativas entre os grupos após 24 horas de infusão. Neste estudo, o valor médio de troponina I no grupo LNC3 foi de 0,027 ng/mL, inferior aos níveis encontrados em um estudo que demonstrou em ratos a cardiotoxicidade da doxorrubicina por administração intravenosa aguda, com valor médio foi de 0,07 ng/mL (Reagan *et al.*, 2013). Ademais em estudos com camundongos e coelhos os valores de cTnI médio foram de 0,03 ng/mL em seu período basal anterior à infusão, ou seja, sugerindo que os valores encontrados no presente estudo para este marcador de dano estão dentro da normalidade (Ajmal *et al.*, 2014; Ajmal *et al.*, 2015).

A respeito do balanço eletrolítico, no presente estudo, os grupos PS80, LNC1 e LNC2, apresentaram valores elevados de potássio após 24 horas de infusão, quando comparados aos resultados finais após 14 dias, onde os valores tenderam a um nível basal comum. Ou seja, os resultados estavam provavelmente ligados às alterações eletrolíticas da infusão da salina ou PS80, não sendo observadas

alterações no grupo LNC3, que recebeu somente NCs durante todo o tempo de infusão. Os valores de potássio encontrados após 24 horas sugerem que a infusão de LNC de poly ( $\epsilon$ -caprolactone) não altera o balanço eletrolítico do potássio.

Em relação às análises histopatológicas, não foram observados sinais de dano cardíaco após 14 dias da exposição aguda, sendo observada uma discreta congestão em alguns ratos, principalmente em vasos periféricos menores, sem qualquer resposta ou dano consolidado. Entretanto, em estudos com avaliação de cardiotoxicidade induzida, frequentemente, são encontrados vacúolos celulares, alterações nucleares, fibrose perivascular e intersticial, congestão, hemorragia, infiltração de leucócitos e degeneração em miócitos após a exposição a quimioterápicos (Reagan et al, 2013; Bertinchant et al, 2003; Abdelhalim et al, 2011) e desarranjos nas miofibrilas e nos componentes celulares além da perda da massa cardíaca após a exposição a antimaláricos (Ofusori *et al.*, 2008).

O ecocardiograma é um método de avaliação de remodelamento cardíaco não invasivo e barato (Kalil Filho *et al.*, 2011). A Sociedade Internacional de Cardiologia, em suas normativas, enfatiza a importância da medida de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF) como o método mais comum de avaliação de toxicidade consolidada ao coração (Altena *et al.*, 2009). A LVEF próxima a 90% representa a função normal do coração e quando cai para níveis menores de 50% indica um processo de insuficiência cardíaca (Sharma e Kass, 2014). Além disso, a Sociedade Brasileira de Cardiologia define um dano cardiotóxico quando ocorre a diminuição de 10 a 20% da fração de ejeção após o fim de uma administração de uma dose aguda alta ou de múltiplas doses (Kalil Filho *et al.*, 2011). De acordo com os resultados ecocardiográficos encontrados neste estudo, as alterações não significaram danos ou remodelamento expressivo do ventrículo esquerdo após 14 dias da administração. Além disso, o peso do coração foi similar em todos os grupos, o que corrobora com os achados histopatológicos, onde não foram encontradas alterações de fibrose ou processo de remodelamento.

A bioacumulação tecidual a NPs no coração ocorre principalmente quando administradas NPs menores que 50 nm e pela composição dos materiais utilizados na produção do nanomaterial (De Jong *et al.*, 2008), sendo também relatado o bloqueio a canais iônicos de potássio relatado com NPs de 1,4 nm produzindo alterações eletrofisiológicas (Leifert *et al.*, 2013). Esses eventos de toxicidade

podem ser relacionados à interação dos nanomateriais com o tecido cardíaco, que possui fenestramento tecidual médio de 6 nm (Gaumet *et al.*, 2008) e irrigação de parte do endocárdio pelo sangue presente dentro dos ventrículos, sendo uma maior área de contato tecidual as NPs presentes na circulação (Guyton *et al.*, 2006). A bioacumulação cardíaca ligada ao tamanho é observada em diversos estudos com NPs inferiores a 100 nm (De Jong *et al.*, 2008), neste estudo as LNC possuem tamanho de 156 nm, corroborando com a ausência de atrações histopatológicas que indiquem dano aos cardiomiócitos após 14 dias da administração.

