



ANEXO I

AValiação DE ESTRESSE OXIDATIVO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANFOTERICINA B UTILIZANDO MODELO DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*).

^{1,2}Maria Eduarda Lyra Cavalcanti (IC-UNIRIO); ^{1,2}Nayara Cecília do Couto Guedes; ¹Thais Morais de Brito; ¹Renata Jurema Medeiros; ³Gabriel de Farias Araujo; ³Enrico Mendes Saggioro; ¹Magno Maciel-Magalhães (coorientador); ²Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (orientadora)

1 – Laboratório de Fisiologia; Departamento de Farmacologia e Toxicologia; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz.

2 – Laboratório de Inovação Farmacêutica e Tecnológica; Departamento de Ciências Fisiológicas; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

3 – Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental; Instituto Oswaldo Cruz; Fundação Oswaldo Cruz.

Apoio Financeiro: Programa PIBIC CNPq/Unirio, Faperj e Programa Inova Fiocruz.

Palavras-chave: *zebrafish*, anfotericina B, nanomateriais, estresse oxidativo, GSH, Lowry

Introdução:

A anfotericina B (AmB) é um fármaco utilizado para o tratamento de diversas doenças como infecções fúngicas, leishmaniose cutânea e visceral, doença de chagas, meningoencefalite amebiana primária, dentre outras (Cavassin *et al.*, 2021). O tratamento com AmB é feito por via intravenosa, porém este é acompanhada de toxicidade limitante à dose, com reações agudas relacionadas à infusão e pela nefrotoxicidade (Hamill, 2013). Visando diminuir sua toxicidade e aumentar a disponibilidade de tratamentos por via oral, a ciência procura desenvolver novas formulações da AmB utilizando a nanotecnologia. Uma das opções estudadas são as nanopartículas poliméricas (NPPs), constituídas por polímeros sintéticos (Soppimath *et al.*, 2001; Owens III; Peppas, 2006). O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um modelo animal que vem recebendo muita atenção da comunidade científica, especialmente pela velocidade com a qual se obtém um conjunto robusto de dados quanto a toxicidade e seu baixo custo quando comparado a outros modelos de teste em animais, principalmente para pesquisas relacionadas com nanopartículas (Sieber *et al.*, 2019, Chakraborty *et al.*, 2016). Todos os seres vivos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), necessário para funções biológicas como fagocitose e crescimento regular celular. Entretanto, sua formação também ocorre quando o metabolismo está combatendo xenobióticos ou em situações de desregulação do corpo. Com a produção exacerbada de ERO, ocorre o estresse oxidativo, sendo possível apontar as áreas onde ocorreu uma ação ou perda, em nível molecular, que pode ter levado a morte de um ser (Finkel, 2003). Com a análise de bioindicadores, como glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e proteínas totais pode-se avaliar o nível de estresse oxidativo que larvas de *zebrafish* enfrentaram durante os experimentos e assim avaliar os focos e o nível da toxicidade de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B.

Objetivo: Verificar o estresse oxidativo causado por nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B utilizando o modelo *zebrafish* (*Danio rerio*)

Metodologia:

As larvas tratadas com nanopartículas de PCL e PLA contendo e não o fármaco e AmB pura foram congeladas a -80°C no último dia do ensaio de toxicidade em embrião de peixe e armazenadas em freezer até o momento dos testes de estresse oxidativo. Resumidamente no teste de toxicidade, os embriões foram expostos às amostras por um período de 96 h, seguindo protocolo adaptado do guia 236 da OECD. Foram realizadas rodadas iniciadas com 0 horas pós-fertilização (hpf), 6 hpf e 24 hpf, com a finalidade de comparar o efeito tóxico das NPPs em diferentes fases do desenvolvimento embrionário. Em relação aos testes de marcadores de estresse oxidativo, inicialmente foi realizada a extração das larvas tratadas com cada concentração utilizando tampão fosfato de potássio pH 7 e 0,1 mol L⁻¹ e com estes extratos foram conduzidas as análises de proteínas totais e GSH. Para a análise de GSH, preparou-se as amostras utilizando uma diluição de 1:1 com água ultrapura e ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,25 mmol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 8. Construiu-se uma curva analítica de 9 pontos com GSH e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7 em 1:1. Procedeu-se a leitura utilizando uma placa de 96 poços, com as amostras em triplicata, utilizando o espectrofotômetro Epoch (Biotek®) no comprimento de onda de 412 nm. Para a quantificação de proteínas totais foi preparada uma diluição 20x do extrato em água ultrapura; um reativo A composto de 0,5 g de Carbonato de sódio, 0,1 g de tartarato de sódio e potássio, 0,05 g de sulfato de cobre, 0,16 g de NaOH, e 0,5 g de SDS, em 15 ml de água ultrapura; e um reativo B com 1,625 ml de Folin-Ciocalteu e avolumado com 6,5 ml de água ultrapura. Para as análises, adicionou-se, em um tubo do tipo *Eppendorf* de 2 ml, 600 µl da amostra diluída, seguido de 240 µl do reativo A e, após uma espera de 10 minutos, 120 µl do reativo B. Procedeu-se então uma incubação no escuro por 30 min. Os pontos de curva para a análise de PTN são preparados com 600 µl de soroalbumina bovina (BSA) e 400 µl de reativo A sendo os pontos 0, 5, 1, 2, 4, 10, 20, 30, 50, e 60 µg mL⁻¹. Para a análise foi utilizado o espectrofotômetro Epoch (Biotek®) no comprimento de onda de 750 nm.

Resultados: A partir da análise em rodada única do bioindicador GSH em larvas de *zebrafish* expostas às NPPs com AmB, verificou-se que os resultados com menores níveis de GSH foram AmB pura 0 hpf, AmB PLA 0 hpf e AmB PLA 6 hpf. Enquanto isso, as outras amostras mostraram um aumento de até três vezes comparado ao de AmB pura 0 hpf, como no caso de AmB PCL 0 hpf, 6 hpf e 24 hpf, e AmB PLA 24 hpf. Ao comparar as amostras de PCL branco e PLA branco (ou seja, amostras de NPPs que não continham o fármaco), obteve-se considerável diferença entre elas, com PCL tendo produção de EROs quase duas vezes os resultados da PLA. Também foi observado que as amostras utilizando PCL, com e sem AmB, apresentam alta ocorrência de GSH até mesmo em concentrações iniciais ao comparar com as outras amostras, chegando a um aumento de ocorrência na mesma amostra de até sete vezes a da menor concentração desta, uma particularidade dos resultados é que as maiores ocorrências de GSH em amostras com PCL não foram todas referentes às maiores concentrações utilizadas nesse estudo. Em contrapartida, nos resultados com PLA as maiores ocorrências chegam a no máximo três vezes a da menor concentração utilizada da amostra.

Conclusão: A partir deste estudo conclui-se que, pela análise de GSH em larvas de *zebrafish* expostos às NPPs com e sem AmB, nas concentrações estudadas, as amostras com PLA parecem gerar menos estresse oxidativo quando comparadas às de PCL. Porém são necessárias outras repetições deste teste para que sejam formuladas conclusões mais concretas.

Referências:

- Cavassin, F. B. *et al.* Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infectious Diseases and Therapy*, 1 mar. 2021. v. 10, n. 1, p. 115–147.
- Chakraborty, C. *et al.* Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 14, n. 1, p. 65, dez. 2016.
- Hamill, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 2013. v. 73, n. 9, p. 919–934.
- Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, n. 2, p. 247–254, 2003.
- Owens III, D.; Peppas, N. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, n. 1, p. 93–102, 3 jan. 2006.
- Sieber, S. *et al.* Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;151-152:152-168.
- Soppimath, K.S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001, 70, 1–20.
- Wang, Y. *et al.* A newly identified derivative of amphotericin B: Isolation, structure determination and primary evaluation of the activity and toxicity. *Journal of Antibiotics*. 2010. 63(9), p. 553-557.