Drogas que possuem alta capacidade de indução de cardiotoxicidade promovem mudanças eletrofisiológicas no coração, especialmente após a administração aguda de altas doses (Wood e Roden, 2004; Kalil Filho *et al.*, 2011). Quando isso ocorre, usualmente são observados eventos como a fibrilação ventricular, taquicardia sinusal e prolongamento do intervalo QT (Wood e Roden, 2004). Alterações fisiológicas e eletrofisiológicas ocorrem em maior proporção na repolarização ventricular, devido à quantidade de receptores sensíveis a hormônios, peptídeos e a drogas presentes nesta região (Thaler, 2008). O intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca (QTc) é o marcador mais apropriado para avaliar esse tipo de alteração (Luo *et al.*, 2004). Neste estudo, não foram observadas alterações condizentes com as alterações do ECG que representem cardiotoxicidade.

E finalmente, as alterações encontradas nas medidas da pressão arterial encontraram-se dentro dos valores de referência para ratos, apesar do aumento progressivo encontrado em todos os grupos nos diferentes tempos de avaliação. Este achado pode estar relacionado à resposta vascular fisiológica ao grande volume infundido, porém, são necessários mais estudos para a avaliação de alterações hemodinâmicas.

Estudos prévios de avaliação toxicológica do grupo com a LNC com polímero de poli-(ε-caprolactona) apresentaram resultados indicativos de segurança relacionado ao uso dessas LNC, uma vez que no experimento agudo de 14 dias e subcrônico de 28 dias, tanto pela via intraperitoneal quanto pela via intradérmica não foram encontradas alterações toxicológicas (Bulcão *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2014; Bulcão *et al.*, 2015). Estes estudos possibilitaram o avanço da pesquisa toxicológica para a via intravenosa, juntamente com o desenvolvimento do método de esterilização das LNC que viabilizou a utilização delas por esta via.

Também a avaliação toxicológica pela via intravenosa, é fundamental uma vez que responde a diversas perguntas sobre a interação das LNC com os componentes sanguíneos, assim possibilitando a continuidade de estudos promissores *in vitro* que vêm sendo realizados na Faculdade de Farmácia da UFRGS, utilizando esta LNC como carreador, e assim, viabilizando novas perspectivas para o futuro uso clínico deste nanomaterial para o transporte de fármacos em estudos terapêuticos. Ademais, a criação e adaptação de metodologias para os estudos toxicológicos, uma vez que não existem normativas completas para a avaliação da nanotoxicidade, representaram um desafio para a logística do trabalho e a preocupação com as interações físico-químicas diversas que as LNC poderiam apresentar.

Além disso, juntamente com estes resultados há a necessidade da avaliação toxicológica sítio específica, como a avaliação dos efeitos sobre o coração, devido ao fato de a cardiotoxicidade ser a principal causa da retirada de medicamentos do mercado. Neste sentido este trabalho foi pioneiro na avaliação da cardiotoxicidade na Faculdade de Farmácia da UFRGS.



**CONCLUSÃO**

---





- ❖ A administração endovenosa aguda de LNC de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não promoveu alterações eletrofisiológicas;
- ❖ A administração endovenosa aguda de LNC de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não alterou funcionalmente a capacidade de bombeamento sanguíneo;
- ❖ A administração endovenosa aguda de LNC de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não alterou as medidas de pressão caudal, mantendo-se dentro dos valores de referência para ratos;
- ❖ As alterações bioquímicas de AST, ALP e potássio observadas 24h após a administração de LNC foram restauradas após 14 dias e sendo assim, as LNC de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não manifestaram efeitos cardiotoxícos significativos após administração IV aguda, avaliadas pela hematologia, bioquímica, status clínico, histopatologia, bem como parâmetros eletrofisiológicos e ultrassonográficos;
- ❖ As alterações histopatológicas não se assemelham aos achados encontrados de cardiotoxicidade por NPs relatados na literatura.







- ❖ Realizar experimento sub-crônico;
- ❖ Realizar Microscopia Eletrônica de Transmissão para identificar os achados encontrados na íntima dos pequenos vasos do coração;
- ❖ Realizar medida de pressão direta na carótida para avaliar alterações de pressão com mais sensibilidade;
- ❖ Avaliar os marcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco;
- ❖ Avaliar a ativação de caspase-3 no tecido cardíaco.



## REFERÊNCIAS

---





ABDELHALIM, M. Gold nanoparticles administration induces disarray of heart muscle, hemorrhagic, chronic inflammatory cells infiltrated by small lymphocytes, cytoplasmic vacuolization and congested and dilated blood vessels. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 233, 2011.

AHN, H.-S. et al. Cardioprotective effects of ecklonia cava polyphenol against doxorubicin-induced cardiotoxicity in an animal rat model with the evidence of electron microscopic finding. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 12\_S, 2014. ISSN 0735-1097.

AILLON, K. L. et al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 457-466, 2009. ISSN 0169-409X.

AJMAL, K. et al. Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity and its prevention by  $\alpha$ -tocopherol. **Pakistan Armed Forces Medical Journal**, v. 64, n. 3, 2014. ISSN 0030-9648.

AJMAL, K. et al. Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity and its prevention by carvedilol. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 278-283, 2015.

ALTENA, R. et al. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. **The lancet oncology**, v. 10, n. 4, p. 391-399, 2009. ISSN 1470-2045.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012. ISSN 0041-008X.

BARNES, C. A. et al. Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. **Nano letters**, v. 8, n. 9, p. 3069-3074, 2008. ISSN 1530-6984.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International journal of pharmaceuticals**, v. 426, n. 1, p. 271-279, 2012. ISSN 0378-5173.

BENEZRA, M. et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 7, p. 2768, 2011.

BERTINCHANT, J. et al. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1, p. 39-51, 2003. ISSN 0009-8981.

BIELECKA-DABROWA, A. et al. The meaning of hypokalemia in heart failure. **International journal of cardiology**, v. 158, n. 1, p. 12-17, 2012. ISSN 0167-5273.

BONOW, R. O. et al. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2-Volume Set. **Philadelphia: Saunders**, 2014.

BULCÃO, R. P. et al. Do poly (epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules induce oxidative or inflammatory damage after in vivo subchronic treatment? **Toxicology Research**, 2015.

BULCÃO, R. P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 167-177, 2014. ISSN 0939-6411.

BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly (epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological sciences**, v. 132 (1), p. 162-176., 2013. ISSN 1096-6080.

CAI, S. et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 212-218, 2010. ISSN 0168-3659.

CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608-13619, 2008. ISSN 1520-6106.

CHEN, L. Q. et al. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size-dependent adsorption, uptake and hemolytic activity. **Chemical research in toxicology**, 2015. ISSN 0893-228X.

CHENG, W. W. et al. Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 4, p. 564-572, 2011. ISSN 1357-2725.

CHIN, C. Gold nanoparticle-spermidine complex blocks the inward rectifier potassium channel. **American journal of cardiovascular disease**, v. 4, n. 2, p. 34, 2014.

CHO, W.-S. et al. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 202-211, 2014. ISSN 1743-5390.

COLLINSON, P. O.; GARRISON, L.; CHRISTENSON, R. H. Cardiac biomarkers—A short biography. **Clinical biochemistry**, 2014. ISSN 0009-9120.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912-1919, 2008. ISSN 0142-9612.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007. ISSN 1520-6017.

DICKOVER, M. S. et al. Zebrafish Cardiac Injury and Regeneration Models: A Noninvasive and Invasive In Vivo Model of Cardiac Regeneration. In: (Ed.). **Wound Regeneration and Repair**: Springer, 2013. p.463-473. ISBN 1627035044.

DONALDSON, K.; POLAND, C. A. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 724-734, 2013. ISSN 0958-1669.

DURÁN, N.; GUTERRES, S. S.; ALVES, O. L. **Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments**. Imprint: Springer, 2014. ISBN 146148992X.

EPA. Nanotechnology: A Brave New World Requires Bold New Research Approaches UCLA awarded \$24 million for innovative nanomaterial research. Washington D.C., 2008. Disponível em: <<http://yosemite.epa.gov/opa/admpress.nsf/2dd7f669225439b78525735900400c31/451426158402e6b4852574c8006746f7!opendocument>>.

FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicological sciences**, v. 121, n. 1, p. 11-30, 2011. ISSN 1096-6080.

FDA. **Single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals**. Fed. Regist. 61: 43934-43935 p. 1996.

FELDMAN, J.; GOLDWASSER, G. P. Eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação. **Revista da SOCERJ**, v. 14, n. 4, p. 256, 2004.

FONTANA, M. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 254-263, 2009. ISSN 1550-7033.

FORCE, T.; KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 5, p. 332-344, 2007. ISSN 1474-175X.

FROHLICH, E. D. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease. **American journal of hypertension**, v. 14, n. S3, p. 194S-199S, 2001. ISSN 0895-7061.

FU, P. P. et al. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. **Journal of food and drug analysis**, v. 22, n. 1, p. 64-75, 2014. ISSN 1021-9498.

GAD, S. C. **Animal models in toxicology**. CRC Press, 2014. ISBN 142001420X.

GALAGUDZA, M. M. et al. Targeted drug delivery into reversibly injured myocardium with silica nanoparticles: surface functionalization, natural biodistribution, and acute toxicity. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 231, 2010.

GANTA, S. et al. Pharmaceutical Nanotechnology: Overcoming Drug Delivery Challenges in Contemporary Medicine. In: (Ed.). **Nanomedicine**: Springer, 2014. p.191-236. ISBN 146142139X.

GARCIA, S. C. et al. Polymeric Nanoparticles: In Vivo Toxicological Evaluation, Cardiotoxicity, and Hepatotoxicity. In: (Ed.). **Nanotoxicology**: Springer, 2014. p.299-324. ISBN 146148992X.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008. ISSN 0939-6411.

GIMENES, C. et al. Low Intensity Physical Exercise Attenuates Cardiac Remodeling and Myocardial Oxidative Stress and Dysfunction in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, 2015. ISSN 2314-6745.

GREENE, R. J.; HARRIS, N. D. **Pathology and therapeutics for pharmacists: a basis for clinical pharmacy practice**. Pharmaceutical press, 2008. ISBN 085369690X.

GUIDANCE, D. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. **Biotechnology Law Report**, v. 30, n. 5, p. 613-616, 2011. ISSN 0730-031X.

GUYTON, A. C. et al. **Fisiología médica**. Elsevier, 2006.

HAMPTON, J. R. **The ECG in practice**. Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 0702046434.

HANS, M.; LOWMAN, A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002. ISSN 1359-0286.

INITIATIVE, N. N. **National Nanotechnology Initiative: The Initiative and Its Implementation Plan 2001**.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. **Technology in cancer research & treatment**, v. 7, n. 6, p. 497-516, 2008. ISSN 1533-0346.

IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 38, n. 3, p. 157-162, 1997. ISSN 1056-8719.

ISMAIL, T. F. et al. The relationship between interstitial fibrosis and contractile function in HCM: a combined T1-mapping and CSPAMM tagging study. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 14, n. 1, p. 1-2, 2012. ISSN 1532-429X.

ISO.229. **ISO/TC 229 N 964 BUSINESS PLAN. N 964 STANDARDIZATION**, I. O. F. Geneva - Switzerland. ISO-229 2012.

JAIN, A. K. et al. Augmented anticancer efficacy of doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles after oral administration in a breast cancer induced animal model. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 1140-1151, 2011. ISSN 1543-8384.

JASSAL, D. S. et al. Utility of tissue Doppler and strain rate imaging in the early detection of trastuzumab and anthracycline mediated cardiomyopathy. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 22, n. 4, p. 418-424, 2009. ISSN 0894-7317.

JONES, R. A. What has nanotechnology taught us about contemporary technoscience? , 2011.

KAEWAMATAWONG, T. et al. Toxicity Test of Nanosilver Particles on Zebrafish (Danio rerio) Embryonic Development. **Thai J Vet Med**, v. 42, n. 3, p. 305-310, 2012.

KALIL FILHO, R. et al. I Diretriz Brasileira de cardio-oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 2, p. 01-52, 2011. ISSN 0066-782X.

KAMINSKAS, L. M. et al. A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 103-111, 2012. ISSN 1549-9634.

KAY, L.; SHAPIRA, P. The potential of nanotechnology for equitable economic development: the case of Brazil. In: (Ed.). **Nanotechnology and the Challenges of Equity, Equality and Development**: Springer, 2011. p.309-329. ISBN 9048196140.

KINGSLEY, J. D. et al. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 340-350, 2006. ISSN 1557-1890.

KJELDSEN, K. Hypokalemia and sudden cardiac death. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 15, n. 4, p. e96, 2010.

KREGGE, J. H. et al. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1111-1115, 1995. ISSN 0194-911X.

KUMAR, V. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2011. ISBN 8535246339.

LEGRAMANTE, J. M. et al. Changes in cardiac autonomic regulation after acute lung exposure to carbon nanotubes: implications for occupational exposure. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1, 2012. ISSN 1687-4110.

LEIFERT, A. et al. Differential hERG ion channel activity of ultrasmall gold nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8004-8009, 2013. ISSN 0027-8424.

LEITE, E. A. et al. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life sciences**, v. 80, n. 14, p. 1327-1334, 2007. ISSN 0024-3205.

LI, X. et al. The prognostic use of serum concentrations of cardiac troponin-I, CK-MB and myoglobin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care**, v. 43, n. 3, p. 219-224, 2014. ISSN 0147-9563.

LI, Z. et al. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. **Environmental health perspectives**, p. 377-382, 2007. ISSN 0091-6765.

LIONTE, C.; BOLOGA, C.; SORODOC, L. **Toxic and drug-induced changes of the electrocardiogram**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9533079029.

LUO, S. et al. A comparison of commonly used QT correction formulae: the effect of heart rate on the QTc of normal ECGs. **Journal of electrocardiology**, v. 37, p. 81-90, 2004. ISSN 0022-0736.

MARTINS, C. S. Troponina: Estrutura, Fisiopatologia e Importância Clínica para Além da Isquemia Miocárdica. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 6, p. 221-240, 2009. ISSN 0871-3413.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 18-29, 2001.

MONTAGUE, B. T.; OUELLETTE, J. R.; BULLER, G. K. Retrospective review of the frequency of ECG changes in hyperkalemia. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 2, p. 324-330, 2008. ISSN 1555-9041.

MOON, T. J. et al. Left ventricular strain and strain rates are decreased in children with normal fractional shortening after exposure to anthracycline chemotherapy. **Cardiology in the young**, v. 24, n. 05, p. 854-865, 2014. ISSN 1467-1107.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010. ISSN 0378-5173.

MORRIS, J.; WILLIS, J.; GALLAGHER, K. Nanotechnology white paper. **US Environmental Protection Agency, Washington, DC, [www.epa.gov/osa/pdfs/nanotech/epa-nanotechnology-whitepaper-0207.pdf](http://www.epa.gov/osa/pdfs/nanotech/epa-nanotechnology-whitepaper-0207.pdf) (Feb. 2007)**, 2007.

NIH.; HEALTH., U. N. I. O. search for: Nanotechnology. **ClinicalTrials.gov**, 2015. Disponível em: <

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=nanotechnology&Search=Search> >. Acesso em: 10 Jan.

O'BRIEN, P. J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 206-218, 2008. ISSN 0300-483X.

O'CONNELL, M. J. **Carbon nanotubes: properties and applications**. CRC press, 2006. ISBN 1420004212.

OBERDÖRSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 2007. ISSN 1743-5390.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 417**. Organization for Economic, 2010. ISBN 9264140182.

\_\_\_\_\_. **Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials**. 36. OECD. Paris: Environment Directorate 2012.

OFUSORI, D. A. et al. Effect of chronic administration of quinine on the myocardium of mice. **J. Appl. Biomed**, v. 6, p. 187-193, 2008.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006. ISSN 0378-5173.

OZKANLAR, Y. et al. Effects of ramipril and darbepoetin on electromechanical activity of the heart in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **International journal of cardiology**, v. 173, n. 3, p. 519-521, 2014. ISSN 0167-5273.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74, 2011.

PARHAM, W. A. et al. Hyperkalemia revisited. **Texas Heart Institute Journal**, v. 33, n. 1, p. 40, 2006.

PARK, J. et al. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 410-418, 2009. ISSN 1549-9634.

PEARCE, J. M. Physics: Make nanotechnology research open-source. **Nature**, v. 491, n. 7425, p. 519-521, 2012. ISSN 0028-0836.

PELLICCIA, A.; DI PAOLO, F. M.; MARON, B. J. The athlete's heart: remodeling, electrocardiogram and preparticipation screening. **Cardiology in review**, v. 10, n. 2, p. 85-90, 2002. ISSN 1061-5377.

POLEGATO, B. et al. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1924-1933, 2015. ISSN 1421-9778.

POOLE, A.; LESLIE, G. B. **A practical approach to toxicological investigations.** Cambridge University Press, 1989. ISBN 0521341183.

PORTER, A. L.; YOUTIE, J. How interdisciplinary is nanotechnology? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 5, p. 1023-1041, 2009. ISSN 1388-0764.

PRAMANIK, D. et al. A composite polymer nanoparticle overcomes multidrug resistance and ameliorates doxorubicin-associated cardiomyopathy. **Oncotarget**, v. 3, n. 6, p. 640, 2012.

RANG, H. P. et al. **Rang and Dale farmacologia.** Churchill Livingstone Elsevier, 2012. ISBN 8535241728.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790, 2006. ISSN 0918-6158.

REAGAN, W. J. et al. Comparison of cardiac troponin I and T, including the evaluation of an ultrasensitive assay, as indicators of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicologic pathology**, p. 0192623313482056, 2013. ISSN 0192-6233.

SAAD, S. Y.; NAJJAR, T. A.; AL-RIKABI, A. C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 3, p. 211-218, 2001. ISSN 1043-6618.

SAVI, M. et al. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 63, 2014. ISSN 1743-8977.

SHARMA, K.; KASS, D. A. Heart failure with preserved ejection fraction mechanisms, clinical features, and therapies. **Circulation research**, v. 115, n. 1, p. 79-96, 2014. ISSN 0009-7330.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001. ISSN 0168-3659.

TAN, T. C.; SCHERRER-CROSBIE, M. Assessing the cardiac toxicity of chemotherapeutic agents: Role of echocardiography. **Current cardiovascular imaging reports**, v. 5, n. 6, p. 403-409, 2012. ISSN 1941-9066.

THALER, M. S. **ECG essencial: eletrocardiograma na prática diária:** Porto Alegre: Artmed 2008.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011. ISSN 0927-7757.



WARHEIT, D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? **Toxicological sciences**, v. 101, n. 2, p. 183-185, 2008. ISSN 1096-6080.

WATTAMWAR, P. P. et al. Tuning of the pro-oxidant and antioxidant activity of trolox through the controlled release from biodegradable poly (trolox ester) polymers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 99, n. 2, p. 184-191, 2011. ISSN 1552-4965.

WHELTON, P. K. et al. Sodium, blood pressure, and cardiovascular disease further evidence supporting the american heart association sodium reduction recommendations. **Circulation**, v. 126, n. 24, p. 2880-2889, 2012. ISSN 0009-7322.

WITTELES, R. M.; TELLI, M. Underestimating cardiac toxicity in cancer trials: lessons learned? **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 16, p. 1916-1918, 2012. ISSN 0732-183X.

WOOD, A. J.; RODEN, D. M. Drug-induced prolongation of the QT interval. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 10, p. 1013-1022, 2004. ISSN 0028-4793.

XIA, T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano letters**, v. 6, n. 8, p. 1794-1807, 2006. ISSN 1530-6984.

XIE, G. et al. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 3, p. 183-190, 2010. ISSN 0340-5761.

ZHIQING, L. et al. ICAM-1 and VCAM-1 expression in rat aortic endothelial cells after single-walled carbon nanotube exposure. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 8562-8574, 2010. ISSN 1533-4880.







## Anexo I. Aprovação do comitê de ética do projeto.

---



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 130279

**Data da Versão do Projeto:** 14/08/2013

**Pesquisadores:**

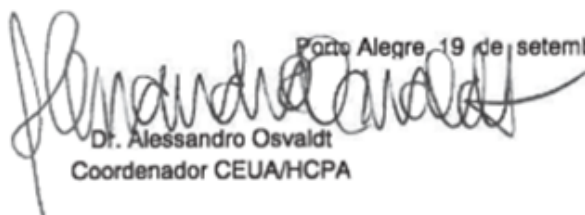
NADINE OLIVEIRA CLAUSELL  
SOLANGE CRISTINA GARCIA  
MICHAEL EVERTON ANDRADES  
JULIANO DURGANTE  
GABRIELA GÖETHEL  
RAFAEL FRACASSO

**Título:** Avaliação sistemática e da possível cardiotoxicidade de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 19 de setembro de 2013.



Dr. Alessandro Osvaldt  
Coordenador CEUA/HCPA



## **Anexo II. Carta de Confirmação da Submissão do Artigo**

Date: Wed, 24 Jun 2015 20:46:45 -0400

From: toxres@rsc.org

To: solange.garcia@ufrgs.br

CC: rafael.fra@hotmail.com;

Subject: Acknowledgement of your Submission to Toxicology Research - TX-ART-06-2015-000207

25-Jun-2015

Dear Professor Garcia:

TITLE: Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable nanocapsules in rats by intravenous administration

Thank you for your submission to Toxicology Research, published by the Royal Society of Chemistry. This is an automatic acknowledgement that you have uploaded your files to our online submission system. Your manuscript ID is: TX-ART-06-2015-000207

Your manuscript will be passed to an editor for initial assessment as soon as possible. If there are any problems with your submission we will contact you.

Please indicate the above manuscript ID when you contact us about this submission. You can check the status of your manuscript by logging into your Author Centre (<https://mc.manuscriptcentral.com/tx>).

The Royal Society of Chemistry is a member of CrossCheck. Your submission may be compared against the CrossCheck database using the iThenticate plagiarism detection software. For further information, please see here: <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/guidelines/EthicalGuidelines/CrossCheck/CrossCheck.asp>

Please contact us if we can be of any assistance.

Yours sincerely,

Toxicology Research Editorial Office

toxres@rsc.org